



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUIZ GABRIEL MATURANA

“EMPREGO DO COLÁGENO COM ORGANIZAÇÃO
SUPRAMOLECULAR NA REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA *IN VITRO* E *IN VIVO*”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luiz Gabriel
Maturana
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M437e	<p>Maturana, Luiz Gabriel Emprego do colágeno com organização supramolecular na regeneração nervosa periférica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> / Luiz Gabriel Maturana. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Nervos periféricos - Regeneração. 2. Tubulização. 3. Materiais biomédicos. 4. Colágeno. 5. Células de Schwann. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971- . II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
-------	---

Título em inglês: Influence of a naturally supraorganized collagen on the peripheral nerve regeneration *in vitro* and *in vivo*.

Palavras-chave em inglês: Peripheral nerves - Regeneration; Tubulization; Biomedical materials; Collagen; Schwann cells.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Guilherme de Araújo Lucas, Marcus Alexandre Finzi Corat.

Data da defesa: 12/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 12 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

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



Assinatura

Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas



Assinatura

Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat



Assinatura

Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

Sumário

Agradecimentos _____	7
Resumo _____	10
Abstract _____	12
1 Introdução _____	13
1.1 Composição do nervo espinhal _____	14
1.2 Bainhas conjuntivas do nervo espinhal _____	15
1.3 Lesão nervosa periférica _____	16
1.4 Envolvimento das células de Schwann no processo regenerativo _____	17
1.5 Reparação do nervo periférico _____	18
1.6 Biomateriais _____	20
1.7 Matriz extracelular _____	22
1.8 Supra-estrutura do colágeno _____	25
2 Justificativa _____	28
3 Objetivos _____	30
3.1 Objetivo geral _____	31
3.2 Objetivos específicos _____	31
3.2.1 <i>In vitro</i> _____	31
3.2.2 <i>In vivo</i> _____	31
4 Materiais e métodos _____	33
4.1 <i>In vitro</i> _____	34
4.1.1 Colágeno com organização supramolecular _____	34
4.1.2 Cultura purificada de células de Schwann _____	34
4.1.3 Imunocitoquímica para as células de Schwann _____	35
4.1.4 Processamento e análise para microscopia eletrônica de varredura (MEV) _____	36
4.2 <i>In vivo</i> _____	36
4.2.1 Animais e grupos experimentais _____	36
4.2.2 Construção da prótese para a tubulização _____	37
4.2.3 Procedimento cirúrgico para a tubulização _____	38
4.2.4 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão _____	39

4.2.5 Morfometria e contagem das fibras regeneradas _____	40
4.2.6 Animais e grupos experimentais para imunoistoquímica e microscopia de polarização _____	41
4.2.7 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para imunoistoquímica _____	41
4.2.8 Microscopia de polarização _____	42
4.2.9 Análise estatística _____	43
5 Resultados _____	44
5.1 Caracterização do colágeno com organização supramolecular _____	45
5.2 <i>In vitro</i> _____	45
5.2.1 Cultura purificada de células de Schwann _____	45
5.2.2 Imunocitoquímica da cultura de células de Schwann _____	46
5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de culturas de células de Schwann _____	47
5.3 <i>In vivo</i> _____	47
5.3.1 Microscopia de luz dos nervos regenerados _____	47
5.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) _____	48
5.3.3 Quantificação dos axônios mielínicos _____	50
5.3.4 Parâmetros morfométricos _____	50
5.3.4.1 Diâmetro das fibras (DF) _____	50
5.3.4.2 Diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) _____	51
5.3.4.3 Espessura da bainha de mielina (EBM) _____	52
5.3.4.4 Razão "g" (RZG) _____	54
5.3.5 Imunoistoquímica _____	56
5.3.6 Microscopia de polarização _____	56
6 Discussão _____	59
7 Conclusões _____	66
8 Figuras e tabelas _____	69
9 Referências bibliográficas _____	87
Autorização da comissão de ética em experimentação animal (CEEA) _____	95

À minha família, dedico esta obra como prova de
minha gratidão e por suster minhas aspirações
abastecendo-me com tranquilidade.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. Sua orientação me capacitou a ver e fazer pesquisa como um pesquisador sério e competente e nossa amizade tornou tudo isso muito gratificante.

Ao Prof. Dr. Amauri Pierucci. Meu grande mentor e melhor amigo. Venho seguindo seus passos desde a graduação, sinto que não os houvesse seguido não teria chegado tão longe e, apesar de tantas dificuldades, hoje posso sentir orgulho e honra de ser um anatomista e pesquisador como sua pessoa.

A Prof. Dra. Candida Luiza Tonizza de Carvalho Melo. Minha professora de anatomia e amiga, a pessoa que me fez querer ser anatomista. Foi um grande prazer ter minha professora como avaliadora no meu exame de qualificação para professor.

Ao Prof. Dr. Benedicto C. Vidal. Por transmitir sua vasta experiência, as amostras de colágenos e as conversas descontraídas.

Aos Profs. Drs. da pré-banca Arnaldo R. dos Santos Jr., José Angelo Camilli e Marcus A. F. Corat. Pelos estimáveis conselhos para o presente trabalho.

A Profa. Dra. Evanise T. Palomari. Por avaliar meu exame de qualificação em língua estrangeira.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a Secretária deste, Lílíam Panagio. Pelo atendimento e cuidados com a documentação.

Ao CNPq e CAPES/DS. Pelas bolsas e financiamentos.

A Adriane e Maria Atonia. Por ajudarem com os microscópios eletrônicos.

Aos meus amigos funcionários do departamento de anatomia Ana Floriana, Carlão, Marlene, Marquinho, Nori, Paulo Francisco, Paulo Bernardes e Toni. Por tudo.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto. Pelas profundas análises sobre anatomia e futebol.

Aos meus amigos do laboratório Aline, Amanda (Cá), Andre, Camila, Camila (ic), Gabriela, Gustavo, Juliana, Luciana, Marília, Matheuzinho, Rafaela, Renata, Roberta, Rodrigo, Sheila e Suzana. Adoro vocês.

Em especial a Amanda (Cá) por nossos assuntos mirabolantes e sérios, aprendi muito.

Em especial ao Gustavo por nossas corridas, caronas, reuniões em sua casa e ajuda nas técnicas laboratoriais, quase um tio.

Em especial a Renata por prestar seu perfil intelecto, uma amizade singular.

Aos meus amigos mais excêntricos Boni, Rafael, Rodrigo e Matheuzinho. Por me darem um pouco de insensatez.

A todo o pessoal do departamento. Pelos assuntos mais engraçados que tornam nosso ambiente amistoso.

Ao *blues*. Pelas infinitas horas me acompanhando com a morfometria.

Em especial a Jimi Hendrix, Nuno Mindelis e Stevie Ray Vaughan.

E claro, ao time de futebol de salão da anatomia. Campeão da primeira Copa Confluência dos Seios em 2009.

Resumo

A axotomia periférica é uma lesão que resulta na perda de continuidade do nervo lesado. No sentido de repará-la, foram desenvolvidas diversas técnicas, entre elas o autoenxerto e a tubulização com próteses de polietileno e biorreabsorvíveis. Esta última tem a vantagem de ser confeccionada com a dimensão e forma desejada, sustentar o processo regenerativo, orientando o brotamento axonal e sofrer degradação de acordo com tempo de implantação. Apesar da grande capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico, há a dependência da expressão correta de fatores de crescimento e rearranjo dos componentes da matriz extracelular pelas células de Schwann. Um dos componentes presentes na matriz extracelular, o colágeno, pode ser produzido com organização supramolecular e ser utilizado no preenchimento de próteses biorreabsorvíveis. Devido às características positivas das próteses reabsorvíveis, a importância das células de Schwann e do colágeno, o objetivo do presente estudo foi investigar *in vitro* e *in vivo* a influência do colágeno com organização supramolecular em relação à regeneração nervosa periférica fazendo uso das técnicas de cultura purificada de células de Schwann e tubulização do nervo isquiático. No estudo *in vitro* foram cultivadas células de Schwann sobre o colágeno com organização supramolecular, sendo estas avaliadas através da imunocitoquímica e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados revelaram uma cultura celular com alto grau de pureza, observados pela intensa marcação com o anticorpo anti-S-100. Além disso, observou-se que a concentração de células de Schwann foi menor no grupo com o colágeno com organização supramolecular, apesar das células de Schwann terem mantido a expressão de componentes da lâmina basal, bem como alterado sua morfologia para se ajustar na superfície do substrato. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados ratos da linhagem Sprague Dawley, fêmeas e adultas divididas em 4 grupos: 1) TP – animais em que foi utilizada a prótese tubular de polietileno vazia (n=7); 2) TPCL – animais em que foi utilizada a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) vazia (n=5); 3) TPCLF – animais em que foi utilizada a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) preenchida com um implante de colágeno com organização supramolecular (n=7); 4) AE – animais que receberam autoenxerto de nervo periférico (n=5). Os resultados *in vivo* foram estudados através da quantificação das fibras regeneradas, morfometria dos nervos regenerados e microscopia eletrônica de transmissão 60 dias pós-cirúrgico. Além disso, o estudo *in vivo* incluiu análises de imunistoquímica e microscopia de polarização 60 dias pós-cirúrgicos

onde, os espécimes utilizados foram divididos em 3 grupos: 1) normal – foram utilizados nervos isquiáticos normais (n=3); 2) TPCL – animais no qual foram utilizados a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) vazia (n=3); 3) TPCLF – animais no qual foram utilizados a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) preenchida com um implante de colágeno com organização supramolecular (n=3). Observaram-se, na quantificação dos axônios, valores significativamente maiores para o grupo AE em relação aos outros grupos. Também se destacam valores superiores observados nos grupos TPCL e TPCLF comparados ao grupo TP. Quanto à morfometria, merecem ênfase os valores obtidos na espessura da bainha de mielina que exibiu diferenças estatisticamente significativas, demonstrando melhor comportamento das células de Schwann na regeneração nervosa periférica para o grupo TPCLF. Os dados de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de polarização nos permitem considerar que a organização geral do nervo e do microambiente apresentou um padrão com analogia voltado ao nervo isquiático ileso. Ainda, os resultados referentes à imunistoquímica, utilizando como marcador o anticorpo anti-p75NTR, demonstraram que as células de Schwann estavam mais reativas durante o processo regenerativo no grupo TPCLF comparado aos grupos TPCL e nervo isquiático ileso. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicaram que o implante de colágeno com organização supramolecular influenciou/estimulou significativamente o comportamento das células de Schwann tanto *in vitro* como *in vivo*.

Abstract

The present study investigated *in vitro* and *in vivo* the influence of naturally supraorganized collagen on the peripheral nerve regeneration. In the *in vitro* study, Schwann cells (SCs) were seeded on naturally supraorganized collagen membranes and evaluated with immunocytochemistry and scanning electron microscopy. The results revealed that SCs kept the expression of basal lamina components and adjusted their morphology to populate the membrane surface. For the *in vivo* study, adult female Sprague Dawley rats were divided into 4 groups: 1) TP – animals that received an empty polyethylene tube (n=7); 2) TPCL – animals that received an empty polycaprolactone (PCL) tube (n=5); 3) TPCLF – animals in which a polycaprolactone (PCL) tube filled with a naturally supraorganized collagen fragment was used (n=7); 4) AE – animals in which the nerve repair was carried out with an autologous nerve graft (n=5). The *in vivo* results were examined by counting of myelinated axons, morphometrical analysis of regenerated fibers and transmission electron microscopy, 60 days after surgery. Moreover, the *in vivo* study included immunohistochemical analysis and polarization microscopy. In this case, the specimens were obtained from one of 3 groups: 1) normal – normal sciatic nerves (n=3); 2) TPCL – animals that received an empty polycaprolactone (PCL) tube (n=3); 3) TPCLF – animals in which the nerve repair was carried out with a polycaprolactone (PCL) tube filled with a naturally supraorganized collagen fragment (n=3). The counting of myelinated axons provided significantly higher values in the AE group as compared to the other groups. Also, TPCL and TPCLF groups displayed higher values when compared to TP group. Regarding the morphometrical analysis, myelin thickness was greater in TPCLF group, indicating a better SC response during the regeneration process. The data regarding transmission electron microscopy and polarization microscopy indicates that TPCLF group achieved a better reorganization of the regenerated nerve microenvironment, resembling the normal nerve morphology. The immunohistochemical results were reinforced by the anti-p75NTR labeling, that demonstrated more active SC in the TPCLF group. The present results indicate that the use of naturally supraorganized collagen positively influenced/stimulated peripheral nerve regeneration possibly by increasing the activity of SC inside the prosthesis.

1 *Introdução*

1.1 Composição do nervo espinhal

O nervo espinhal apresenta como componentes celulares as células perineurais, fibroblastos, macrófagos e especialmente as células de Schwann as quais envolvem os axônios formando a bainha de mielina (Garbay *et al.*, 2000; Schimdt & Leach, 2003). Os axônios são projeções dos neurônios motores presentes na coluna anterior da medula espinhal e neurônios sensitivos localizados no gânglio espinhal (sensitivo). Estes podem ser mielínicos ou amielínicos e ambos são capazes de propagar impulsos elétricos a longas distâncias. Nos axônios mielínicos, as células de Schwann formam em seu redor uma estrutura tubular com múltiplas camadas denominada bainha de mielina. As células de Schwann são separadas umas das outras, ao longo dos axônios, por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitais laterais do seu citoplasma, denominados nódulos de Ranvier (Ladon & Hall, 1976; Peters *et al.*, 1976).

Os axônios amielínicos apresentam um tipo especial de relação com as células de Schwann. Uma única célula de Schwann, através de projeções citoplasmáticas, envolve total ou parcialmente cerca de 5 a 25 axônios, não havendo a formação da bainha de mielina. Como resultado, estes axônios encontram-se individualmente alocados no interior de sulcos ou canais formados pelas projeções do citoplasma das células de Schwann (Peters *et al.*, 1976).

A bainha de mielina é formada pela diferenciação da membrana plasmática das células de Schwann. Apresenta em sua composição grande concentração de lipídios como o colesterol, fosfoglicerídeos, esfingomielina, glicolipídios e ácidos oléicos. Contudo, também apresenta proteínas como a proteína zero (P0), proteína mielínica periférica 22 (PMP22), glicoproteína associada à mielina (GAM), proteína básica de mielina (PBM), proteína P2, entre outras (Garbay *et al.*, 2000). Devido à sua constituição altamente lipídica, esta atua como um isolante elétrico do axônio permitindo a rápida propagação do impulso nervoso ao órgão alvo.

Além disso, a bainha de mielina possui uma ordenação molecular que exhibe birrefringência intrínseca. As caudas hidrofóbicas dos lipídios empilham-se em camadas ordenadas com interações, de tal forma que apresentam características de cristal líquido do tipo esméctico. Este arranjo confere a bainha de mielina birrefringência negativa com respeito ao longo eixo do axônio. A remoção dos lipídios dos axônios revela a presença de birrefringência positiva devido à presença de proteínas estruturais na mielina e dos neurofilamentos (tubulina) dos axônios (Vidal *et al.*, 1980).

1.2 Bainhas conjuntivas do nervo espinhal

O axônio, juntamente com a bainha de mielina, denomina-se fibra nervosa. O conjunto de fibras nervosas é envolvido por três camadas de tecido conjuntivo as quais, juntamente com os componentes da matriz extracelular, entram na composição do nervo. A camada mais externa é chamada de epineuro, formada por tecido conjuntivo denso não modelado, possui fibras de colágeno tipo I, fibroblastos e vasos sangüíneos em sua constituição. A camada subjacente é denominada perineuro, encontram-se as células pavimentosas, (isto é, fibroblastos e células perineurais) unidas fortemente por junções de adesão, havendo presença de colágeno I e III, os quais se dispõem concêntricamente em relação aos grupos de axônios originando os fascículos. Esta camada é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois, atua como barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular (Lundbrog, 1993).

A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro. Contém axônios mielínicos envolvidos pela bainha de mielina e axônios amielínicos, envolvidos pelas projeções citoplasmáticas das células de Schwann e fibras de colágeno tipo III orientadas longitudinalmente em relação ao eixo do axônio. Nesse tecido conjuntivo podem residir

macrófagos, poucos fibroblastos dispersos e, eventualmente, mastócitos (Lundborg, 1993; Schimdt & Leach, 2003).

1.3 Lesão nervosa periférica

Devido a trajetos superficiais dos nervos periféricos em algumas partes do corpo, esses estão sujeitos a vários tipos de lesões, como por exemplo, o esmagamento e a transecção. (Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Schimdt & Leach, 2003). Dentre as várias lesões que podem acometer no sistema nervoso periférico, a mais severa é a transecção completa de um nervo (axotomia). Neste caso, há perda da continuidade do nervo e sua retração, de forma que este passa a apresentar um coto proximal e um coto distal (Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999; Schimdt & Leach, 2003).

Após a transecção nervosa, do coto proximal ocorre o vazamento do material axoplasmático em virtude do rompimento da membrana celular destes axônios, os corpos celulares dos neurônios lesados entram em cromatólise, tendo seus núcleos deslocados para a periferia do corpo celular do neurônio (Terenghi, 1999; Zochodne, 2000).

No coto distal desenvolve-se um processo degenerativo descrito em 1850 por Waller, sendo denominado degeneração Walleriana (Waller, 1850). Durante esse processo ocorre a fragmentação da bainha de mielina dos axônios lesados (Lunn *et al.*, 1990). Concomitantemente, ocorre o recrutamento dos macrófagos em direção ao local da lesão, bem como a multiplicação das células de Schwann. Ambos os tipos celulares atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamento dos axônios em degeneração (Sunderland, 1990; Ide, 1996; Bruck, 1997; Cheng & Zochodne, 2002; Stoll *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003), criando assim, um

microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal em direção ao órgão alvo, fundamental ao sucesso do processo regenerativo (Frisen, 1997; Zochodne, 2000).

1.4 Envolvimento das células de Schwann no processo regenerativo

As células de Schwann são vitais durante o processo de degeneração Walleriana, além disso, dão suporte ao crescimento axonal, servindo como interface entre os axônios e a matriz extracelular (Ide, 1996). Elas expressam várias integrinas (entre elas a $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$), receptores de membrana importantes para a interação dessas células com moléculas da matriz extracelular (Milner *et al.*, 1997). Realizam a mielinização dos axônios em brotamento e provém um substrato rico para o crescimento axonal, pois sintetizam vários fatores de crescimento, como o fator neurotrófico de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), entre outros, fundamentais ao desenvolvimento, manutenção e regeneração das células nervosas (Jessen & Mirsky, 1999; Garbay *et al.*, 2000; Zochodne, 2000; Schimdt & Leach, 2003).

Após a Degeneração Walleriana, as células de Schwann organizam-se em colunas celulares semelhantes a tubos, as Bandas de Büngner, que induzem e orientam o crescimento axonal em direção ao órgão alvo através da síntese de moléculas neurotróficas (Salonem *et al.*, 1987; Abernithy *et al.*, 1994; Frisen, 1997). A ausência da formação das Bandas de Büngner pelas células de Schwann no coto distal dificulta grandemente a regeneração axonal, normalmente resultando na formação de neuromas (Salonem *et al.*, 1987).

Quando as células de Schwann foram utilizadas no modelo da tubulização, demonstrou-se que essas células participavam efetivamente do processo regenerativo, corroborando ainda mais para os estudos de lesão nervosa (Abernithy *et al.*, 1994; Madison & Archibald, 1994).

Além disso, o emprego das células de Schwann para o preenchimento de tubos confeccionados a partir de biomateriais como o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli (L-ácido láctico) (PLLA), contribuiu positivamente e acelerou ainda mais o processo regenerativo (Evans *et al.*, 2002; Schlosshauer *et al.*, 2003).

1.5 Reparação do nervo periférico

A regeneração do sistema nervoso periférico é considerada um fenômeno altamente complexo, o qual resulta em uma sucessão de eventos expressa de forma cronológica e sincronizada, visando o reajuste do microambiente do nervo lesado (Ide, 1996). Este sistema é dotado de grande potencial regenerativo após uma lesão, contudo, tal capacidade, é altamente dependente da correta expressão temporal dos diversos fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, bem como da interação entre os axônios em regeneração com as células não neuronais presentes no nervo (Barnes, 1985; Ide, 1996).

Apesar da grande capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico (Ide, 1996), há casos onde a extensão da lesão impossibilita a reconexão entre os cotos. Nesse intuito, vários tecidos tais como os ossos, fâscias, tendões, músculos estriados esqueléticos e vasos sanguíneos foram utilizados experimentalmente no reparo do nervo periférico. Tecidos não-autólogos, de outros doadores (aloenxertos), e até mesmo de outras espécies (xenoenxertos) foram utilizados experimentalmente, porém há a desvantagem de reação imune do receptor (Barker & Widner 2004; Wennersten *et al.*, 2006). Comprovadamente, o autoenxerto de nervos cutâneos (e.g. nervo cutâneo sural ou safeno) resulta em uma melhor recuperação motora e sensitiva. O autoenxerto (autógeno) apresenta características de biocompatibilidade, promove a adesão e migração celular. Entretanto, há a necessidade de remoção de tecido nervoso do paciente para o implante

(Fields *et al.*, 1989; Yannas & Hill, 2004), resultando na perda de sensibilidade da área do nervo retirado para o transplante.

Outras técnicas para o reparo do nervo periférico são utilizadas nos casos de lesões periféricas, como a sutura das bainhas conjuntivas (neurorrafia) e a tubulização (Fields *et al.*, 1989; Lundborg *et al.*, 1994; Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004).

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

A regeneração através de uma prótese tubular depende da formação prévia de um vínculo não celular que conecta os dois cotos. Esta conexão consiste de uma matriz de fibrina que fornece um substrato inicial para migração de células não neuronais (fibroblastos, células endoteliais e células de Schwann). A matriz de fibrina é posteriormente degradada por mecanismos endógenos e substituída por fibras de colágeno orientadas longitudinalmente que servirão como substrato para brotos de regeneração do coto proximal (Ceballos *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2004).

Os objetivos da técnica de tubulização são criar um ambiente favorável à regeneração, orientar o crescimento das fibras em direção ao coto distal, proteger as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitar a formação de neuromas. Além disso, possibilita o emprego de moléculas da matriz extracelular (e.g. colágeno, fibronectina, laminina), células fundamentais para o processo regenerativo (e.g. células de Schwann), e fatores neurotróficos para o preenchimento do tubo a

fim de aumentar a eficiência do processo regenerativo (Fields *et al.*, 1989; Labrador *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Schimdt & Leach, 2003; da Silva *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004; Alluin *et al.*, 2008). Neste sentido, quando utilizadas às células de Schwann no modelo da tubulização, demonstrou-se uma melhora significativa do processo regenerativo (Abernethy *et al.*, 1994; Madison & Archibald, 1994).

É importante ressaltar que a técnica da tubulização apresenta algumas desvantagens. Uma delas é a elevação gradativa da pressão no interior da prótese, à medida que o nervo regenerado aumenta em espessura. Como resultado, dificulta-se a vascularização, o que resulta em degeneração axonal secundária (Fields *et al.*, 1989). Dessa forma, em muitos casos, torna-se obrigatória a realização de uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do tubo. Outro fator limitante dessa técnica é a distância máxima entre os cotos, que não pode ser superior a alguns milímetros (Butí *et al.*, 1996; Schimdt & Leach, 2003; da Silva *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Yannas & Hill, 2004).

1.6 Biomateriais

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

A confecção de próteses a partir de biopolímeros para a tubulização tem ênfase na substituição do enxerto autógeno de nervos cutâneos, evitando-se a perda da sensibilidade da área cujo nervo seria retirado para implante e a formação de neuromas dolorosos (Aldini *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1999).

Vários materiais sintéticos biorreabsorvíveis têm sido pesquisados através do modelo da tubulização. Dentre esse grupo podemos destacar o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli caprolactona (PCL), os quais demonstraram efeitos positivos em vários ensaios (Evans *et al.*, 2002, Schimdt & Leach, 2003; Schlosshauer *et al.*, 2003; Yannas & Hill, 2004). Os biomateriais apresentam propriedades físicas e químicas de grande interesse no campo da reconstituição nervosa periférica, tais como o tempo de degradação, porosidade, biocompatibilidade, esterilidade, resistência e, além disso, podem ser confeccionados com as mais variadas formas e dimensões (e.g. diâmetro, comprimento) (Evans, *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003). Mas a grande vantagem desses polímeros está na sua forma de degradação, que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos resultantes da degradação completamente absorvidos pelo organismo (Rezwan *et al.*; 2006).

Baseando-se na literatura, os resultados mais significativos utilizando tubos biodegradáveis foram obtidos a partir de poli caprolactona (PCL), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (_L- ácido láctico) (PLLA). Estes materiais obtiveram resultados equivalentes aos da prática do autoenxerto, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, quando combinados com outros elementos como células de Schwann, fatores neurotróficos (e.g. fator de crescimento do nervo [NGF], fator neurotrófico derivado do cérebro [BDNF] e fator-beta de transformação do crescimento [TGFβ] e moléculas da matriz extracelular (e.g. colágeno, laminina e fibronectina). As combinações propiciaram uma melhora na resposta funcional refletindo em um número significativo de axônios regenerados próximo aos valores do nervo não lesionado, além de manter a viabilidade celular *in vitro* (Aldini *et al.*, 1996; Pereira Lopes *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2002; Hadlock *et al.*, 2000; Bryan *et al.*, 2003; Koshimune *et al.*,

2003; Navarro *et al.*, 2003; Schlosshauer *et al.*, 2003; Galla *et al.*, 2004; Komiyama *et al.* 2004; Pierucci *et al.*, 2008).

Vários autores, entre eles Gilchrist (1998), Lenihan (1998) e Bunting (2005), sugerem que os biomateriais poderiam vir a receber diferentes tipos celulares (e.g. células-tronco mesenquimais, células de Schwann) e substâncias com atividade biológica comprovada, como fatores de crescimento celulares (fatores neurotróficos) encapsulados e com liberação controlada integrados ao polímero para melhora da eficácia do processo regenerativo.

As células-tronco mesenquimais têm a habilidade de se diferenciarem em células de origem mesenquimal ou epitelial (tais como células endoteliais, musculares estriadas esqueléticas, cardiomiócitos e hepatócitos). Por isso estão sendo usadas em modelos de regeneração de tecido. Células-tronco mesenquimais usadas no modelo de tubulização para avaliar a regeneração nervosa periférica forneceram um ambiente adequado e favorável para crescimento e mielinização, aumentando o número de fibras mielinizadas e a espessura da bainha de mielina bem como provocaram uma recuperação funcional mais rápida nos animais que receberam estas células (Pereira Lopes *et al.*, 2006).

1.7 Matriz extracelular

A capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico é altamente dependente da correta expressão temporal dos diversos fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. A matriz extracelular pode ser definida como sendo um substrato extracelular que permite a migração, proliferação e diferenciação celular *in vivo* e possui uma composição complexa com grande variedade de moléculas que são adequadas para suportar o processo celular necessário para a função ótima de tecidos e órgãos. Dentre as moléculas, o colágeno, a

fibronectina e laminina são fundamentais para a viabilidade e organização celular durante o brotamento e crescimento axonal do coto proximal em direção ao órgão alvo (Rutka *et al.* 1988; Sunderland, 1990; Ide, 1996; Timpl & Brown 1996; Badylak *et. al.*, 2009).

O colágeno, a fibronectina e a laminina são ativamente produzidas pelas células de Schwann e influenciam fortemente na sua adesão, crescimento, diferenciação e regulação do alongamento axonal durante o desenvolvimento e após uma lesão (Chernousov & Carey, 2000).

Um dos principais componentes da matriz extracelular são as lamininas, essas são caracterizadas como sendo glicoproteínas formadas por três cadeias de polipeptídios α , β e γ . Podemos encontrar 5 tipos de cadeia α , 4 tipos de cadeia β e 3 tipos de cadeia γ , com peso molecular de aproximadamente 800kDa. As diferentes cadeias combinam-se para formar até 14 isoformas diferentes de lamininas, como por exemplo, a laminina I que é formada por $\alpha 1\beta 1\gamma 1$. São importantes na membrana basal por atuarem na ligação entre as células e moléculas de colágeno (Rutka *et al.* 1988).

Para confirmar os efeitos positivos destas moléculas da matriz extracelular, trabalhos empregando o substrato de matrigel, composto por laminina e colágeno tipo IV, mostraram a eficiência destas no crescimento axonal, aumentando o número de axônios regenerados (Tonge *et al.*, 1997).

O colágeno constitui-se de uma glicoproteína representada por 11 isoformas diferentes. O colágeno tipo I é encontrado na pele, ossos e tecido conjuntivo. Já o colágeno tipo II esta presente somente nas cartilagens. O colágeno tipo III aparece nos vasos sanguíneos, pele, tecido conjuntivo do nervo, pulmão e intestino. E o colágeno tipo IV é encontrado especialmente na membrana basal das células de Schwann (Rutka *et al.* 1988).

Cada molécula de colágeno é formada por 3 polipeptídeos de cadeia α em tripla hélice, com peso molecular de aproximadamente 95kDa. Cada tipo de colágeno apresenta cadeias α com uma seqüência de aminoácidos específica. Por exemplo, o colágeno tipo I é formado por duas cadeias $\alpha 1$ idênticas e por uma cadeia $\alpha 2$. Por outro lado, a estrutura do colágeno tipo IV é caracterizada por 3 domínios: o N-terminal 7S, um C-terminal globular (NC1) e a parte central da tripla hélice com pequenas interrupções na repetição de glicina-X-Y, resultando em uma tripla hélice flexível. As posições X e Y são freqüentemente ocupadas por prolina e hidoxiprolina (Rutka *et al.* 1988; Gelse *et al.* 2003).

Trabalhos *in vitro* utilizando colágeno associado ou não a glicosaminoglicanos obtiveram efeitos positivos sobre a migração, proliferação e a viabilidade dos componentes celulares não neurais (Santos *et al.*, 2000; Spilker *et al.*, 2001). A confecção de tubos a partir de colágeno preenchida com elementos da matriz extracelular demonstrou efeitos promissores na regeneração axonal (Keilhoff *et al.*, 2003). Implantes biológicos compostos de matriz extracelular também obtiveram resultados positivos em testes experimentais, estimulando a angiogenese e causando proliferação, migração e diferenciação celular (Badylak *et al.*, 2009).

Estes implantes biológicos compostos de matriz extracelular são fabricados visando facilitar a reconstrução de tecidos orgânicos. A matriz extracelular dos implantes é adquirida de uma variedade de tecidos, incluindo valvas do coração, vasos sanguíneos, pele, nervos, músculo estriado esquelético, tendões, ligamentos, submucosa intestinal, bexiga urinária e fígado (Badylak *et al.*, 2009). Estes produtos podem ser elaborados de diversas formas com vários locais de aplicação. Uma camada hidratada pode ser usada como um material de suporte direto. Várias camadas hidratadas podem ser prensadas e formar um implante com multicamadas. A camada hidratada pode ser também liofilizada e, em seguida, ser fragmentada para formar um

material de configuração inespecífica. O material fragmentado pode ser digerido enzimaticamente para formar uma substância líquida que, repolimerizada torna-se um gel ou até misturada com um polímero sintético para fazer um implante híbrido (Badylak *et al.*, 2009).

Os implantes biológicos são freqüentemente desidratados por liofilização ou por vácuo. A liofilização é um processo pelo qual a água é removida do material por sublimação por baixa temperatura e pressão. É normalmente utilizada para preservar tecidos de enxertos biológicos, tais como ossos e tendões. A liofilização pode significar diminuição do suporte biológico em aproximadamente 30%, resultando em uma morfologia mais compacta (Badylak *et al.*, 2009).

As relações estruturais e funcionais de implantes biológicos incluem o entendimento da arquitetura tridimensional do material biológico, a composição biomecânica de tais materiais, o processo de produção e, talvez o mais importante, um entendimento das mudanças que ocorrem seguindo a regeneração com a substituição *in vivo*. O comportamento mecânico de implantes derivados da matriz extracelular depende de fatores como o microambiente do tecido local, o ritmo de degradação do implante biológico, forças presentes dentro do ambiente mecânico e o ritmo e alcance em que a infiltração de novas células deposita a nova matriz (Badylak *et al.*, 2009).

1.8 Supra-estrutura do colágeno

A eficiência de implantes direcionados na regeneração de axônios depende de características físicas, tais como a presença de poros interconectados e orientados em paralelo como guia para infiltração/migração de células no implante (Bozkurt *et al.*, 2009; Yow *et al.*, 2009). Enquanto substratos para o crescimento de nervos fornecem direção global para regeneração de axônios e invasão de células não neuronais, eles não fornecem uma direção local

para axônios e células dentro do tubo. Em estudos experimentais, um gel de colágeno tipo I magneticamente alinhado resultou em um direcionamento e a invasão de neuritos e células de Schwann em cultura de gânglio espinhal sobre o gel. Este resultado foi atribuído ao contato de cones de crescimento e células de Schwann sobre as fibrilas de colágeno alinhadas (Ceballos *et al.*, 1999).

A arquitetura da fibra de colágeno possui um papel crítico em determinar o comportamento biomecânico da matriz extracelular. O alinhamento e organização das fibras de colágeno são dependentes da função do tecido em que ele é encontrado. Por isso, as fibras de colágeno da matriz extracelular derivada de tendões e ligamentos são altamente alinhadas ao maior do eixo de toda a estrutura (Badylak *et al.*, 2009).

Medidas detalhadas de propriedades ópticas anisotrópicas como dicroísmo, dispersão anormal de birrefringência e curvas na textura da birrefringência com impregnação por prata na fibra de colágeno de tendão sustenta a hipótese de que partículas de prata são elipsóides e são distribuídas helicoidalmente nas ou sobre as fibras de colágeno (Vidal & Joazeiro, 2002). Isto indica que a fibra e/ou feixe de colágeno de tendões não são arranjados em uma estrutura plana e que o padrão de ondas refletem em uma organização helicoidal de fibras/feixes de colágeno. Deste modo, a orientação das fibras do tendão pode ser considerada como uma complexa estrutura com organização supramolecular (Vidal, 2003; Vidal & Mello, 2008). Secções axiais de tendões bovinos tratados com ácido acético examinados com luz polarizada respaldam a supra-organização de feixes helicoidais de colágeno nestes tendões, e uma organização similar é descrita em tendões de ratos (Vidal, 2003).

A organização e o estado de agregação molecular de um implante biológico são importantes fatores que proporcionam um ambiente adequado para orientação e regeneração

axonal (Fields *et al.*, 1989; Labrador *et al.*, 1998; Ceballos *et al.*, 1999). Proteínas orientadas naturalmente podem facilitar o crescimento axonal e pode ser degradada de maneira mais eficiente. Em adição, o uso de moléculas da matriz extracelular que apresentam propriedades de autorreunião e agregação macromolecular não tem sido totalmente investigado (Oliveira *et al.*, 2005).

Em contraste, o colágeno submetido a diferentes tratamentos não reproduz o padrão de fibras organizado helicilmente (Oliveira *et al.*, 2005). Esses pesquisadores investigaram a importância da organização e o estado de agregação molecular do colágeno tipo I na regeneração axonal. Os resultados demonstraram que o uso de moléculas naturalmente ordenadas longitudinalmente influenciou positivamente na regeneração nervosa periférica. Dessa forma, a ordenação molecular favorece a regeneração nervosa e, provavelmente pode beneficiar no reconhecimento celular, atuar na interação entre axônios e as células não neuronais, facilitar a difusão de fatores tróficos, bem como, estimular a migração de células de Schwann, além de ser degradada mais eficientemente.

2 *Justificativa*

A superficialidade no trajeto de alguns nervos periféricos, em diferentes regiões do corpo humano, torna-se um fator de risco para a ocorrência de vários tipos de lesões, como por exemplo, o esmagamento e a transecção. Atualmente, as lesões nervosas periféricas amplas são corrigidas cirurgicamente com o autoenxerto de nervos cutâneos (nervo sural ou safeno), resultando em uma recuperação motora e sensitiva em graus variáveis. Porém, há perda da sensibilidade na área do nervo retirado para o enxerto. Com o advento da bioengenharia, surge uma nova gama de pesquisas com materiais biorreabsorvíveis (biomateriais), entre eles podemos destacar o poli (ácido lático) (PLA) e a poli caprolactona (PCL). Estes surgem como alternativa na substituição do autoenxerto autógeno de nervos cutâneos e apresentam propriedades físicas e químicas de grande interesse no campo da reconstituição nervosa periférica, tais como o tempo de bioabsorção e porosidade, além de poderem ser confeccionados com as dimensões desejadas e introduzidos em seu interior moléculas da matriz extracelular. Considera-se que a organização e o estado de agregação molecular de implantes nervosos são importantes fatores que fornecem um ambiente adequado para regeneração e orientação axonal. Neste sentido o colágeno com organização supramolecular extraído do tendão bovino apresenta um padrão supra-estrutural consistindo de fibras orientadas.

Em virtude da problemática referida acima, este projeto tem por finalidade estudar *in vitro* a relação das células de Schwann com o colágeno com organização supramolecular e *in vivo* a implantação do colágeno com organização supramolecular aliado à prótese tubular de poli caprolactona (PCL) confeccionada pelo método do solvente, desenvolvido em nosso laboratório.

3 *Objetivos*

3.1 Objetivo geral

Tendo-se em vista os estudos realizados em nosso laboratório com o emprego de biomateriais na confecção de próteses tubulares, a importância das células de Schwann na regeneração nervosa periférica e o estudo da expressão dos componentes da matriz extracelular, nosso escopo é pesquisar *in vivo* e *in vitro* a influência do colágeno com organização supramolecular sobre a regeneração nervosa periférica fazendo uso das técnicas de tubulização e cultura purificada de células de Schwann.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 In vitro

1) Estudar a expressão do S-100, do colágeno tipo IV, da cadeia $\alpha 1\beta 1$ para a laminina tipo I e da cadeia $\alpha 2\beta 1$ para a laminina tipo II através da imunocitoquímica das células de Schwann sobre o colágeno com organização supramolecular.

2) Analisar morfologicamente a cultura purificada das células de Schwann sobre o colágeno com organização supramolecular após o período de 4 dias de cultivo através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.2.2 In vivo

1) Estudar morfologicamente os nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, poli caprolactona (PCL) vazio e preenchido com colágeno com organização supramolecular e pela técnica do autoenxerto após o período de 60 dias de tubulização por meio da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

2) Examinar morfometricamente e quantificar os axônios regenerados no interior dos tubos de polietileno, poli caprolactona (PCL) vazio e preenchido com colágeno com organização supramolecular e pela técnica do autoenxerto, após o período de 60 dias pós-operatório, por meio da microscopia de luz.

3) Avaliar a expressão do S-100, p75NTR, colágeno tipo IV, laminina e neurofilamentos através da imunistoquímica dos nervos regenerados no interior dos tubos de poli caprolactona (PCL) vazio e preenchido com colágeno com organização supramolecular e do nervo isquiático ileso.

4) Estudar birrefringência do colágeno e fibras nervosas dos nervos regenerados no interior dos tubos de poli caprolactona (PCL) vazios e preenchidos com colágeno com organização supramolecular e do nervo isquiático normal sob microscopia e polarização.

4 *Materiais e métodos*

4.1 In vitro

4.1.1 Colágeno com organização supramolecular

As amostras de colágeno foram extraídas do tendão calcâneo de boi usando uma técnica patenteada (#P.I.97015709, B.C. Vidal). Fragmentos das amostras de tendão bovino foram limpos e imersos em uma solução contendo 5% de ácido acético, 0,01% HCL e 1mg pepsina/g de tendão, sendo mantida a 7-10°C por 24 horas. O colágeno solubilizado foi filtrado e as fibras foram reconstituídas com a adição de uma solução de NaCl com concentração final de 5%. Em seguida as fibras obtidas foram dialisadas com água destilada em um tubo de 6mm de diâmetro a 5°C com troca de água a cada 24 horas. 1,5 litro de água foram necessários para adquirir o total de 200g do colágeno com organização supramolecular (Oliveira *et al.*, 2005).

Em seguida, o colágeno foi moldado na forma cúbica com cerca de 5mm de comprimento por 5mm de largura e aproximadamente 1mm de espessura e colocadas nos poços da placa de cultura (96 poços). Antecedendo a realização da cultura primária, as amostras de colágeno foram esterilizadas com irradiação gama com uma carga de 15KGy no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) em Belo Horizonte na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para evitar qualquer tipo de contaminação pré-lançamento e cultivo das células de Schwann na placa de cultura.

4.1.2 Cultura purificada de células de Schwann

A cultura de células de Schwann foi preparada pelo método modificado de Brockes *et al.*, (1979) e Assouline *et al.*, (1983). Assim, nervos isquiáticos de ratos Sprague Dawley (NTac Unib:SD) (n=10) (neonatos) foram extraídos e o epineuro dissecado. Após este procedimento, os nervos foram reduzidos e incubados em colagenase 0,05% (Worthing, Freehold, NY) por 30

minutos, a 37°C. Em seguida, foram lavados em solução de Hanks, e incubados com tripsina por 15 minutos a 37°C. A tripsina foi inibida com soro fetal bovino e posteriormente foi realizada a centrifugação do homogenato. Este foi ressuscitado em meio modificado Eagle (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e antibiótico. Em seguida, as células foram lançadas nos poços contendo o colágeno e cultivadas por 4 dias.

A pureza da cultura foi avaliada pela marcação com o anticorpo anti-S-100 (marcador da proteína carreadora de cálcio localizada em todo o citoplasma das células de Schwann) (policlonal; Dako, Glostrup, Dinamarca). Os experimentos foram organizados em um grupo cujas células de Schwann foram cultivadas sobre o colágeno com organização supramolecular e outro grupo com o cultivo sobre a placa de cultura (controle) e foram realizados em quadruplicata. Já o meio de cultura foi substituído a cada 2 dias. Para contagem do número de células adicionadas na placa de cultura foi utilizada a seguinte fórmula: número de quadrantes contados (câmara de Neubauer) X 10.000 (fator de correção) = número de células por mililitro (cel/mL).

4.1.3 Imunocitoquímica para as células de Schwann

Após 4 dias de cultura, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavadas 2 vezes em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4 por 5 minutos. Para evitar marcações inespecíficas, as culturas foram incubadas por 45 minutos em uma solução contendo albumina bovina (Sigma) 1% e triton X (0,25%) em PB. Em seguida, as preparações foram incubadas com os anticorpos primários anti-S-100 (marcador da proteína carreadora de cálcio localizada em todo o citoplasma das células de Schwann), anti-colágeno tipo IV, anti-laminina α 1, anti-laminina α 2 e anti-laminina β 1 (expressos pelas células de Schwann, localizando-se em

sua membrana basal) por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas 2 vezes em PB 0,1M, pH 7,4 por 5 minutos, e incubadas com anticorpo secundário fluorescente (CY-2 ou CY-3) por 45 minutos. A seguir, o material foi novamente lavado 2 vezes em PB 0,1M, pH 7,4 por 5 minutos. Posteriormente, os espécimes foram montados em glicerol e observados em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) equipado com sistema de fluorescência.

4.1.4 Processamento e análise para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As culturas foram fixadas com Karnovsky (2% glutaraldeído e 1% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4) por 15 minutos. Posteriormente, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% por 20 minutos e lavadas cuidadosamente em tampão cacodilato. Em seguida, a cultura foi desidratada em concentração crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 15 minutos cada lavagem), antes de serem levadas até o aparelho de ponto crítico (Balzers CTD 030). Após a passagem pelo ponto crítico, as amostras foram armazenadas em sílica gel até o momento de serem colocadas nos sputters. Em seguida, foram metalizadas com ouro-paládio e, posteriormente observadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA 840A), operando a 10KV.

4.2 In vivo

4.2.1 Animais e grupos experimentais

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados ratos da linhagem Sprague Dawley (NTac Unib:SD), fêmeas e adultas (n=24). Os animais foram divididos em 4 grupos:

- 1) Grupo TP – animais em que foi utilizada a prótese tubular de polietileno vazia (n=7).

- 2) Grupo TPCL – animais em que foi utilizada a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) vazia (n=5).
- 3) Grupo TPCLF – animais em que foi utilizada a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) preenchida com um implante de colágeno com organização supramolecular (n=7).
- 4) Grupo AE – animais que receberam autoenxerto de nervo periférico (n=5).

Os animais operados tiveram um período de sobrevida de 60 dias.

4.2.2 Construção da prótese para a tubulização

A confecção da prótese tubular foi realizada pela técnica do solvente. Para isto, foi adicionado 1,65g de poli caprolactona (PCL) em 33ml de solvente (dicloroetano). A seguir, a solução foi deixada em temperatura ambiente por 12 horas para completa homogeneização. No dia seguinte, a solução foi colocada em uma placa contida no interior de uma cuba de vidro com o meio saturado de solvente. Foram esperadas 12 horas para completa evaporação do material, foi retirada a membrana da cuba, sendo esta colocada em uma câmara de vácuo por 5 minutos, de forma que eventuais resíduos do solvente não permaneçam nas membranas. A seguir, as membranas foram enroladas em pinos com diâmetro de 1,6mm (Evans *et al.*, 1999), sendo então cortadas com 10mm de comprimento.

Os implantes de colágeno com organização supramolecular do grupo experimental TPCLF foram moldadas em fragmentos na forma de um cubo possuindo 4mm de comprimento por 1mm de largura e 1mm de espessura e foram inseridos dentro do tubo de poli caprolactona (PCL) no momento da cirurgia. O implante foi posicionado e alinhado entre os cotos nervosos na parte média do tubo.

4.2.3 Procedimento cirúrgico para a tubulização

Após anestesia (0,2ml de ketamina e 0,2ml de xylazina, 0,2ml/100g peso corpóreo, ip), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo isquiático foi exposto e transeccionado. Após a retração dos cotos, foram realizadas as propostas para os grupos experimentais. No grupo TP, os cotos proximal e distal do nervo isquiático foram introduzidos e fixados com um ponto cirúrgico passando pelo epineuro do nervo e nas extremidades da prótese tubular de polietileno vazia, mantendo o alinhamento e deixando-se um espaço de 6-7mm entre os cotos. O grupo TPCL obedeceu ao mesmo procedimento dispondo de uma prótese tubular de poli caprolactona (PCL) vazia e o grupo TPCLF também seguiu o procedimento descrito. No entanto, antes da fixação dos cotos nas extremidades do tubo de caprolactona (PCL), foi inserido um exemplar do implante de colágeno com organização supramolecular na parte média do tubo mantendo o alinhamento entre os cotos. No grupo AE, o autoenxerto foi realizado logo após a separação entre os cotos proximal e distal. Um segmento do nervo seccionado, cerca de 6-7mm, foi invertido e conectado aos cotos proximal e distal através de 2 pontos cirúrgicos passando pelo epineuro (neurorrafia) em cada extremidade do implante com os cotos e mantendo a continuidade do nervo isquiático. Encerrados estes procedimentos, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele fechada com 3 pontos cirúrgicos (fio mononylon 4-0, ethicon). Os animais foram mantidos em biotério por um período de 60 dias, recebendo ração e água *ad libitum*.

4.2.4 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão

Após o período de sobrevivência de 60 dias, os animais de todos os grupos foram anestesiados com 0,2ml de ketamina e 0,2ml de xylazina, (0,2ml/100g peso corpóreo, ip.), submetidos a toracotomia e a seguir perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando a lavagem dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 150ml de uma solução salina tamponada (NaCl 0,9% em PB 0,1M, pH 7,4). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 300ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente a fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo e autoenxerto foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e dissecados sob lupa, sendo os cotos proximal e distal separados. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo PB 0,1M, pH 7,4. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em PB 0,1M, pH 7,4. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescentes de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS). Os blocos foram desbastados e as secções semi-finas (0,5µm) obtidas foram coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio de luz. A seguir, algumas regiões foram selecionadas e os blocos retrimados sendo realizados os cortes ultrafinos (500Å; Ultramicrótomo LKB, Bromma 8800) os quais foram coletados em telas de cobre (200 Mesh). Após contraste em acetato de uranila e citrato de chumbo, os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico Zeiss Leo 906, operando a 60kv.

4.2.5 Morfometria e contagem das fibras regeneradas

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: número de axônios mielínicos regenerados, diâmetro das fibras (DF), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão "g" (RZG) ($RZG = DAM/DF$). O estudo do comportamento das células de Schwann em particular, foi realizado a partir dos valores da EBM e da RZG, enquanto que a resposta regenerativa axonal foi avaliada pelos resultados do DF e DAM. A RZG consiste de um valor numérico que traz informações a cerca do padrão de normalidade do nervo isquiático a partir da relação entre o DAM e o DF, sendo estes valores próximos a 0,7.

Para a contagem de axônios mielínicos, 4 campos representativos de cada nervo regenerado foram digitalizados com o auxílio de uma vídeo câmera digital (Olympus U-Cmad-2) conectada a um microscópio Olympus BX60 (Obj. 100x). O número total de fibras foi estimado a partir de uma regra de três simples, levando-se em conta a área total do nervo regenerado.

Os quatro campos amostrados em cada nervo regenerado foram empregados para obtenção das medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos. Estas foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula $D=P/\pi$. A diferença entre o DF e o DAM fornecerá a EBM (Mayhew & Sharma, 1984). A morfometria foi realizada empregando-se um sistema computadorizado, utilizando-se o programa Image Tool 3.00 (UTHSCSA).

4.2.6 Animais e grupos experimentais para imunistoquímica e microscopia de polarização

Ratos da linhagem Sprague Dawley (NTac Unib:SD), fêmeas e adultas 60 dias pós-operatórios foram utilizados para imunistoquímica e microscopia de polarização. Os espécimes foram divididos em 3 grupos:

- 1) Grupo normal – foram utilizados nervos isquiáticos normais (n=3).
- 2) Grupo TPCL – animais no qual foram utilizados a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) vazia (n=3).
- 3) Grupo TPCLF – animais no qual foram utilizados a prótese tubular constituída de poli caprolactona (PCL) preenchida com um implante de colágeno com organização supramolecular (n=3).

4.2.7 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para imunistoquímica

Após o tempo de sobrevivência pré-determinado, os animais designados para a imunistoquímica foram perfundidos de acordo com o procedimento para microscopia eletrônica, porém, subsequente à perfusão de 300ml com solução salina, foi utilizada uma solução de formalina 10% em PB 0,1M, pH 7,4.

Após fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas e mantido a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e dissecados sob lupa. Os nervos foram colocados individualmente em frascos contendo uma solução de sacarose 20% em PB 0,1M, pH 7,4 por 12 horas, sendo em seguida imersos em tissue-tek (Miles Inc., USA) e congelados em n-hexano (Merk), mantido em nitrogênio líquido a -40°C. Cortes congelados com 12µm de espessura foram obtidos em criostato (Leica) e as seções foram

transferidas para lâminas gelatinizadas e estocadas a -20°C até o momento da realização das imunomarcações. Para realização da imunistoquímica, os espécimes, após atingirem a temperatura ambiente, foram imersos em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram incubadas em uma solução contendo albumina bovina (BSA) 1% em PB 0,1M, pH 7,4 por 1 hora. Após, foram feitas três lavagens em PB 0,1M, pH 7,4, sendo posteriormente, aplicados os anticorpos primários coelho anti-S-100 (marcador da proteína carreadora de cálcio localizada em todo o citoplasma das células de Schwann), coelho anti-p75NTR (receptor de baixa afinidade para neurotrofinas), coelho anti-colágeno tipo IV, coelho anti-laminina (expressos pelas células de Schwann, localizando-se em sua membrana basal) e camundongo anti-neurofilamentos (presentes nos axônios) e incubados por 2 horas a 4°C . Em seqüência, após lavagem em PB 0,1M, pH 7,4, os respectivos anticorpos secundários conjugados com CY-2 ou CY-3 foram aplicados por 45 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PB 0,1M, pH 7,4 e montadas em glicerol/PB (3:1), sendo observadas em microscópio de fluorescência.

4.2.8 Microscopia de polarização

Os mesmos grupos, quantidade de amostras, procedimentos para fixação dos espécimes e cortes congelados referidos na técnica anterior foram empregados para a metodologia de microscopia de polarização.

Após atingirem a temperatura ambiente, as lâminas com cortes longitudinais de nervo foram montadas em água destilada e observadas no microscópio de polarização (Olympus BX51-P BX2). Tal microscópio permite alterar a angulação da lâmina, e por assim ser, do tecido em relação ao analisador e ao polarizador. Dependendo da angulação foram obtidas as compensações da birrefringência desejadas, aumentando ou diminuindo a intensidade do brilho

para o colágeno (-45°) ou para a bainha de mielina (+45°). As imagens capturadas foram estudadas utilizando o analisador de imagens Image-Pro Plus 6.3, Media Cybernetics, Inc. (Silver Spring, MD, USA).

4.2.9 Análise estatística

A partir dos resultados numéricos da contagem dos axônios mielínicos regenerados, assim como os dados morfométricos, foram calculados a média e erro padrão. Estes parâmetros foram avaliados pelo método da análise da variância - ANOVA. As diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram analisadas fazendo-se uso do teste “t” de Student (resultados paramétricos) e teste “U” de Mann-Whitney (resultados não paramétricos), assumindo-se um nível de significância igual a *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

5 *Resultados*

5.1 Caracterização do colágeno com organização supramolecular (figura 1)

Macroscopicamente, após moldado na forma prismática para posterior implantação *in vitro* ou *in vivo*, as amostras do colágeno com organização supramolecular demonstravam coloração branca com um aspecto esponjoso e textura macia, sendo facilmente deformável. O material ainda demonstrou-se hidrofílico, tomando a aparência de um gel sem, entretanto, desagregar-se.

Em cortes transversais do colágeno com organização supramolecular vista sob microscopia óptica, notou-se uma malha tridimensional intrincada de fibras e lacunas entre elas.

Quando as amostras de colágeno foram submetidas à distensão do fragmento como um todo, foram expostas as fibras colágenas organizadas paralelamente umas às outras com um alto grau de alinhamento em diferentes níveis de profundidade do material estudadas com diferentes focos.

5.2 *In vitro*

5.2.1 *Cultura purificada de células de Schwann*

O número de células lançadas em cada poço foi estimado através da câmara de Neubauer, resultando em aproximadamente 12×10^4 cel/ml em cada poço da placa de cultura com 96 poços. Observou-se, em contraste de fase, que a maioria das células apresentaram como característica a morfologia fusiforme bipolar com prolongamentos citoplasmáticos típicos de células de Schwann além de outras formas.

5.2.2 Imunocitoquímica da cultura de células de Schwann

A imunomarcção anti-S-100 revelou que a cultura celular tinha um alto grau de pureza, observada pela intensa marcação com o anticorpo. Pôde ser visto que a concentração de células de Schwann foi menor no grupo com o colágeno com organização supramolecular. As células de Schwann cultivadas sobre o colágeno com organização supramolecular apresentavam a morfologia variada desde seu padrão típico à formas ovóides com grandes prolongamentos tortuosos e múltiplos, estabelecendo comunicações entre si além de aparentar se conformar no relevo do colágeno com organização supramolecular. Enquanto que as células do grupo controle mantiveram um padrão morfológico típico e em formas triangulares sendo que os prolongamentos dessas células se mostraram mais curtos e afilados com comunicações (figura 2).

A imunomarcção com o anticorpo anti-colágeno IV demonstrou que as células de Schwann de ambos os grupos expressaram este componente da matriz extracelular. A visualização da laminina I se deu pela dupla-marcação com os anticorpos anti-cadeia $\alpha 1$ e anti-cadeia $\beta 1$, já para a laminina tipo II foi realizada a dupla-marcação do anticorpo anti-cadeia $\alpha 2$ com o anticorpo anti-cadeia $\beta 1$, resultando em uma marcação co-localizada alaranjada para ambas as lamininas. As células apresentaram o comportamento típico, expressando tanto a laminina I como a laminina II nos grupos controle e sobre o colágeno com organização supramolecular (figura 3).

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de culturas de células de Schwann (figura 4)

A superfície do colágeno se revelou irregular, alternando desde áreas contendo depressões e cavidades/canais a regiões menos acidentadas. Mas a aparência predominante foi a de uma estrutura organizada em camadas sobrepostas ora mais ora menos compactadas com grande variação na disposição e conformação dos poros.

A cultura sobre o colágeno com organização supramolecular auferiu uma densidade celular inferior àquelas cultivadas sobre a placa de cultura. As células de Schwann encontradas sobre o colágeno apresentavam-se com certo alinhamento em direção ao seu maior eixo. Além disso, notou-se a morfologia normal das células de Schwann com prolongamentos mais curtos e volumosos se ajustando e se moldando ao relevo da membrana, sugerindo melhor aderência e coaptação destas células sobre o substrato.

5.3 In vivo

5.3.1 Microscopia de luz dos nervos regenerados (figura 5)

Nos cortes transversais dos nervos regenerados do grupo TP após 60 dias de tubulização, pôde-se observar a presença de um epineuro delgado contendo vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais em seu interior. As amostras possuíam a forma cilíndrica normal e foi facilmente notada a formação de fasciculações entre os feixes de fibras nervosas. A média da área dos nervos deste grupo foi $160.856,63 \pm 16.656,5 \mu\text{m}^2$, sendo inferior aos outros grupos.

O epineuro do grupo TPCL apresentou-se com proporção em sua espessura e continha maior quantidade de vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais em relação ao grupo TP. O epineuro estava ainda circundado por células inflamatórias, possivelmente atuando na

degradação do tubo de poli caprolactona (PCL). A maioria dos nervos do grupo TPCL tinha aspecto cilíndrico com fasciculações evidentes formadas na sua intimidade e a média da área dos nervos atingiu $256.848,59 \pm 15.676,98 \mu\text{m}^2$.

Foi observado no grupo TPCLF o epineuro equivalente ao grupo TPCL, que também traziam numerosas células inflamatórias, além de vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais abundantes e de calibre maior. A maioria dos nervos do grupo TPCLF também apresentava o aspecto cilíndrico e fasciculações evidentes. No entanto, não foi visto nenhum vestígio do implante de colágeno com organização supramolecular sob microscopia de luz, indicando a rápida absorção do material *in vivo*. A área dos nervos regenerados foi ligeiramente menor que o grupo TPCL, resultando em $247.110,15 \pm 13.378,14 \mu\text{m}^2$ de média.

Na maior parte das amostras do grupo AE, o epineuro descrevia uma organização mais complexa dos demais grupos. Ele foi encontrado espesso na periferia do nervo emitindo projeções que separaram o tecido nervoso em grandes conjuntos de fibras nervosas que, na maioria das amostras estavam dissociados em 3 ou até 7 aglomerados. Singularmente, boa parte dos axônios regenerados situava-se no epineuro quase na superfície do nervo o que acusa uma menor proteção das fibras em questão. Ainda, no microambiente do epineuro localizaram-se várias grandes células adiposas com uma quantidade de vasos sanguíneos mais discreta. A média da área dos nervos do grupo AE foi superior aos demais grupos, alcançando $474.889 \pm 23.775,72 \mu\text{m}^2$.

5.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) (figura 6)

Ao microscópio eletrônico, após o período de 60 dias de tubulização, observou-se no grupo TP um microambiente composto por axônios apresentando uma delgada bainha de mielina

conferida por uma única célula de Schwann. Os axônios amielínicos apresentaram-se com menor dimensão e organizados em pequenos compartimentos compartilhando projeções de uma mesma célula de Schwann. Os axônios puderam ser notados entre fibras colágenas dispersas coincidindo com células perineurais.

O grupo TPCL revelou o microambiente melhor organizado descrevendo numerosas formações de mini-fascículos de colágeno bem delimitados abrigando as células em lojas. A espessura da bainha de mielina mostrou-se ser mais densa nestes axônios em relação ao grupo anterior. Os axônios amielínicos, por sua vez, possuíam diâmetro inferior aos mielínicos e estavam envolvidos, em conjuntos, por processos citoplasmáticos de uma única célula de Schwann.

Constatou-se, no grupo TPCLF, as fibras nervosas compactadas por mini-fascículos de colágeno e células perineurais denotando uma melhor organização do microambiente além de possuir quantidade menor de matriz extracelular em relação ao tecido nervoso. A espessura da bainha de mielina deste grupo mostrou ser superior nestes axônios, em relação a todos os demais grupos, enquanto que os axônios amielínicos regenerados dispunham-se em grupos maiores envoltos por somente uma célula de Schwann.

O microambiente do grupo AE manifestou uma grande coleção de matriz extracelular, tendo, em alguns pontos, mais elementos da matriz extracelular que propriamente fibras nervosas. Ainda, muitas fibras colágenas colocavam-se nas adjacências de conjuntos de axônios arquitetando fartos mini-fascículos. As fibras mielínicas possuíam calibre variado e alternavam a espessura da bainha de mielina e as fibras amielínicas distribuíam-se de forma aleatória alocadas em projeções de uma única célula de Schwann.

5.3.3 Quantificação dos axônios mielínicos (figura 7)

Após o período de 60 dias de tubulização, o grupo TP apresentou um número médio de $5.257,91 \pm 506,43$ fibras regeneradas. No grupo TPCL obteve-se cerca de $9.291,29 \pm 847,41$ axônios mielínicos. Já no grupo TPCLF houve a regeneração de aproximadamente $9.605,04 \pm 813,18$ axônios mielínicos, enquanto que o grupo AE teve por volta de $16.454,45 \pm 820,84$ fibras nervosas regeneradas em média.

Apenas a relação dos valores obtidos entre os grupos TPCL e TPCLF não houve diferença estatística. A estimativa total de fibras nervosas regeneradas do grupo AE foi superior aos grupos TP, TPCL e TPCLF exibindo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). O grupo TP foi o que obteve menor número de fibras regeneradas em relação aos grupos TPCL e TPCLF ($p < 0,05$, $p < 0,01$ respectivamente).

5.3.4 Parâmetros morfológicos

5.3.4.1 Diâmetro das fibras (DF) (figura 8)

Os animais do grupo TP, 60 dias após a tubulização, apresentaram axônios mielínicos com diâmetros variando entre $0,5\mu\text{m}$ e $9,5\mu\text{m}$ com média igual a $3,72 \pm 0,49\mu\text{m}$. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos de frequência entre $1,51$ e $2,5\mu\text{m}$, $2,51$ e $3,5\mu\text{m}$ e entre $3,51$ e $4,5\mu\text{m}$, o que corresponde a $24,3\%$, $28,42\%$ e $22,2\%$ do total respectivamente. As demais fibras, $25,06\%$ restantes, estavam distribuídas nas outras classes de frequências e podem ser vistas na tabela 1.

Quanto ao grupo TPCL, axônios mielínicos apresentaram o diâmetro variando entre $0,5\mu\text{m}$ e $9,5\mu\text{m}$ com média igual a $3,82 \pm 0,59\mu\text{m}$. O intervalo de frequência mais repetido nesta medida foi entre $1,51$ e $2,5\mu\text{m}$, $2,51$ e $3,5\mu\text{m}$ e entre $3,51$ e $4,5\mu\text{m}$, correspondendo a $25,1\%$,

28,95% e 22,45% respectivamente. Já as outras fibras que completam este grupo denotam 21,75% e estão distribuídas na tabela 1.

As amostras derivadas dos animais do grupo TPCLF também obtiveram o DF variando entre 0,5 μ m e 9,5 μ m atingindo a média de 3,99 \pm 0,44 μ m. Os intervalos de frequência com mais ocorrência apareceram entre 1,51 e 2,5 μ m, 2,51 e 3,5 μ m e entre 3,51 e 4,5 μ m, sendo 20,67%, 31,87% e 26,85% respectivamente. O restante de amostras consiste de 20,6% e estão dispostas na tabela 1.

No grupo AE, o DF variou entre 0,5 μ m e 10,5 μ m com média de 3,53 \pm 0,62 μ m. A maioria das fibras regeneradas encontraram-se nos intervalos de frequência 1,51 a 2,5 μ m e 2,51 a 3,5 μ m, o que corresponde a 29,4% e 25,35% respectivamente. As fibras restantes nos outros intervalos de frequência representam 45,23% e estão apresentadas na tabela 1.

Com relação à análise estatística intergrupos observou-se que nos intervalos de frequência de 0,5 e 1,5 μ m foi constatado diferença significativa para o grupo TP em relação ao TPCLF ($p < 0,05$) e para o grupo AE em relação ao TPCL ($p < 0,05$) e ao TPCLF ($p < 0,001$), exprimindo que o processo regenerativo avaliado por meio do DF dos grupos TP e AE foram mais expressivos nos menores diâmetros desta análise. Além disso, no intervalo de frequência com diâmetro entre 3,51 e 4,5 μ m, o grupo TPCLF apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo AE.

5.3.4.2 Diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) (figura 9)

As amostras do grupo TP, após 60 dias de tubulização, apresentaram axônios com diâmetro se alternando entre 0,5 e 8,5 μ m com média igual 3,02 \pm 0,43 μ m. As maiores porcentagens desta mensuração foram observadas nos intervalos de frequência entre 2,51 e

3,5 μ m e 3,51 e 4,5 μ m, correspondendo a 31,6% e 28,26% do total, respectivamente. 40,13% representam os axônios das demais frequências e estão dispostos na tabela 2.

A distribuição de frequência do DAM das amostras do grupo TPCL atingiu 0,5 μ m em um extremo e 9,5 μ m no outro e a média entre esses valores foi igual a 2,96 \pm 0,52 μ m. Notou-se que nos intervalos de frequência entre 1,51 e 2,5 μ m, 2,51 e 3,5 μ m e entre 3,51 e 4,5 μ m encontravam-se maior porcentagem dos axônios mielínicos, sendo, respectivamente, 21,38%, 31,63% e 27,75% das amostras. 19,22% restringiam-se aos outros intervalos de frequência e também podem ser vistos na tabela 2.

Quanto ao grupo TPCLF, os axônios medidos variaram de 0,5 a 9,5 μ m de diâmetro com média de 2,74 \pm 0,37 μ m. Já os intervalos de frequência que mais se repetiram foram os mesmos do grupo TPCL com 23,5%, 38,03% e 25% em cada um deles. Os outros intervalos limitaram-se a 13,46% e podem ser observados na tabela 2.

O DAM referente ao grupo AE distribuíram-se de 0,5 até 10,5 μ m obtendo a média de 2,9 \pm 0,56 μ m. A maioria dos axônios mielínicos foi encontrada nos intervalos de frequência 1,51 a 2,5 μ m, 2,51 a 3,5 μ m e 3,51 a 4,5 μ m incidindo em 27,5%, 29,43% e 23,5% respectivamente. As fibras restantes nos outros intervalos de frequência representam 19,55% e estão distribuídos na tabela 2.

Na análise estatística intergrupo não foi vista diferença significativa em nenhum intervalo de frequência.

5.3.4.3 Espessura da bainha de mielina (EBM) (figura 10)

A distribuição de frequência da EBM dos nervos regenerados no interior do tubo de polietileno (TP) delineou variação que alcançou 0,05 a 1,25 μ m e média igual a 0,35 \pm 0,04 μ m. As

maiores porcentagens deste grupo foram encontradas nos intervalos de frequência entre 0,26 e 0,35 μm e 0,36 e 0,45 μm , sendo igual a 39,89% e 23,96% do total, respectivamente. 36,14% representam as demais classes de frequência e podem ser estudadas na tabela 3.

A EBM dos nervos regenerados no grupo TPCL variou de 0,16 a 1,15 μm com média situada em 0,43 \pm 0,05 μm . Neste, 32,74% e 27,97% apresentaram-se nos intervalos de frequência 0,36 a 0,45 μm e 0,46 a 0,55 μm , respectivamente. Os 39,28% estavam entre os outros intervalos de frequência e estão esquematizados na tabela 3.

As amostras do grupo TPCLF, após 60 dias de tubulização, apresentaram a EBM alternando entre 0,26 e 1,65 μm com média igual 0,62 \pm 0,05 μm . As maiores porcentagens desta mensuração foram observadas nos intervalos de frequência entre 0,46 e 0,55 μm , 0,56 e 0,65 μm e 0,66 e 0,75, refletindo 19,75%, 31,3% e 18,7% do total, respectivamente. 30,23% representam os axônios das demais frequências e estão dispostos na tabela 3.

No grupo AE, a EBM variou entre 0,05 μm e 1,05 μm com média de 0,31 \pm 0,05 μm . A maioria das fibras regeneradas foi encontrada nos intervalos de frequência 0,26 a 0,35 μm e 0,36 a 0,45 μm , o que corresponde a 43,89% e 22,27% respectivamente. As fibras restantes nos outros intervalos de frequência representam 33,82% e estão presentes na tabela 3.

No tratamento estatístico intergrupos foram notados diferenças significativas no intervalo de frequência 0,05 a 0,15 μm com maior relevância para o grupo AE ($p < 0,05$) em relação aos grupos TPCL e TPCLF. Novamente, no intervalo 0,16 a 0,25 μm , o grupo AE obteve maior valor ($p < 0,001$) na EBM que os grupos TPCL e TPCLF. No intervalo entre 0,26 a 0,35 μm o grupo AE continuou a se sobressair aos grupos TPCL ($p < 0,01$) e TPCLF ($p < 0,001$) e o grupo TP também se sobressaiu aos grupos anteriores ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente) nesta ordem de frequência. A EBM nos grupos TP, TPCL e AE foi maior que o grupo TPCLF ($p < 0,001$) entre

0,36 e 0,45 μm . Já nos intervalos de frequência 0,56 a 0,65 μm , 0,66 a 0,75 μm , 0,76 a 0,85 μm , 0,86 a 0,95 μm e 0,96 a 1,05 μm o grupo TPCLF obteve medidas com maior relevância estatística (com alternância de $p < 0,01$ e $p < 0,001$) sobre todos os outros grupos. O grupo TPCLF ainda se destacou ($p < 0,05$) aos grupos TP e AE entre 1,06 e 1,15 μm e sobre os grupos TP, TPCL e AE ($p < 0,05$) entre 1,16 e 1,25 μm na EBM.

Portanto, os grupos AE e TP obtiveram valores estatisticamente significativos nos menores intervalos de frequência em relação aos grupos TPCL e TPCLF sendo que não houve diversidade entre os primeiros em nenhuma medida na EBM. No intervalo de frequência 0,46 a 0,55 μm não foi observada nenhuma diferença significativa. Nos intervalos de frequência restantes, o grupo TPCLF apresentou dados estatisticamente superiores em relação aos outros grupos, predizendo que o comportamento das células de Schwann com relação à EBM, no grupo TPCLF, foi mais proeminente nos maiores intervalos de frequência enquanto que nos grupos TP e AE foi mais acentuado nos intervalos menores.

5.3.4.4 Razão "g" (RZG) (figura 11)

Os nervos regenerados do grupo TP apresentaram RZG variando entre 0,46 e 1,05 μm e média igual a 0,8 \pm 0,02 μm . Destas 60,24% limitava-se no intervalo de frequência 0,86 a 0,95 μm . Os demais valores, 39,75%, podem ser vistos na tabela 4.

A RZG do grupo TPCL variou entre 0,46 e 1,05 μm e obtiveram a média de 0,76 \pm 0,07 μm . As maiores porcentagens foram encontradas nos intervalos entre 0,76 e 0,85 μm e 0,86 e 0,95 μm , totalizando 46,89% e 35,19%, respectivamente. Os outros valores, 17,9%, estão detalhados na tabela 4.

A RZG referente ao grupo TPCLF se encontravam entre 0,26 e 0,95 μ m obtendo a média de 0,67 \pm 0,02 μ m. A maioria dos axônios mielínicos encontraram-se nas classes de frequência 0,66 a 0,75 μ m e 0,76 a 0,85 μ m, o que corresponde a 42,39% e 36,08% respectivamente. As fibras restantes nas outras classes representam 21,52% e estão detalhadas na tabela 4.

No grupo AE, a RZG variou de 0,46 μ m a 1,05 μ m com média de 0,81 \pm 0,02 μ m. A maioria das fibras regeneradas foi encontrada no intervalo de frequência 0,86 a 0,95 μ m, o que consiste 55,09%. As fibras restantes nos outros intervalos representam 44,9% e estão impressas na tabela 4.

O comportamento das células de Schwann verificado através da RZG intergrupos demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa nos intervalos de frequência 0,46 a 0,55 μ m, 0,56 a 0,65 μ m e 0,66 a 0,75 μ m, com valores superiores para as amostras dos grupos TP, TPCL e AE em relação ao grupo TPCLF ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$). No intervalo de frequência 0,76 a 0,85 μ m não houve diferença significativa intergrupos. A RZG no intervalo 0,86 a 0,95 μ m teve o grupo TP se sobressaindo aos grupos TPCL e TPCLF ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente) e o grupo TPCLF com valores inferiores aos grupos TPCL e AE ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente). Por fim, o grupo AE se destacou aos grupos TPCL e TPCLF ($p < 0,05$) no intervalo de frequência 0,96 a 1,05 μ m.

Tais dados vêm a confirmar os resultados obtidos através da mensuração da EBM. A maioria das amostras dos grupos TP, TPCL e AE encontravam-se deslocados para a direita do intervalo de frequência de 0,65 a 0,75, fora do padrão de normalidade. A relação entre o DAM e o DF no grupo TPCLF manifestou maior amostragem com proporção adequada entre os elementos da fibra nervosa.

5.3.5 Imunoistoquímica (figura 12)

A imunomarcção com o anticorpo anti-S-100 foi realizada em cortes longitudinais dos nervos regenerados. Após 60 dias de sobrevivida foi observada uma intensa marcação em nervos isquiáticos normais, em nervos regenerados no interior do tubo de poli caprolactona vazio (TPCL) e em nervos regenerados com o tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular (TPCLF). Nos grupos TPCL e TPCLF as fibras nervosas estabeleceram um padrão de disposição paralelo ao longo eixo do nervo enquanto que o nervo ileso obedeceu a um padrão paralelo ondulado de suas fibras.

Por meio do anticorpo p75NTR, receptor de baixa afinidade para o fator derivado do nervo (NGF) e outras neurotrofinas (BDNF, NT3/4), pode-se auferir informação sobre a reatividade das células de Schwann. Nos experimentos realizados, houve uma leve marcação no grupo de nervos ileso, sendo ampliada pelo processo regenerativo no grupo TPCL e estando ainda mais intensa com a adição do colágeno com organização supramolecular no grupo TPCLF.

Quando utilizado o anticorpo anti-colágeno IV em cortes longitudinais foi obtida uma marcação mais tênue em relação aos outros anticorpos sem, no entanto, exprimir diferença visível na intensidade da marcação intergrupos.

O experimento utilizando a dupla marcação com os anticorpos primários anti-laminina e anti-neurofilamento revelou a expressão destes elementos em todos os grupos, definida pela intensa marcação de ambos os anticorpos.

5.3.6 Microscopia de polarização (figura 13)

Em cortes longitudinais, sob microscopia de polarização, evidenciou-se a birrefringência do nervo periférico. O nervo normal apresentou um padrão ondulado de suas fibras

possibilitando demonstrar a alternância de brilho a regiões escuras, ou seja, das fibras colágenas em coerência com as bainhas de mielina. Ambas se equilibravam em intensidade da birrefringência e percorriam seus trajetos intimamente conexos de forma contígua, paralelamente, tanto compensando a birrefringência para o colágeno como para a mielina. Tal fato sugere que o nervo periférico normal possui uma supra-organização (formando crimps). O padrão ondulado do nervo como um todo indica que as fibras colágenas se opõem perpendicularmente ao empilhamento dos lipídios presentes na bainha de mielina, de certa forma, decorando e envolvendo as fibras nervosas com uma composição helical tridimensional. Assim, a inferência é de que tais fibras proporcionam não só um papel estrutural, mas também uma função diretora no ordenamento/direcionamento dos axônios dentro do feixe nervoso, uma disposição ainda não retratada em nervos periféricos.

As amostras do grupo TPCL apresentaram as fibras dispostas não tão emparelhadas entre si como no nervo isquiático normal, no entanto, pôde ser notada a birrefringência do colágeno entre as fibras nervosas e com maior magnitude no epineuro. Quando compensado para a birrefringência do colágeno, este pôde ser identificado em regiões escuras formando grandes feixes e mostrar sua organização associada às fibras nervosas que parecem aproveitá-lo como guia e suporte estrutural no processo regenerativo. Compensando a birrefringência para mielina, esta correlação tornou-se mais evidente por aumentar a intensidade do brilho do colágeno. Com a microscopia de polarização, ainda pôde ser vista a bainha de mielina envolvendo os axônios e as suas extensões através do reconhecimento dos nódulos de Ranvier.

No grupo TPCLF, a organização do nervo foi semelhante ao grupo supracitado, porém, a amplitude da birrefringência do colágeno destas amostras foi mais elevada e as fibras apresentavam-se mais justapostas indicando um padrão voltado para o visto no nervo normal. As

fibras colágenas se distribuíam no nervo de forma mais homogênea em feixes menores se entremeando aos outros elementos do nervo isquiático. Isto pode ser mais bem ressaltado compensando a birrefringência para mielina resultando, assim, em uma imagem levemente mais brilhante no nervo como um todo. A disposição mais agregada destes elementos, como resultado do implante do colágeno com organização supramolecular suscita uma relação mais íntima das fibras colágenas com as células de Schwann no processo regenerativo. Tal como, no grupo TPCL, a microscopia de polarização revelou maiores espaços internodais envolvendo os axônios do nervo isquiático.

6 *Discussão*

Há alguns anos a técnica de tubulização tem sido estudada na tentativa de melhor compreender o processo regenerativo, bem como, em alguns casos, substituir o autoenxerto. Associado à técnica, vários materiais tais como ossos, fâscias, tendões, músculos estriados esqueléticos e vasos sanguíneos foram utilizados experimentalmente (Fields *et al.*, 1989; Yannas & Hill, 2004; Pierucci *et al.*, 2009). Além disso, a técnica de tubulização propicia a implantação de moléculas da matriz extracelular no interior do tubo com o intuito de otimizar a regeneração nervosa periférica. Estas propostas têm demonstrado efeitos promissores afetando a angiogenese e causando proliferação, migração e diferenciação celular (Keilhoff *et al.*, 2003; Badylak *et al.*, 2009).

Atualmente, a arquitetura e o desenvolvimento de implantes biológicos estão em constante evolução, partindo de um suporte mecânico inerte, progredindo para uma plataforma dinâmica para adesão, proliferação, diferenciação e interação celular com o microambiente fisiológico (Yow *et al.*, 2009).

Existe um consenso geral de que a regeneração nervosa é melhorada quando implantes de matriz extracelular são alinhados ao longo do eixo do tubo. A orientação respaldada pelo contato de cones de crescimento em resposta as fibras alinhadas causam a projeção de neuritos necessários para regeneração nervosa, além de evitar a formação de neuromas (Dubey *et al.*, 1999).

Em tubos preenchidos com implantes alinhados, a regeneração de fibras pode ser guiada pelo contato orientado. As propriedades físicas e químicas do microambiente são cruciais para regeneração axonal. A interação entre axônios em regeneração e o substrato adjacente pode ser um fator chave para o alongamento axonal (Alluin *et al.*, 2008).

Oliveira *et al.*, (2005) consideraram que a organização e o estado de agregação molecular do colágeno em implantes nervosos são importantes fatores que fornecem um ambiente adequado para regeneração e orientação axonal. Proteínas orientadas naturalmente podem facilitar o brotamento axonal e ser degradado mais eficientemente. Neste sentido o colágeno com organização supramolecular extraído do tendão bovino apresentou um padrão supra-estrutural consistindo de fibras orientadas.

Em pesquisa desenvolvida por Dubey *et al.*, (1999), foi estudado *in vitro* o efeito de um gel com fibras de colágeno alinhadas magneticamente durante a fibrilogenese. Como resultado, foi observado que a cultura de gânglio espinhal (sensitivo) sobre o gel promoveu o alongamento de neuritos quando o campo magnético aplicado foi maior.

Em outro trabalho, Ceballos *et al.*, (1999) testaram um gel de colágeno magneticamente alinhado no interior de um guia nervoso com a hipótese de aperfeiçoar a regeneração nervosa periférica. As amostras de nervos regenerados com o gel magneticamente alinhado apresentaram a formação de fascículos nervosos e, apesar do número de fibras mielínicas ser menor que as de um nervo normal, foi possível notar a rápida reabsorção do implante de colágeno.

Em contraste, considera-se que o colágeno submetido a diferentes tratamentos pode não se apresentar auto-organizado em fibras orientadas helicilmente (Oliveira *et al.*, 2005). O colágeno com organização supramolecular utilizado neste trabalho, por meio do seu método de produção, não apresenta alterações em sua supra-estrutura e, por assim ser, mantém a organização natural de fibras/feixes no seu arranjo helical.

Nossos resultados analisados pela imunocitoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstraram que é possível desenvolver a cultura primária de células de Schwann sobre o colágeno supra-organizado. Apesar dos nossos experimentos apresentarem

menor número de células sobre o colágeno comparado ao grupo controle, estas aparentaram se comportar fisiologicamente bem, expressando componentes da lâmina basal (colágeno IV, laminina I e laminina II) e se ajustando nas camadas do substrato. Além disso, o colágeno com organização supramolecular denota influenciar a reação das células de Schwann em contato com o mesmo, traduzido pelas adaptações morfológicas dessas células nos experimentos realizados.

Um aspecto importante ressaltado por Pierucci *et al.*, (2008) com relação a cultura de células de Schwann é que sua morfologia pode variar de acordo com a superfície onde são cultivadas. Estes autores relataram que as células de Schwann cultivadas em uma membrana hidrofóbica exibiram diferentes morfologias, podendo refletir negativamente na síntese de fatores neurotróficos e na proliferação celular. Interessantemente, a morfologia das células cultivadas em nossa pesquisa exibiu o padrão típico das células de Schwann, além de outras formas. Mas o que chamou a atenção foram os prolongamentos das células de Schwann, os quais se mostraram bem mais longos com comunicações entre si e se ajustando e se amoldando ao relevo do colágeno, sugerindo melhor aderência e coaptação destas células sobre o substrato. E deste modo, as células de Schwann cultivadas sobre o colágeno com organização supramolecular ainda foram capazes de expressar os componentes da matriz extracelular da mesma forma que as células cultivadas sobre a placa de cultura (controle).

Sustentando o conceito de que um implante alinhado favorece a regeneração nervosa periférica, Hadlock *et al.*,(2000) desenvolveram um trabalho utilizando um implante de colágeno orientado longitudinalmente por 5 canais associado à introdução de células de Schwann com a técnica de tubulização. O material foi implantado em um espaço de 7mm (medida semelhante a deste trabalho) entre os cotos do nervo isquiático de ratos Fisher. Já a regeneração axonal foi avaliada 6 semanas pós-operatório na região central do tubo para ser comparada com o

autoenxerto. Como resultado, a porcentagem de tecido nervoso pela área de secção transversa do grupo com o implante de colágeno com canais obteve a média de $26,3 \pm 10,1\%$ comparado com o autoenxerto, $23,8 \pm 3,6\%$. Ainda, as células de Schwann estavam presentes nos canais vistos com a coloração de azul de toluidina em secções histológicas longitudinais.

Todavia, os autores supracitados não trouxeram dados importantes relacionados ao comportamento das células de Schwann como a EBM e a RZG. Em nosso estudo obtivemos diferenças significativas com relação à espessura da bainha de mielina no grupo TPCLF e na ocorrência de uma igualdade intergrupos no intervalo de frequência $0,76$ a $0,85\mu\text{m}$ com relação à RZG.

Com o gel de colágeno magneticamente alinhado, Ceballos *et al.*, (1999) testaram em um período de 60 dias em camundongos a influência do alinhamento deste na regeneração nervosa periférica através técnica de tubulização. Os valores médios alcançados com relação à área de secção transversa para todos os animais com o implante do gel de colágeno magneticamente alinhado foram maiores que os grupos que não apresentavam o implante. A contagem de fibras mielínicas regeneradas foi significativamente maior comparado aos grupos controle, porém a espessura da bainha de mielina foi menor comparado aos grupos sem o gel alinhado.

Nossos dados apóiam os resultados com relação à área do nervo e o número de fibras regeneradas, sendo também maiores que o tubo de polietileno (TP). Mas, quando comparamos a espessura da bainha de mielina, nossos valores divergem no sentido de que esta mensuração foi significativamente maior no grupo com o implante de colágeno com organização supramolecular (TPCLF) nos maiores intervalos de frequência. Isto também pôde ser notado em nossos experimentos analisados pela microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de

polarização, o qual, além de revelar maior espessura da bainha de mielina, permitiu uma análise pormenorizada da organização no nervo normal e no nervo em regeneração.

No nervo normal pôde ser notada uma supra-organização ondulada (formando crimps) semelhante a tendões e cordas tendíneas (Vidal, 2003; Vidal & Mello, 2008; Vidal & Mello, 2009). Isto indica que o estado do colágeno no microambiente do nervo periférico proporciona, além do seu papel estrutural, uma função diretora no ordenamento/direcionamento dos axônios dentro do feixe nervoso. Um arranjo ainda não descrito em nervos periféricos. Com o implante de colágeno com organização supramolecular, o microambiente do nervo como um todo se mostrou mais compactado/organizado por mini-fascículos formados por colágeno melhor distribuído e células perineurais. Além de possuir quantidade relativamente menor de matriz extracelular e manifestar um padrão direcionado para o nervo normal.

Talvez, com o suporte estrutural cedido pelo implante de colágeno com organização supramolecular, as células de Schwann tiveram seu processo migratório antecipado e otimizado, intensificando sua ação durante o processo regenerativo localmente. Para somar a esta hipótese, nossos dados de imunistoquímica através da marcação com o anticorpo anti-p75NTR demonstrou maior reatividade das células de Schwann no grupo TPCLF durante o processo regenerativo, indicando, novamente, que as células de Schwann sofreram influência do implante de colágeno com organização supramolecular no processo regenerativo.

Tipicamente, materiais de implantes biológicos biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis com degradação *in vivo* têm efeitos marcantes sobre a resposta local e eventos de remodelação que determinam o resultado de eventos clínicos. O pequeno tempo de implantação de implante de matriz extracelular comumente apresenta uma diminuição na resistência que é temporariamente associada com a rápida degradação *in vivo* do implante. A degradação ocorre

rapidamente com quase 50% do implante degradado em 1 mês e a degradação completa em torno de 3 meses (Badylak *et. al.*, 2009). Nos experimentos realizados nesta pesquisa, o implante de colágeno com organização supramolecular após 60 dias implantados não foi percebida no microambiente do nervo regenerado. Isto pode ser estimável, pois segundo estes autores a degradação fornece a percepção sobre o ritmo de produção de nova matriz e, durante a remodelação, a degradação do implante ocorre rapidamente. Neste passo, a matriz extracelular recém formada tem a oportunidade de se organizar totalmente em conjunto com a diminuição inicial da resistência do implante.

Tendo-se em vista o acima discutido, acreditamos que a técnica de tubulização aliada ao emprego de moléculas naturalmente organizadas da matriz extracelular demonstrou ser uma abordagem admissível no campo da reconstituição nervosa periférica. O processo regenerativo sobrevivendo do implante de colágeno com organização supramolecular surtiu de forma dinâmica, permitindo a regeneração axonal enquanto nova matriz extracelular foi formada e o implante reabsorvido, presumindo que a reorganização do microambiente do nervo em regeneração progredia para um modelo mais próximo do nervo isquiático ileso. O implante de colágeno com organização supramolecular teve uma relação ativa com as células de Schwann influenciando/estimulando incisivamente o comportamento destas células tanto *in vitro* como *in vivo*.

O presente estudo abre, portanto, novas perspectivas para o emprego de moléculas com organização supramolecular no processo de regeneração nervosa. Neste sentido, novos estudos utilizando diferentes tipos celulares associados a essa matriz colagênica, tais como células gliais e mesmo células tronco adultas, serão realizados em nosso laboratório no sentido de otimizar o processo regenerativo e a recuperação funcional após axotomia periférica.

7 *Conclusões*

1) O colágeno com organização supramolecular apresentou predominantemente a aparência de uma estrutura organizada em camadas sobrepostas ora mais ora menos compactadas com grande variação na disposição e conformação dos poros.

2) As células de Schwann cultivadas sobre o colágeno com organização supramolecular apresentavam a morfologia variada desde seu padrão típico à formas ovóides com grandes prolongamentos tortuosos e múltiplos, estabelecendo comunicações entre si, sugerindo melhor aderência e coaptação destas células sobre o substrato.

3) As células de Schwann foram capazes de sintetizar os componentes da lâmina basal quando cultivadas sobre o colágeno com organização supramolecular.

4) As fibras nervosas regeneradas do grupo AE foi superior aos grupos TP, TPCL e TPCLF. O grupo TP obteve menor número de fibras regeneradas em relação aos grupos TPCL e TPCLF.

5) O tubo de poli caprolactona (PCL) aliado ao colágeno com organização supramolecular proporcionou melhor organização do microambiente do nervo durante o processo regenerativo. Em especial, a espessura da bainha de mielina mostrou-se superior nestes axônios em relação aos grupos sem o implante de matriz extracelular.

6) O nervo periférico normal demonstrou haver uma supra-organização. O padrão ondulado do nervo como um todo indica que as fibras colágenas circundam as fibras nervosas com uma composição helical tridimensional, cumprindo não só um papel estrutural, mas também uma função no ordenamento/direcionamento dos axônios dentro do feixe nervoso, um dado não descrito até então em nervos periféricos.

7) No grupo TPCLF a amplitude da birrefringência do colágeno destas amostras foi visualmente mais elevada e as fibras apresentavam-se mais justapostas indicando um padrão

próximo ao do nervo normal. A disposição mais agregada destes elementos, como resultado do implante do colágeno com organização supramolecular sugere um estágio de organização tecidual mais avançado em relação aos demais grupos experimentais.

8) A imunomarcção, realizada em cortes longitudinais dos nervos regenerados, demonstrou a expressão dos anticorpos anti-S-100, anti-colágeno IV, anti-laminina e anti-neurofilamento em todos os grupos. Por meio do anticorpo anti-p75NTR foi constatada a reatividade das células de Schwann havendo maior intensidade da imunomarcção de expressão dos componentes S-100, colágeno IV, lamininas e neurofilamentos no grupo TPCLF.

8

Figuras e tabelas

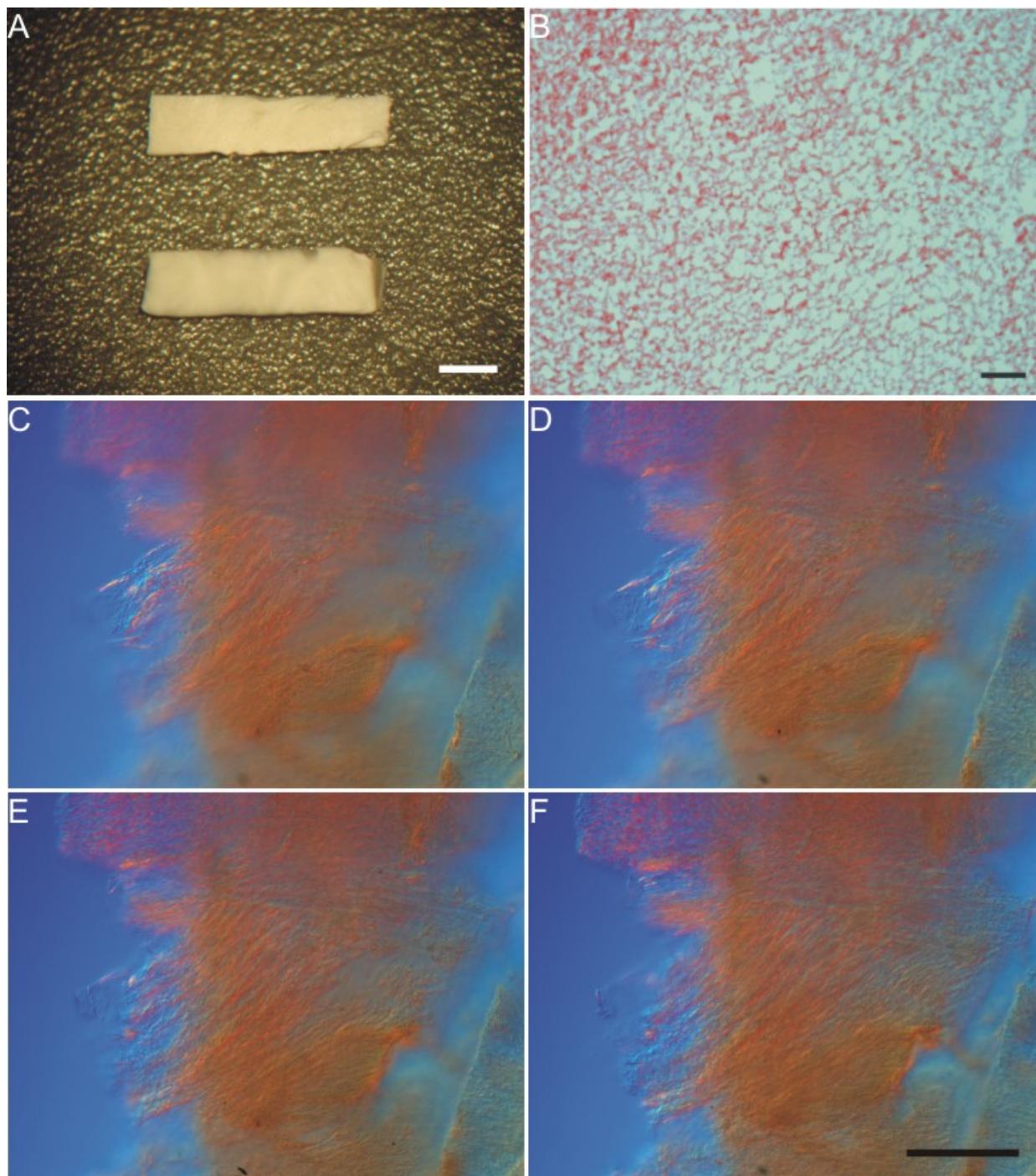


Figura 1 – Caracterização do colágeno com organização supramolecular. (A) Fragmento de colágeno utilizado pré-implante *in vivo*. Escala=1mm. (B) Fotomicrografia de um corte transversal do colágeno com organização supramolecular sob microscopia de luz. Escala=100 μ m. (C-F) Amostras do colágeno com organização supramolecular observados em diferentes profundidades de foco, da superfície para profundidade. Escala=100 μ m.

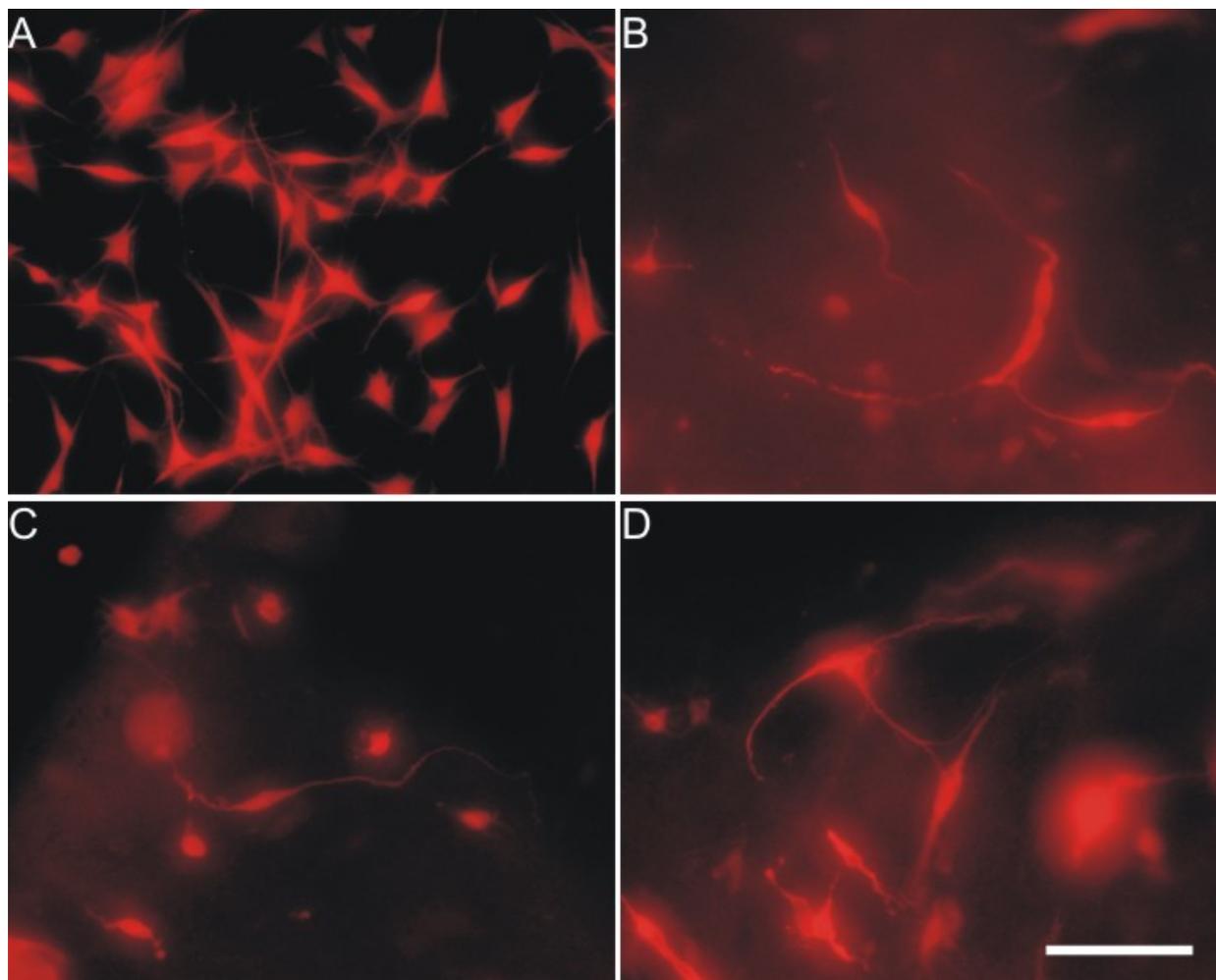


Figura 2 – (A) Imunocitoquímica em cultura purificada de células de Schwann utilizando o anticorpo anti-S-100 cultivadas 4 dias em meio proliferativo a 10% de soro fetal bovino (SFB) sobre a placa de cultura (controle) e (B-D) sobre o colágeno com organização supramolecular. Escala=100 μ m.

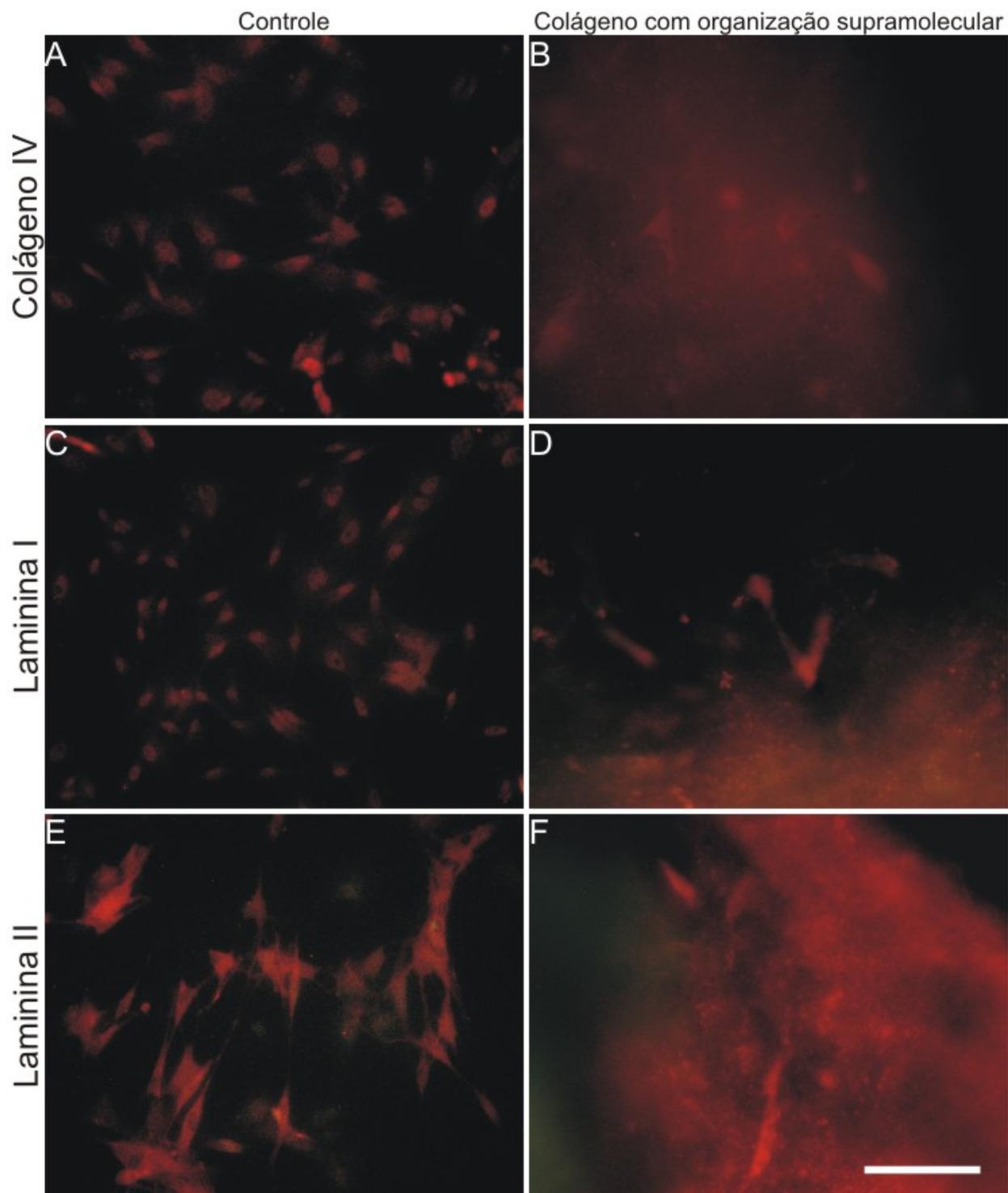


Figura 3 – Imunocitoquímica em cultura purificada de células de Schwann utilizando os anticorpos anti-colágeno IV, anti- $\alpha 1\beta 1$ (para laminina tipo I), anti- $\alpha 2\beta 1$ (para laminina tipo II) cultivadas 4 dias em meio proliferativo a 10% de soro fetal bovino (SFB), (A, C e E) sobre a placa de cultura (controle) e (B, D e F) sobre o colágeno com organização supramolecular. Escala=100 μ m.

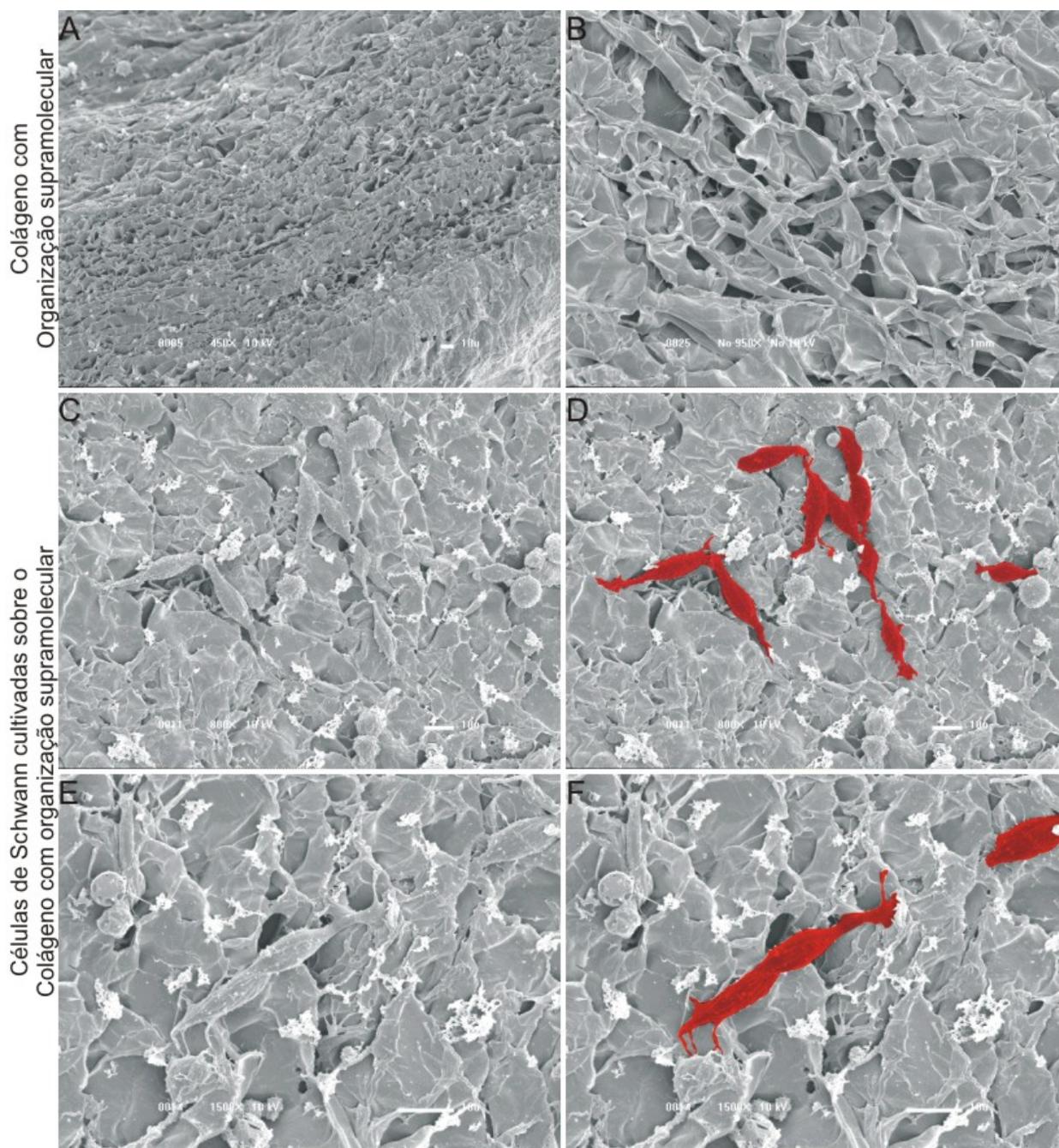


Figura 4 – (A-B) Micrografia eletrônica de varredura do colágeno com organização supramolecular. (C-F) Exemplos representativos de células de Schwann cultivadas sobre o colágeno, (D) representa a micrografia colorizada de (C) enquanto que (F) representa a micrografia colorizada de (E). Escala=10μm.

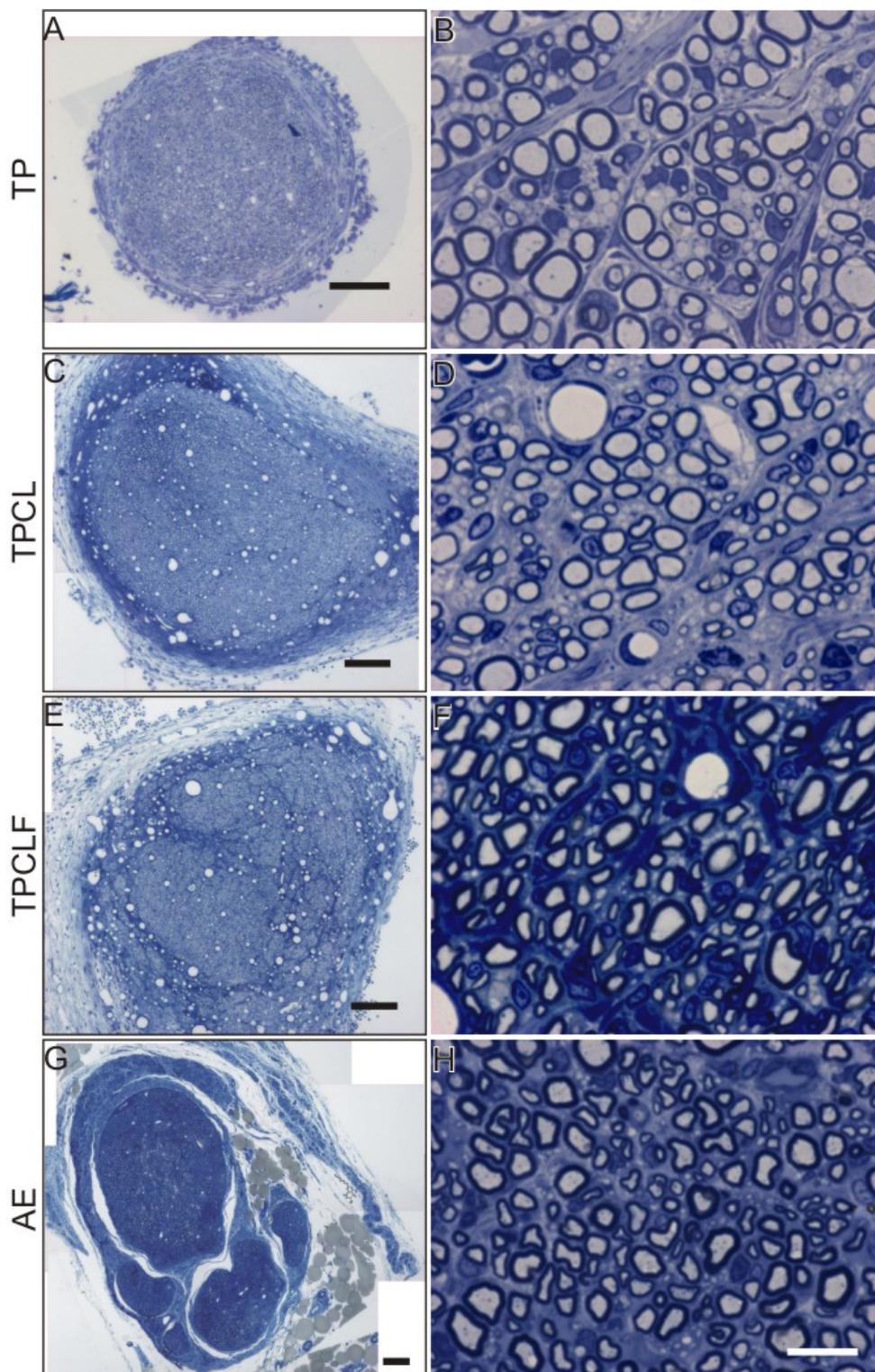


Figura 5 – Vista panorâmica dos nervos regenerados observados por microscopia de luz 60 após a tubulização. TP, implante do tubo de polietileno (A e B), TPCL, implante do tubo de poli caprolactona (PCL) vazio (C e D), TPCLF, implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular (E e F) e AE, autoenxerto de nervo periférico (G e H). Escala=100 μ m.

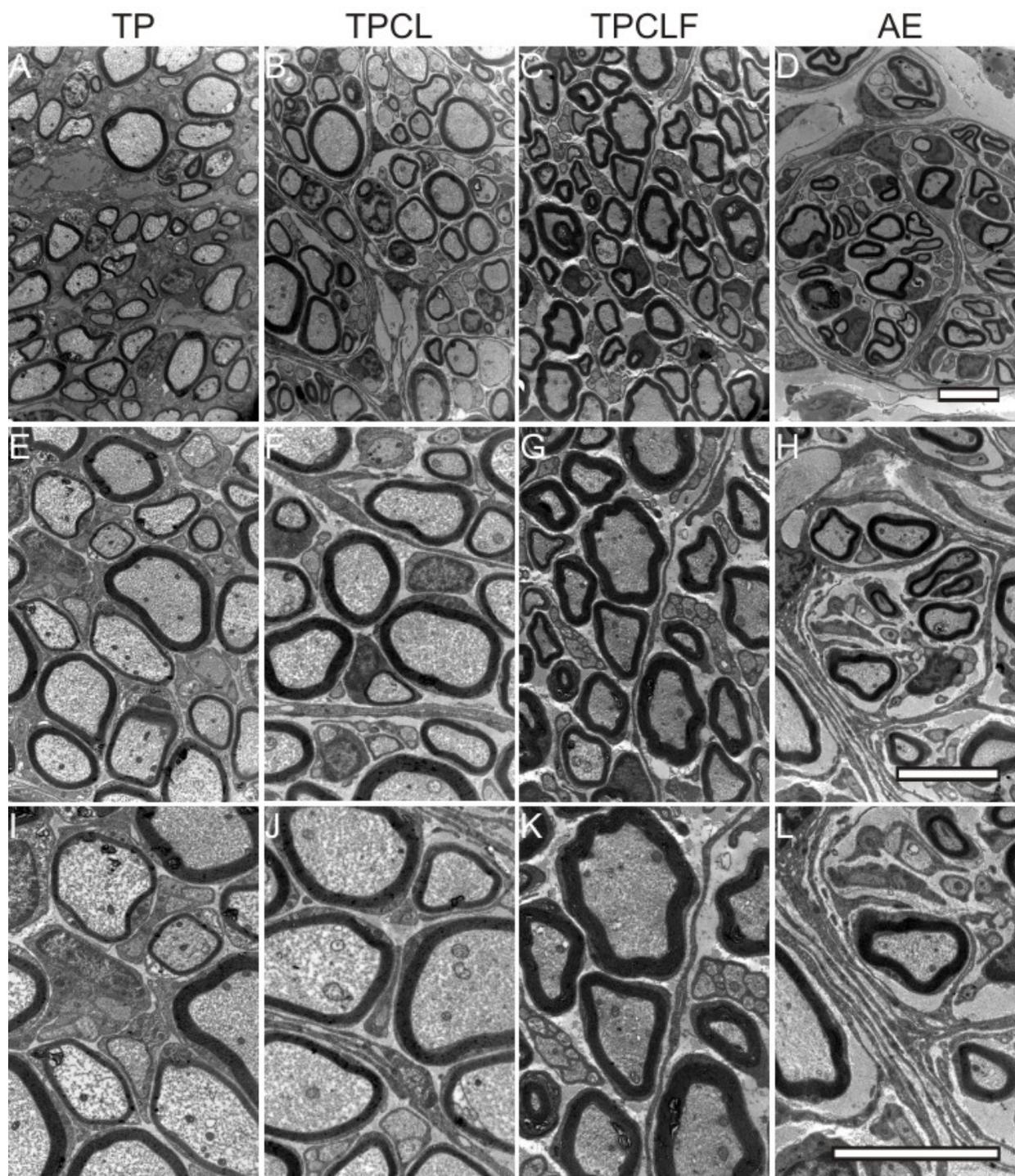


Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão nos diferentes grupos experimentais 60 dias após a tubulização em diferentes aumentos. TP, implante do tubo de polietileno (A, E e I), TPCL, implante do tubo de poli caprolactona vazio (B, F e J), TPCLF, implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular (C, G e K) e AE, autoenxerto de nervo periférico (D, H e L). Escala=5 μ m.

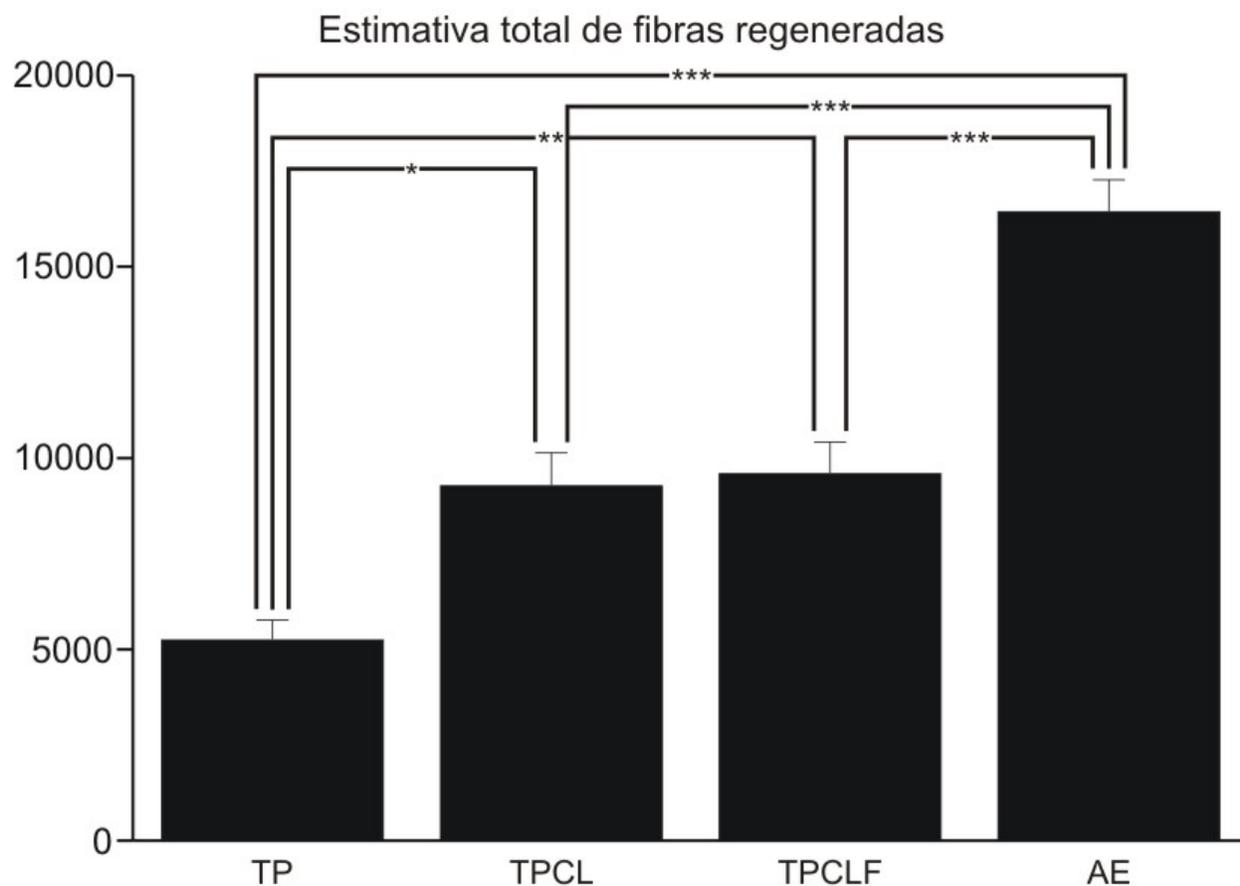


Figura 7 – Estimativa de fibras regeneradas nos diferentes grupos experimentais 60 dias pós-cirúrgicos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ – teste “t” de student e teste “u” de Mann-Whitney). TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

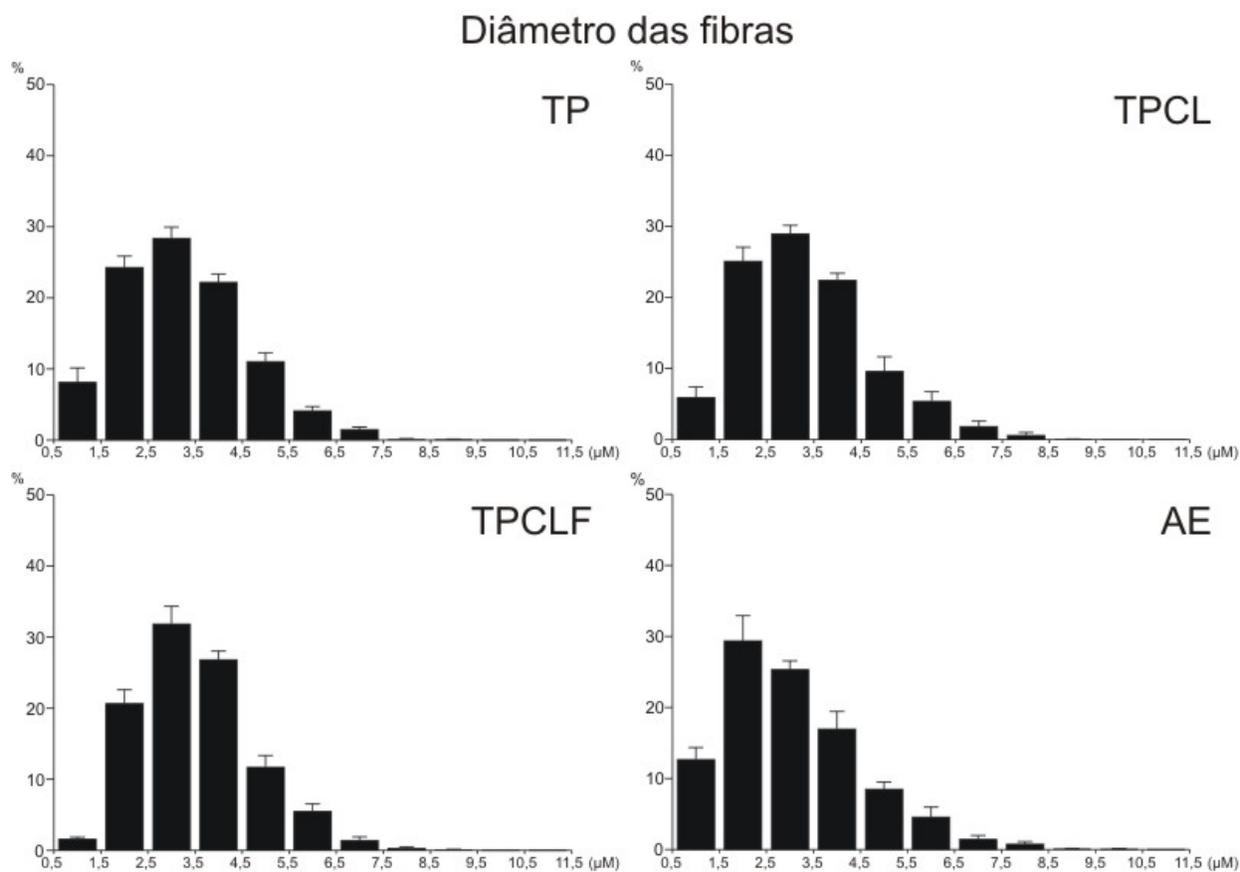


Figura 8 – Distribuição de frequência do diâmetro das fibras (DF) regeneradas nos diferentes grupos experimentais, 60 dias pós-cirúrgicos. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

Tabela 1 – Distribuição de frequência do diâmetro das fibras (DF) regeneradas nos diferentes grupos experimentais.

TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

<i>Intervalo de frequência (μm)</i>	<i>Média em porcentagem e erro padrão</i>			
	<i>TP</i>	<i>TPCL</i>	<i>TPCLF</i>	<i>AE</i>
0,5 – 1,5	8,14±2	5,95±1,45	1,6±0,26	12,68±1,68
1,51 – 2,5	24,3±1,57	25,1±1,94	20,67±1,91	29,4±3,52
2,51 – 3,5	28,42±1,53	28,95±1,17	31,87±2,44	25,35±1,19
3,51 – 4,5	22,2±1,15	22,45±0,94	26,85±1,16	17±2,43
4,51 – 5,5	11±1,22	9,61±2,02	11,71±1,62	8,52±0,98
5,51 – 6,5	4,14±0,57	5,4±1,32	5,5±1,02	4,6±1,36
6,51 – 7,5	1,51±0,31	1,85±0,72	1,41±0,49	1,46±0,51
7,51 – 8,5	0,11±0,07	0,6±0,39	0,29±0,19	0,78±0,32
8,51 – 9,5	0,08±0,05	0,03±0,03	0,07±0,07	0,1±0,06
9,51 – 10,5	-	-	-	0,06±0,06

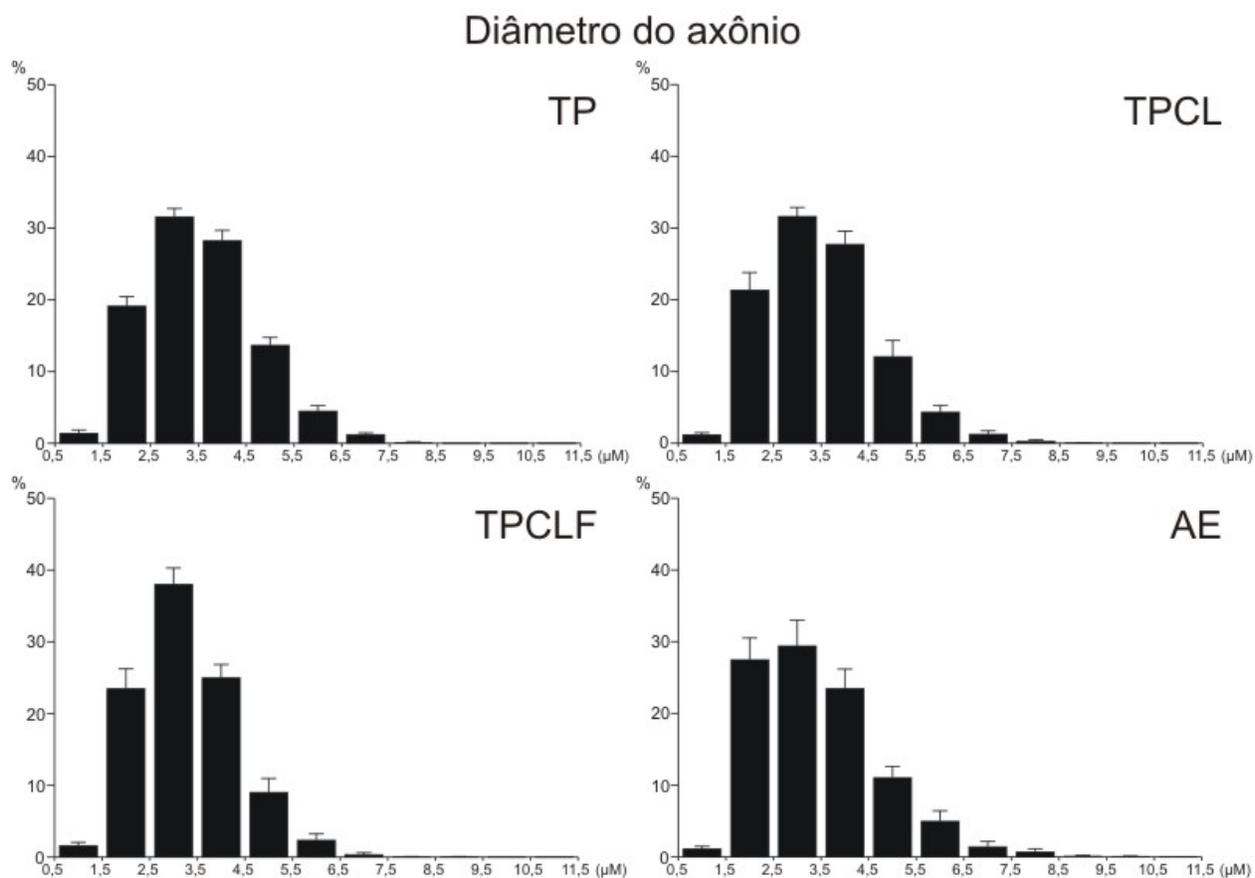


Figura 9 – Distribuição da frequência do diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) dos nervos regenerados nos diferentes grupos experimentais, 60 dias pós-cirúrgicos. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

Tabela 2 – Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) regeneradas nos diferentes grupos experimentais. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

<i>Intervalo de frequência (μm)</i>	<i>Média em porcentagem e erro padrão</i>			
	<i>TP</i>	<i>TPCL</i>	<i>TPCLF</i>	<i>AE</i>
0,5 – 1,5	1,41±0,44	1,18±0,28	1,6±0,46	1,14±0,33
1,51 – 2,5	19,1±1,32	21,38±2,4	23,5±2,73	27,5±3,02
2,51 – 3,5	31,6±1,14	31,63±1,23	38,03±2,26	29,43±3,58
3,51 – 4,5	28,26±1,41	27,75±1,8	25±1,82	23,5±2,67
4,51 – 5,5	13,68±1,06	12,09±2,23	9,04±1,93	11,05±1,54
5,51 – 6,5	4,51±0,72	4,34±0,92	2,37±0,86	4,97±1,44
6,51 – 7,5	1,23±0,22	1,27±0,46	0,36±0,25	1,43±0,73
7,51 – 8,5	0,12±0,05	0,27±0,23	0,03±0,03	0,71±0,41
8,51 – 9,5	-	0,03±0,03	0,03±0,03	0,16±0,07
9,51 – 10,5	-	-	-	0,06±0,06

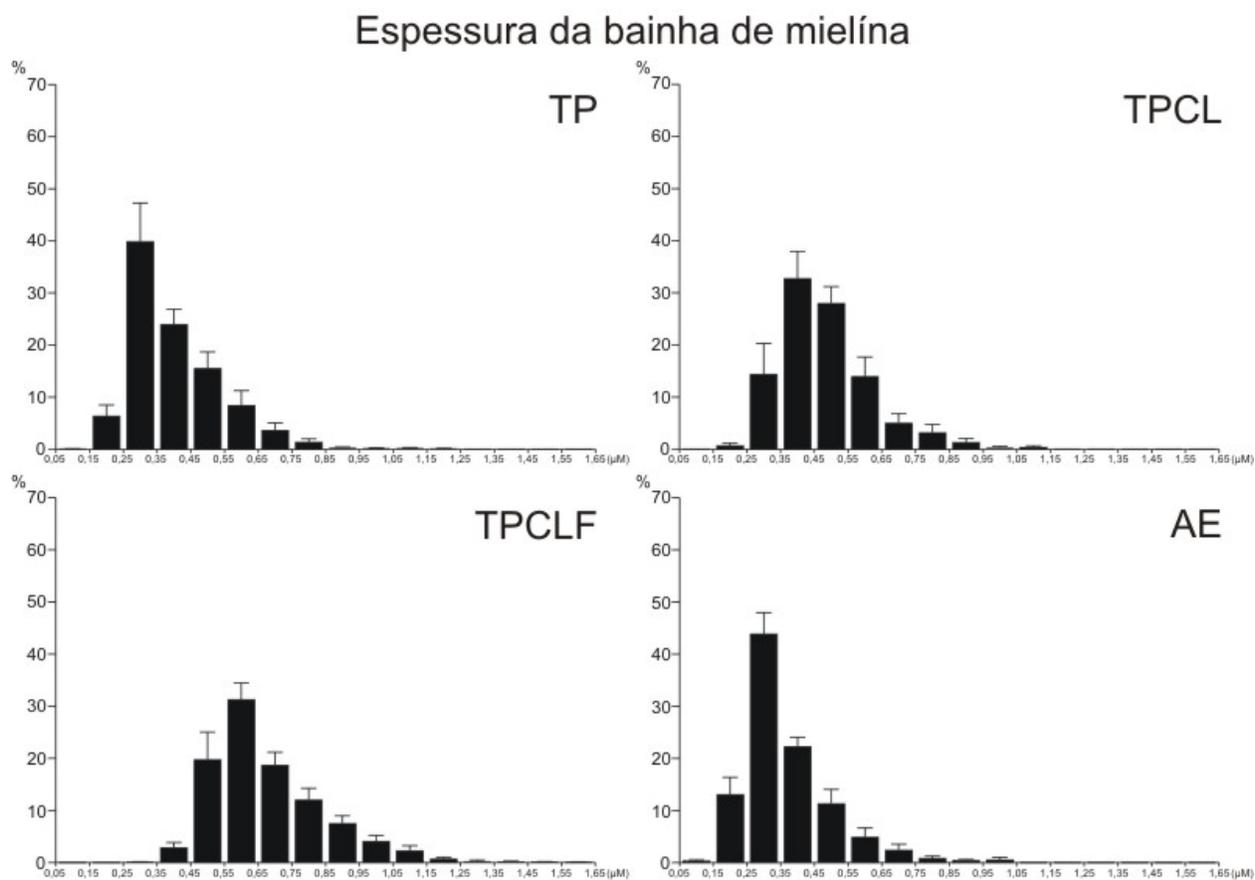


Figura 10 – Distribuição da freqüência da espessura da bainha de mielina (EBM) dos nervos regenerados nos diferentes grupos experimentais, 60 dias pós-cirúrgicos. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

Tabela 3 – Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM) dos nervos regenerados nos diferentes grupos experimentais. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

<i>Intervalo de frequência (μm)</i>	<i>Média em porcentagem e erro padrão</i>			
	<i>TP</i>	<i>TPCL</i>	<i>TPCLF</i>	<i>AE</i>
0,05 – 0,15	0,03±0,03	-	-	0,34±0,18
0,16 – 0,25	6,38±2,1	0,7±0,4	-	13,07±3,3
0,26 – 0,35	39,89±7,38	14,4±5,9	0,09±0,04	43,89±4,06
0,36 – 0,45	23,96±2,87	32,74±5,2	2,88±0,95	22,27±1,76
0,46 – 0,55	15,51±3,15	27,97±3,19	19,75±5,26	11,32±2,71
0,56 – 0,65	8,44±2,78	13,95±3,73	31,3±3,14	4,87±1,74
0,66 – 0,75	3,64±1,37	5,01±1,78	18,7±2,44	2,4±1,13
0,76 – 0,85	1,37±0,61	3,16±1,59	12,02±2,23	0,85±0,37
0,86 – 0,95	0,32±0,09	1,31±0,73	7,5±1,46	0,39±0,2
0,96 – 1,05	0,15±0,07	0,32±0,2	4,09±1,11	0,54±0,45
1,06 – 1,15	0,19±0,12	0,39±0,24	2,3±0,92	-
1,16 – 1,25	0,07±0,07	-	0,68±0,34	-
1,26 – 1,35	-	-	0,3±0,18	-
1,36 – 1,45	-	-	0,17±0,11	-
1,46 – 1,55	-	-	0,1±0,06	-
1,56 – 1,65	-	-	0,06±0,06	-

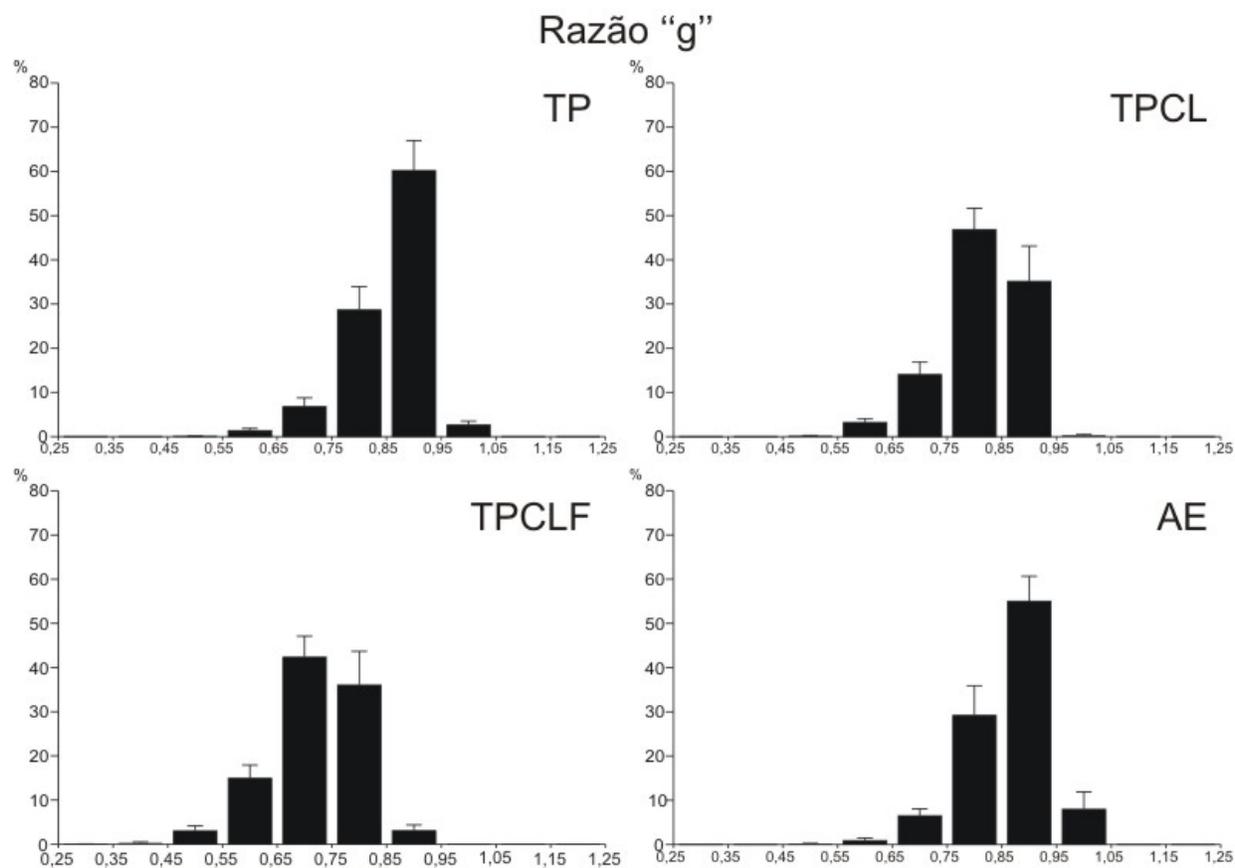


Figura 11 – Distribuição da frequência razão “g” (RZG) dos experimentos realizados nos diferentes grupos experimentais, 60 dias pós-cirúrgicos. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

Tabela 4 – Distribuição de frequência da razão “g” (RZG) dos nervos regenerados nos diferentes grupos experimentais. TP – implante do tubo de polietileno, TPCL – implante do tubo de poli caprolactona vazio, TPCLF – implante do tubo de poli caprolactona preenchido com colágeno com organização supramolecular e AE – autoenxerto de nervo periférico.

<i>Intervalo de frequência (μm)</i>	<i>Média em porcentagem e erro padrão</i>			
	<i>TP</i>	<i>TPCL</i>	<i>TPCLF</i>	<i>AE</i>
0,25 – 0,35	-	-	0,03±0,03	-
0,36 – 0,45	-	-	0,33±0,19	-
0,46 – 0,55	0,07±0,04	0,2±0,09	3,05±1,09	0,15±0,11
0,56 – 0,65	1,41±0,44	3,26±0,74	14,98±2,93	0,93±0,51
0,66 – 0,75	6,84±1,91	14,11±2,74	42,39±4,72	6,54±1,48
0,76 – 0,85	28,7±5,23	46,89±4,75	36,08±7,59	29,25±6,63
0,86 – 0,95	60,24±6,72	35,19±7,91	3,11±1,27	55,09±5,56
0,96 – 1,05	2,67±0,81	0,32±0,15	-	8±3,9

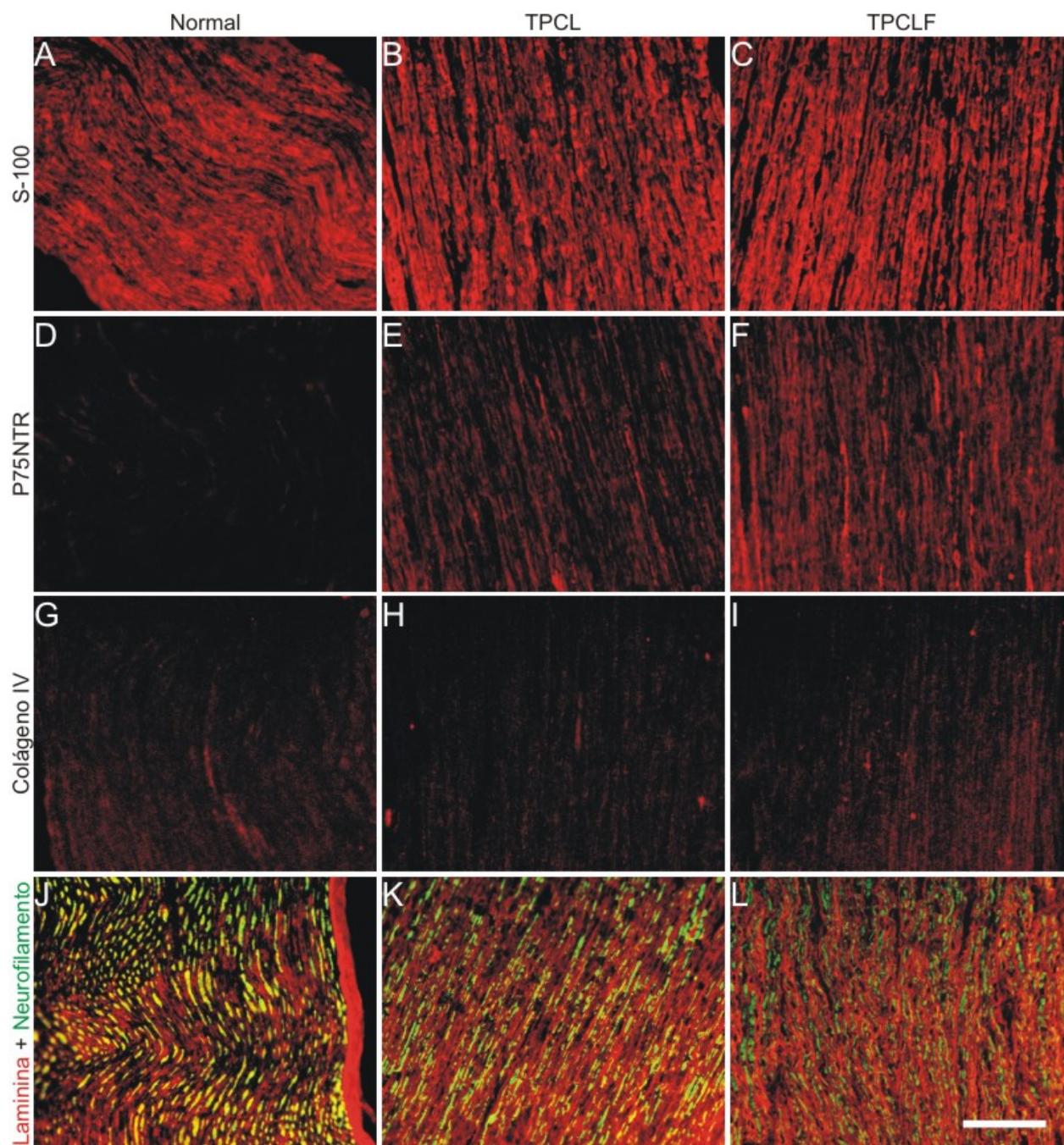


Figura 12 – Imunoistoquímica dos grupos normal (A, D, G e J), TPCL (B, E, H e K) e TPCLF (C, F, I e L), 60 pós-cirúrgicos utilizando os anticorpos anti-S-100 (A-C), anti-p75NTR (D-F), anti-colágeno IV (G-I) e a dupla marcação com os anticorpos anti-laminina e anti-neurofilamento (letras J-L). Escala=100 μ m.

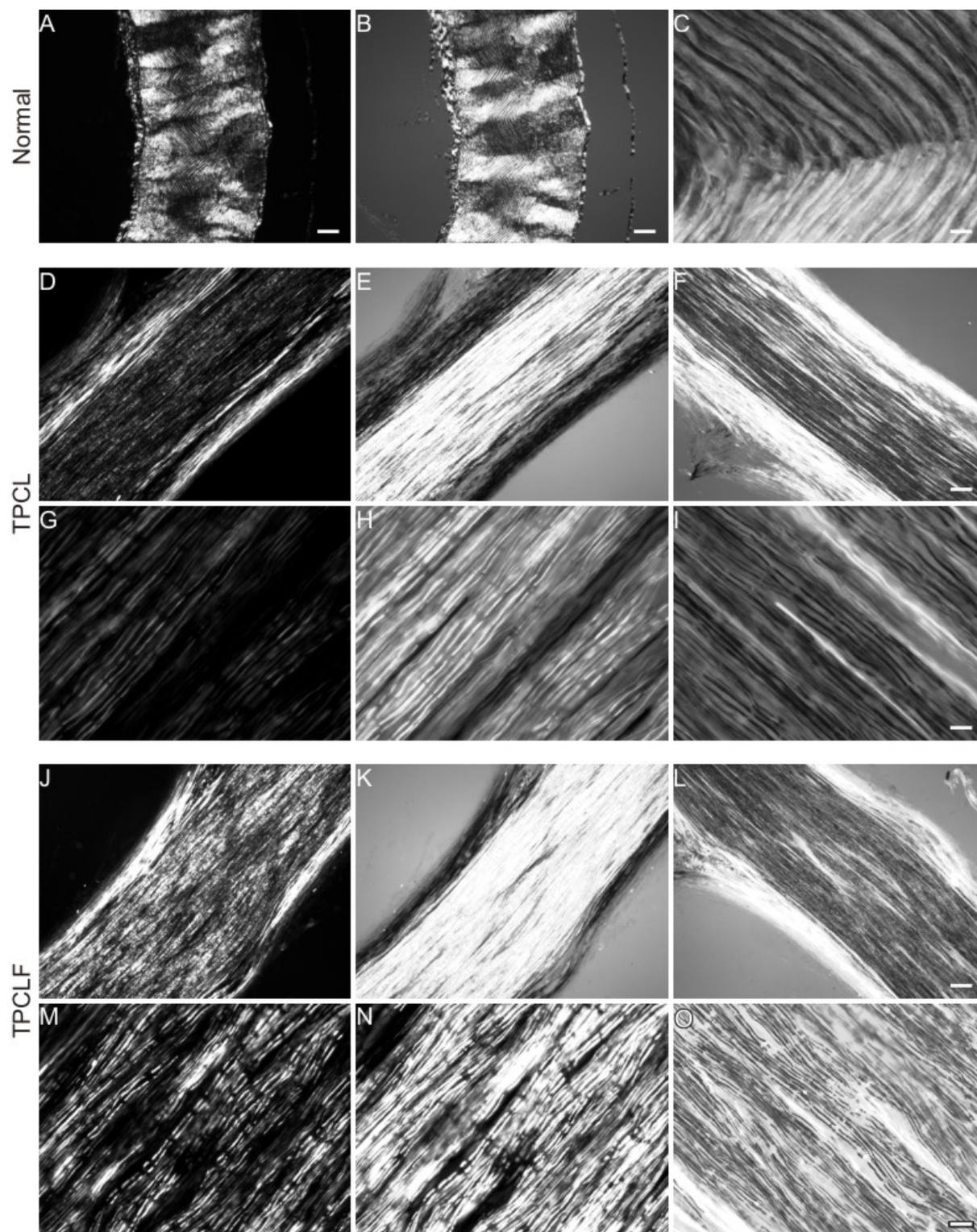


Figura 13 – Análise de birrefringência do nervo isquiático sob microscopia de polarização nos grupos normal (A-C), TPCL (D-I) e TPCLF (J-O). Birrefringência do nervo como um todo (A, D, G, J e M). Compensação da birrefringência para o colágeno (B, C, E, H, K e N). Compensação da birrefringência para a mielina (letras B, C, F, I, L e O). Escalas=10 μ m e 100 μ m.

9

Referências bibliográficas

1. Abernethy, DA; Thomas, PK; Rud, A; King, RH. 1994. Mutual attraction between emigrant cells from transected denervated nerve. *J. Anat.* 184(Pt 2): 239-249.
2. Aldini, NN; Perego, G; Cella, GD; Maltarello, MC; Fini, M; Rocca, M; Giardino, R. 1996. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials* 17(10): 959-962.
3. Alluin, O; Wittmann, C; Marqueste, T; Chabas, JF; Garcia, S; Lavaut, MN; Guinard, D; Feron, F; Decherchi, P. 2009. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. *Biomaterials*. 30: 363-373.
4. Assouline, JG; Bosch, EP; Lim, R. 1983. Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve: an immunoselective method using surfaces coated with anti-immunoglobulin antibodies. *Brain Res.* 277(2): 389-392.
5. Badylak, SF; Freytes, DO; Gilbert, TW. 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomaterialia* 5: 1-13.
6. Barker, RA. & Widner, H. 2004. Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx*. 1(4): 472-481.
7. Barnes, DM. 1985. What makes nerves regenerate? Many experimental strategies revolve around a central issue: What conditions promote regeneration and functional recovery in mammalian nerves? *Science* 230(4729): 1024-1025.
8. Bloch, J; Fine, EG; Bouche, N; Zurn, AD; Aebischer, P. 2001. Nerve growth factor- and neurotrophin-3- releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. *Exp. Neurol.* 172(2): 425-432.
9. Bozkurt, A; Deumens, R; Beckmann, C; Damink, LO; Heschel, FSI; Sellhaus, B; Weis, J; Jahnen-Dechent, W; Brook, GA; Pallua, N. 2009. In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructure nerve guide with longitudinal guidance channels. *Biomaterials*. 30: 169-179.
10. Brockes, JP; Fields, KL; Raff, MC. 1979. Studies on culture rat Schwann cell. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165(1): 105-128.
11. Bruck, W. 1997. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 7(2): 741-752.

12. Bryan, DJ; Tang, JB; Holway AH; Rieger-Christ KM; Trantolo DJ; Wise DL; Summerhayes IC. 2003. Enhance peripheral nerve regeneration elicited by cell-mediated events delivered via a bioresorbable PLGA guide. *J. Reconstr. Microsurg.* 19(2): 125-134.
13. Bunting, S; Di Silvio, L; Deb, S; Hall, S. 2005. Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration. *Hand Surg. [Br]*. 30(3): 242-247.
14. Buti, M; Verdu, E; Labrador, RO; Vilches, JJ; Fores, J; Navarro, X. 1996. Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Exp. Neurol.* 137(1): 26-33.
15. Brockes, JP; Fields, KL; Raff, MC. 1979. Studies on culture rat Schwann cell. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165(1): 105-128.
16. Ceballos, D; Navarro, X; Dubey, N; Wendelschafer-grabb G; Kennedy, WR; Tranquillo, RT. 1999. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improve peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 158(2): 290-300.
17. Cheng, C & Zochodne, DW. 2002. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience* 115(1): 321-329.
18. Chernousov, MA & Carey, DJ. 2000. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol. Histopathol.* 15(2): 593-601.
19. Da Silva, CF; da Gama, SA; Júnior, RM; Pereira, FC. 2003. Influence of highly purified of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration in vivo. *Braz. J. of Morfol. Sci.* 20(2): 121-124.
20. Dubey, N; Letourneau, PC; Tranquillo, RT. 1999. Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology.* 158: 338-350.
21. Evans, GR; Brandt, K; Katz, S; Chauvin, P; Otto, L; Bogle, M; Wang, B; Meszlenyi, RK; Lu, L; Mikos, AG; Patrick, CW Jr. 2002. Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seed with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 23(3): 841-848.

22. Evans, GR; Brandt, K; Widmer, MS; Lu, L; Meszlenyi, RK; Gupta, PK; Mikos, AG; Hodges, J; Williams, J; Gurlek, A; Nabawi, A; Lohman, R; Patrick, CW Jr. 1999. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 20(12): 1109-1115.
23. Fields, RD; Le Beau, JM; Longo, FM; Ellisman, MH. 1989. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog. Neurobiol.* 33(2): 87-134.
24. Frisen J. 1997. Determinants of axonal regeneration. *Histol. Histopathol.* 12(3): 857-68.
25. Galla, TJ; Vedecnik, SV; Halbgewachs, J; Steinmann, S; Friedrich, C; Stark, GB. 2004. Fibrin/Schwann cell matrix in poly-epsilon-caprolactone conduits enhances guided nerve generation. *Int. J. Artif. Organs* 27(2): 127-36.
26. Garbay, B; Heape, AM; Sargueil, F; Cassagne, C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 61(3): 267-304.
27. Gelse, K; Pöschl, E; Aigner, T. 2003. Collagens – structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 55(12): 1531-1546.
28. Gilchrist, T; Glasby, MA, Healy, DM; Kelly, G; Lenihan, DV; McDowall, KL; Miller, IA; Myles, LM. 1998. In vitro nerve repair-in vivo. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradable glass tubes-a preliminary report. *Br. J. Plast. Surg.* 51(3): 231- 237.
29. Hadlock, T; Sundback, C; Hunter, D; Cheney, M; Vacanti, JP. 2000. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 6(2): 119-127.
30. Ide, C. 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.* 25(2): 101-121.
31. Jessen, KR & Mirsky, R. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.* 22(9): 402-410.
32. Keilhoff, G; Stang, F; Wolf, G; Fansa, H. 2003. Bio- compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* 24(16): 2779-2787.
33. Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, Vacanti CA, Vacanti MP, Igotz RA. 2004. Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit. *J. Neurosci. Methods* 134(2):133-40.

34. Koshimune, M; Takamatsu, K; Nakatsuka, H; Inui, K; Yamano, Y; Ikada, Y. 2003. Creating bioabsorbable Schwann cell coated conduits through tissue engineering. *Biomed. Mater. Eng.* 13(3): 223-229.
35. Labrador, RO; Buti, M; Navarro, X. 1995 Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery. *Neuroreport* 6(15): 2022-2026.
36. Labrador, RO; Butí, M, Navarro, X. 1998. Influence of collagen and laminin gels concentration nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp. Neurol.* 149(1): 243-252.
37. Landon, D & Hall, S. 1976. The myelinated nerve fiber. In: The peripheral nerve. Ed. D. N. Landon. London. Chapman and Hall, pp. 1-105.
38. Lenihan, DV; Carter, AJ; Gilchrist, T; Healy, DM; Miller, IA; Myles, LM; Glasby, MA. 1998. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. *J. Hand Surg. [Br].* 23(5): 588-93.
39. Lundborg, G. 1993. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *J. Hand Ther.* 6(3): 179-188.
40. Lundborg, G; Rosen, B; Abrahamson, SO; Dahlin, L; Danielsen, N. 1994. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J. Hand Surg.* 19(3): 273-276.
41. Lundborg, G; Rosen, L; Dahlin, L; Holmberg, J; Rosen, I. 2004. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg.* 29(2): 100-107.
42. Lunn, ER; Brown, MC; Perry, VH. 1990. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neurosci.* 35(1): 157-165.
43. Madison, RD. & Archibald, SJ. 1994. Point sources of Schwann cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons- Effects of freeze thawing. *Exp. Neurol.* 128 (2): 266-275.
44. Mayhew, TM & Sharma, AK. 1984. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 139(Pt 1): 59-66.

45. Milner, R; Wilby, M; Nishimura, S; Boylen, K; Edwards, G; Fawcett, J; Streuli, C; Pytela, R; French-Constant, C. 1997. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev. Biol.* 185(2): 215-228.
46. Navarro, X; Rodriguez, FJ; Ceballos, D; Verdu, E. 2003. Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries. *Med. Biol. Eng. Comput.* 41(2): 220-226.
47. Oliveira, ALR; Pierucci, A; Pereira, KB. 2004. Review: Peripheral nerve through the nerve tubulization technique. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(4): 225-231.
48. Oliveira, ALR; Vidal, BC; Langone F. 2005. Naturally supraorganized collagen increases axonal regeneration after tubulization repair. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22(3): 143-148.
49. Pereira Lopes, FR; Campos, LCM; Corrêa Jr., JD; Balduino, A; Lora, S; Langone, F; Borojevic, R; Martinez, AMB. 2006. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Experimental Neurology.* 198: 457-468.
50. Peters, A; Palay, S.L.; Webster, H. F. 1976. The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. *Philadelphia, Saunders*; pp: 406.
51. Pierucci, A; Duek, EAR; Oliveira, ALR. 2008. Peripheral nerve regeneration through biodegradable conduits prepared using solvent evaporation. *Tissue Engineering.* 14(5): 595-666.
52. Pierucci, A; Duek, EAR; Oliveira, ALR. 2009. Expression of basal lamina components by Schwann cells cultured on poly (lactic acid) (PLLA) and poly (caprolactone) (PCL) membranes. *J. Mater Sci: Mater Med.* 20: 489-495.
53. Pierucci, A; Faria, AM; Pimentel, ER; Santos, AR Jr.; Oliveira, ALR. 2004. Effects of agrican on Schwann cell migration *in vitro* and nerve regeneration *vivo*. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(3): 125-130.
54. Rezwani, K; Chen, QZ; Blaker, JJ; Boccaccini, AR. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27 (18): 3413-3431.
55. Rodríguez, FJ; Verdú, E; Ceballos, D; Navarro, X. 2000. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 161(2): 571-584.

56. Rutka, JT; Apodaca, G; Stern, R; Rosenblum, M. 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J. Neurosurg.* 69(2): 155-70.
57. Salonen, V; Peltonen, J; Roytta, M; Virtanen, I. 1987. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J. Neurocytol.* 16(5): 713-720.
58. Santos Jr, AR; Wada, ML; Langone, F; Oliveira, ALR. 2000. Differential schwann cell migration in adult and old mice: an in vitro study. *Brain Res.* 881(1): 73-76.
59. Schlosshauer, B; Muller, E; Schroder, B; Planck, H; Muller, HW. 2003. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res.* 963(1-2): 321-326.
60. Schmidt, CE & Leach, JB. 2003. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5: 293-347.
61. Spilker, MH; Asano, K; Yannas, IV; Spector, M. 2001. Contraction of collagen-glycosaminoglycan matrices by peripheral nerve cells in vitro. *Biomaterials* 22(10): 1085-1093.
62. Stoll, G; Jander, S; Myers, RR. 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7(1): 13-27.
63. Sundback, C; Hadlock, T; Cheney, M; Vacanti, J. 2003. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials* 24(5): 819-830.
64. Sunderland, S. 1990. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve* 13(9): 771-784.
65. Terenghi, G. 1999. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* 194(Pt 1): 1-14.
66. Timpl, R & Brown, JC. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18(2): 123-132.

67. Tonge, DA; Golding, JP; Edbladh, M; Kroon, M; Ekstrom, PE; Edstrom, A. 1997. Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. *Experimental Neurol.* 146(1): 81-90.
68. Vidal, BC. 1980. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Mol Biol.* 26: 415-21.
69. Vidal, BC. 2003. Image analysis fo tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron.* 34: 423-432.
70. Vidal, BC; Joazeiro, P. 2002. Electron microscopic determination of silver incorporation in collagen fibers as a model of organic-metal chiral supramolecular structure with optical anisotropic properties. *Micron.* 33: 507-509.
71. Vidal, BC; Melo, MLS. 2008. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta Histochemica.* 112: 53-61.
72. Vidal, BC; Melo, MLS. 2009. Structural of collagen fibers in chordate tendineae as assessed by optical anisotropic properties and fast fourier transform. *Journal of Structural Biology.* 167: 166-175.
73. Waller, AV. 1850. Experiments on the section of glossofaryngeal and hipoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 140: 423-429.
74. Wennersten, A; Holmin, S; Al Nimer, F; Meijer, X; Wahlberg, LU; Mathiesen, T. 2006. Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. *Exp. Neurol.* 199(2): 339-47.
75. Yannas, IV & Hill, BJ. 2004. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials* 25(9): 1593-1600.
76. You, SZ; Quek, CH; Yim, EKF; Lim, CT; Leong, KW. 2009. Collagen-based fibrous scaffold for spatial organization of encapsulated and seeded human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 30: 1-10.
77. Zochodne, DW. 2000. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl.* 9: 33-38.

Autorização da comissão de ética em experimentação animal (CEEA)

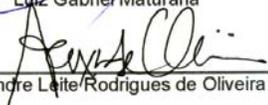
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "Emprego do colágeno com organização supramolecular na regeneração nervosa periférica *in vitro* e *in vivo*":

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

(X) tem autorização da seguinte Comissão de Bioética ou Biossegurança*: Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp, sob Protocolo(s) nº 1360-1.

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


 Luiz Gabriel Maturana

 Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Nome: 

Função:

Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
 Presidente
 Comissão de Ética na Experimentação Animal
 CEEA/IB - UNICAMP