

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Amauri Pierucci

Influência do agrecam sobre a migração das células de
Schwann *in vitro* e regeneração nervosa periférica *in*
vivo após transecção do nervo ciático

Tese 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

Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

P616i **Pierucci, Amauri**
Influência do agrecam sobre a migração das células de Schwann *in vitro* e
regeneração nervosa periférica *in vivo* após transecção do nervo ciático /
Amauri Pierucci. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Co-orientador: Edson Rosa Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia.

1. Matriz extracelular. 2. Proteoglicanos. 3. Cultura. 4. Sistema nervoso.
I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues. II. Pimentel, Edson Rosa.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 19 de Fevereiro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

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

Assinatura

Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto

Assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes

Assinatura

À Lucirléia, minha grande companheira,
agradeço por estar sempre ao meu lado,
apoiando-me em cada etapa da minha vida.
Retribuirei esse amor com várias conquistas
ao seu lado.

À minha família, agradeço pelo incentivo, apoio e ajuda. Foram fundamentais nessa conquista, devo a vocês o que sou hoje e onde chegarei.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, orientador e um grande amigo especial, agradeço-lhe por ajudar-me nos momentos decisivos de minha carreira, motivar-me na área da pesquisa, e sempre acreditar em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, co-orientador e grande amigo, passou-me tranquilidade e segurança para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço-lhe pela ajuda e cooperação na parte bioquímica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues Santos Júnior, grande amigo, agradeço-lhe pelo enorme auxílio na parte experimental da cultura de células.

Às Profas. Dras. Selma Candelária Genari e Mary Anne Heidi Dolder pela realização da pré-banca.

À Profa. Dra. Glauce pela realização da pré-banca e por ceder os anticorpos necessários para o desenvolvimento da tese.

Ao Cristiano Chagas e todos os membros do laboratório de patologia experimental pela amizade e auxílio técnico na realização das imunomarcações.

Aos técnicos e amigos Marcos Aurélio, Nori e Francisco pelo auxílio nos serviços de rotina para microscopia eletrônica, material fotográfico e pela confecção do gel e dosagens das amostras.

A Maria Antonia e Adriana do laboratório de microscopia eletrônica do IB pela realização dos cortes ultra-finos empregados na análise ultraestrutural deste trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Anatomia e Biologia Celular pelo incentivo e amizade nesta etapa de minha vida.

À CAPES e FAEP pela ajuda financeira.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	<i>xi</i>
Resumo.....	<i>xiii</i>
Abstract.....	<i>xv</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aspectos gerais.....	02
1.2 Estrutura do nervo periférico.....	03
1.3 Regeneração no SNP e SNC.....	05
1.4 Eventos após lesão do nervo periférico.....	06
1.5 Pré- degeneração.....	08
1.6 Aspectos sobre as células de Schwann.....	09
1.7 Fatores neurotróficos.....	11
1.8 Matriz extracelular.....	14
1.9 Proteoglicanos.....	17
OBJETIVOS.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Extração e purificação do agrecam.....	22
2.2 Dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs).....	22
2.3 Dosagem de proteínas.....	23
2.4 Precipitação e lavagem do agrecam.....	24
2.5 Preparação das amostras de agrecam para eletroforese.....	24
2.6 Montagem do gel.....	25
2.7 Eletroforese.....	26
2.8 Estudo <i>in vitro</i>	26
2.8.1 Cultura de explantes de nervo ciático e nervos pré-degenerados.....	26

	ix
2.8.2 Contagem de células.....	27
2.8.3 Imunocitoquímica.....	28
2.9 Estudo <i>in vivo</i>	28
2.9.1 Animais e grupos experimentais.....	28
2.9.2 Procedimentos para tubulização.....	29
2.9.3 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica.....	29
2.9.4 Processamento para imunoistoquímica.....	30
2.9.5 Morfometria e contagem das fibras regeneradas.....	31
2.9.6 Análise estatística.....	32
3. RESULTADOS.....	33
3.1. Dosagem de GAGs e proteínas do agrecam e eletroforese do gel de agarose-poliacrilamida.....	34
3.2. Estudo <i>in vitro</i>	34
3.2.1 Análise morfológica do nervo normal.....	34
3.2.2 Migração e viabilidade celular do nervo normal.....	34
3.2.3 Contraste de fase e imunomarcacão do nervo normal.....	35
3.2.4 Análise morfológica do nervo pré-degenerado.....	35
3.2.5 Migração e viabilidade do nervo pré-degenerado.....	36
3.2.6 Contraste de fase e imunomarcacão do nervo pré-degenerado.....	37
3.3 Estudo <i>in vivo</i>	37
3.3.1 Características morfológicas do nervo regenerado no interior do tubo vazio.....	37
3.3.2 Características morfológicas do nervo regenerado no interior do tubo preenchido com agrecam.....	38
3.3.3 Contagem dos axônios mielínicos.....	39
3.3.4 Parâmetros morfométricos.....	39

	x
3.3.4.1 Diâmetro dos axônios mielínicos.....	40
3.3.4.2 Diâmetro das fibras mielínicas.....	41
3.3.4.3 Espessura da bainha de mielina e razão “g”.....	42
4. DISCUSSÃO & CONCLUSÕES.....	44
5. FIGURAS E TABELAS.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO I.....	98

ABREVIATURAS

BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BPB	azul de bromofenol
BSA	Albumina de soro bovino
CNTF	fator neurotrófico ciliar
COL	colágeno
CS	condroitim sulfato
CS-4	condroitim sulfato 4
CSPG	proteoglicano de condroitim sulfato
Da	Dalton
DAM	diâmetro do axônio mielínico
DFM	diâmetro da fibra mielínica
DMMB	azul de dimetilmetileno
DRG	glânglio da raiz dorsal
EBM	espessura da bainha de mielina
EGF	fator de crescimento epidermal
FN	fibronectina
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
G1	domínio globular 1
G2	domínio globular 2
G3	domínio globular 3
GAGs	glicosaminoglicanos
GDNF	fator neurotrófico derivado da glia
GGF	fator de crescimento da glia/ neuregulina 2
HA	ácido hialurônico
HS	heparam sulfato
HSPG	heparam sulfato proteoglicano
Ig	Imunoglobulina
IGF	fator de crescimento para insulina
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-12	interleucina 12

KS	keratan sulfato
LAM	laminina
LEC	lectina
MBP	proteína básica para mielina
MEC	matriz extracelular
NGF	fator de crescimento do nervo
NT-3	neurotrofina 3
NT-4/5	neurotrofina 4/5
P0	proteína 0
PBS	tampão fosfato salina
PG	proteoglicano
PMP22	proteína mielínica periférica 22
SC	células de Schwann
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
TGF- β	fator de crescimento tumoral β
trk A	tirosina quinase A
trk B	tirosina quinase B
trk C	tirosina quinase C

Resumo

A regeneração nervosa periférica é um fenômeno complexo que envolve diferentes tipos celulares, os quais auxiliam na regeneração axonal e na reorganização dos componentes da matriz extracelular do microambiente do nervo. Nesse, estão presentes as células de Schwann, fibroblastos, macrófagos, fibras de colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Entre os componentes não neurais, as células de Schwann são fundamentais para o processo regenerativo, pois fagocitam os fragmentos de axônios e de bainha de mielina em degeneração no coto distal, guiam os axônios em regeneração através das bandas de Büngner e secretam fatores neurotróficos para a sobrevivência e crescimento neuronal. Entre os componentes da matriz extracelular, os proteoglicanos apresentam a propriedade de reter substâncias hidrossolúveis, interagir com outros componentes da matriz extracelular, e funcionar como receptores para fatores de crescimento. Tendo-se em vista as características estruturais dos proteoglicanos no que diz respeito à sua capacidade de retenção de moléculas hidrossolúveis, bem como a homologia de seus componentes a fatores de crescimento, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do agrecan sobre a regeneração axonal *in vivo*, empregando-se a técnica da tubulização do nervo ciático. Adicionalmente, seus efeitos sobre o comportamento das células de Schwann serão investigados *in vitro*, através da cultura de explantes de nervo ciático. O nervo ciático esquerdo dos camundongos C57BL/6J (n=20) foi transeccionado e os cotos proximal e distal foram suturados no interior de um tubo de polietileno, permanecendo uma distância de 4mm entre os cotos. No grupo controle o tubo foi implantado e deixado vazio enquanto que no grupo experimental, esse foi preenchido com agrecan. Após 5 semanas, os animais foram sacrificados e o nervo regenerado foi processado para imunoistoquímica e microscopia eletrônica. Em cultura, nervos ciáticos de ratos Wistar (n=10) foram utilizados

para estudo da migração e viabilidade celular. Os resultados *in vitro* mostraram que a migração e viabilidade celular foram maiores quando utilizada menor concentração de soro fetal bovino (20%) associada ao acréscimo do agrecam. *In vivo*, houve um aumento do número de fibras quando utilizado o agrecam ($2343 \pm 370,31$) em relação ao grupo controle ($1522 \pm 424,58$). Embora o diâmetro axonal, o diâmetro da fibra e a espessura da bainha de mielina tenham sido menores quando utilizado agrecam ($3,01 \mu\text{m} \pm 0,10$; $3,86 \mu\text{m} \pm 1,22$; $0,36 \mu\text{m} \pm 0,10$) em relação ao grupo controle ($3,40 \mu\text{m} \pm 1,37$; $4,53 \mu\text{m} \pm 1,56$; $0,44 \mu\text{m} \pm 0,11$), a razão “g” indicou que o padrão de mielinização foi proporcional ao diâmetro axonal no grupo com agrecam ($0,76 \pm 0,06$) e no controle ($0,74 \pm 0,08$). Os resultados desse estudo reforçam a hipótese que o agrecam, devido as propriedades biológicas e capacidade trófica, contribui para o processo da regeneração axonal e tem efeitos positivos sobre as células de Schwann.

Abstract

Peripheral nerve regeneration is an intricate phenomenon that is dependent on the glial cells, which produce neurotrophic factors and reorganize the environment at the distal stump. It is well known that extracellular matrix components may have positive effects on both glial and neuronal survival and behavior. Among such molecules, collagen, laminin and fibronectin were proven to benefit the process both *in vivo* and *in vitro*. More recently, studies have shown that glycosaminoglycans also have, under certain conditions, a positive influence on the peripheral nerve regeneration process. In the present study we evaluated the effects of aggrecan, a high molecular weight proteoglycan, on non neuronal cell migration *in vitro*. Also, we investigated the properties of such a proteoglycan on axonal regeneration after sciatic nerve transection and tubulization. *In vitro*, non neuronal cell migration and viability were accessed for up to 2 weeks of culturing. *In vivo*, five weeks after tubulization, the number of axons, axonal and fiber diameter and myelin thickness were obtained from regenerated fibers found at the tube mid point. In culture, with lower fetal calf serum concentration (20%), aggrecan increased the glial cell number and viability. *In vivo*, the number of regenerated fibers was statistically greater when aggrecan was used (2343 ± 370.31) compared to the empty tube (1522 ± 424.58). Although the axonal diameter, fiber diameter and myelin thickness in the aggrecan treated group ($3.01 \mu\text{m} \pm 0.10$; $3.86 \mu\text{m} \pm 1.22$; $0.36 \mu\text{m} \pm 0.10$; respectively) were smaller than in the empty tube ($3.40 \mu\text{m} \pm 1.37$; $4.53 \mu\text{m} \pm 1.56$; $0.44 \mu\text{m} \pm 0.11$; respectively), the “g” ratio indicated a pattern of myelination that was proportional to the axonal diameter in both groups (0.76 ± 0.06 - aggrecan; 0.74 ± 0.08 - empty). The results of this study reinforce the hypothesis that

aggrecan, due to its biological properties and trophic capabilities, contributes to the axonal regeneration process and has particularly positive effects on the Schwann cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A regeneração nervosa periférica, após a lesão de um nervo periférico, é um fenômeno complexo que envolve vários eventos (Ide, 1996). Logo após a transecção do nervo (axotomia), este passa a apresentar um coto proximal e um coto distal, separado por uma fenda resultante da retração dessas estruturas (Lundborg, 1993).

No coto distal desenvolve o processo da degeneração Walleriana. Esta tem como característica principal, a degeneração da bainha de mielina e dos axônios lesados. Dos tipos celulares presentes no nervo, os macrófagos e as células de Schwann (SC) iniciam a fagocitose dos elementos em degeneração (Bruck *et al.*, 1995; Bruck, 1997). No início, os macrófagos sintetizam e liberam interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL 6), as quais atuam como agentes quimiotáticos para as SC. As SC, por sua vez, também realizam fagocitose e sintetizam compostos fundamentais para o processo regenerativo, entre eles, os fatores neurotróficos. Os principais fatores neurotróficos presentes no microambiente do nervo são o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator neurotrófico ciliar (CNTF). Após a lesão periférica, seus níveis aumentam, juntamente com seus receptores (Taniuchi *et al.*, 1986; Lewin *et al.*, 1997; Zochodne, 2000).

Os componentes da matriz extracelular (MEC) como colágeno (COL), fibronectina (FN), laminina (LAM) estão presentes no nervo e também são reorganizados após a lesão (Tona *et al.*, 1993). São fundamentais ao processo regenerativo pois, os brotamentos axonais que crescem do coto proximal em direção ao coto distal são, em parte, orientados pelos componentes MEC.

Apesar da grande capacidade regenerativa do Sistema Nervoso Periférico (SNP), há casos onde a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos. Uma técnica de reparo empregada nessa situação é a tubulização, que pode ser otimizada com acréscimo de

fatores neurotróficos, componentes da MEC e componentes celulares do nervo periférico como as SC, aumentando a eficiência do processo regenerativo (Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Labrador *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001).

1.2 Estrutura do nervo periférico

Os nervos periféricos são formados por axônios, células não neurais e componentes da MEC como o COL e laminina (LAM). O axônio, juntamente com sua bainha de mielina, denomina-se fibra nervosa. Estas fibras são envoltas por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, chamada de epineuro, é formada por tecido conjuntivo frouxo, possui vasos e fibroblastos e apresenta fibras de COL tipo I em sua arquitetura. A camada média de tecido conjuntivo, denominada de perineuro, apresenta células pavimentosas fortemente unidas por "tight junctions" que dispõem-se em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas. Entre as sucessivas camadas celulares são encontradas fibras de COL tipo I e tipo III. Esta camada é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois, atua como uma barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular (Guth, 1956; Cajal, 1959; Lundborg, 1993). A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro, apresenta íntimo contato com as fibras nervosas. O endoneuro é composto por fibras de COL III do tipo reticular dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa. Nesse tecido conjuntivo podem residir os macrófagos, poucos fibroblastos dispersos ao acaso e, eventualmente, mastócitos (Guth, 1956; Cajal, 1959; Lundborg, 1993).

O axônio é uma extensão longa e delgada do corpo celular do neurônio capaz de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. Estes podem ser mielínicos ou amielínicos. Nos axônios mielínicos, as SC formam em seu redor, uma estrutura tubular com múltiplas camadas, denominada bainha de mielina. As SC estão

separadas umas das outras, ao longo destes axônios, por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma. Estes espaços são denominados nodos de Ranvier (Landon & Hall, 1976; Peters *et al.*, 1976).

Os axônios amielínicos apresentam um tipo especial de relação com as SC. Neste caso, uma SC, 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 expansões do citoplasma das SC (Peters *et al.*, 1976).

A bainha de mielina é formada pela diferenciação da membrana plásmatica das SC. Tem como característica a alta concentração lípidica e poucas proteínas. Os componentes lípidicos que entram em sua estrutura são o colesterol, fosfoglicerídeos, esfingomielina, gangliosídeos e ácidos oléicos. Já os componentes protéicos são a proteína zero (P0), proteína mielínica periférica 22 (PMP22), glicoproteína associada à mielina (MAG), proteína básica mielínica (MBP), proteína P2, entre outras (Garbay *et al.*, 2000). Tendo-se em vista sua natureza lípidica, esta bainha atua como um isolante, permitindo a rápida propagação dos potenciais de ação dos neurônios ao órgão alvo.

1.3 Regeneração no Sistema Nervoso Periférico e Central

As fibras mielínicas e amielínicas mostram grande capacidade regenerativa no Sistema Nervoso Periférico (SNP), diferentemente daquelas do Sistema Nervoso Central (SNC). Tal fato pode ser atribuído à organização das células da glia, componentes da MEC e expressão de fatores de crescimento (Barnes, 1985; Ide, 1996). Apesar das causas da baixa capacidade regenerativa do SNC não serem totalmente claras, acredita-se que esta seja, em grande parte, o resultado da formação de um tecido cicatricial inibidor do alongamento axonal, elaborado pelas células da glia do SNC, principalmente oligodendrócitos e astrócitos. Já as células não neurais do SNP, principalmente as SC, provêm substrato para o crescimento axonal, pois sintetizam fatores de crescimento para os axônios em regeneração (Taniuchi *et al.*, 1988). Além disso, os neurônios periféricos são capazes de regenerar sua projeção axonal e restabelecer o contato com o órgão alvo, havendo a possibilidade de recuperação da função motora e sensitiva. Para isso, é necessário que os eventos do processo regenerativo ocorram de maneira sincronizada, havendo fagocitose dos axônios em degeneração pelos macrófagos, proliferação das SC e síntese de fatores de crescimento no coto distal. Concomitantemente, uma ponte constituída de fibrina conecta os cotos sendo povoada por células não neurais, vasos sangüíneos e componentes da MEC. Em seqüência, ocorre o brotamento axonal do coto proximal em direção ao coto distal, sendo acompanhado pela mielinização dos axônios pelas SC (Le Beau *et al.*, 1988).

Dessa forma, a resposta regenerativa no SNP é um fenômeno complexo e dependente de uma série de eventos necessários para reajustar o microambiente do nervo lesado, no intuito de restabelecer a homeostasia. Portanto, é necessário que ocorra a interação dos componentes celulares não neurais, incluindo-se as SC e macrófagos presentes no nervo, bem como a síntese de fatores de crescimento e a expressão de seus

receptores, por exemplo, o NGF e BDNF. Adicionalmente, a produção de moléculas de adesão celular como LAM e FN e moléculas da MEC, tais como COL e proteoglicano de heparan sulfato (HSPG) são fundamentais para que os brotamentos axonais do coto proximal alcancem o órgão alvo, reinervando-o (Barnes, 1985; Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999).

Subseqüentemente à transecção de um nervo periférico, surge a necessidade de reaproximar os cotos separados pela fenda após a sua retração. Várias técnicas, como a sutura das bainhas conjuntivas (neurorrafia), implantes de autoenxertos de músculo estriado esquelético e nervos periféricos, além da tubulização, tem sido propostas para tal finalidade (Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993).

A tubulização é uma técnica que emprega uma estrutura tubular onde os cotos distal e proximal serão introduzidos e fixados com dois pontos cirúrgicos em suas extremidades, permitindo a reaproximação, deixando-se um espaço de poucos milímetros entre os cotos (Fields *et al.*, 1989). Essa técnica tem como objetivos propiciar 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, permite empregar moléculas da MEC, células fundamentais para o processo regenerativo (e.g., SC), e fatores de neurotróficos para o preenchimento do tubo (Fields *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001).

1.4 Eventos após lesão do nervo periférico

As lesões do SNP podem ser resultantes do esmagamento ou transecção parcial ou completa do nervo periférico. Posteriormente à transecção completa do nervo periférico (axotomia), há perda da continuidade do nervo e sua retração (Sunderland, 1990; Terenghi,

1999) de forma que este passa a apresentar um coto proximal (segmento proximal) e um coto distal (segmento distal) (Lundborg, 1993).

Na porção distal do coto proximal, devido ao transporte anterógrado de moléculas sinápticas e estruturais do citoesqueleto, ocorre um acúmulo de material axoplasmático (Zochodne, 2000). Inicialmente, pode ocorrer o vazamento desse material axoplasmático, em virtude do rompimento da membrana celular destes axônios (Terenghi, 1999). O corpo celular entra em cromatólise, ou seja, há dissolução dos corpúsculos de Nissl, deslocamento do núcleo para a periferia e aumento do volume do corpo celular. Além disso, há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela produção de moléculas de reparo (Cajal, 1959). As SC, macrófagos e fibroblastos passam a apresentar características relacionadas à proliferação e migração celular tanto no coto proximal quanto no distal (Cheng & Zochodne, 2002).

No coto distal ocorre uma série de mudanças, inicialmente descritas por Waller (1850), sendo denominadas, em conjunto, degeneração Walleriana. Devido à interrupção do contato com o corpo celular, a ausência de suporte trófico e ao aumento da entrada de íons cálcio (Ca^{+2}) nas fibras axotomizadas, inicia-se a degeneração do coto distal com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios (Lunn *et al.*, 1990). Concomitantemente, ocorre um recrutamento dos macrófagos em direção ao local da lesão, bem como a proliferação e multiplicação das SC. Estes dois tipos celulares atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração (Guth, 1956; Beuche & Fried, 1984; Stoll *et al.*, 1989; Sunderland, 1990; Bruck *et al.*, 1995; Ide, 1996; Bruck, 1997; Stoll *et al.*, 2002) criando, dessa forma, um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal, fundamental ao sucesso regenerativo (Zochodne, 2000).

Durante a degeneração Walleriana, as SC liberam citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8, envolvidas no recrutando dos leucócitos (Rutkowisk *et al.*, 1999). Os macrófagos, por sua

vez, secretam fatores de crescimento e citocinas, IL-1, IL-6, IL-12, os quais agem como fatores quimiotáticos para as SC e neurônios lesados (Stoll *et al.*, 1989; Kiefer *et al.*, 2001)

Demonstrou-se experimentalmente que, durante a degeneração Walleriana, fatores químicos liberados pelas SC e pelos próprios macrófagos presentes no coto distal do nervo e, principalmente, a degeneração da bainha de mielina e dos axônios, influenciam no recrutamento e comportamento fagocítico dos macrófagos (Stoll *et al.*, 1989; Bruck *et al.*, 1995; Bruck, 1997).

Dessa forma, a fragmentação e metabolização da bainha de mielina são intensificadas através das interações entre esses dois componentes celulares. Constatou-se também que o óxido nítrico no local da lesão é importante na regeneração nervosa, pois auxilia no desarranjo da mielina e facilita a fagocitose pelos componentes celulares (Zochodne, 2000).

1.5 Pré-degeneração

A pré-degeneração do nervo periférico é uma técnica utilizada para induzir a proliferação celular e obter-se SC *in vitro*. Após a transecção do nervo ciático, por exemplo, o conteúdo protéico e trófico no coto distal aumenta e a atividade neurotrófica alcança o seu nível máximo. A técnica da pré-degeneração também estimula o brotamento axonal em direção ao coto distal (Danielsen *et al.*, 1994; Marcol *et al.*, 2003).

Este método consiste na transecção do nervo ciático *in vivo*, sendo este mantido por um determinado tempo *in situ*. Durante este período, preferencialmente 1 semana, ocorre a degeneração Walleriana no coto distal, havendo proliferação das SC, as quais atuam na fagocitose da mielina fragmentada e dos restos de axônios em degeneração (Keilhoff *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000; Verdú *et al.*, 2000). As SC também sintetizam fatores tróficos como NGF, CNTF, BDNF, fator de crescimento da insulina (IGF) (Lunn *et*

al.,1990; Sunderland, 1990; Abernithy *et al.*,1994; Danielsen *et al.*,1994; Bruck *et al.*,1995; Bruck, 1997; Zochodne, 2000).

Atualmente, a pré-degeneração tem sido empregada para elevar a quantidade de SC em cultura num curto intervalo de tempo (Keilhoff *et al.*,1999; Rodríguez *et al.*,2000; Verdú *et al.*,2000). Estas células podem ser utilizadas para implantes no SNC e para preenchimento da fenda gerada após a transecção e a retração dos cotos de um nervo periférico (Morrissey *et al.*,1991; Keilhoff *et al.*,1999; Rodríguez *et al.*,2000). O extrato do nervo pré-degenerado pode também ser utilizado no preenchimento de próteses tubulares, atuando positivamente na resposta regenerativa (Marcol *et al.*,2003).

Além da pré-degeneração, há outras técnicas para obtenção de SC com maior grau de pureza em culturas. Uma delas é a técnica que utiliza a baixa temperatura para descolar as SC da superfície, as quais podem ser coletadas e subcultivadas (Jirsová *et al.*,1997). Outra técnica é a co-cultura, a qual leva em conta o tempo de migração de cada tipo celular, de tal modo que inicialmente é esperada a migração dos fibroblastos e, após alguns repiques, obtêm-se as SC (Morrissey *et al.*,1991).

1.6 Aspectos sobre as Células de Schwann

A relação entre os axônios e as SC inicia-se precocemente durante o período da embriogênese. Esta associação, sob determinadas condições, induz a formação da bainha de mielina, sendo esta proporcional ao calibre axonal (Lemke & Chao, 1988; Rosen *et al.*,1990). Acredita-se que certas moléculas como a LAM e a molécula de adesão neural (N-CAM), participem e propiciem essas interações entre o axônio e SC (Ide, 1996).

Assim, a expressão gênica das proteínas da mielina, a P0, a MBP e a PMP22 é restrita às SC (Jessen & Mirsky,1999). Quando ocorre lesão periférica e há perda do

contato das SC com os axônios lesados, as SC regulam a expressão dessas proteínas, as quais estão envolvidas na mielinização axonal (Lemke & Chao, 1988).

As SC, durante o desenvolvimento do SNP, apresentam aspecto ovóide e não possuem lâmina basal. Após a associação com os axônios, estas passam a apresentar um aspecto fusiforme, com heterocromatina nuclear e citoplasma elétron-denso, havendo o aparecimento da lâmina basal. Subseqüentemente a uma lesão nervosa, as SC apresentam citoplasma translúcido e adquirem características de células proliferativas e fagocíticas, sendo vitais durante o processo de degeneração Walleriana (Ide, 1996). Além disso, têm função estrutural, dando suporte ao crescimento axonal, servindo como interface entre os axônios e a MEC do endoneuro (Son & Thompson, 1995; Ide, 1996).

A lâmina basal é formada por várias moléculas, como a LAM, a FN, o COL, o proteoglicano de condroitin sulfato (CSPG) e o HSPG (Zuo *et al.*, 1997).

Subseqüentemente a uma lesão nervosa, sua lâmina basal não sofre degradação nem é fagocitada pelos macrófagos; esta permanece como tubos vazios servindo como substrato para o crescimento, e maturação e orientação dos axônios em regeneração (Ide *et al.*, 1983; Gulati, 1988).

As SC provenientes do coto distal, após proliferação e fagocitose da mielina dos axônios degenerados, sob influência de moléculas como o fator de crescimento da glia/neuregulina-2 (GGF) (Madison & Archibald, 1994), organizam-se em colunas celulares semelhantes a tubos, as Bandas de Büngner, que induzem e orientam o crescimento axonal através das moléculas neurotróficas (Salonem *et al.*, 1987; Yoshii *et al.*, 1987; Smith & Stevenson, 1988; Abernithy *et al.*, 1994). Entre elas, o NGF, o BDNF, o CNTF e o GDNF, fundamentais ao desenvolvimento, manutenção e regeneração das células nervosas (Son & Thompson, 1995; Jessen & Mirsky, 1999; Zochodne, 2000). As SC são responsáveis pela regulação da expressão de receptores de alta e baixa afinidade para os

fatores neurotróficos. Porém, quando restabelecido o contato axonal as SC diminuem a expressão desses receptores (Taniuchi *et al.*, 1986; Raivich & Kreutzberg, 1987; Madison & Archibald, 1994). Devido à expressão de receptores de baixa afinidade associadas ao NGF na superfície das SC, estas provêm um gradiente de fator trófico capaz de orientar os axônios na regeneração (Taniuchi *et al.*, 1988).

A ausência das Bandas de Büngner no coto distal dificulta grandemente a regeneração, axonal normalmente resultando na formação de neuromas (Salonem *et al.*, 1987).

Acredita-se que as SC sejam capazes de promover o crescimento dos brotamentos axonais. Estudos mostraram que a ausência deste componente celular torna os brotamentos axonais ineficientes, de forma que o crescimento axonal não atinge o órgão alvo (Hall, 1986; Berry *et al.*, 1988). Porém, quando os axônios acompanham as SC, o crescimento axonal é otimizado (Torigoe *et al.*, 1996).

Durante o processo de tubulização, alguns experimentos utilizando as SC para o preenchimento do tubo, obtiveram resultados positivos na regeneração e reinervação muscular (Rodríguez *et al.*, 2000).

1.7 Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos são polipeptídeos, sendo divididos em duas classes: as neurotrofinas e as neurocitocinas. Exemplos clássicos de neurotrofinas são o NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 (neurotrofinas 3, 4/5). Como exemplo de neurocitocinas, podemos citar o CNTF, o fator de crescimento do fibroblasto (FGF), IL-1, o fator transformador de crescimento (TGF), e o fator inibitor de leucemia (LIF) (Lewin *et al.*, 1997).

Estes fatores neurotróficos são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios sensitivos, motores, simpáticos do SNP e neurônios colinérgicos presentes

no SNC (Sendtner *et al.*,1992; Ide, 1996; Koop *et al.*,1997; Lewin *et al.*,1997; Terenghi, 1999; Yong *et al.*,2001).

Outros fatores, como o GGF, promovem a sobrevivência neural, proliferação das SC e interação entre as células da glia e os neurônios (Koop *et al.*,1997; Terenghi, 1999).

De forma ampla, os fatores neurotróficos influenciam na atividade neural, incluindo-se a atividade sináptica, promovem o desenvolvimento durante o período embrionário, a manutenção e sustentação durante a vida adulta e a sobrevivência dos neurônios após a lesão nervosa. Estes são produzidos pelos órgãos alvo e transportados retrógradamente ao corpo celular dos neurônios. Os fatores neurotróficos também podem ser produzidos pelas aferências (Linden, 1994; Oliveira *et al.*,2002). Quando ocorre uma lesão nervosa, há a interrupção no fornecimento de fatores neurotróficos, podendo levar à morte neuronal e conseqüentemente à ausência regenerativa (Terenghi, 1999). Em virtude disso, os componentes não neurais, por exemplo as SC, passam a produzi-los, de forma a proteger os neurônios e estimular a regeneração axonal (Acheson *et al.*,1991; Distefano *et al.*,1992; Ide, 1996; Lewin *et al.*,1997).

Os fatores neurotróficos têm a particularidade de se ligarem a uma classe de receptores de alta especificidade e afinidade, denominadas tirosina quinases (trk). O NGF liga-se ao receptor trkA, BDNF e NT-4/5 ligam-se ao receptor trkB e o NT-3 ao trkC. Porém, pode haver a ligação destes fatores neurotróficos ao receptor de baixa afinidade, denominado p75^{NGFR} (Distefano *et al.*,1992).

Observou-se que após a transecção do nervo ciático, tanto os níveis de fatores neurotróficos, como NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5, quanto os RNAm para seus receptores, trkA, trkB e trkC, são regulados positivamente no segmento distal do nervo (Funakoshi *et al.*,1993).

A função desses receptores é internalizar os fatores de crescimento, os quais irão ativar determinados genes, promovendo a sobrevivência e regeneração (Terenghi, 1999).

No nervo transeccionado, foi observado que os níveis de NGF aumentam no local da lesão. Porém, quando ocorre a regeneração, a expressão desse fator neurotrófico diminui, indicando que a regulação desse fator de crescimento ocorre negativamente pelo contato axônio-SC (Heumam *et al.*, 1987).

A administração sistêmica de BDNF e CNTF, após a axotomia, resulta numa melhora da recuperação funcional do nervo (Cheng *et al.*, 1998). Ainda, o uso de NGF e NT-3, estimula a regeneração dos axônios mielínicos e amielínicos (Santosa *et al.*, 1998; Bloch *et al.*, 2001). Apesar dos fatores neurotróficos NGF e NT-3 demonstrarem resultados positivos após uma lesão periférica, alguns trabalhos mostraram que a aplicação de doses excessivas desses fatores no local da lesão acabam por inibir o processo regenerativo (Yong *et al.*, 2001).

O uso de BDNF, resultou no aumento da espessura da bainha de mielina e diâmetro dos axônios. Quando adicionado CNTF melhorou ainda mais a recuperação funcional (Lewin *et al.*, 1997). A utilização do GDNF, após a transecção do nervo ciático, teve efeito protetor nos neurônios motores, aumentou o número de axônios mielínicos e atuou positivamente na recuperação funcional do nervo ciático (Chen *et al.*, 2001). A utilização do GDNF *in vitro* e *in vivo* revelou que este fator neurotrófico promove a sobrevivência de neurônios sensitivos presentes nos glânglios da raiz dorsal (DRG) (Matheson *et al.*, 1997).

A aplicação do GGF *in vitro* e *in vivo*, demonstrou que este preveniu a morte de SC e estimulou a sua proliferação (Koop *et al.*, 1997). Quando adicionados fatores de crescimento, como o fator de crescimento para insulina (IGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) combinados com o COL e metilcelulose no interior

de tubos, estes estimularam a regeneração nervosa, aumentando o número de axônios mielínicos (Wells *et al.*, 1997).

1.8 Matriz extracelular

O espaço entre as células que compõem um tecido denominado espaço extracelular. Este é preenchido por uma variedade de macromoléculas, constituindo-se a MEC. Ela é composta por COL, proteoglicanos (PGs) e proteínas que interagem entre si, bem como com a superfície das células. Funcionam como uma armação para estabilizar a estrutura física do tecido, mas também, influenciam no comportamento, desenvolvimento, migração e proliferação celular. As macromoléculas principais que compõem a MEC são a LAM, o COL, o heparam sulfato (HS) e a FN (Terrisa *et al.*, 1999).

A LAM, FN, ácido hialurônico (HA) e CSPG, são componentes que estão presentes no endoneuro do nervo ciático de rato adulto. Após uma lesão, estes componentes são degradados e as SC presentes no nervo periférico, durante a degeneração Walleriana, participam ativamente desta degradação, reorganização e síntese (Tona *et al.*, 1993).

Tendo-se em vista a presença do HA e do CS no endoneuro, acredita-se que estas moléculas formam parte de um agregado de PG. O agregado é a molécula mais conhecida desse grupo (Tona *et al.*, 1993). Numerosos estudos sustentam a possibilidade que os PGs sejam moléculas inibitórias que regulam ou guiam o crescimento axonal (Snow *et al.*, 1990; Zuo *et al.*, 1997). No SNC, a MEC tem poucos componentes, sendo o CSPG, PGT1, um exemplo característico. Este forma agregados complexos com HA semelhantes ao que ocorre na cartilagem. O PGT1 está presente na substância cinzenta e branca do cérebro, cercando os corpos dos grandes neurônios como as células de Purkinje no cerebelo (Iwata *et al.*, 1993). Outros CSPG do cérebro, o Cat 301 e o Cat 304 são encontrados na superfície celular dos neurônios e são expressos durante o desenvolvimento pós-natal do SNC (Fryer *et al.*, 1992).

Adicionalmente, o brevicam é um dos mais abundantes CSPG presentes no cérebro. É sintetizado e localiza-se na superfície dos astrócitos, interage com dendritos e axônios dos neurônios. Também foi encontrado circundando as células piramidais do hipocampo, células granulares e células de Purkinje do cerebelo. O brevicam tem ação inibitória ao crescimento dos brotamentos dos neurônios granulares do cerebelo *in vitro*, controlando o brotamento de axônios e dendritos (Seidenbecher *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1997).

Semelhantemente, o versicam e o decorim, mostraram efeitos inibitórios à adesão celular em várias linhagens celulares, neurônios sensitivos e SC. Outras moléculas como o CS do agrecam apresentaram efeito inibitório à adesão celular. Estes efeitos inibitórios dependem da concentração do CS utilizada (Braunewell *et al.*, 1995a, b; Condic *et al.*, 1999).

Alguns estudos mostraram uma atividade inibitória do CSPG no brotamento axonal. O CSPG é encontrado no interior dos fascículos do nervo, particularmente na lâmina basal associada às SC e, após lesão do nervo ciático, é regulado negativamente na regeneração axonal (Zuo *et al.*, 1997)

As moléculas de CS podem modular e orientar o crescimento axonal no SNC, isto depende dos tipos de neurônios, da interação entre as moléculas e da localização destas no SNC (Anderson *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1999). Quando tratado com condroitinase, o brotamento axonal aumenta em 38%. Possivelmente, a deposição de CSPG no local da lesão pode reforçar e impedir o crescimento axonal (Zuo *et al.*, 1997). É possível que a MEC do endoneuro e compartimento intersticial que cerca a lâmina basal das SC sejam ricas em componentes inibitórios e possam regular o crescimento de brotamentos axonais (Zuo *et al.*, 1997).

Outros estudos indicaram que, além do CS, o keratan sulfato (KS) também é responsável pela inibição dos neuritos dos DRG de embriões em experimentos *in vitro*. É

importante ressaltar que a inibição varia de acordo com a concentração destes componentes (Snow *et al.*,1990).

Por outro lado, outros componentes da MEC como o colágeno, mostram-se estimulatórios do processo regenerativo (Rosen *et al.*1990; Labrador *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* utilizando COL mostraram que este é benéfico à migração, proliferação e à viabilidade das SC (Santos *et al.*,2000).

Outros estudos, utilizando a LAM e FN, mostraram que estes elementos atuam positivamente no processo regenerativo, aumentando o número de axônios mielínicos, neurônios sensitivos e, influenciando na migração das SC (Bailey *et al.*,1993).

Os GAGs quando administrados exógenamente, incluindo o CSPG, estimulam a regeneração nervosa, aumentando o número de axônios regenerados, elevando a expressão de RNAm para MBP e P0, importantes no processo regenerativo, além de acelerar a reinervação muscular (Gorio *et al.*,1997). Outros trabalhos comprovaram que o uso de GAGs e o IGF promove a sobrevivência dos neurônios motores, aumenta a reinervação das fibras musculares e melhora a recuperação funcional (Di Giulio *et al.*,2000). Quando utilizado somente GAGs, estes elevaram o IGF no plasma e músculo denervado, atuando positivamente na resposta regenerativa (Gorio *et al.*,1998). Também constatou-se que os GAGs promovem a sobrevivência neuronal, brotamento axonal e estimulam a produção de fatores neurotróficos (Gorio *et al.*,1996).

Os GAGs, quando administrados em baixas concentrações *in vitro*, promovem o brotamento axonal e reduzem a necessidade de fatores neurotróficos (Lesma *et al.*,1996). Aplicando-se o CS-4 exógeno em culturas de explantes da retina, observou-se o crescimento em comprimento destes axônios. A resposta positiva nesse processo foi obtida quando se utilizou a concentração de 100µg/ml de CS-4. Assim, sugere-se que os GAGs dos proteoglicanos são importantes na regulação do crescimento axonal *in vitro* (Challacombe & Elam, 1997).

Outros estudos *in vitro* avaliaram a migração das células de um explante sobre um substrato composto de COL-GAGs, mostrando que as células do explante, fibroblastos e SC migravam sobre o substrato, alojavam-se e interagiam com o material (Spilker *et al.*, 2001).

1.9 Proteoglicanos

Os PGs, são moléculas altamente conservadas entre as espécies, podem ser extraídos a partir da cartilagem e tendões (Heinegård & Sommarin, 1987a). Estão presentes também na MEC do SNC e SNP, promovendo a interação entre outros componentes da MEC e neurônios, criando dessa forma um ambiente propício para a migração, proliferação celular e para o crescimento orientado dos axônios (Jollés, 1993; Margolis & Margolis, 1993; Vertel, 1995; Bovolenta & Espinosa, 2000). Estudos mostraram que os PGs, juntamente com o COL, são os maiores componentes da MEC do nervo periférico (Zuo *et al.*, 1997).

Os PGs apresentam peso molecular entre $1,3-3,5 \times 10^6$ Daltons (Da) (Heinegård & Sommarin, 1987a). São formados por uma proteína central a qual GAGs estão covalentemente ligados, como CS, KS, além de oligossacarídeos O-ligados e N- ligados (Heinegård & Sommarin, 1987a; Mulard, 1999).

Os PGs podem funcionar como receptores para o FGF e fator de crescimento tumoral β (TGF- β), os quais podem interagir e ligar-se aos GAGs e a proteína central (Margolis & Margolis, 1993; Bovolenta & Espinosa, 2000).

O maior dos PGs, denominado agregam, predomina na cartilagem e é um dos proteoglicanos mais abundantes e melhor estudados (Vertel, 1995; Bovolenta & Espinosa, 2000). Outros PGs também são encontrados na cartilagem, entre eles estão o decorin, biglican e perlecan (Vertel, 1995). O agregam, neurocam, versicam e brevicam são PGs

presentes no SNC; estes interagem na plasticidade e diferenciação neuronal (Seidenbecher *et al.*, 1995).

O agrecam apresenta várias cadeias de GAGs, estas são responsáveis pela geração de uma grande carga negativa, resultado da presença de grupos sulfatos e/ou carboxílicos. Tal particularidade possibilita a manutenção de um alto grau de hidratação, estabilizando e dando resistência à compressão para cartilagens articulares (Vertel, 1995; Bovolenta & Espinosa, 2000). Os GAGs estão envolvidos no fenômeno do crescimento axonal orientado, promovendo ou inibindo seu crescimento. Tais características são grandemente dependentes da concentração, localização no SNC, relações com outras moléculas e o estágio de desenvolvimento do sistema nervoso (Margolis & Margolis, 1993; Anderson *et al.*, 1998; Bovolenta & Espinosa, 2000).

O agrecam é um componente fundamental na estrutura e fisiologia da cartilagem, participa diretamente e funcionalmente da resistência osmótica da cartilagem. Estes PGs podem ainda seqüestrar fatores de crescimento e organizar a estrutura da matriz extracelular (Knudson & Knudson, 2001).

O agrecam é capaz de ligar-se a molécula de HA e formar grandes complexos agregados, cerca de 50 monômeros de agrecam com o HA, daí a razão destes proteoglicanos serem chamados de agrecam. A massa molecular dos monômeros de agrecam tem em média 3×10^3 kDa, 90% corresponde a aproximadamente 100 cadeias de CS, 30 cadeias de KS, 8-10 glicosídeos N-ligados e 100 oligossacarídeos O-ligados, que se ligam a proteína central de $0,25 \times 10^3$ kDa.

As moléculas de agrecam apresentam domínios com características estruturais e funcionais bem distintas. A proteína central do agrecam apresenta 3 domínios globulares, G1, G2 e G3. G1 localiza-se na porção N-terminal do esqueleto protéico, ligando-se especificamente ao HA em uma interação estabilizada por uma proteína de ligação (Franzén *et al.*, 1981), apresentando uma seqüência homóloga à imunoglobulina (Ig). G2

tem a função desconhecida, mas possivelmente desempenha um papel na interação com outras moléculas da MEC. O domínio G3, localizado na porção C-terminal, contém sequência homóloga ao fator de crescimento epidermal (EGF) e outra sequência homóloga à lectina (LEC). A sequência homóloga ao EGF pode estar relacionada com a regulação do crescimento neuronal e a sequência homóloga à LEC pode estar relacionada com a interação celular/MEC (Hardingham & Fosam, 1992; Vertel, 1995; Bovolenta & Espinosa, 2000; Knudson & Knudson, 2001). Ainda, é possível que G3 participe em processos de interação com a galactose presente nas moléculas de COL (Hardingham & Fosam, 1992).

Os PGs apresentam efeitos positivos e negativos sobre a regeneração axonal (Snow *et al.*, 1990; Brauwnell *et al.*, 1995a, b; Gorio *et al.*, 1996; Lesma *et al.*, 1996; Challacombe & Elam, 1997; Gorio *et al.*, 1997; Zuo *et al.*, 1997; Gorio *et al.*, 1998), dependendo de sua estrutura, concentração e localização no sistema nervoso (Margolis & Margolis, 1993; Anderson *et al.*, 1998; Bovolenta & Espinosa, 2000).

Tendo-se em vista as características estruturais do agrecam apresentadas anteriormente, associadas à ausência de estudos sobre seus efeitos na regeneração do sistema nervoso periférico, tivemos como objetivo principal investigar a sua ação, empregando-se a técnica da tubulização do nervo ciático *in vivo* e seus efeitos sobre as SC *in vitro*.

Objetivos

Tendo-se em vista as características estruturais dos PGs no que diz respeito à sua capacidade de retenção de moléculas hidrossolúveis, bem como a homologia de seus componentes a fatores de crescimento e a interação com outras moléculas da MEC, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Padronizar uma técnica para o estudo do comportamento das SC *in vitro*, enfocando a migração e viabilidade;
2. Estudar a ação do agrecam no comportamento das SC *in vitro*, utilizando como modelo de estudo, a cultura primária de nervo ciático;
3. Estudar a influência do agrecam no processo de regeneração nervosa periférica *in vivo*, através do emprego da técnica de tubulização do nervo ciático.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração e purificação do Agrecam

Cartilagens do processo xifóide de frango foram picadas e homogenizadas em 12 volumes de PBS (0,15M NaCl em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.4), contendo 50mM EDTA e 1mM fenil-metil sulfonil fluoreto - PMSF. Os fragmentos da cartilagem foram separados por centrifugação a 5000 rpm (centrifuga Beckmam, rotor JA-20. O precipitado foi extraído e tratado com 15 volumes de cloreto de guanidina 4M (GuHCl) em tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,8, contendo EDTA 50 mM e PMSF 1mM. A extração foi feita a 4°C por 20 horas, em agitação constante (Heinegård & Sommarin, 1987b). O extrato foi obtido depois de uma centrifugação a 18000 rpm/ 50 minutos (centrifuga Beckmam, rotor JA-20). Proteoglicanos de alto peso molecular, presentes no sobrenadante foram separados por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl, densidade de 1,35 mg/ml) (Heinegård & Sommarin, 1987b). A ultracentrifugação foi feita em centrifuga Beckmam, rotor 80 Ti a 34000 rpm por 61 horas, a 15°C. O tubo de ultracentrifuga foi dividido em quatro frações aproximadamente de mesmo tamanho, D1 (fundo do tubo), D2, D3 and D4 (topo). Foi utilizada somente a fração D1, rica em grandes proteoglicanos (agrecam). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), e os GAGs sulfatados foram quantificados pelo método de DMMB (Farndale *et al.*, 1986).

2.2 Dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs)

O azul de dimetilmetileno (DMMB) foi utilizado para dosagem de GAGs sulfatadas pois é um método simples e rápido de quantificá-las em soluções contendo proteoglicanos. Este reagente quando ligado à GAGs apresenta como característica a metacromasia (Farndale *et al.*, 1986).

Para dosagem de GAGs sulfatadas em proteoglicanos, utilizou-se condroitin sulfato (CS-1mg/ml) como padrão na leitura num espectrofotômetro HP8452A. As leituras de absorbância foram feitas em $\lambda = 526\text{nm}$.

Utilizou-se 5, 10, 15, 20, 25 μl de CS e acrescentou-se H_2O de tal forma que a solução final resultasse em 100 μl (CS + H_2O) da amostra total. Posteriormente adicionou-se 2,5 ml de DMMB em cada amostra para quantificação das GAGs (Farndale *et al.*, 1986). Fez-se triplicatas de cada amostra e, através da média aritmética de cada triplicata, construiu-se uma curva padrão.

A amostra de proteoglicano foi preparada a partir da solução D1. Retirou-se 5 μl da mesma e adicionou-se 45 μl de H_2O . Desta solução retirou-se 10 μl , adicionou-se 90 μl de H_2O e 2,5 ml do reagente DMMB. Realizou-se uma triplicata destas amostras e, em seguida, fez-se a leitura no espectrofotômetro. A média aritmética foi calculada e representada graficamente para determinar a quantidade de GAGs presente na fração D1.

2.3 Dosagem de proteínas

A dosagem protéica foi realizada pela utilização do corante Comassie Brilhante Blue G-250, que tem a propriedade de ligar-se a proteínas. Através da leitura em espectrofotômetro com absorbância a 596nm, dosou-se as proteínas da amostra D1. Esta dosagem foi realizada no intervalo de 2 minutos a 1 hora, que corresponde ao período em que a reação é estável (Bradford, 1976).

Para fazer a curva padrão foram utilizados 10, 20, 40, 60, 80 μl de BSA (1mg/ml). Foram quantificados 60 μl de uma amostra da solução D1. Tanto a solução padrão quanto a amostra foram completadas com H_2O de forma que o volume total fosse de 100 μl . Acrescentou-se 5ml do reagente Comassie Brilhante Blue G-250 na solução final.

Realizou-se uma triplicata destas amostras e, em seguida, fez-se a leitura no espectrofotômetro. A média aritmética foi calculada e representada graficamente para determinar a quantidade de proteínas presente na fração D1.

2.4 Precipitação e lavagem do Agrecam

Para realizar a precipitação, foram colocados 100µl da fração D1, 50µl de tampão acetato de sódio 1M a pH 7,4 e 1350µl de etanol em eppendorfs de 1,5ml. Após incubação a 4°C durante a noite, as amostras foram centrifugadas a 8000rpm por 4 minutos em uma microcentrífuga Fisher mod. 235v. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido e precipitado novamente como exposto acima, para completa remoção do GuHCl (Heinegard *et al.*, 1985).

Posteriormente, as amostras precipitadas foram ressuspendidas em 100µl PBS, para posterior utilização nos experimentos com cultura de explantes.

2.5 Preparação das amostras de agrecam para eletroforese

Foram colocadas em um eppendorf de 2 ml, 114µl da amostra precipitada em etanol e ressuspendida em PBS, 36µl de tampão acetato de sódio 2,5M, pH 7,4; 1350µl de etanol e incubou-se por 24 hs a 4°C durante a noite. Posteriormente, a solução foi centrifugada à 8000rpm durante 4 minutos, como descrito acima. O precipitado foi suspenso em SDS 0,5%, de modo a se obter uma concentração de proteoglicanos de 0,25 a 2mg/ml. Incubou-se por 2 hs a 37°C e, previamente à eletroforese, foram misturados um volume igual de solução contendo 60% de sacarose e 0,05% de azul de bromofenol (BPB) em tampão estoque (Tris acetato 0,04M, sulfato de sódio 1mM, pH 6,8) (Heinegård *et al.*, 1985).

2.6 Montagem do gel

Placas esmerilhadas com as dimensões de 3mm de espessura, 8 cm de comprimento e 7cm de largura foram utilizadas para montagem do gel.

Para preparação do gel foram misturados 1,64ml de uma solução estoque de acrilamida (0,912g de acrilamida e 0,048g de BIS/10ml de H₂O), 11,5mg de Triton X-100 e 0,049ml de TEMED. À parte, foi preparada uma solução de agarose que continha 0,0786g de agarose em 7,376ml de tampão estoque (Tris acetato 0,04M, sulfato de sódio 1mM pH 6,8). Em seguida, foram adicionados 0,984ml de persulfato de amônia (PAM) 4% à solução de acrilamida acima descrita.

Para sustentar o gel de agarose-poliacrilamida e evitar o deslizamento entre as placas, foi feito e colocado com antecedência, entre as placas, no fundo, uma solução de acrilamida (290µl de H₂O, 125µl de tampão estoque, 85µl de acrilamida/BIS, 1µl de APS e 1µl de TEMED) que polimerizou por 1 hora. Posteriormente foi adicionado o gel de agarose-poliacrilamida sobre o gel de acrilamida.

Após seguir os passos da montagem do gel de acrilamida e agarose-poliacrilamida, o gel foi colocado em uma câmara úmida a 4°C durante a noite. Em seguida, o gel foi deixado em temperatura ambiente por 2 hs juntamente com o tampão de eletroforese (tampão estoque diluído 4X com H₂O).

Amostras de 5 e 10µl foram aplicadas em cada um dos slots. Também foram aplicados como padrão, 5 e 10µl de condroitin sulfato (CS). Nas cubas, foi colocado o tampão de eletroforese (tampão estoque diluído 4X em H₂O).

2.7 Eletroforese

A eletroforese foi realizada por um período de 11 hs a uma temperatura de 2-4°C durante a noite, sendo utilizada uma voltagem de 28V (3-4V/cm). Após a corrida, o gel foi cuidadosamente colocado em solução fixadora (ácido acético 7% e metanol 50%) durante 1 hora. A coloração do gel foi feita com azul de toluidina (0,2g de corante em solução 3% de ácido acético) por 2 hs (Heinegård *et al.*, 1985). Em seguida, a descoloração foi feita com a solução descorante de ácido acético (3% v/v ácido acético). Após ser fotografado em negatoscópio, o gel foi colocado em solução encolhedora para plastificação.

2.8 Estudo *in vitro*

2.8.1 Cultura de explantes de nervos ciáticos e nervos pré-degenerados

Para a pré-degeneração foram utilizados nervos ciáticos de ratos da linhagem Wistar (adultos, n=10). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10%. Em seguida, fez-se uma incisão na pele e afastou-se a musculatura na região média da coxa. Posteriormente, seccionou-se o nervo ciático esquerdo. Fechou-se a musculatura e suturou-se a pele. Após uma semana da axotomia retirou-se o coto distal do nervo ciático lesionado. O nervo ciático contralateral serviu como controle.

Após a dissecação, os nervos foram reduzidos a fragmentos com cerca de 2mm de comprimento, lavados em meio de cultura Ham F-10 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell - Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brazil) e 100µg/ml de gentamicina (Schering-Pough S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Foram posteriormente colocados em placas de cultura contendo 24 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) a 37°C com 5% CO₂ por até 20 dias. Oito condições experimentais foram usadas:

1) Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina e 20% SFB, 2) Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina + 20% SFB e 102 µg/ml de agrecam, 3) Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina e 40% SFB, e 4) Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina + 40% SFB e 102 µg/ml de agrecam 5) pré-degenerado + Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina e 20% SFB, 6) pré-degenerado + Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina + 20% SFB e 102 µg/ml de agrecam, 7) pré-degenerado + Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina e 40% SFB, e 8) pré-degenerado + Ham F-10 suplementado com 100µg/ml de gentamicina + 40% SFB e 102 µg/ml de agrecam.

O meio de cultura (0,2ml) foi trocado a cada 48 horas sendo acrescentados 2µl de agrecam. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8.2 Contagem das células

O número de células que migraram do explante do nervo normal, em 4 poços para cada situação experimental, foi avaliado nos dias 4, 6, 8. Da mesma maneira, para o nervo pré-degenerado, o número de células foi avaliado nos dias 7, 9, 11. A contagem celular foi feita visualmente usando-se um microscópio invertido Olympus IX-50 com um sistema de contraste de fase e um contador. Adicionalmente, as células não aderentes, nas diferentes amostras, foram coletadas no 14^o dia e contadas, empregando-se um hemocítômetro.

Para o cálculo do número de células não aderentes usou-se a seguinte fórmula:
 Número de quadrantes contados (normalmente 10 quadrantes da câmara de Neubauer) X 10.000 (fator de correção da câmara) = Número de células por mililitro (cel/ml).

2.8.3 *Imunocitoquímica*

Após cerca de 14 dias de cultura, as amostras foram fixadas em formalina 10% por 1h (Reagen Quimibras Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e lavadas em PBS 0,1M; pH 7,4 a 37°C. Para evitar-se marcações inespecíficas, as culturas foram incubadas por 1 hora com albumina bovina (Sigma) 1% em PBS. Em seguida, as preparações foram incubadas com um anticorpo monoclonal anti-S-100 (1:200) (S-100 rabbit anti-cow, Dako cod. Z311) por 12 horas a 4°C. As amostras foram então lavadas em PBS a 37°C e incubadas com anticorpo secundário fluorescente (CY-3) por 1h. As células foram observadas em microscópio invertido (Olympus IX-50). Usou-se o corante cresil violeta para visualizar a morfologia em contraste de fase.

2.9 *Estudo in vivo*

2.9.1 *Animais e grupos experimentais*

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 20 camundongos da linhagem C57BL/6J, machos adultos (8-12 semanas), divididos em 2 grupos experimentais:

Grupos	Imunohistoquímica (n)	Microscopia Eletrônica (n)
1.Tubo vazio	4	6
2. Tubo preenchido com agrecan	4	6

2.9.2 Procedimento cirúrgico para a tubulização

Após anestesia (0.25g Ketamina and 0.02g Xylazina dissolvida em 5ml de água destilada, 0.2ml/25g 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, procedeu-se a exposição do nervo ciático. O nervo foi transeccionado e, após a retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados, com um ponto cirúrgico (fio mononylon 9-0, Ethicon), no interior de um tubo de polietileno (Clay Adams, comprimento=6,00mm, diâmetro interno=0,76mm e diâmetro externo=1,22mm), deixando-se um espaço de 4,0mm entre eles.

Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele fechada com 2 ou 3 grampos cirúrgicos. Os animais foram mantidos em biotério por um período de 5 semanas, recebendo ração e água *ad libitum*.

2.9.3 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica

Após anestesia com Hidrato de Cloral 10% (0,1 ml/20g, *i.p.*) os animais foram 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 e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 300ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38.

No momento posterior a fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo de polietileno 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 tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38 e dissecados sob lupa, sendo os cotos proximal e distal separados. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e contrastados com acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa de sacarose, por 12 horas. Posteriormente a passagem pelo acetato de uranila, os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS). Os blocos foram desbastados e secções semi-finas (0,5µm) obtidas e 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 ultra-finos (500Å; ultramicrotomo 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.

2.9.4 Processamento para Imunoistoquímica

Após um período de sobrevida de 5 semanas, os animais foram sacrificados seguindo-se o protocolo descrito no item anterior, substituindo-se a solução fixadora por formalina 10%. Posteriormente à fixação, os espécimes foram dissecados, imersos em tissue-tek (Milles Inc., USA) e congelados em n-hexano (J. Baket, SP), o qual foi mantido a -70°C em nitrogênio líquido. Cortes histológicos longitudinais com 10 µm de espessura foram obtidos em criostato (Leica) e as secções foram então transferidas para lâminas silanizadas e estocadas em um freezer até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunoistoquímica, os espécimes, após terem atingido a temperatura ambiente, foram imersos em PBS 0,01M, sendo a peroxidase endógena bloqueada com H₂O₂ 3% (3 vezes de 5 minutos). Posteriormente, foram incubados com uma solução de BSA 1% em PBS 0,01M por 1 hora. Em seguida, após três lavagens em PBS 0,01M, foi aplicado o anticorpo primário (S-100, 1:250 em BSA) (S-100 rabbit anti-cow, Dako cod. Z311) por um período de 12 horas.

Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário contendo peroxidase (Dako EnvisionTM, cod. K1491). A peroxidase foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenil tetrahydrochloride, Sigma cod.D 5637), as lâminas contracoradas com hematoxilina de Meyer e montadas em resina (Entelan, Merk).

2.9.5 Morfometria e contagem das fibras regeneradas

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: número de axônios mielínicos nos nervos normais, número de axônios mielínicos regenerados, diâmetro das fibras mielínicas [DFM], diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina [EBM] e razão "g" [RZG] ($RZG = DAM/DFM$). O estudo do comportamento das SC em particular, foi realizado a partir dos valores da EBM e da RZG, enquanto que a resposta regenerativa axonal foi avaliada pelos resultados do DFM e DAM.

A EBM é um parâmetro que ilustra diretamente o nível de atividade fisiológica das SC durante a regeneração, estando também relacionada à recuperação funcional do nervo, tendo sido utilizada na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (Lundbog *et al.*, 1982; Oliveira & Langone, 2000). A RZG, que corresponde ao quociente entre DAM e DFM, é um parâmetro morfométrico que expressa a relação que se

estabelece entre a SC e o axônio durante a regeneração funcional do nervo (Smith & Koles, 1970; Waxman, 1980).

Para a contagem de axônios mielínicos, três campos representativos de cada nervo regenerado, bem como de nervos não operados (n=3), foram digitalizados com 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 três campos amostrados em cada nervo regenerado, também 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 diâmetro das fibras mielínicas [DFM] e o diâmetro dos axônios mielínicos [DAM] forneceu a espessura da bainha de mielina [EBM]. A morfometria foi realizada empregando-se um sistema computadorizado, utilizando-se o programa Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics).

2.9.6 Análise Estatística

A partir dos resultados numéricos da contagem dos axônios mielínicos regenerados e dos axônios mielínicos presentes nos nervos contralaterais, assim como os dados morfométricos, foram calculadas média e desvio-padrão. Estes parâmetros foram então estudados pelo método da análise da variância - ANOVA. As diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram estudadas fazendo-se uso do teste de Newman Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Dosagem de GAGs e proteínas do agrecam e eletroforese em gel de agarose- poliacrilamida

Com o emprego de uma curva padrão, constatou-se que a concentração de GAGs no tubo D1 era 8,5mg/ml. Da mesma forma, a concentração de proteínas no interior do tubo D1 era 0,116mg/ml.

Amostras da fração D1 da ultracentrifugação foram precipitadas e aplicadas em gel de agarose-poliacrilamida. Após a corrida, o gel foi corado com azul de toluidina (AT). Observou-se um material polidisperso e metacromático que corresponde aos PGs de alto peso molecular.

Como ilustrado na Figura 1, observe-se que à esquerda estão as bandas correspondentes ao PG. Nos “slots”, foram aplicadas os seguintes volumes: 5 e 10 μ l, correspondendo à 255 μ g e 510 μ g de PG. À direita do gel, observe-se que os diferentes volumes de CS aplicados em cada “slot”, 5 e 10 μ l (1mg/ml), faz com que as bandas apresentem diferenças em suas densidades.

3.2. Estudo in vitro

3.2.1 Análise morfológica do nervo normal

Após a transecção do nervo ciático, foi observada a retração dos cotos. Retirou-se cerca de 1cm do segmento distal do nervo e seguiu-se o protocolo de procedimento do explante em cultura.

3.2.2 Migração e viabilidade celular do nervo normal (Figura 2)

A migração celular do explante foi analisada durante todo o período de cultivo. Durante o período de migração, observou-se que os maiores índices de migração ocorriam

quando utilizava-se maiores concentrações de SFB. Quando aplicada a concentração de 40%SFB, 7578 células migrantes foram obtidas. Quando adicionou-se 2 µl de agrecam (102 µg) o número de células migrantes foi de 6406 células. Porém, quando utilizada baixa concentração de soro fetal bovino, 20%SFB, e acrescentou-se 2 µl de agrecam, o número de células migrantes foi de 4247 células. Contudo, quando utilizou-se 20%SFB obteve-se 2601 células somente.

A adição do agrecam reduziu o descolamento celular, tanto em menor quanto em maior concentração de SFB, indicando um aumento da viabilidade celular. Adicionando-se agrecam ao meio com 40%SFB, o número de células não aderentes foi de 5200 células. A ausência do agrecam mostrou que o número de células atingia cerca de 10200. Utilizando-se baixas concentrações de soro, a viabilidade celular, com o acréscimo de agrecam, foi de 14600 e o não emprego do mesmo resultou em 16200 células destacadas.

3.2.3 Contraste de fase e imunomarcação do nervo normal (Figura 3)

Quando avaliado o número de células migrantes em contraste de fase, observou-se que as células migravam do explante de nervo periférico. Porém, o número de células era inferior ao nervo pré-degenerado.

É importante ressaltar que a degeneração das culturas deu-se em torno de 15 e 20 dias. Quando fez-se a imunomarcação para S-100, revelou-se que o número destas SC presentes na placa de cultura era discreto quando aplicado agrecam, nas diferentes concentrações de SFB.

3.2.4 Análise morfológica do nervo pré-degenerado

Uma semana após a transecção do nervo ciático, observou-se a retração dos cotos, sendo que o proximal apresentava, em sua extremidade, um tecido tipicamente cicatricial,

com aspecto e textura condizentes com um neuroma. O coto distal apresentava, em sua extremidade, aspecto fibrótico semelhante ao proximal. Distalmente à fibrose, o diâmetro do coto distal era superior ao de um nervo normal. Não observou-se qualquer tecido de ligação entre os cotos após a transecção do nervo.

3.2.5 Migração e viabilidade do nervo pré-degenerado (Figura 4)

O número de células migrantes do explante foi observado durante todo o período de migração. Observou-se que a migração das células que compõem o nervo periférico, fibroblastos e SC foi maior quando utilizou-se uma maior concentração de soro fetal bovino (40%SFB). Com 40% de SFB obteve-se um total de 8629 células. Quando adicionou-se 2 µl de agrecam (102 µg) o número de células migrantes foi de 8935 células. Porém, quando utilizada baixa concentração de soro fetal bovino, 20%SFB, e acrescentou-se 2 µl de agrecam (102 µg) o número de células migrantes foi de 6006 células. Em contrapartida, quando usou-se somente 20%SFB obteve-se 4922 células a partir do explante.

A viabilidade celular, contada a partir de células não aderentes à superfície, mostrou que, em baixas concentrações de SFB, o agrecam aumentou a viabilidade celular, tendo 1600 células destacadas, enquanto que, sem a adição de agrecam, o número de células não aderentes atingiu 2400 células.

Quando utilizada uma maior concentração de SFB e agrecam, o descolamento celular atingiu 1800 células e, quando ausente o agrecam, o número de células destacadas foi 4400 células.

3.2.6 Contraste de fase e imunomarcção do nervo pré-degenerado

(Figura 5)

Avaliando-se o número de células migrantes em contraste de fase, observou-se que a migração celular era superior quando elevou-se a concentração de SFB e aplicou-se o PG.

Observou-se que as células começavam a indicar sinais de degeneração por volta de 15 dias de cultura e a degeneração completa ocorria no 20^a dia.

A imunomarcção feita com o anticorpo S-100 evidenciou que a pré-degeneração do nervo ciático induziu um aumento significativo do número de SC migrantes. Ainda, o tratamento com agrecam associado à pré-degeneração resultou num aumento no número de células migrantes (aproximadamente 25%).

3.3 Estudo in vivo

3.3.1 Características morfológicas do nervo regenerado no interior do tubo vazio

(Figuras 6 A, C, E; Figura 7 A, C)

Nos cortes transversais pôde-se observar, ao microscópio óptico, a presença de um epineuro ligeiramente espessado contendo vasos sanguíneos de diversos calibres em seu interior. As fibras nervosas regeneradas apresentavam-se dispostas no interior dos fascículos delimitados por expansões citoplasmáticas de células perineurais (Figura 6A). Os fascículos apresentavam-se frouxos e com uma leve marcação das células perineurais. Os axônios regenerados relacionavam-se com as SC e geralmente apresentavam forma circular (Figura 6C). Em corte longitudinal, o citoplasma das SC revelou-se imuno-reativo para S100 (Figura 6E).

Ao microscópio eletrônico, os mini-fascículos apresentavam-se claramente delimitados pelas células perineurais. Os espaços entre as várias camadas de células perineurais estavam preenchidos por grupos de fibras colágenas dispostos paralelamente ao longo do eixo longitudinal do nervo. As células perineurais apresentavam núcleo geralmente com secção circular ou elíptica, apresentando pequena quantidade de cromatina condensada (Figura 7A, C).

No interior dos fascículos observou-se tanto axônios mielínicos quanto amielínicos. Os mielínicos possuíam maiores dimensões, sempre apresentando-se relacionados a uma única SC.

Os axônios amielínicos apresentavam-se organizados em pequenos grupos, sempre compartilhando projeções de uma mesma SC (Figura 7A, C).

O endoneuro apresentou uma grande quantidade de fibras colágenas (fibras reticulares), dispostas paralelamente ao longo do eixo longitudinal do nervo (Figura 7C).

3.3.2 Características morfológicas do nervo regenerado no interior do tubo preenchido com agrecam (Figura 6B, D, F; Figura 7B, D)

Nos cortes transversais observados ao microscópio óptico, constatou-se a presença de vários fascículos na porção regenerada. Estes estavam delimitados por um epineuro delgado, onde haviam alguns vasos sanguíneos. Os axônios regenerados encontravam-se no interior dos fascículos e apresentavam um diâmetro reduzido e semelhante entre si. Havia uma forte compartimentação destes fascículos e a presença de numerosas células perineurais. As SC associavam-se aos axônios mielínicos. Vasos epineurais, perineurais e endoneurais, distribuídos por todo o nervo, apresentavam diâmetros semelhantes entre si (Figura 6B, D).

Em cortes longitudinais observou-se uma imunomarcção para S-100 significativamente mais intensa que no tubo vazio (Figura 6F).

Ao microscópio eletrônico, observou-se que as células perineurais delimitavam os grupos de axônios regenerados (Figura 7B, D). Notou-se a presença, nas adjacências dos axônios mielínicos, de uma pequena quantidade de fibras colágenas endoneurais. Os axônios mielínicos relacionavam-se às projeções de uma única SC. Ultraestruturalmente visualizou-se também a membrana basal das SC e o endoneuro com poucas fibras de colágeno (Figura 7D).

Os axônios amielínicos possuíam diâmetro inferior aos mielínicos, estando envolvidos por processos citoplasmático de uma única SC (Figura 7D).

3.3.3 Contagem dos axônios mielínicos (Figura 8)

A figura 8 apresenta o número total de axônios mielínicos regenerados no interior do tubo de polietileno, após um período de cinco semanas. Foram quantificados os axônios obtidos no interior do tubo vazio, no interior do tubo preenchido com agrecam e no nervo normal de animais não operados.

Observou-se que o grupo controle não operado apresentou o maior número de axônios mielínicos ($4151 \pm 28,87$). No grupo onde o tubo foi implantado vazio, obteve-se $1522 \pm 424,58$ axônios mielínicos regenerados. Porém, quando o tubo foi preenchido com agrecam, houve a regeneração de $2343 \pm 370,31$ axônios mielínicos, sendo estatisticamente superior ao tubo vazio.

3.3.4 Parâmetros Morfométricos

No estudo morfométrico dos nervos regenerados em cada situação, assim como dos nervos normais, foram considerados os seguintes parâmetros: Diâmetro das Fibras

Mielínicas (DFM), o qual corresponde ao axônio e a sua bainha de mielina; Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM), correspondendo ao axônio sem a sua bainha de mielina; Espessura da Bainha de Mielina (EBM) e Razão "g" (RZG), a qual foi obtida a partir do quociente DAM/DFM.

O estudo das distribuições de frequência dos parâmetros acima mencionados, suas médias e respectivos desvios-padrão foram obtidos a partir dos dados amostrados em cada grupo.

3.3.4.1 Diâmetro dos axônios mielínicos (Tabela I, Figuras 9A, 9B e 9C)

Os animais do grupo controle apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,01 μ m e 9,0 μ m e uma média $3,40 \pm 1,37\mu$ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 2,01 μ m e 3,00 μ m e entre 3,01 μ m e 4,00 μ m, correspondendo a 30,25% e 29,04% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 41,71% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 0,67% possuíam diâmetro entre 0,01 a 1,0 μ m, 12,18% possuíam diâmetros de 1,01 μ m até 2,0 μ m, 14,06% entre 4,01 e 5,00 μ m, 9,1% entre 5,01 μ m e 6,00 μ m e 4,68% diâmetros eram maiores do que 6,00 μ m.

Os axônios do grupo com agrecam apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,01 μ m e 8,0 μ m e uma média $3,01 \pm 1,10\mu$ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 2,01 μ m e 3,00 μ m e entre 3,01 μ m e 4,00 μ m, correspondendo a 38,07% e 25,55% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 36,38% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 0,70% possuíam diâmetros de 0,01 μ m até 1,0 μ m, 17,39% entre 1,01 e 2,00 μ m, 12,92% entre 4,01 μ m e 5,00 μ m e 5,76% diâmetros eram maiores do que 5,00 μ m.

A distribuição de frequência do DAM no nervo normal variou de 0,01 a 11,0 μ m e média de $4,13 \pm 1,82\mu$ m. Neste grupo, 23,16% dos axônios mielínicos apresentaram diâmetro entre 3,01 e 4,00 μ m, 9,3% entre 1,01 e 2,0 μ m, 21,04% entre 2,01 e 3,00 μ m, 17,94% entre 4,01 e 5,00 μ m e 12,56% entre 5,01 e 6,00 μ m. Os demais 7,34% apresentaram-se entre 6,01 μ m e 7,0 μ m, 5,54% entre 7,01 μ m e 8,0 μ m, 1,79% entre 8,01 μ m e 9,0 μ m e 0,81% entre 9,01 e 11,0 μ m.

3.3.4.2 Diâmetro das fibras mielínicas (Tabela I, Figuras 10A, 10B e 10C)

Os animais cujo tubo foi deixado vazio, apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,00 a 10,0 μ m e média $4,53 \pm 1,56\mu$ m. As maiores porcentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 3,01 a 4,00 μ m e 4,01 a 5,00 μ m, correspondendo a 27,58% e 23,83% do total, respectivamente. As demais fibras mielínicas, que representam os 48,59% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 13,92% possuíam diâmetro entre 2,01 e 3,00 μ m, 15,80% entre 5,01 e 6,00 μ m e 9,1% entre 6,01 μ m e 7,0 μ m. Os restantes 7,79% distribuem-se entre 7,01 e 12,0 μ m.

Os animais cujo tubo foi preenchido com agrecam, apresentou fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,0 a 9,0 μ m e média $3,86 \pm 1,22\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram observadas nos intervalos de 2,01 a 3,00 μ m e 3,01 a 4,00 μ m, correspondendo a 27,24% e 31,31% do total, respectivamente. As demais fibras mielínicas, que representam os 41,45% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 2,09% possuíam diâmetro entre 1,01 e 2,0 μ m, 20,28% possuíam diâmetro entre 4,01 e 5,00 μ m, 12,13% entre 5,01 e 6,00 μ m e 6,59% entre 6,01 μ m e 9,0 μ m.

Os nervos não operados apresentaram fibras mielínicas variando de 1,0 a 14,0 μ m, com média 6,0 \pm 2,38 μ m. Destas, 46,81% apresentaram diâmetro num intervalo de 3,01 a 6,00 μ m. Os 53,19% restantes estavam distribuídos nos seguintes intervalos: 0,49% entre 1,01 e 2,00 μ m, 8,16% entre 2,01 e 3,00 μ m e 13,05% entre 6,01 e 7,00 μ m. Ainda foram observadas 11,26% de fibras entre 7,01 e 8,00 μ m e 20,07% de fibras distribuídas em porcentagens decrescentes nos intervalos 8,01 a 14,0 μ m restantes.

3.3.4.3 Espessura da bainha de mielina e razão "g" (Tabela I, Figuras 11A, 11B e 11C)

Os animais utilizados no grupo controle apresentaram valores de EBM distribuídos entre 0,1 e 0,9 μ m e média igual a 0,44 \pm 0,11 μ m. Destes, o intervalo que apresentou maior frequência, correspondendo a 35,88%, foi aquele entre 0,31 a 0,40 μ m, sendo seguido pelo intervalo entre 0,41 e 0,50 μ m, que representou 35,20% do total amostrado. Três outros pequenos contingentes de axônios mielínicos, representando 15,13%, 5,9% e 4,9%, apresentavam bainha de mielina com espessura entre 0,51 e 0,61 μ m, entre 0,61 e 0,70 μ m e 0,21 e 0,30 μ m respectivamente. Somente 2,54% das espessuras amostradas apresentaram-se superiores a 0,71 μ m e 0,27% entre 0,1 e 0,2 μ m. A razão "g" neste grupo apresentou valor médio de 0,74 \pm 0,08.

A distribuição de frequência da EBM dos animais no grupo com agrecam variou de 0,01 a 0,9 μ m e média de 0,36 \pm 0,10 μ m. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,31 e 0,4 μ m corresponderam a 43,64% do total. Dos 53,36% restantes, 25,94% possuíam espessura entre 0,21 μ m e 0,30 μ m, enquanto que 20,38% tinham distribuição entre a 0,41 μ m e 0,5 μ m. Os demais valores que somavam 8,94% e eram superiores a 0,51 μ m e 1,1% estavam entre 0,01 e 0,2 μ m. A RZG neste grupo tinha média de 0,76 \pm 0,07.

No grupo normal, a distribuição de frequência da EBM dos animais variou de 0,01 a 1,4 μ m. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,81 e 0,90 μ m corresponderam a 14,35% do total. 13,21% correspondem entre 0,71 e 0,80 μ m, 38,33% possuíam espessura inferior a 0,70 μ m, enquanto que 33,43% foram superiores a 0,91 μ m. O valor da RZG neste grupo tinha média de $0,68 \pm 0,08$.

4. DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

A regeneração nervosa periférica depende de vários eventos que contribuem para a formação de um microambiente adequado a sustentar o crescimento axonal, bem como da capacidade intrínseca dos neurônios de desenvolverem uma resposta regenerativa após a lesão (Fawcett & Keynes, 1990; Fawcett, 1992). Os elementos não neurais são fundamentais ao processo regenerativo, pois direcionam o crescimento axonal a partir do coto proximal em direção ao coto distal e participam da reorganização da região lesada. As células não neurais são responsáveis pela produção de fatores de crescimento tais como NGF, BDNF, GDNF, CNTF, os quais estimulam e dão suporte para o crescimento orientado dos axônios em regeneração (Barnes, 1985; Taniuchi *et al.*, 1988; Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999).

Diferentemente do SNP, o SNC não apresenta grande capacidade regenerativa. Os seus componentes celulares não dão suporte trófico para o direcionamento dos axônios em crescimento e, além disso, forma-se um tecido cicatricial após a lesão, que inibe o brotamento axonal.

Sabe-se que os componentes da MEC são fundamentais para o processo regenerativo, pois guiam os brotamentos axonais do coto proximal em direção ao coto distal. Os PGs são um dos maiores constituintes da MEC do nervo periférico ao lado do COL (Zuo *et al.*, 1997). Podem ser encontrados em diferentes tecidos como tendões, SNC, SNP e cartilagens. Para este estudo foram extraídos PGs a partir do processo xifóide de frango. Os PGs, por serem moléculas altamente conservadas entre as espécies, podem ser degradados e incorporados ao organismo receptor sem gerar uma resposta imunológica

prejudicial ao processo regenerativo (Heinegård & Sommarin, 1987a, b), semelhantemente ao COL, a LAM e ao HA (Fields *et al.*, 1989; Da-Silva *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, deu-se grande ênfase ao estudo dos componentes da MEC sobre as modificações que ocorrem nas células não neurais e no microambiente do nervo em resposta a uma determinada lesão. Neste sentido, muitas evidências experimentais comprovaram que os primeiros eventos subsequentes à axotomia são a reorganização dos componentes da MEC e a mudança de comportamento das SC, importantes para o processo regenerativo (Ide *et al.*, 1983; Hall, 1986; Gulati, 1988; Ide, 1996). Desta forma, o presente trabalho baseou-se no estudo da influência do PG de grande peso molecular, agregam, sobre a regeneração axonal, empregando-se para isso a técnica da tubulização. O modelo da tubulização é uma das técnicas de reparo usada após a lesão do nervo periférico. Esta técnica tem a vantagem de conectar os cotos retraídos e separados por uma fenda, o que não seria possível pela simples sutura dos mesmos. Além disso, serve para orientar os axônios em regeneração, evitar a deposição de tecido cicatricial neste microambiente e testar diversas substâncias, como moléculas da MEC, as próprias SC e os diversos fatores neurotróficos (Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Rodrigues *et al.*, 2000). Adicionalmente, estudamos os efeitos do agregam sobre a proliferação celular e migração das SC, utilizando como modelo de estudo a cultura de nervo ciático normal e pré-degenerado.

O agregam obtido por ultracentrifugação em gradiente de CsCl analisado em eletroforese em gel de agarose-poliacrilamida (Heinegård & Sommarin, 1987b), mostrou-se altamente polidisperso devido à grande variedade no tamanho dos GAGs que fazem parte desta molécula.

O agrecam, PG de alto peso molecular, foi quantificado quanto a concentração de GAGs (8,5mg/ml) e proteínas (0,116 mg/ml). Para o preenchimento da prótese tubular, colocou-se 2 µl da suspensão de agrecam, contendo 8,5 µg de proteoglicano. Já em cultura, adicionou-se 2µl contendo 102 µg de PG. Uma concentração semelhante foi empregada por Challacombe & Elam (1997) ao estudarem os efeitos do CS em explantes de nervo óptico.

O agrecam após ser ressuspendido em PBS, teve o aspecto físico em forma de um gel, possibilitando o preenchimento da prótese tubular sem que ocorresse seu vazamento. A consistência em forma de um gel viscoso permitiu que os axônios crescessem de forma orientada em direção ao coto distal.

No estudo *in vivo*, utilizamos como parâmetro quantitativo a contagem do número de axônios mielínicos regenerados após cinco semanas da tubulização do nervo ciático. O preenchimento da prótese tubular com agrecam, resultou na regeneração de aproximadamente 2350 axônios. Este valor foi significativamente superior àquele obtido quando o tubo foi deixado vazio (em torno de 1500 axônios regenerados). Contudo, ambos os grupos experimentais apresentaram um número de axônios inferiores àquele do nervo normal. O melhor resultado regenerativo axonal apresentado pelo grupo onde o tubo foi preenchido com agrecam, pode ter sido resultado das propriedades estruturais do PG, incluindo-se sua homologia com fatores de crescimento.

Neste sentido, está bem estabelecido que os GAGs ligados à proteína central dos PGs podem funcionar como receptores para fatores de crescimento, tais como FGF e o TGF-β. Estes podem estar envolvidos na orientação e crescimento axonal (Margolis & Margolis, 1993; Bovolenta & Espinosa, 2000). Ainda, a proteína central dos PGs apresenta três domínios globulares. O domínio G3 têm seqüência homóloga ao EGF e a LEC. Esse pode regular o crescimento axonal e interagir com outros componentes da MEC

(Hardingham & Fosam, 1992; Bovolenta & Espinosa, 2000; Knudson & Knudson, 2001).

Adicionalmente, outros estudos sugerem que os PGs tem característica de reter substâncias hidrossolúveis, tais como fatores neurotróficos (Knudson & Knudson, 2001), o que contribui para a hipótese de que houve um maior brotamento axonal no grupo onde o tubo foi preenchido com agrecam.

Embora existam alguns trabalhos mostrando que os constituintes dos PGs são inibitórios sobre a regeneração nervosa periférica (Snow *et al.*,1990; Brauwnell *et al.*,1995a, b; Zuo *et al.*,1997), outros, por sua vez, ressaltaram que os GAGs presentes nos PGs, possuem efeitos positivos sobre processo regenerativo (Gorio *et al.*,1996; Lesma *et al.*,1996; Challacombe & Elam, 1997; Gorio *et al.*,1997; Di Giullio *et al.*,2000; Spilker *et al.*,2001).

Sabe-se que o CS modula e orienta o crescimento axonal, sendo que seus efeitos dependem de sua concentração, do período regenerativo e do desenvolvimento do SNC e SNP (Anderson *et al.*,1998). Dessa forma, nossos resultados quanto ao número de axônios regenerados evidenciaram que os PGs têm efeitos positivos sobre a regeneração axonal. Essas moléculas podem ter retido fatores tróficos através dos componentes estruturais dos PGs e estes fatores de crescimento, por sua vez, influenciado positivamente no brotamento axonal.

Nossos resultados, no que diz respeito ao número de axônios regenerados no tubo vazio, foi equivalente a experimentos realizados por outros pesquisadores. Porém, o emprego do agrecam resultou em um número de axônios regenerados significativamente superior ao HA tanto com baixa quanto com alta viscosidade (Da-Silva, 2003).

Adicionalmente à contagem de axônios regenerados, analisamos diferentes parâmetros morfológicos; o DFM, o DAM, a EBM e a RZG. O estudo do comportamento

das SC em particular, foi realizado a partir dos valores da EBM e da RZG, enquanto que a resposta regenerativa axonal foi avaliada pelos resultados do DFM e DAM.

A EBM é um parâmetro que ilustra diretamente o nível de atividade fisiológica das SC durante a regeneração, estando também relacionada à recuperação funcional do nervo, tendo sido utilizada na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (Lundbog *et al.*, 1982; Oliveira & Langone, 2000). A RZG, que corresponde ao quociente entre DAM e DFM, é um parâmetro morfométrico que expressa a relação que se estabelece entre a SC e o axônio durante a regeneração funcional do nervo (Smith & Koles, 1970; Waxman, 1980). Em relação ao DFM e DAM, nossos resultados indicaram que o grupo tratado com agrecam apresentou axônios com menores dimensões comparativamente àqueles presentes no tubo vazio. A EBM seguiu o mesmo padrão desses últimos. Apesar dessas diferenças, os valores de RZG mostraram-se estatisticamente iguais nos grupos experimentais, demonstrando a existência de uma proporcionalidade no que diz respeito ao grau de mielinização. Estes resultados reforçam a hipótese de que o agrecam é capaz de estimular o brotamento axonal.

A análise da ultraestrutura do nervo periférico, mostrou que no caso do tubo preenchido com agrecam, havia epineuro e perineuro delgado, fascículos compactados e endoneuro com pouca proporção de fibras colágenas. Por outro lado, o tubo vazio apresentou um espesso epineuro e perineuro, com fascículos frouxos e endoneuro rico em fibras colágenas. Os nervos regenerados no interior de tubos vazios apresentaram um estado mais inicial do processo regenerativo; a grande espessura do perineuro indica que a barreira hemato-nervosa ainda está se estabelecendo. Já quando o tubo foi preenchido com agrecam, observou-se uma maior compactação dos fascículos, além desses apresentarem maior número de axônios; a camada perineural apresentou-se mais delgada evidenciando

que a barreira hemato-nervosa já estava melhor estabelecida. A menor quantidade de fibras colágenas reforça a hipótese de que o endoneuro apresentou-se num estado de maturação mais avançado em relação ao tubo vazio. Essas evidências demonstram que o agrecam otimizou o crescimento do nervo periférico assim como a sua maturação, em relação ao tubo vazio.

Após a lesão nervosa as SC são fundamentais para o processo regenerativo. Estas entram em processo mitótico acelerado durante o processo da degeneração Walleriana, devido à desconexão com os axônios em degeneração bem como a liberação das citocinas pelos macrófagos. Juntamente com os macrófagos, as SC participam da fagocitose dos axônios e das bainhas de mielina em processo degenerativo. As SC produzem fatores neurotróficos, como NGF, BDNF, CNTF, e GDNF (Salonem *et al.*,1987; Yoshii *et al.*,1987; Bruck *et al.*,1995; Jessen & Mirsky, 1995; Son & Thompson, 1995; Bruck, 1997; Zochodne, 2000) e regulam a expressão de receptores de alta e baixa afinidade para as neurotrofinas (Taniuchi *et al.*,1986; Raivich & Kreutzberg, 1987; Funakoshi *et al.*,1993; Madison & Archibald, 1994). Além disso, a membrana basal das SC serve como substrato para orientação axonal, através das bandas de Büngner (Politis *et al.*,1982). Ainda, a associação entre a SC com o axônio, induz a síntese da bainha de mielina, fundamental para os axônios mielínicos, pois a sua composição lípidica aumenta a velocidade de propagação do impulso nervoso (Ide, 1996; Garbay *et al.*,2000). A lâmina basal produzida pelas SC contém diversas moléculas da MEC, tais como o CSPG, a LAM, a FN, o COL e o HSPG. Logo após a lesão nervosa ela permanece como tubos, dando suporte ao crescimento axonal, migração e proliferação celular (Son & Thompson, 1995; Ide, 1996).

Nos experimentos *in vitro*, o agrecam foi utilizado em culturas primárias de explantes de nervos ciático normais e pré-degenerados para análise de seus efeitos sobre as SC. Assim, avaliando-se o efeito do agrecam sobre a migração e proliferação dos componentes não neurais do nervo periférico, ou seja, fibroblatos e SC, notou-se que a migração do explante do nervo normal aumentou sob maior concentração de SFB (40%). Contudo, em menor concentração de SFB (20%), o agrecam estimulou uma maior migração dos componentes celulares do nervo periférico. Nesse sentido, o agrecam mostrou-se importante para a migração celular pois, provavelmente devido às suas características de reter moléculas hidrossolúveis, como por exemplo os fatores para crescimento celular presentes no meio de cultura, proporcionou um maior estímulo para a migração celular a partir do explante.

O ensaio de viabilidade celular evidenciou que após a adição do agrecam, tanto em maiores concentrações quanto em menores concentrações de SFB, o número de células destacadas da placa de cultura foi significativamente reduzido. Acreditamos que, pelo fato do agrecam ter em sua estrutura uma sequência homóloga à LEC, esta é capaz de interagir com outras moléculas da MEC produzidas pelas células migrantes, fortalecendo a adesão destas células à superfície da placa de cultura, resultando numa maior viabilidade.

A marcação com S-100 revelou uma proporção de SC em todas as condições, sendo este número bastante amplificado quando empregou-se a pré-degeneração. Estes resultados estão de acordo com o fato do coto distal do nervo ciático pré-degenerado *in situ*, após uma semana, apresentar uma atividade celular significativamente aumentada. Esta técnica é utilizada para induzir a proliferação das SC *in vivo* com a finalidade de obter-se o maior rendimento *in vitro* (Danielsen *et al.*,1994; Keilhoff *et al.*,1999; Rodríguez *et al.*,2000, Verdú *et al.*,2000; Marcol *et al.*,2003).

No presente estudo, empregamos um modelo experimental baseado na pré-degeneração do nervo ciático e buscamos induzir uma maior proliferação das SC, no sentido de obter-se um maior número de SC *in vitro*. Assim, investigamos os efeitos do agrecam sobre o processo migratório e proliferativo destas células em cultura. De fato, a marcação com S-100, mostrou que as SC eram mais numerosas quando o nervo foi pré-degenerado, atingindo-se uma proporção de aproximadamente 25%. Esse método permitiu um bom rendimento na obtenção das SC, possibilitando também o estudo do comportamento de outras células não neurais, tais como os fibroblastos. Nossos experimentos revelaram que o número de células migrantes do nervo pré-degenerado foi superior ao nervo normal tanto em maior quanto em menor concentração de SFB.

De forma semelhante ao nervo normal, a viabilidade celular nessas condições experimentais mostrou melhores resultados com a presença de agrecam, tanto com maior quanto em menor concentração de SFB. Dessa forma, evidenciaram-se os efeitos positivos do agrecam nos experimentos *in vitro*, os quais estão de acordo com os resultados obtidos por Challacombe & Elam (1997) estudando explantes de nervo óptico.

Nossos resultados também mostraram que, independentemente do experimento, se o explante fosse pré-degenerado ou não, a maior concentração de SFB foi capaz de promover um rendimento maior no número de células migrantes, possivelmente pela maior disponibilidade de nutrientes. Porém, acreditamos que a condição com menor concentração de SFB, seja mais próxima da realidade encontrada no microambiente do nervo periférico.

Tendo-se em vista a estrutura do agrecam e sua capacidade de reter moléculas hidrossolúveis, associadas a sua homologia com fatores de crescimento e a interação com outros componentes da MEC, acreditamos que o agrecam atue positivamente no processo regenerativo, agindo principalmente sobre a atividade das SC e no brotamento axonal. Os

resultados *in vitro* por nós obtidos, associados àqueles já presentes na literatura, reforçam esta hipótese. Contudo, há necessidade de aprofundar os conhecimentos dos efeitos do agrecam sobre o processo regenerativo no SNP. Assim, provavelmente o emprego de culturas de SC purificadas, bem como o estudo de diferentes concentrações dos PGs *in vitro* e *in vivo* será de grande importância para a consolidação dessa hipótese.

Por fim, a associação do agrecam com outros componentes da MEC, tais como o COL, LAM, decorim, FN e outros, também será de grande relevância para o melhor entendimento da biologia da regeneração do SNP. Ainda, a digestão enzimática do agrecam, de modo a obter-se a proteína central bem como os GAGs purificados, permitirá uma melhor compreensão da importância relativa de cada componente dessa macromolécula para o processo regenerativo axonal.

Conclusões

- 1) A análise do processo regenerativo *in vivo* mostrou que a utilização do agrecam na tubulização aumenta o número dos axônios mielínicos em relação ao grupo controle.
- 2) Embora o diâmetro do axônio, da fibra e a espessura da bainha de mielina tenham sido menores na presença do agrecam, comparativamente ao controle, a razão "g" manteve-se constante, indicando uma proporcionalidade entre as dimensões dos axônios regenerados e sua bainha de mielina.
- 3) O tratamento com agrecam promove o aumento da imunoreatividade para a proteína S-100 *in vivo*, reforçando a hipótese de que este PG influencia positivamente no processo regenerativo do SNP.
- 4) A pré-degeneração do nervo ciático otimizou a migração e a multiplicação das SC *in vitro*.
- 5) O estudo *in vitro* mostrou que o agrecam é capaz de estimular a migração celular quando utilizada uma menor concentração de SFB. Tal estímulo não foi evidente sob uma maior concentração de SFB.
- 6) O agrecam é capaz de aumentar a viabilidade celular *in vitro*, independentemente da concentração de SFB.

5. Figuras e Tabelas

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose poliacrilamida do proteoglicano agrecam. O aspecto altamente polidisperso se deve à diversidade no comprimento das cadeias de glicosaminoglicanos presente no proteoglicano. À direita está o padrão de condroitin sulfato (CS).

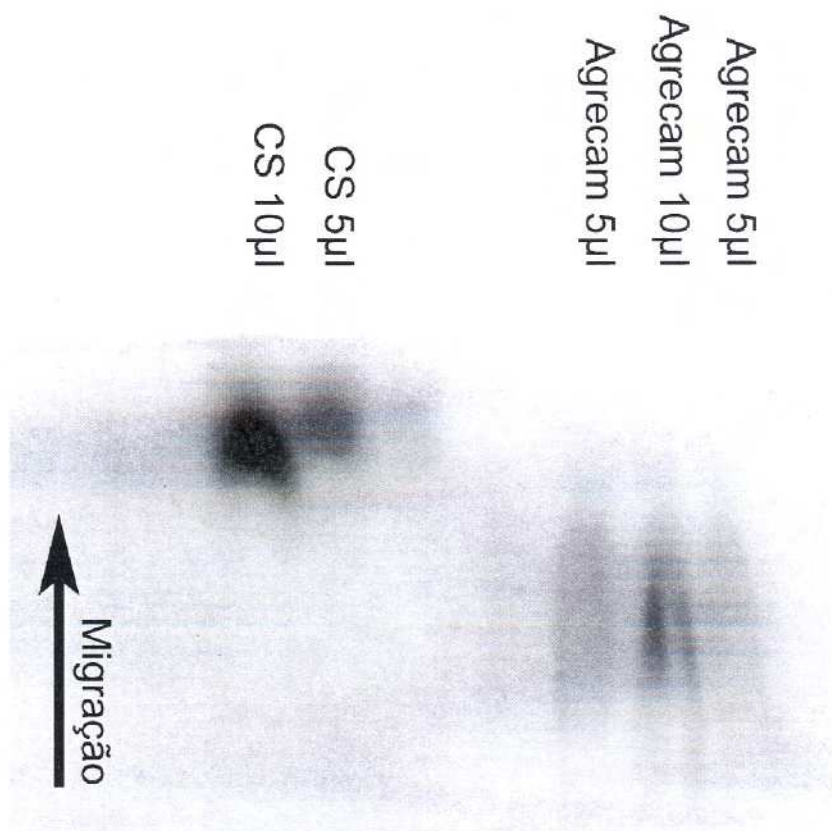


Figura 2 – A. Migração de células não neurais do explante do nervo em diferentes condições experimentais. Observe-se que, em menor concentração de SFB, o agrecam estimula uma maior migração celular. **B.** Contagem de células não aderidas à placa de cultura, após de 14 dias de cultivo. Notar que a adição de agrecam aumenta a viabilidade celular.

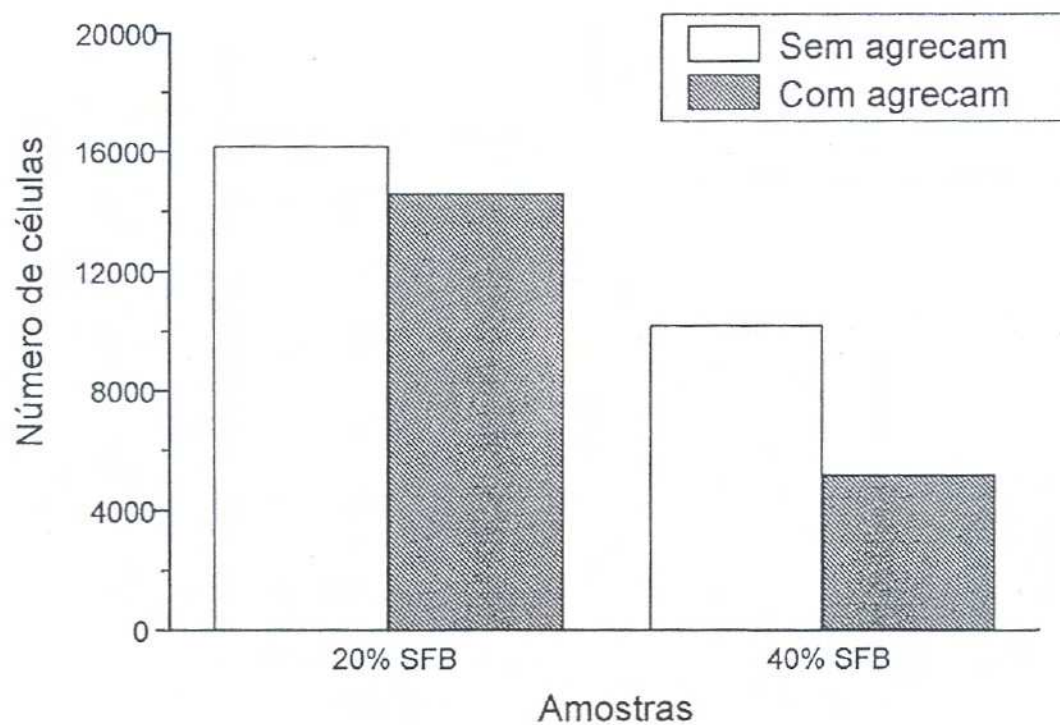
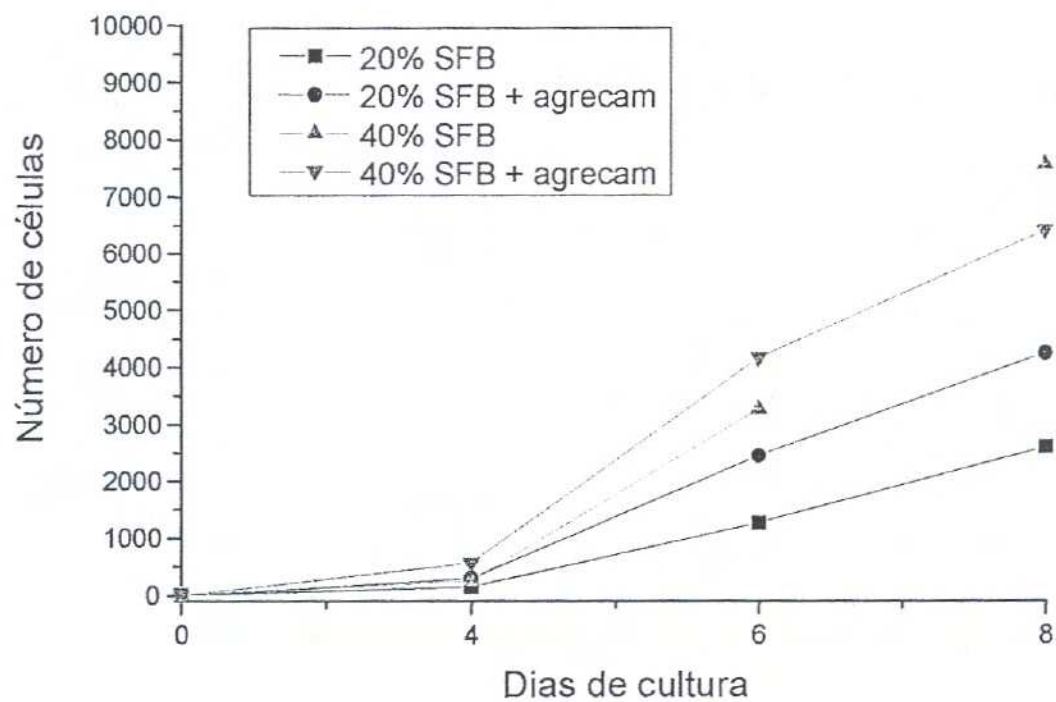


Figura 3 – Células migrantes coradas com cresil violeta após 14 dias de cultura e imunocitoquímica (anticorpo S-100) para células de Schwann, nas diferentes condições experimentais. **A, B.** 20% de soro fetal bovino (SFB), **C, D.** 20% SFB com agregam, **E, F.** 40% SFB, **G, H.** 40% SFB com agregam. (**A, C, E, G**) Vista panorâmica das células em cultura; escala=50µm. (**B, D, F, H**). Marcação do anticorpo S-100 nas células de Schwann; escala = 50µm.

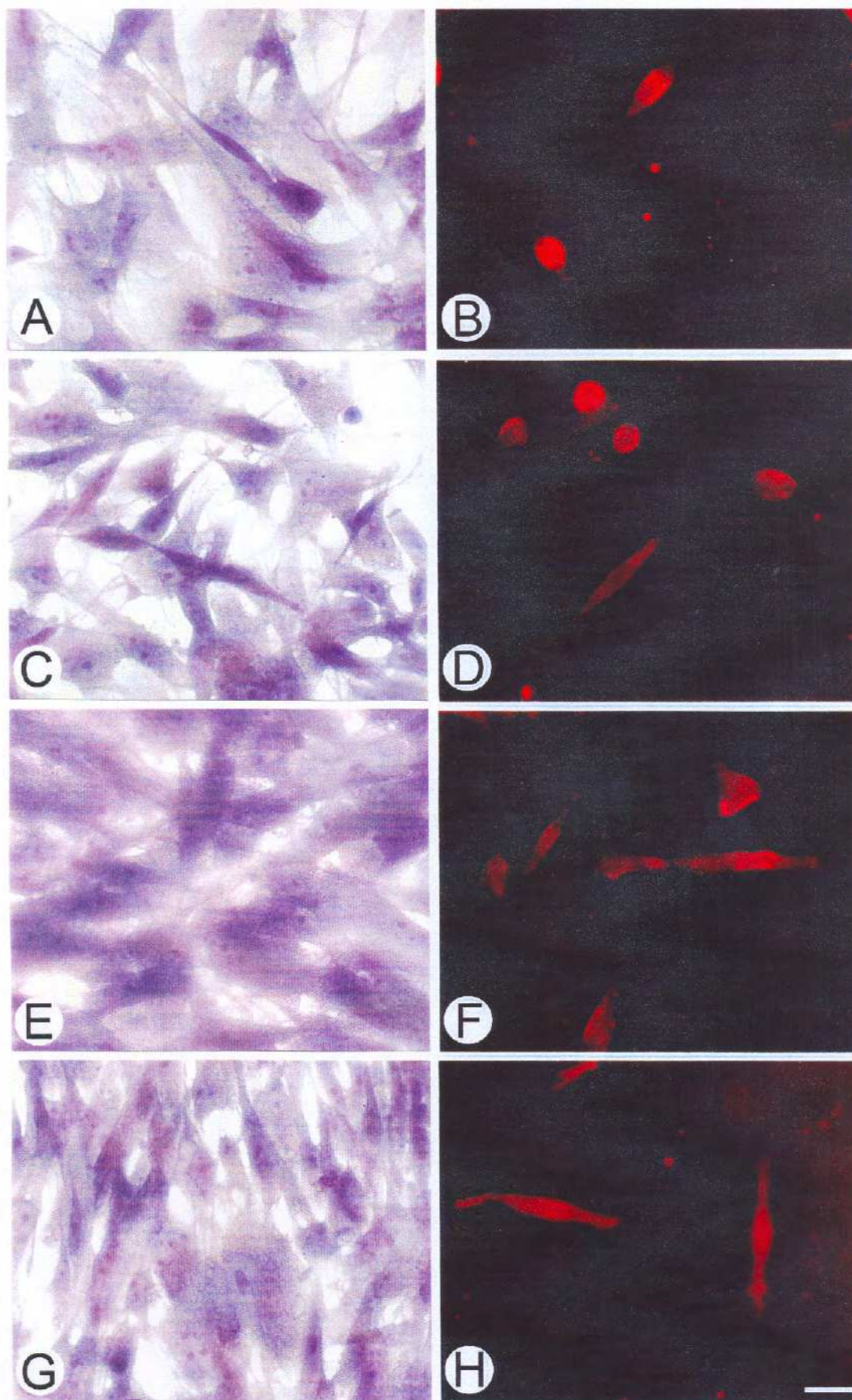


Figura 4 – A. Migração das células não neurais do explante do nervo ciático pré-degenerado nas diferentes condições experimentais. **B.** Contagem de células não aderidas à placa de cultura, após de 14 dias de cultivo.

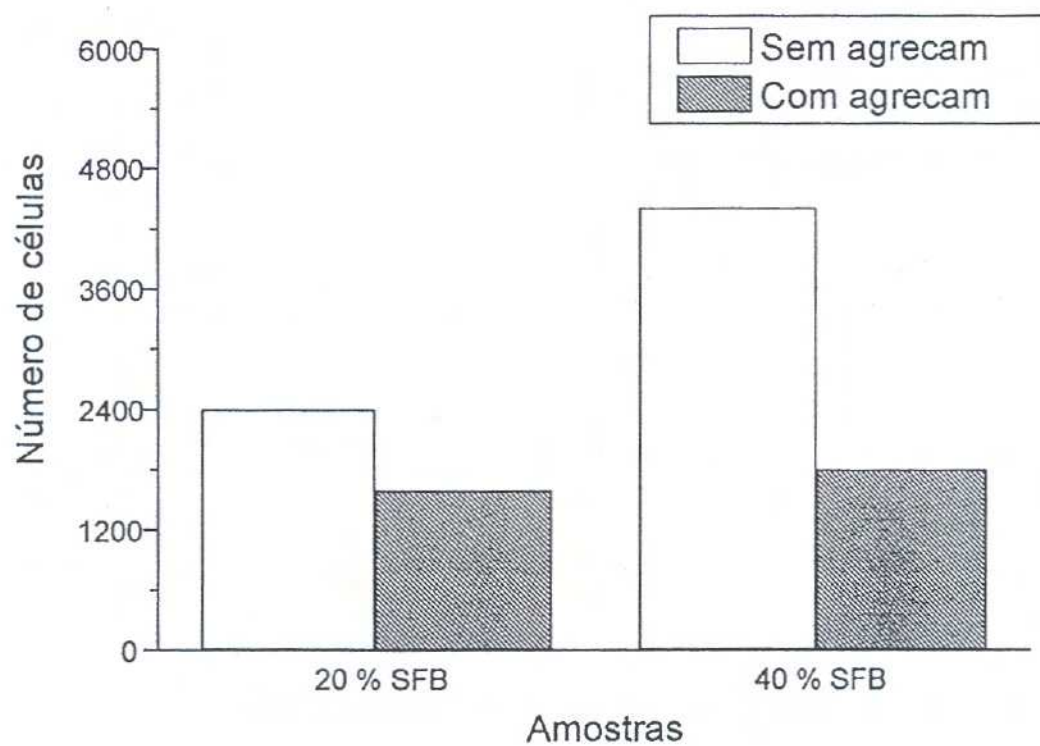
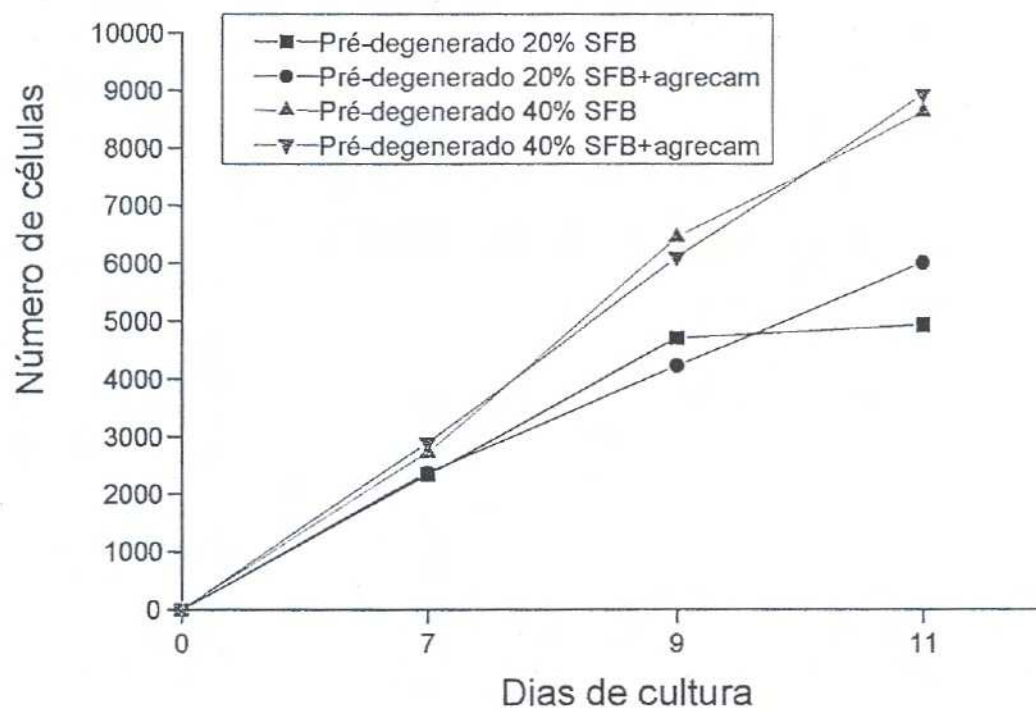


Figura 5- Células migrantes coradas com cresil violeta após 14 dias de cultura e imunocitoquímica (anticorpo S-100) para células de Schwann de explantes de nervos pré-degenerados, nas diferentes condições experimentais. **A, B.** 20% de soro fetal bovino (SFB), **C, D.** 20% SFB com agregam, **E, F.** 40% SFB, **G, H.** 40% SFB com agregam. (**A, C, E, G**) Vista panorâmica das células em cultura; escala=50µm. (**B, D, F, H**). Marcação com S-100 nas células de Schwann; escala = 50µm.

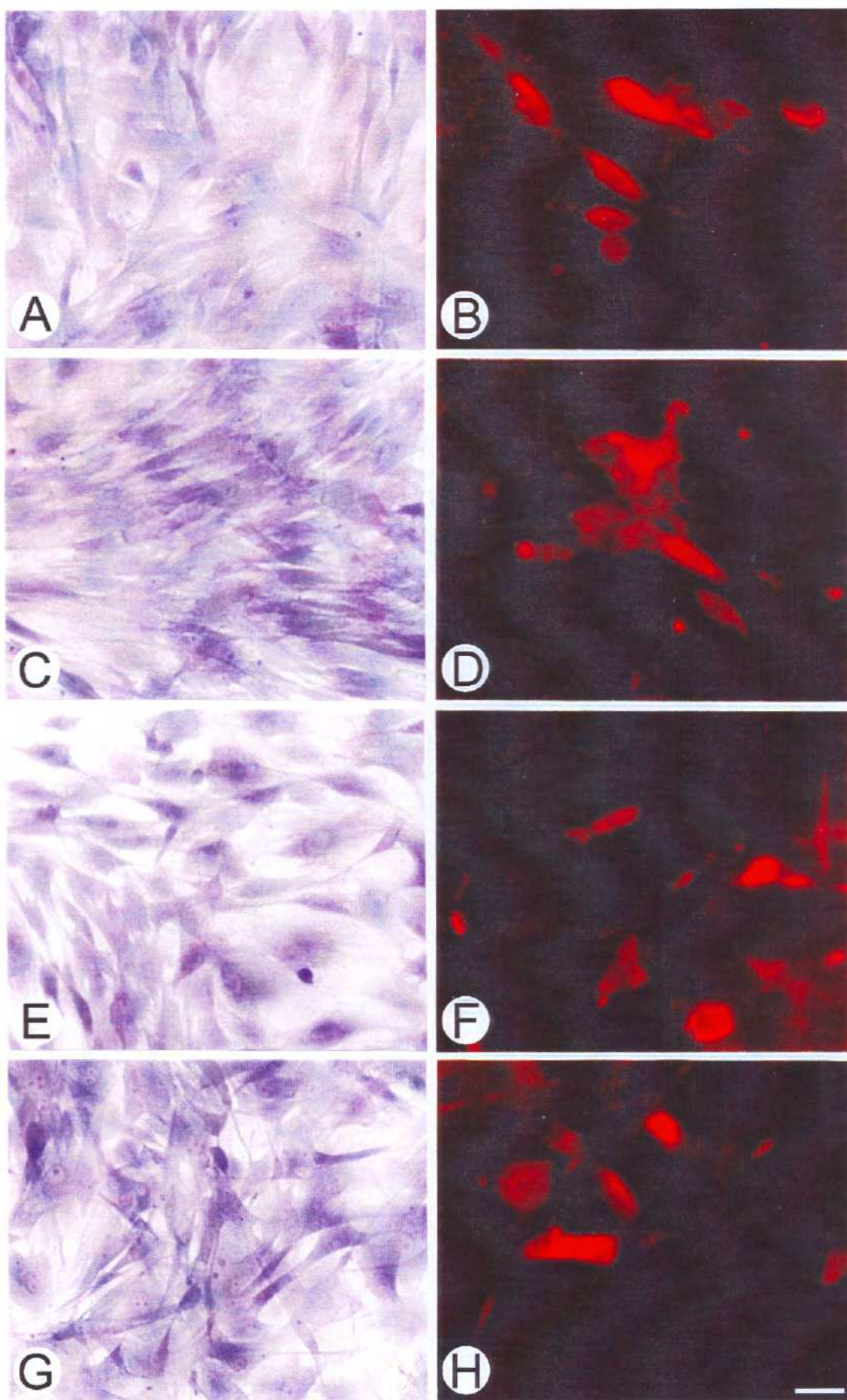


Figura 6 – Vista panorâmica do nervo regenerado, 5 semanas após a tubulização. **A.** tubo vazio, **B.** tubo preenchido com o gel de agreca.; escala = 50 μm . **C.** Secção transversal do nervo regenerado no interior do tubo vazio. Note o menor grau de fasciculação (setas). **D.** Detalhes do nervo regenerado do grupo tratado com o agreca em uma secção transversal. Observe os mini-fascículos (setas) e o endoneuro compactado. **E., F.** Imunohistoquímica para S-100 realizadas em secções longitudinais do nervo regenerado. Note a marcação mais intensa dos processos das células de Schwann quando o tubo foi preenchido com o gel de agreca (**F.**, setas) comparativamente ao tubo vazio (**E.**, setas). escala = 15 μm .

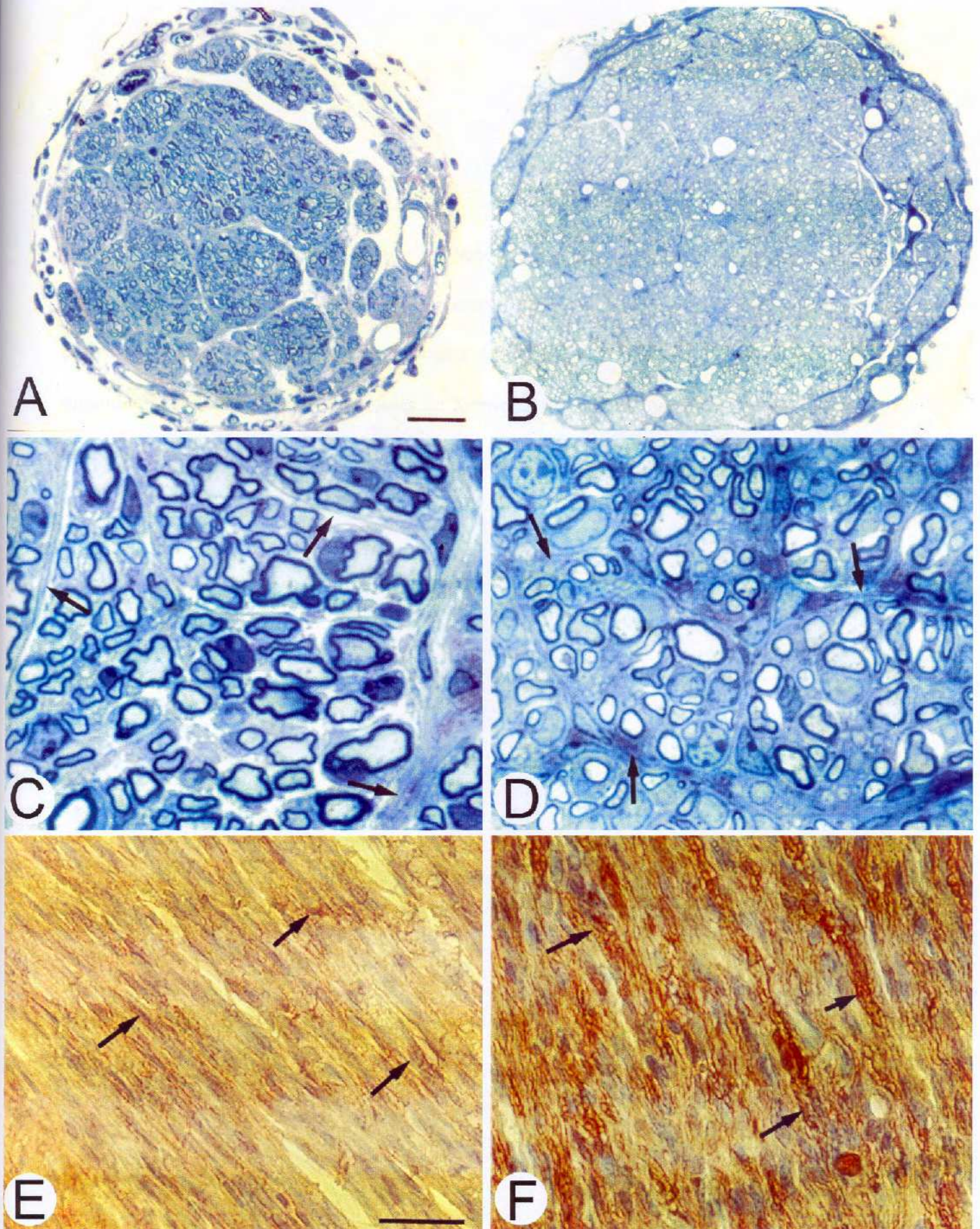


Figura 7- Fotomicrografia eletrônica de um nervo regenerado, 5 semanas após tubulização. **A-C.** Tubo vazio, **B-D.** Tubo preenchido com agrecam. Observe os fascículos delimitados pelas células perineurais (setas). Note a presença de grupos de axônios amielínicos (cabeças de seta), axônios mielínicos com suas respectivas células de Schwann (*) e fibras colágenas do endoneuro (**), escala = 5 μ m.

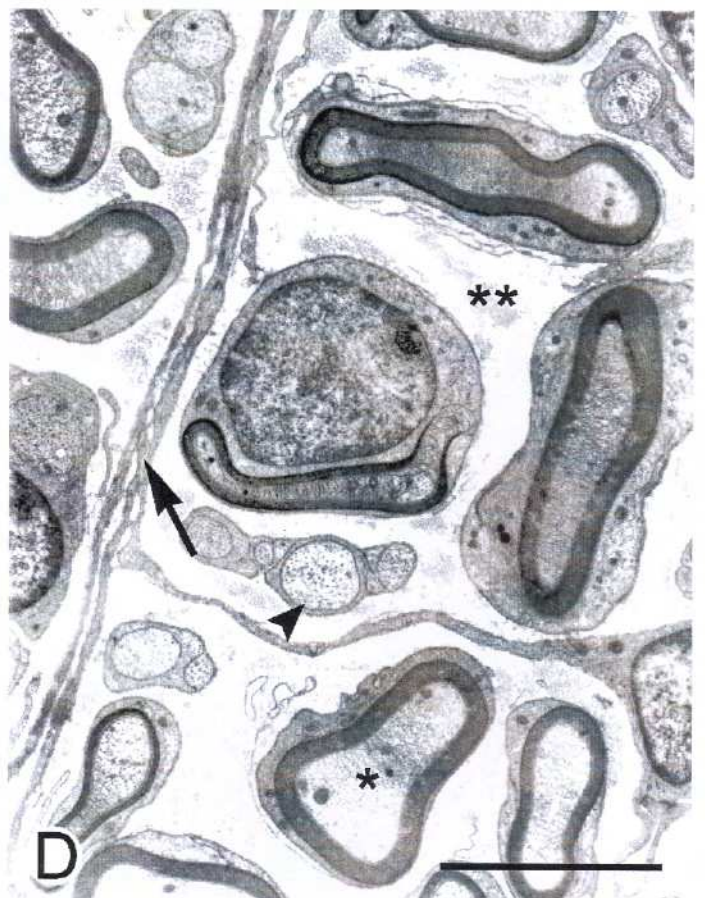
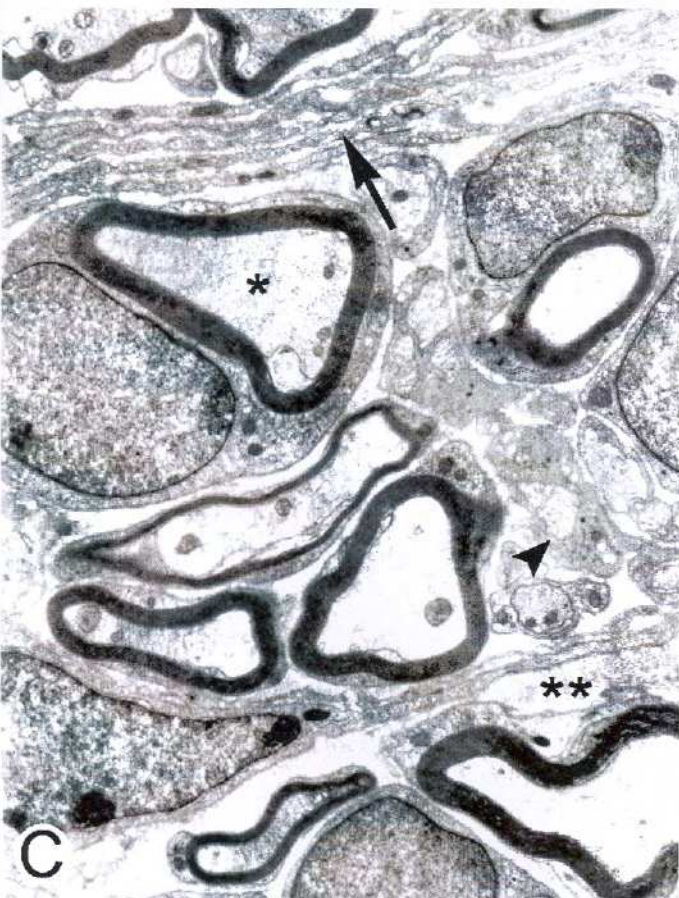
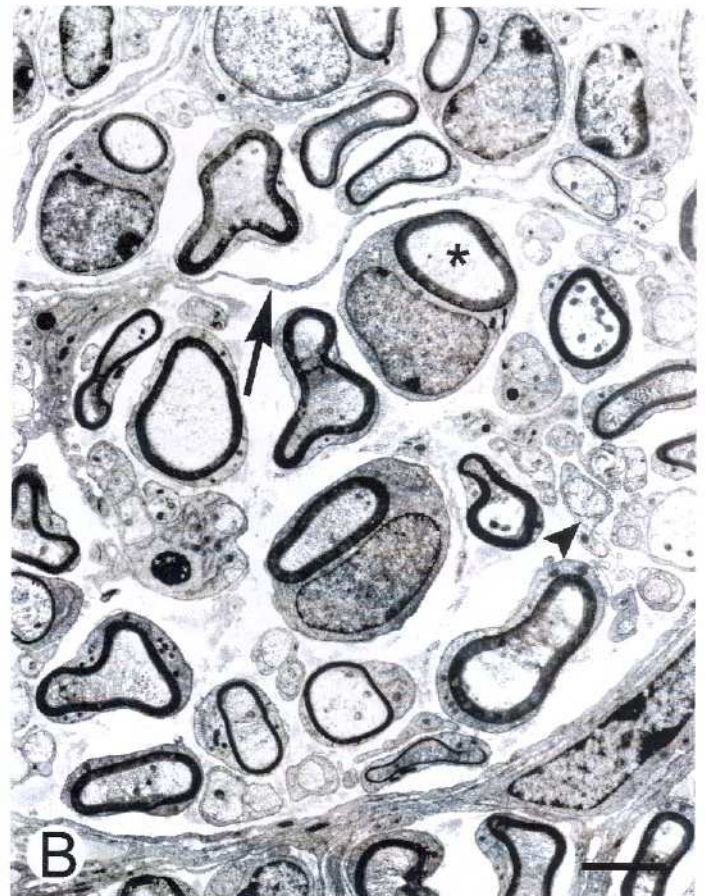
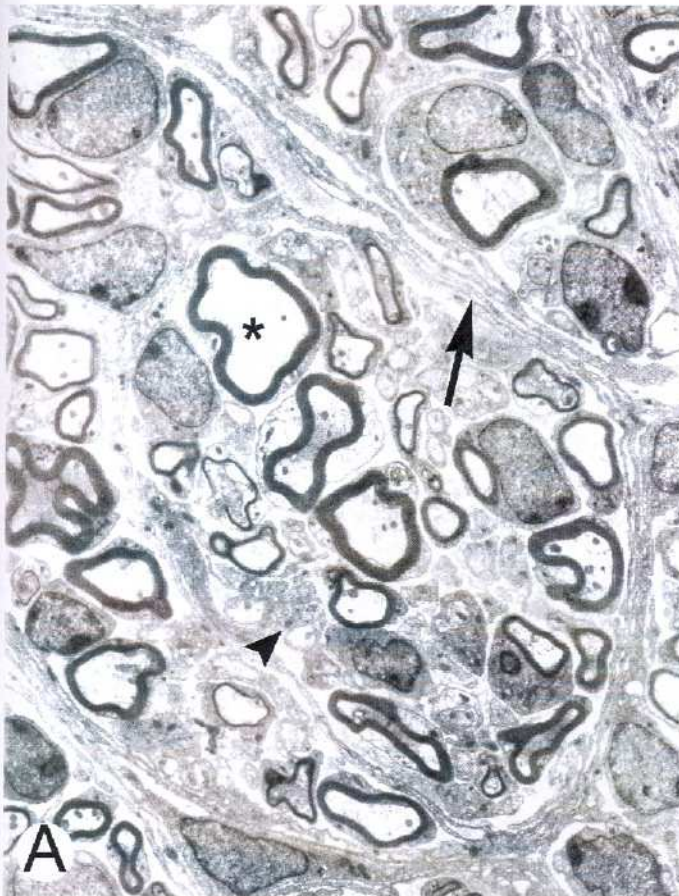


Figura 8 – Número de fibras regeneradas 5 semanas após a tubulização. Observe que o grupo onde o tubo foi preenchido com agrecam, mostrou um número maior de axônios mielínicos comparativamente ao tubo vazio. Esse, porém, foi inferior ao valor encontrado no normal (* $P < 0.05$; Teste de Newman-Keuls).

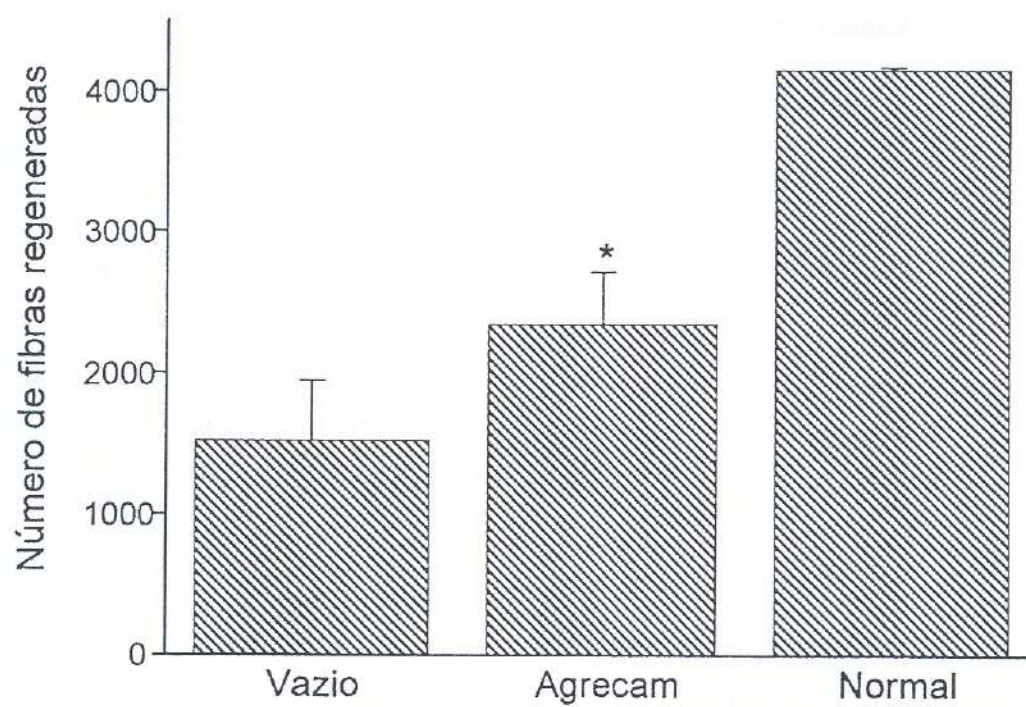
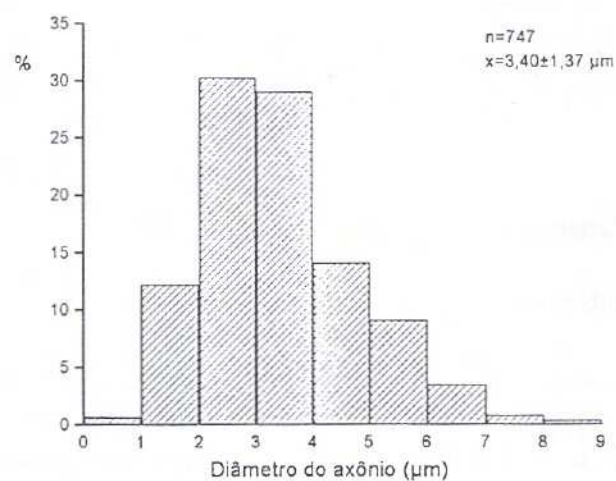


Figura 9- Distribuição de frequência dos axônios mielínicos regenerados obtidos na porção média do tubo de polietileno, 5 semanas após a tubulização. **A.** Diâmetro dos axônios mielínicos do grupo onde o tubo permaneceu vazio (μm), **B.** Diâmetro dos axônios mielínicos do tubo preenchido com agregam (μm), **C.** Diâmetro dos axônios mielínicos do nervo normal (μm). O valor **n** significa o número de axônios amostrados e **x** a média \pm SD (μm) de cada parâmetro.

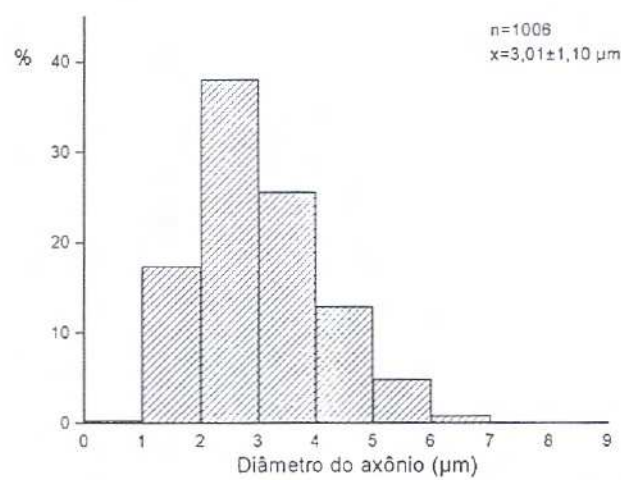
A

Tubo vazio



B

Tubo preenchido com agrecam



C

Nervo normal

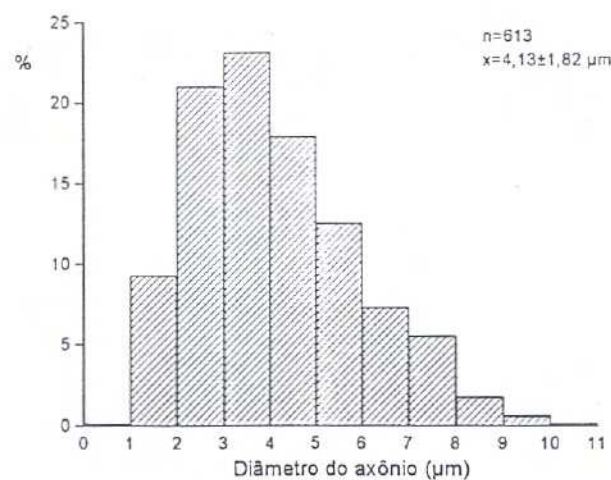
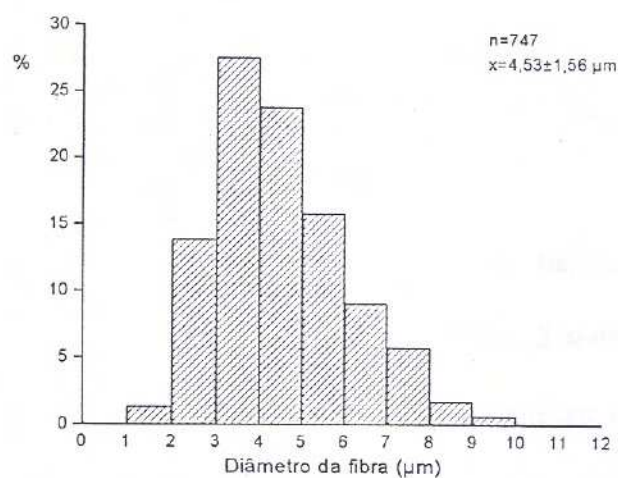


Figura 10- Distribuição de frequência das fibras mielínicas regeneradas obtidas na porção média do tubo de polietileno, 5 semanas após a tubulização. **A.** Diâmetro das fibras mielínicas do grupo onde o tubo permaneceu vazio (μm), **B.** Diâmetro das fibras mielínicas do tubo preenchido com agrecam (μm), **C.** Diâmetro das fibras mielínicas do nervo normal (μm). O valor **n** significa o número de axônios amostrados e **x** a média \pm SD (μm) de cada parâmetro.

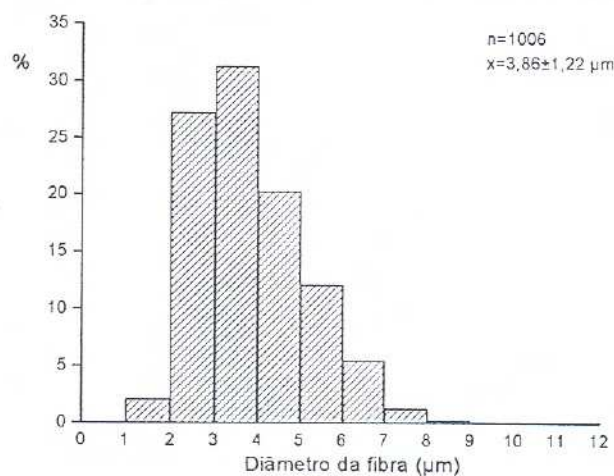
A

Tubo vazio



B

Tubo preenchido com agregan



C

Nervo normal

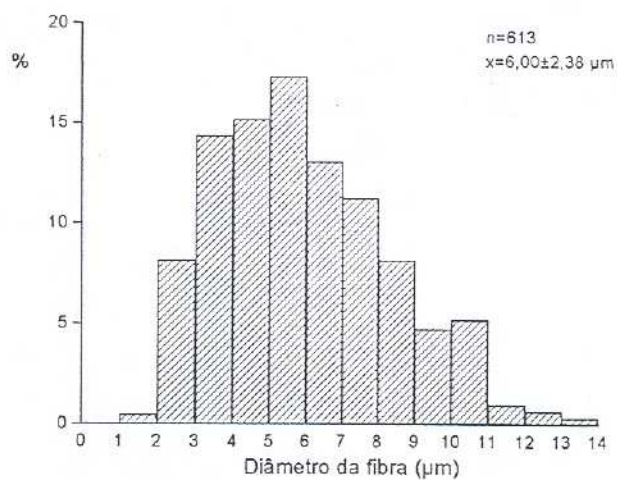
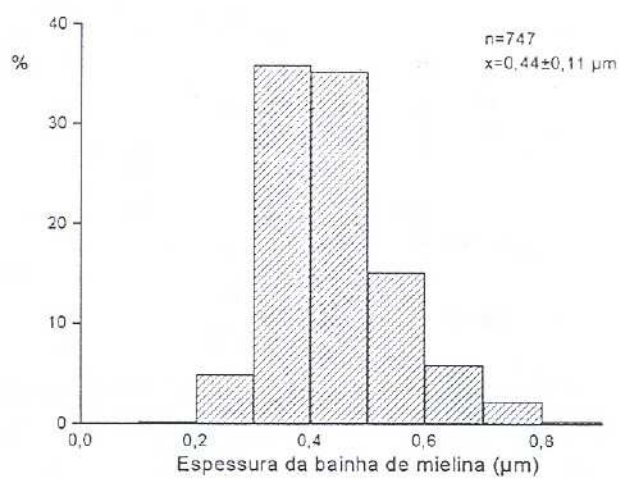
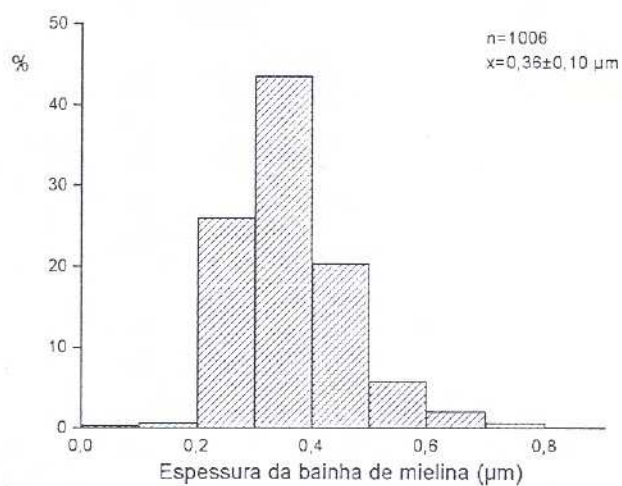


Figura 11- Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina dos axônios regenerados obtidos na porção média do tubo de polietileno, 5 semanas após a tubulização. **A.** Espessura da bainha de mielina do grupo onde o tubo permaneceu vazio (μm), **B.** Espessura da bainha de mielina do tubo preenchido com agrecam (μm), **C.** Espessura da bainha de mielina do nervo normal (μm). O valor **n** significa o número de axônios amostrados e **x** a média \pm SD (μm) de cada parâmetro.

A Tubo vazio



B Tubo preenchido com agregam



C Nervo normal

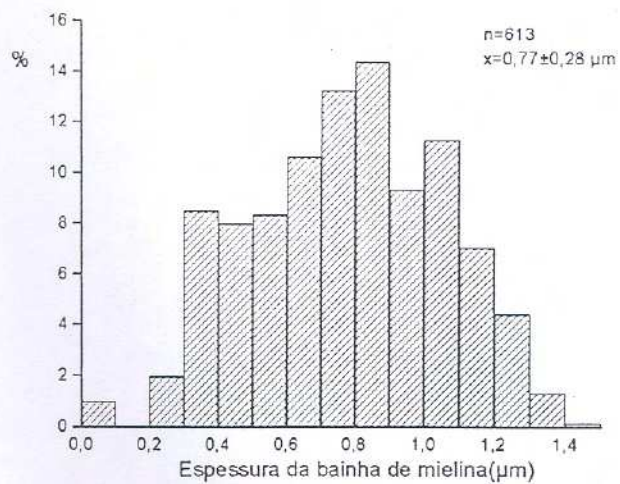


Tabela I – Dados morfométricos obtidos dos axônios regenerados, cinco semanas após a tubulização. O valor **n** significa o número de axônios contados e **g** significa a razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. Valores apresentados como média \pm SD.

Grupo	n	Diâmetro do axônio (μm)	Diâmetro da fibra (μm)	Bainha de mielina (μm)	Razão "g"
Agrecam	1006	3.01 ± 0.10	3.86 ± 1.22	0.36 ± 0.10	0.76 ± 0.06
Vazio	744	3.40 ± 1.37	4.53 ± 1.56	0.44 ± 0.11	0.74 ± 0.08
Normal	613	4.13 ± 1.82	6.00 ± 2.38	0.77 ± 0.28	0.68 ± 0.08

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABERNITHY, D. A.; THOMAS, P. K; RUD, A. *et al.* Mutual attraction between imigrant cells from transected denervated nerve. **J. Anat.**, v.84, p.239-249, 1994.
 2. ACHESON, A.; BARKER, P. A.; ALDERSON, R. F. *et al.* Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: Inhibition by antibodies to NGF. **Neuron**, v.7, p.265-275, 1991.
 3. ANDERSON, R. B.; WALZ, A.; HOLT, C. E.; KEY, B. Chondroitin sulfates module axon guidance in embryonic *Xenopus* brain. **Devlopmental Biology**, v.202, p.235-243, 1998.
 4. BAILEY, S. B.; EICHLER, M. E.; VILLADIEGO, A.; RICH, K. M. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicone chambers. **J. Neurocytol.**, v.22, p.176-184, 1993.
 5. BARNES, D. M. What makes nerves regenerate? Many experimental strategies revolve around a central issue: What conditions promote regeneration and functional recovery in mammalian nerves? **Science**, v.230, p.1024-1025, 1985.
 6. BERRY, M.; HALL, S.; FOLLOWS, R.; REES, L.; GREGSON, N.; SIEVERS, J. Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. **J. Neurocytol.**, V.17, p.727-744, 1988.
-
-

Citações bibliográficas de acordo com as normas da ABNT 6023, ago. 2000.

7. BEUCHE, W.; FRIED, R. L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, V.13, p.767-796, 1984.

8. BLOCH, J.; FINE, E. G.; BOUCHE, N.; ZURN, A. D.; AEBISCHER, P. Nerve growth factor and neurotrophin-3 releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. **Experimental Neurology**, v.172, p.425-432, 2001.

9. BOVOLENTA, P.; ESPINOSA, I. F. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outhgrowth. **Progress in Neurobiology**, v. 61, p.113-132, 2000

10. BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Ann. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

11. BRAUNEWELL, K. -H.; PESHEVA, P.; MCCATHY, J. B.; FURCHT, L. T. *et al.* Functional involvement of sciatic nerve derived-versicam and decorin-like molecules and other chondroitin sulphate proteoglycans in ECM-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. **European Journal of Neurosc.**, v.7, p.805-814, 1995a.

12. BRAUNEWELL, K. -H.; MARTINI, R.; LE BARON, R.; KRESSE, H. *et al.* Up-regulation of a chondroitin sulphate epitope during regeneration of mouse sciatic nerve: Evidence that the immunoreactive molecules are related to the chondroitin sulphate proteoglycans decorin and versican. **European Journal of Neurosc.**, v.7, p.792-804, 1995b.

-
13. BRUCK, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. **Brain Pathol.**, v.7, p.741-752, 1997.
 14. BRUCK, W.; BRUCK, C.; MARUSHAK, B.; FRIED, R. L. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. **Acta Neuropathol.**, V.89, p.363-367, 1995.
 15. CAJAL, S. R. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner, p.469, 1959.
 16. CHALLACOMBE, J.; ELAM, J. S. Chondroitin 4-sulphate stimulates regeneration of goldfish retinal axons. **Experimental Neurology**, v.143, p.10-17, 1997.
 17. CHEN, Z. Y.; CHAI, Y. F., Cao, L. *et al.* Glial cell line derived neurotrphic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rat. **Brain Research**, v.902, n.2, p.272-276, 2001.
 18. CHENG, C.; ZOCHODNE, W. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. **Neuroscience**, v.115, n.1, p.321-329, 2002.
 19. CHENG, E. T.; UTLEY, D. S.; Ho, P.-R. *et al.* Functional recovery of transected nerves treated with systemic BDNF and CNTF. **Microsurgery**, v.18, p.35-41, 1998.

-
20. CONDIC, M. L.; SNOW, D. M.; LETOURNEAU, P. C. Embryonic neurons adapt to the inhibitory proteoglycan aggrecan by increasing integrin expression. **The Journal of Neuroscience**, v.19, n.22, p.10036-10043, 1999.
21. DANIELSEN, N.; KERNS, J. M.; HOLMQUIST, B. *et al.* Pre-degenerated nerve grafts enhance regeneration by shortening the initial delay period. **Brain Research**, v.666, p.250-254, 1994.
22. DA-SILVA, C. F.; DA GAMA, S. A. M.; JÚNIOR, R. M.; PEREIRA, F. C. Influence of highly purified of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration in vivo. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.20, n.2, p.121-124, 2003.
23. DI GIULIO, A. M.; GERMANI, E.; LESMA, E. *et al.* Glycosaminoglycans co-administration enhance insulin-like growth factor-I neuroprotective and neurodegenerative activity in traumatic and genetic models of motor neuron disease: a review. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v.18, p.339-346, 2000.
24. DISTEFANO, P. S.; FRIEDMAN, B.; RADZIEJEWSKI, C. *et al.* The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograded axonal transport in peripheral and central neurons. **Neuron**, v.8, p.983-993, 1992.
25. FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphate glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Bioch. Bioph. Acta**, v.883, p.173-177, 1986.

-
26. FAWCETT, J. W. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. **TINS**, v.15 n.1, p.5-8, 1992.
27. FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. Peripheral nerve regeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**, v.13, p.43-60, 1990.
28. FIELDS, R. D.; LE BEAU, J. M.; LONGO, F. M. *et al.* Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**, v.33, p. 87-134, 1989.
29. FRANZÉN, A.; BJÖRNSSON, S.; HEINEGÅRD, D. Cartilage proteoglycan aggregate formation. Role of link protein. **Biochem. J.**, v.197, p.669-674, 1981.
30. FRYER, H. J. L.; KELLY, G. M.; MOLINARO, L.; HOCKFIELD, S. The high weight cat-301 chondroitin sulphate proteoglycan from brain is related to the large aggregating proteoglycan from cartilage, aggrecan. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.14, p.9874-9883, 1992.
31. FUNAKOSHI, H., FRISEN, J., BARBANY, G. *et al.* Differential expression of messenger- RNAs for neurotrophins and their receptor after axotomy of the sciatic nerve. **J. Cell Biol.**, v.123, n.2, p.455-465, 1993.
32. GARBAY, B.; HEAPE, A. M.; SARGUEIL, F.; CASSAGNE, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.61, p.267-304, 2000.

-
33. GORIO, A.; LESMA, E.; VERGANI, L.; DI GIULIO, A. M. Glycosaminoglycan supplementation promotes nerve regeneration and muscle reinnervation. **European Journal of Neuroscience**, v.9, n.8, p.1748-1753, 1997.

 34. GORIO, A.; VERGANI, L.; LESMA, E.; DI GIULIO, A. M. Neuroprotection, neuroregeneration, and interaction with insulin-like growth factor-1: Novel non-anticoagulant action of glycosaminoglycans. **Journal of Neurociense Research**, v.51, n.5, p.559-562, 1998.

 35. GORIO, A.; VERGANI, L.; FERRO, L. *et al.* Glycosaminoglycans in nerve injury: II. Effects on transganglionic degeneration and on the expression of neurotrophic factors. **Journal of Neurosc. Research**, v.46, p.572-580, 1996.

 36. GULATI, A. K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. **J. Neurosurg.**, v.68, p.117-123, 1988.

 37. GUTH, L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. **Peripheral Nervous System Regeneration**, v.36, p.441-478, 1956.

 38. HALL, S. M. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. **Neruropath. and Applied Neurobiology**, v.12, n.1, p.27-46, 1986.

 39. HARDINGHAM, T. E; FOSAM, A. T. Proteoglycans: Many forms and many fuctions. **Faseb Journal**, v.6, n.3, p.861-870, 1992.

-
40. HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y.; HERBOM, E. *et al.* Assay of proteoglycan population using agarose-polyacrilamide gel eletrophoresis. **Anal. Biochem.**, V.151, p.41-48, 1985.
41. HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y. Proteoglycans: an overview. **Meth. Enzimol.**, v.144, p.305-319, 1987a.
42. HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y. Isolation and characterization of proteoglycans. **Meth. Enzimol.**, v.144, p.319-372, 1987b.
43. HEUMANN, R.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; MEYER, M.; RODECK, M. J.; MISKO, T. P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: role of macrophages. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.84, p.8735-8739, 1997.
44. IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, v.25, n.2, p.101-121, 1996.
45. IDE, C; TOHYAMA, K; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cells basal lamina and nerve regeneration. **Brain Research**, v.288, p.61-75, 1983.
46. IWATA, M.; WIGHT, T. N.; CARLSON, S. S. A brain extracelular matrix proteoglycan forms aggregates with hyaluronan. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.20, p.15061-15069, 1993.

-
47. JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Schwann cells their precursors emerge as major regulators of nerve development. **Trends of Neurosc.**, v.22, n.9, p.402-410, 1999.
48. JIRSOVÁ, K.; SODDAR, P.; MANDYS, V.; BÄR, P. R. Cold yet: A method to obtain pure Schwann cell cultures without the need for cytotoxic, apoptosis-inducing drug treatment. **Journal of Neurosc. Methods**, v.78, p.133-137, 1997.
49. JOLLÈS, P. Proteoglycans. Introduction. **Experientia**, v.49, p.365-368, 1993.
50. KEILHOFF, G.; FANSA, H.; SCHNEIDER, W.; WOLF, G. In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerves conduits. **Journal of Neurosc. Methods**, v.89, p.17-24, 1999.
51. KIEFER, R.; KIESEIERB, B. C.; STOLLG, G. *et al.* The role macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.64, n.2, p.109-127, 2001.
52. KNUDSON, B. C.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. **Cell & Developmental Biology**, v.12, p.69-78, 2001.
53. KOOP, D. M.; TRACHTENBERG, J. T.; THOMPSON, W. J. Glial growth factor rescue Schwann cells of mechanoreceptors from denervation-induced apoptosis. **The Journal of Neurosc.**, v.17, n.17, p.6697- 6706, 1997.

-
54. LABRADOR, R. O.; BUTÍ, M.; NAVARRO, X. Influence of collagen and laminin gels concentration nerve regeneration after resection and tube repair. **Experimental Neurology**, v.149, p.243-252, 1998.

 55. LANDON, D. N.; HALL, S. The myelinated nerve fiber. In: The peripheral nerve. Ed. D.N. Landon. London. Chapman and Hall, p. 1-105, 1976.

 56. LE BEAU, J. M.; LA CORBIERE, M.; POWELL, H. C. *et al.* Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. **Brain Research**, v.459, p.93-104, 1988.

 57. LEMKE, G.; CHAO, M. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptors genes. **Development**, v.102, p.499-504, 1988.

 58. LESMA, E.; DI GIULIO, A. M.; FERRO, L.; PRINO, G.; GORIO, A. Glycosaminoglycans in nerve injury: I. Low doses of glycosaminoglycans promote neurite formation. **Journal of Neurosc. Research**, v.46, p.565-571, 1996.

 59. LEWIN, S. L.; UTLEY, D. S.; CHENG, E. T.; VERITY, A. N. *et al.* Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhance rates of functional recovery compared with BDNF treatment alone. **The Laryngoscope**, v.107, p.992-999, 1997.

 60. LINDEN, R. The survival of developing neurons: a review of afferent control. **Neuroscience**, v.58, p.671-682, 1994.

-
61. LOGAN, A.; BAIRD, A; BERRY, M. Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere. **Experimental Neurology**, v.159, p.504-510, 1999.
62. LUNDBORG, G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. **Journal of Hand Therapy**, v.6, n.3, p.179-188, 1993.
63. LUNN, E. R.; BROWN, M. C.; PERRY, V. H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neuroscience**, v.35, n.1, p.157-165, 1990.
64. MADISON, R. D.; ARCHIBALD, S. J. 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.**, v.128, n.2, p.266-275, 1994.
65. MARCOL, W.; KTULSKA, K.; SABUDA, E. 'S. *et al.* Regeneration of sciatic nerves of adult rats induced by extracts from distal stumps of pre-degenerated peripheral nerves. **Journal of Neuroscience Research**, v.72, p.417-424, 2003.
66. MARGOLIS, R. K.; MARGOLIS, R. U. Nervous tissue proteoglycans. **Experientia**, v.49, p.429-446, 1993.
67. MATHESON, C.; CARNAHAN, J.; URICH, J. L. *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: Comparison with the effects of the neurotrophins. **Journal Neurobiol.**, v.32, p.22-32, 1996.

-
68. MORRISSEY, T. K.; KLEITMAN, N.; BUNGE, R. P. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. **The Journal of Neurosci.**, v.11, n.8, p.2433-2442, 1991.
69. MULARD, L. Proteoglycans. **Biochemie**, v.78, n.3, p.215-216, 1996.
70. OLIVEIRA, A. L. R.; LANGONE, F. Non-neuronal cells are not the main limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.12, p.1467-1475, 2000.
71. OLIVEIRA, A. L. R.; RISLING, M.; NEGRO, A. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. **Journal Comp. Neurol.**, v.447, n.4, p.381-393, 2002.
72. PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. DE F. The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. Phylafelphia, Saunders, p.406, 1976.
73. POLITIS, M. J.; EDERLE, K.; SPENCER, P. S. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regeneration axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. **Brain Research**, v.253, p.1-12, 1992.
74. RAIIVICH, G.; KREUTZBERG, G. W. Expression of growth factor receptors in injured nervous tissue: I. Axotomy leads to a shift in the cellular distribution of specific beta

-
- nerve growth factor binding in the injured and regeneration PNS. **J. Neurocytol.**, v.16, n.5, p.689-700, 1987.
75. RODRÍGUES, F. J.; VERDÚ, E.; CEBALLOS, D.; NAVARRO, X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v.161, p.571-584, 2000.
76. ROSEN, J. M.; PADILLA, J. A.; NQUYEN, K. D.; PADILLA, M. A.; SABELMAN, E. E.; PHAM, H. N. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. **Ann. Plast. Surg.**, v.25, p.375-387, 1990.
77. RUTKOWISK, J. L.; TUIITE, G. F.; LINCON, P. M. *et al.* Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. **Journal of Neuroimmunology**, v.101, p.47-60, 1999.
78. SALONEN, V.; PELTONEN, J.; ROYTTA, M. *et al.* Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. **J. Neurocytol.**, v.16. p.713-720, 1987.
79. SANTOS JR., A. R.; WADA, M. L. F., LANGONE, F., OLIVEIRA, A. L. R. Differential Schwann cell migration in adult and old mice: an in vitro study. **Brain Res.**, v.881, p.73-76, 2000.

-
80. SANTOSA, X.; RODRIGOB, J.; HONTANILLAC, B.; BILBAOA, G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. **Journal of Neurosc. Methods**, v.85, n.1, p.119-127, 1998.
81. SEIDENBECHER, C.; RICHTER, K.; RAUCH, U.; FÄSSLER, R. Brevican, a chondroitin sulphate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. **The Journal of Biol. Chemistry**, v.270, n.45, p.27206-27212, 1995.
82. SENDTNER, M.; STÖCKLI, K. A.; THOENEN, H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **The Journal of Cell Biology**, v.118, n.1, 139-148, 1992.
83. SMITH, G. V.; STEVENSON, J. A. Peripheral nerve grafts lacking viable Schwann cells fail to support central nervous system axonal regeneration. **Exp. Brain Res.**, v.69, p.299-306, 1988.
84. SMITH, R. S.; KOLES, Z. J. Myelinated nerve fibers-computed effect of myelin thickness on conduction velocity. **Am. J. Physiol.**, v.219, p.1256-1260, 1970.
85. SNOW, D. M.; LEMMON, V.; CARRINO, D. A. *et al.* Sulphate proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v.109, p.111-130, 1990.

-
86. SON, Y.-J.; THOMPSON, W. J. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. **Neuron**, v.14, p.125-132, 1995.
87. SPILKER, M. H.; ASANO, K.; YANNAS, I. V; SPECTOR, M. Contraction of collagen-glycossaminoglycan matrices by peripheral nerve cells in vitro. **Biomaterials**, v.22, n.10, p.1085-1093, 2001.
88. STOLL, G.; GRIFFIN, J. W.; LI, C. Y.; TRAPP, B. D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J. Neurocytol.**, v.18, p. 671-683, 1989.
89. STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v.7, n.1, p.13, 2002.
90. SUNDERLAND, S. S. The Anatomy and Physiology of nerve injury. **Muscle & Nerve**, v.13, p.771-784, 1990.
91. TANIUCHI, M.; CLARK, H. B.; SCHWEITZER, J. B.; JOHNSON JR., E. M. Expression of nerve growth factor receptor by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, supression by axonal contact and binding properties. **J. Neurosci.**, v.8, p.664-681, 1988

-
92. TANIUCHI, M.; CLARK, H. B.; JOHNSON JR., E. M. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p.4094-4098, 1986.
93. TERENCE, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat.**, v.194, p.1- 14, 1999.
94. TERRISA, D. J; CHENG, E. T.; UTLEY, D. S. *et al.* Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparasion of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. **Auris Nasus Larynx**, v.26, n.2, p.117-122, 1999.
95. TONA, A.; PERIDES, G.; RAHEMTULLA, F. *et al.* Extracellular Matrix in regeneration rat sciatic nerve. A comparative study on the localization of laminin, hialuronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. **J. Histochemcytochem.**, v.41, n.4, p.593-599, 1993.
96. TORIGOE, K.; TANAKA, H.; TAKAHASHI, A. *et al.* Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v.137, p.301-308, 1996.
97. VERDÚ, E.; RODRÍGUES, F.; CABRERA, G. G. *et al.* Expansion of adult Schwann cell from mouse predegenerated peripheral nerves. **Journal of Neuroscience Methods**, v.99, p.111-117, 2000.

-
98. VERTEL, B. M. The ins and outs of aggrecan. **TINS**, v.5, p.458-464, 1995.
99. WALLER, A. V. Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v.140, p.423-429, 1850.
100. WAXMAM, S. G. Structure-function relations in nerves and nerve injuries. In: Nerve repair and regeneration: its clinical and experimental basis. Eds. D. L. Jewett, H. R. McCarroll, Jr., St. Louis, Mosby, p.186-198, 1980.
101. WELLS, M. R.; KRAUS, K.; BATTER, D. K. *et al.* Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: A comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. **Experimental Neurology**, v.146, p.359-402, 1997.
102. YAMADA, H.; FREDETTE, B.; SHITARA, K. *et al.* The brain chondroitin sulphate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.20, p.7784- 7795, 1997.
103. YONG, C.; MILLER, E.; NICKLOUS, D. M. *et al.* Nerve growth factor and neurotrophin-3 affect functional recovery following peripheral nerve injury differently. **Restor Neurol. Neurosc.**, v.18, n.4, p.167-175, 2001.

-
104. YOSHII, S.; YAMAMURO, T.; ITO, S.; HAYASHI, M. In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. **Exp. Neurol.**, v.95, p.469-473, 1987.
105. ZOCHODNE, D. W. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. **Muscle & Nerve**. Supplement 9, p.S33-S38, 2000.
106. ZUO, J.; HERNANDEZ, Y. J.; MUIR, D. Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. **Journal of Neurobiology**, v.34, n.1, p.41-54, 1997.

Anexo I

Effects of aggrecan on Schwann cell migration *in vitro* and
nerve regeneration *in vivo*

Amauri Pierucci ^a; Aline M. Faria ^b; Edson R. Pimentel ^b, Arnaldo R. Santos Jr. ^b,
Alexandre L.R. Oliveira ^a

^aDepartment of Anatomy;

^bDepartment of Cell Biology; State University of Campinas – UNICAMP, 13084-971, Campinas, SP, Brazil.

Running title: Aggrecan enhances peripheral nerve regeneration

Corresponding Author: Alexandre L.R. Oliveira, Department of Anatomy, State University of Campinas – UNICAMP; CP 6109, CEP 13084-971; Campinas, SP, Brazil. Phone: +55 19 3788-6295; Fax. + 55 19 3289-3124; E-mail: alroliv@unicamp.br

Sources of support: A. Pierucci received a scholarship from CAPES. This work was supported by FAEP, Unicamp.

Abstract

Although the role of many small proteoglycans on the Nervous System regeneration has been established, little is known about the properties of large proteoglycans. In this study we evaluated the effects of aggrecan, a high molecular weight proteoglycan, on Schwann cells (SC) *in vitro* and investigated its properties on axonal regeneration after sciatic nerve tubulization. *In vivo*, the number of regenerated axons as well as morphometrical parameters were obtained. *In vitro*, aggrecan increased the SC number and viability. *In vivo*, the number of regenerated fibers was statistically increased when aggrecan was applied and no morphometrical differences were found. The present results indicate that aggrecan contributes to the peripheral axonal regeneration process and has a particularly positive effect on the SC.

Key words: proteoglycans, extracellular matrix, cell culture, tubulization, glycosaminoglycans.

Introduction

Peripheral regeneration is an intricate phenomenon that engages different cell types in a large remodeling process. Schwann cells are key players in this process and produce several of the molecules responsible for an oriented axonal regrowth [1, 2]. Over the years, certain molecules have been shown to exert positive influence on the regeneration process. Thus, collagen, laminin, fibronectin, nidogen and tenscin were identified *in situ* or applied in various ways after peripheral lesion, and were proven to benefit the process [3-9].

Proteoglycans, which are proteins with one or more covalently attached glycosaminoglycan chains, have been shown to exert both positive and negative influence on axonal regeneration depending on its structure, concentration and location in the nervous system [4, 10-14]. Most of the knowledge about proteoglycans is restricted to those with low molecular weight. In this sense, little is known about the properties of high molecular weight proteoglycans, such as the aggrecan, on the peripheral nerve regeneration process.

In this way, cell culturing and *in vivo* models would be helpful for a better understanding of the role of aggrecan in such process. *In vitro* assays have the advantage of isolating the SC and may give a more accurate understanding about the properties regarding cell multiplication, viability and migration, which were one of the main objectives in our study. For this, we have used primary SC cultures obtained from explants of adult sciatic nerve rats.

Complementarily to the *in vitro* observations, *in vivo* analysis would access the effects of aggrecan on axonal sprouting and SC interaction with newly formed axons. In the present investigation, nerve tubulization was used as the *in vivo* paradigm. Such a procedure has the advantage that the tube itself works as a micro chamber, isolating the lesion site from the surroundings [15, 16]. Additionally, the tube provides mechanical orientation for the regenerating fibers from the proximal stump to reach the distal end of the nerve and can be filled with different kinds of substances [17]. Taking such facts into account, the effects of aggrecan on regeneration

were accessed by surgically sectioning mice sciatic nerves and bridging the stumps with polyethylene tubes prefilled with purified aggrecan.

Material and Methods

Biochemical preparation of Aggrecan

Chicken xyphoid cartilage was minced and homogenized in PBS (0.15M NaCl in 50 mM phosphate buffer pH 7.4, containing 50mM EDTA and 1mM phenyl methyl sulphonyl fluoride - PMSF). After this preextraction, the cartilage fragments were separated by centrifugation at 5000 rpm in a Beckman JA-20 rotor, and extracted with 15 volumes of 4M guanidinium chloride (GuHCl) in 0.05M acetate buffer pH 5.8, containing 50 mM EDTA and 1mM PMSF. The extraction was carried out at 4°C for 20 hours, under constant agitation. The extract was obtained after centrifugation at 18000 rpm in a Beckman JA-20 rotor. Large Proteoglycans present in the supernatant were separated using a CsCl gradient density, starting with a density of 1.35 mg/ml, in the presence of 4M GuHCl, as described by Heinegård and Sommarin [18]. Ultracentrifugation was done in a Beckman 80 Ti rotor, at 34000 rpm for 61 hours, at 15°C. The gradient was divided into four equal fractions, D1 (top), D2, D3 and D4 (bottom of the tube). Only the D1 fraction, rich in the large proteoglycan aggrecan, was used. Agarose-polyacrilamide gel electrophoresis was used to visualize the extracted aggrecan. The protein concentration was determined by the Bradford method [19], and sulfated glycosaminoglycans were determined as described by Farndale and co-workers [20].

In vitro study

Culture of sciatic nerves explants

For this study, sciatic nerves from adult (4 months old, n=10) Wistar male rats were used. In order to increase the number of Schwann cells migrating from the explant, the sciatic nerves were

predegenerated. In this way, the sciatic nerves were exposed and transected at mid thigh level one week before the culturing procedures (modified from [21]). After the period of predegeneration, the nerves were dissected out and reduced into fragments of about 1cm long and washed in Ham F-10 medium (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20% fetal calf serum (FCS, Nutricell - Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, SP, Brazil) and 100µg/ml of gentamicin (Schering-Pough S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The fragments were then cut into smaller 2mm long pieces and cultured in culture plates with 24 wells (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) at 37°C with 5% CO₂ for 20 days. Four different experimental conditions were used: 1) Ham F-10 medium supplemented with 100µg/ml of gentamicin and 20% FCS, 2) Ham F-10 medium supplemented with 100µg/ml of gentamicin and 20% FCS plus 102 µg/ml of aggrecan, 3) Ham F-10 medium supplemented with 100µg/ml of gentamicin and 40% FCS, and 4) Ham F-10 medium supplemented with 100µg/ml of gentamicin and 40% FCS plus 102 µg/ml of aggrecan. New media (all groups) plus 102 µg/ml of aggrecan (groups 2 and 4) were added every second day. All experiments were carried out in triplicate.

Cell counting

During the period of culturing, the total number of explant migrating cells was evaluated on days 7, 9 and 11 under all experimental conditions. Cell counting was performed using an Olympus IX-50 inverted microscope with a phase contrast system. We also evaluated the number of non-adherent cells in the different samples, when detachment was observed. At this point, the culture medium present in the wells was collected, and the non-adherent cells were counted with a hemocytometer.

Immunocytochemistry

After 20 days of culturing, the cells were fixed in 10% formalin for 1h (Reagen Quimibras Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and washed in phosphate buffered saline (PBS) 0.1M in pH

7.2 at 37°C. In order to block nonspecific staining, the specimens were incubated for 1h with 1% bovine serum albumin (BSA, by Sigma) in PBS. The preparations were then incubated overnight in a moist chamber at 4°C with a monoclonal anti-S-100 antibody (dilution 1:200). The samples were rinsed in PBS at 37°C, and incubated with anti-rabbit CY-3 secondary antibodies for 1h. The cells were then observed with an inverted microscope (Olympus IX-50) equipped for fluorescence analysis. Control experiments were performed by the omission of the primary antibodies.

In vivo study

Animals

In this study, twenty 8 to 10 week-old C57BL/6J male mice were used. The animals were divided into two groups. In the first group (n=10), purified aggrecan gel was applied after sciatic nerve tubulization. In the second group (n=10), the tubes were left empty and served as the control. All procedures were in accordance to the local ethical committee guidelines (CEEAB/Unicamp).

Surgical Procedures

Under deep anesthesia (Pentobarbital 50mg/Kg, i.p.), the left sciatic nerve was exposed and transected at mid-thigh level. The proximal stump was introduced into a 6mm long polyethylene tube and sutured with an epineural stitch (9-0 nylon suture) to the tube end. In the first group the tube was filled with 2µl of purified avian aggrecan gel (8.5 µg), and in group 2, the tube was left empty. The distal stump was then sutured to the distal end of the tube, leaving a 4 mm gap. The musculature and the skin were closed with 6-0 silk sutures and the animals were maintained for five weeks with food and water *ad libitum*.

Specimen Preparation and Morphometrical Analysis

Five weeks after tubulization, the animals were transcardially perfused with Karnovsky solution (Glutaraldehyde 2%, Paraformaldehyde 1%) (n=4 for each group) or with Formalin 10% (n=3 for each group). The regenerated and the contralateral nerves were dissected out and, in the Karnovsky

fixed animals, the specimens were post-fixed with Osmium Tetroxide (2%) and processed for Araldite embedding. Transverse semi-thin sections (0.5 μm thick) were obtained at the mid point of the polyethylene tube, stained with toluidine blue, and the total number of regenerated axons (TMF) counted. Three fields of each specimen were photographed with a light microscope (100X) covering an area of at least 30% of the cross-sectional area of the nerve. Sampling bias was avoided by spreading the micrographs systematically over the entire cross section, according to the scheme proposed by Mayhew and Sharma [22]. Using the Image Tool software (Version 2.00, The University of Texas Health Center in Santo Antonio, USA), the regenerated fibers, as well as those from the contralateral nerve, were measured, and the diameter of the myelinated fibers (FD), diameter of the regenerated axons (AD) and the myelin thickness (MT), obtained. Also the “g” ratio was calculated using the formula “g”= AD/FD. Regarding the axon diameter (D) measurement, this was calculated from the perimeter (P), by applying the formula $D=P/\pi$. The data are presented as the mean \pm SD. The one-way ANOVA and Newman-Keuls test ($p<0.05$) were used for the statistical analysis. Ultra-thin sections were also cut for ultra structural analysis. The formalin fixed specimens were frozen in tissue-tek and used for immunocytochemical labeling.

Immunocytochemistry

Longitudinal nerve sections were obtained in a cryostat and the endogenous peroxidase was inactivated with 3% H_2O_2 in distilled water for 5 min at room temperature. The slides were transferred to a humidified chamber and S-100 antibody (Dako, Z311) was applied. Primary antibody was incubated overnight at 10°C. After several rinses with PBS, the sections were incubated for 1h with Envision peroxidase labeled polymer (Dako, K1491). Peroxidase was detected using a 3,3',5,5'-diaminobenzidine solution, washed in distilled water, counterstained with hematoxylin and mounted in Entelan (Merck). Sections were examined in an Olympus BX60 microscope.

Results

Characterization of the extracted aggrecan

Figure 1 represents an electrophoresis agarose-polyacrilamide gel counterstained with toluidine blue. Aggrecan was identified as a polydisperse band, as the glycosaminoglycan chains greatly vary in length. The protein concentration present in the D1 aggrecan enriched fraction was 0,116mg/ml and the concentration of GAGs 8,5mg/ml.

(Position of Figure 1)

In vitro study

Immunocytochemistry and counting of migrant and non-adherent cells

The anti-S-100 immunocytochemical analysis of migrating cells confirmed the presence of SCs in the studied culturing conditions (Figure 2). The groups supplemented with 40% FCS displayed a greater number of migrating cells. Under this condition, the addition of aggrecan did not increase the cell number (Figure 2A), but greatly reduced cell detachment (Figure 2B). A slight increase in cell number could be observed with the addition of aggrecan when the cells were supplemented with 20% FCS (Figure 2A). In this case, cell viability was also improved with aggrecan (Figure 2B)

(Position of Figure 2)

In vivo study

Morphology and immunocytochemistry

Transverse sections of the regenerated nerve at the tube midpoint showed a number of myelinated fibers organized into small bundles surrounded by perineural-like cells and fibroblasts (Figure 3A, B). Along with such cells, myelinated and non myelinated axons could also be observed at the ultrastructural level (Figure 3C, D).

The S-100 staining showed the presence of SC longitudinally organized along the axons. Such labeling was stronger in the specimens treated with aggrecan and was concentrated on the SC projections (Figure 3E, F).

Number of regenerated fibers and morphometric data

A statistically greater number of myelinated fibers were found in the regenerated nerves treated with aggrecan when compared with the empty tube (Figure 3G). On the other hand, no statistical differences regarding axonal and fiber diameter and myelin thickness were detected (Table 1). Also, the “g” ratio indicated that the myelin thickness was proportional to the axonal diameter in all groups (Table 1).

(Position of Figure 3 and Table I)

Discussion

It is well known that proteoglycans are expressed in the nervous system and may exert both positive and negative influence on axonal outgrowth both *in vivo* and *in vitro* [4]. Such properties are mostly due to the glycosaminoglycan (GAG) chains and several studies have focused on the neurite growth regulating properties of different GAGs [10-14]. However, most of the literature up to date dealt either with the GAGs alone or with low molecular weight proteoglycans, such as decorin and versican [13]. In our study, we used aggrecan extracted from avian xyphoid process, which was purified using an ultracentrifugation method. Since we used the proteoglycan in its native form, the protein domains and the oligosaccharides remained intact, retaining the molecule characteristics. In this way, we were able to investigate its properties on the peripheral nervous system regeneration *in vitro* and *in vivo*.

In culture, the addition of aggrecan associated with 20% FCS stimulated SC migration and increased cell viability. Such result was not evident when the medium was supplemented with 40% FCS, although, in this case, the viability was greatly augmented. We believe that such results may be due to aggrecan's matrix forming properties as well as the possibility of creating a neurotrophic

rich environment, especially under higher FCS concentration. Interestingly, aggrecan is also known to contain a domain that shows homology with trophic factors and lectins that may increase cell adhesion [18, 23]. Also, the sulphated glycosaminoglycan chains of aggrecan effectively concentrate the negative charges that are able to establish a high degree of hydration, which is of great importance for neurotrophic factor storage at the lesion site [18]. In this way, it is possible that aggrecan increases non neuronal cell viability which is of great importance during nerve regeneration.

The results obtained *in vivo*, after sciatic nerve tubulization, are in line with the *in vitro* observations. In this sense, the group in which the tube was filled with aggrecan gel, showed the best regenerative results regarding the number of axons as well as the immunocytochemical staining for the SCs. Interestingly, the effects of aggrecan, under similar experimental conditions, were far superior to hyaluronic acid which is also an important molecule found in the peripheral nerve [24]. We hypothesize that aggrecan is able to stimulate axonal sprouting and SC survival and possibly accelerated the initial steps of the regenerative process. Regarding the axonal diameter, fiber diameter and myelin thickness, no statistical difference was observed when the tube was filled with aggrecan or left empty. However, the “g” ratio obtained for both groups was similar, reinforcing the hypothesis that the axonal diameter and myelin thickness remained proportional.

Conclusion

The results of this study reinforce the hypothesis that aggrecan, due to its biological properties and trophic capabilities, contributes to the peripheral axonal regeneration process and has a particularly positive effect on the SC.

References

1. Bunge RP, Bunge MP. Interrelationship between Schwann cell function and extracellular matrix production. *Neurosci. Lett* 1983; 82: 77-82.
2. Caband HE, Rodkey WG, Nenth TJ. Progressive ultrastructural changes after peripheral nerve transection and repair. *J. Hand Sur.* 1982; 7: 353-365.
3. Bailey SB, Eichler ME, Villadiego A, Rich KM. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicone chambers. *J. Neurocytol.* 1993; 22: 176-184.
4. Chamberlain LJ, Yanas IV, Hsu H-P, Strichartz G, Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp. Neurol.* 1998; 154: 315-329.
5. Madison R, Da Silva CF, Dikkes P, Chiu T-H, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp. Neurol.* 1985; 88: 762-772.
6. Ohbayashi K, Inoue HK, Awaya A, Kobayashi S, Kohga H, Nakamura M, Ohye C. Peripheral nerve regeneration in silicone tube: effect of collagen sponge prosthesis, laminin, and pyrimidine compound administration. *Neurol. Med. Chir.* 1996; 36: 428-433.
7. Rosen JM, Padilla JA, Nquyen KD, M. Padilla A, Sabelman EE, Pham HN. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. *Ann. Plast. Surg.* 1990; 25: 375-387.

-
8. Wells MR, Krans K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniadis HN, Hanson H-A. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen and methylcellulose. *Exp. Neurol.* 1997; 146: 395-402.
 9. Yoshii S, Yamamuro T, Ito S, Hayashi M. In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. *Exp. Neurol.* 1987; 95: 469-473.
 10. Di Giulio AM, Germani E, Lesma E. Glycosaminoglycans co-administration enhance insulin-like growth factor-I neuroprotective and neurodegenerative activity in traumatic and genetic models of motor neuron disease: a review. *Int. J. Devl. Neuroscience* 2000; 18: 339-346.
 11. Challacombe J, Elam, JS. Chondroitin 4-sulphate stimulates regeneration of goldfish retinal axons. *Experimental Neurology* 1997; 143: 10-17.
 12. Lesma E, Di Giulio AM, Ferro L, Primo G, Gorio A. Glycosaminoglycans in nerve injury: I. Low doses of glycosaminoglycans promote neurite formation. *Journal of Neurosc. Research* 1996; 46: 565-571.
 13. Braunewell, K-H, Pesheva P, McCathy JB, Furcht LT. Functional involvement of sciatic nerve derived-versicam and decorin-like molecules and other chondroitin sulphate proteoglycans in ECM-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. *European Journal of Neurosc.* 1995; 7: 805-814.
 14. Snow D, Lemmon V, Carrino DA. Sulphate proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology* 1990; 109: 111-130.

-
15. Fields RD, LeBeau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog. Neurobiol.* 1989; 33: 87-134.
 16. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: Influence of gap length and of distal stump components. *Exp. Neurol.* 1982; 76: 361-375.
 17. Madison RD, Da Silva CF, Dikkes P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prosthesis. *Brain Res.* 1988; 447: 325-334.
 18. Heinegård D, Sommarin Y. Isolation and characterization of proteoglycans. *Meth. Enzimol.* 1989; 144: 319-373.
 19. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
 20. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphate glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Bioch. Bioph. Acta* 1986; 883: 173-177.
 21. Verdú E, Rodríguez F, Cabrera GG. Expansion of adult Schwann cell from mouse predegenerated peripheral nerves. *Journal of Neuroscience Methods* 2000; 99: 111-117.
 22. Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anatomy.* 1984; 139: 59-66.

23. Vertel BM. The ins and outs of aggrecan. *TINS* 1995; 5: 458-464.
24. Da-Silva CF, Da Gama SA, Júnior RM, Pereira FC. Influence of highly purified of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration in vivo. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 2003; 20(2): 121-124.

Legends

Figure 1 – Electrophoresis agarose-polyacrilamide gel counterstained with toluidine blue. Aggrecan can be identified as a polydisperse band. Chondroitin sulfate (CS) was used as a molecular weight control.

Figure 2 – **A.** Migration of cells from the sciatic nerve explants under the different experimental conditions. Note a slight increase in cell number when aggrecan was added along with the 20% fetal calf serum (FCS). **B.** Counting of non-adherent cells found in the culture medium after 14 days of culturing. Note that aggrecan enhances the cell viability specially when associated with 40% FCS. **C-F.** Immunocytochemical labeling (S-100) of the Schwann cells cultured under the different experimental conditions. **C.** 20% FCS, **D.** 20% FCS plus aggrecan, **E.** 40% FCS, **F.** 40% FCS plus aggrecan. Scale bar = 50µm.

Figure 3 – **A-B.** Tube midpoint transverse section of a regenerated nerve, five weeks after tubulization. **A.** Tube filled with aggrecan gel; Scale bar = 50 µm. **B.** Tube left empty. **C.** Electron micrograph of a regenerated nerve when the tube was left empty. Observe that the mini-fascicules are surrounded by thick perineural like cell processes. The arrow head depicts non myelinated axons. Scale bar = 5 µm. **D.** Electron micrograph of a regenerated nerve from the aggrecan treated group. Note the relative endoneurial looseness, and the thin perineural like cells processes. The arrow head indicates non myelinated axons. **E, F.** S-100 immunohistochemistry. Note the stronger labeling at the Schwann cell processes when the tube was filled with aggrecan (**E.**, arrows) as compared with the empty tube (**F.**). Scale bar = 15 µm.

Table 1 – Morphometrical data obtained from the regenerated axons, five weeks after sciatic nerve tubulization. No statistical differences were observed between the empty tube and aggrecan filled tube. ($p < 0.05$; Newman-Keuls test). The **n** value means the number of measured fibers. Data are presented as the mean \pm SD.

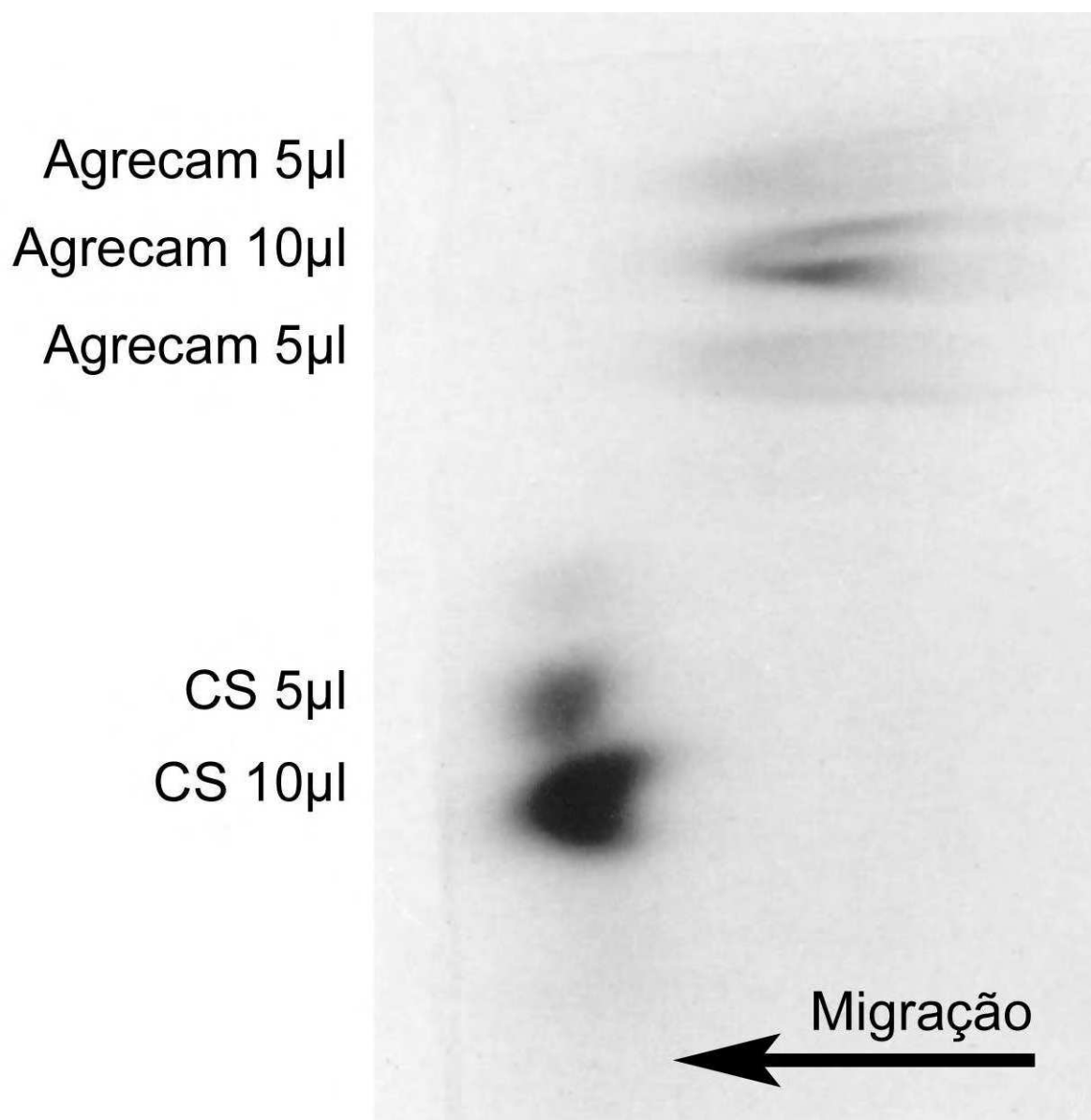
Figura 1

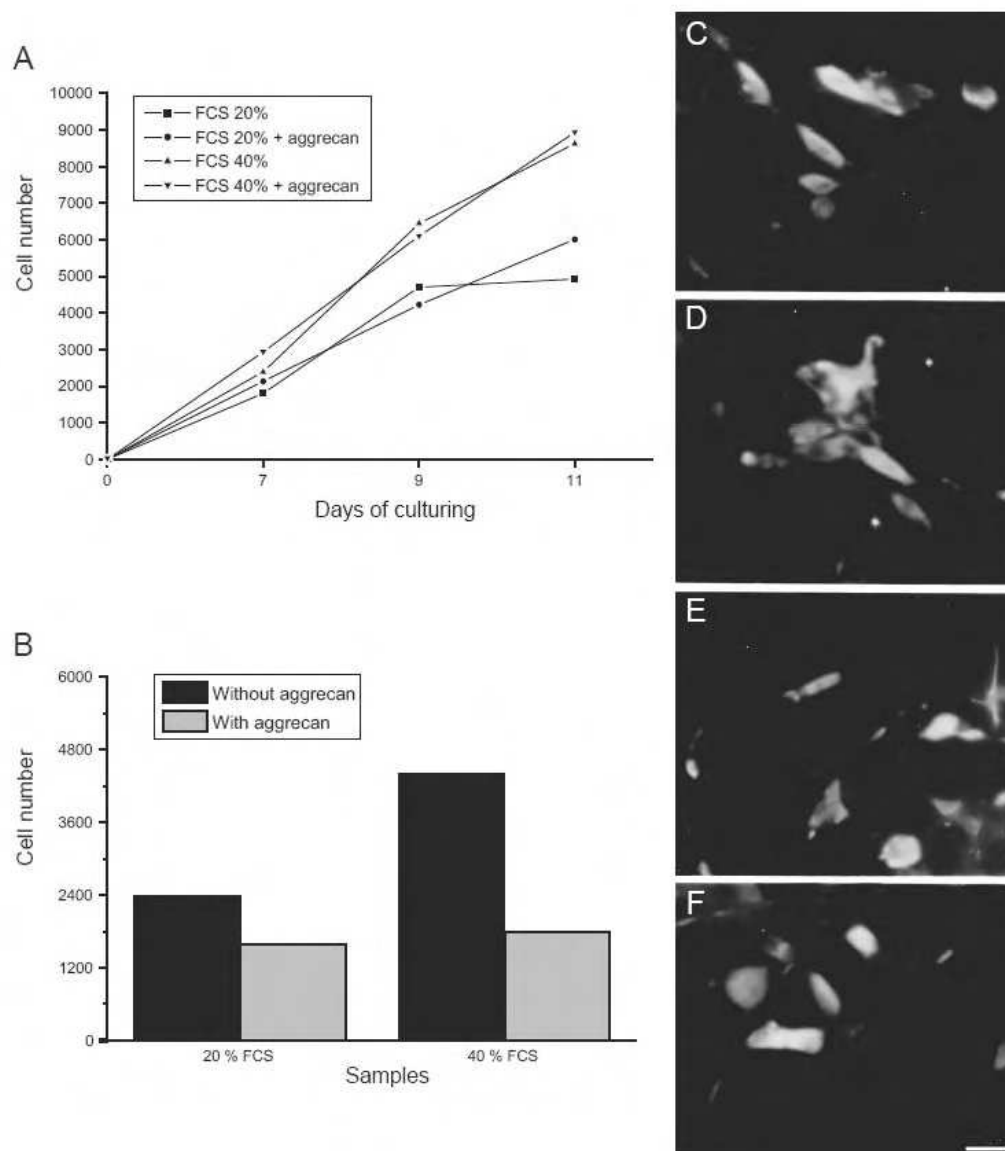
Figura 2

Figure 3

