

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Amauri Pierucci

**“Influência dos polímeros poli caprolactona (PCL) e poli L-ácido
lático (PLLA), sobre a expressão de componentes da membrana
basal de células de Schwann *in vitro* e *in vivo*”**

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

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P616i

Pierucci, Amauri

Influência dos polímeros poli caprolactona (PCL) e poli L-ácido láctico (PLLA), sobre a expressão de componentes da membrana basal de células de Schwann *in vitro* e *in vivo* / Amauri Pierucci. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Regeneração periférica. 2. Biomateriais. 3. Células de Schwann. 4. Matriz extracelular. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Influence of poly caprolactone (PCL) and poly L-lactic acid (PLLA) polymers on Schwann cell basal lamina components expression *in vitro* and *in vivo*.

Palavras-chave em inglês: Peripheral regeneration; Biomaterials; Schwann cells; Extracellular matrix.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Antônio Castro Rodrigues, Tânia de Fátima Salvini, Paulo Pinto Joazeiro.

Data da defesa: 27/11/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 27 de Novembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

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


Assinatura

Profa. Dra. Cecília Amélia Carvalho Zavaglia


Assinatura

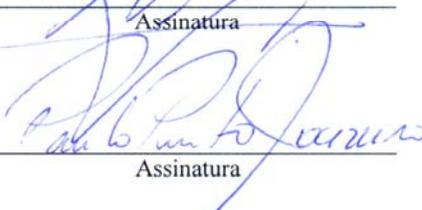
Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini


Assinatura

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto

Assinatura

Profa. Dra. Silvia Lacchini

Assinatura

| | |
|---|----|
| Agradecimentos | 8 |
| Abreviaturas..... | 13 |
| Resumo..... | 16 |
| Abstract..... | 19 |
| | |
| 1. Introdução..... | 21 |
| 1.1 Aspectos gerais..... | 22 |
| 1.2 Composição do nervo periférico..... | 23 |
| 1.3 Anatomia do nervo periférico..... | 24 |
| 1.4 Lesão nervosa periférica..... | 25 |
| 1.5 Células de Schwann..... | 26 |
| 1.6 Reparo de lesões nervosas..... | 28 |
| 1.7 Biomateriais..... | 31 |
| 1.8 Matriz extracelular..... | 35 |
| | |
| 2. Justificativa..... | 39 |
| | |
| 3. Objetivos gerais..... | 42 |
| | |
| 4. Objetivos específicos..... | 44 |
| | |
| 5. Materiais e Métodos..... | 48 |
| 5.1 Materiais e métodos..... | 49 |
| 5.1.1 Construção de próteses de para a tubulização..... | 49 |
| 5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura das próteses tubulares..... | 50 |
| 5.1.3 Confeção de membranas para cultura..... | 50 |
| 5.2 Estudo in vitro..... | 51 |
| 5.2.1 Cultura de células de Schwann..... | 51 |
| 5.2.2 Imunocitoquímica para as células de Schwann..... | 51 |
| 5.2.3 Processamento e análise para microscopia eletrônica de varredura..... | 52 |
| 5.3 Estudo in vivo..... | 53 |

| | |
|---|----|
| 5.3.1 Animais e grupos experimentais..... | 53 |
| 5.3.2 Procedimento cirúrgico para a tubulização..... | 54 |
| 5.3.3 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão..... | 54 |
| 5.3.4 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para imunohistoquímica..... | 56 |
| 5.3.5 Morfometria e contagem das fibras regeneradas..... | 57 |
| 5.3.6 Análise estatística..... | 58 |
| | |
| 6. Resultados..... | 59 |
| 6.1 Resultados..... | 60 |
| 6.1.1 Microscopia eletrônica de varredura das próteses após o período de 30 e 60 dias de tubulização e imagem da implantação dos tubos..... | 60 |
| 6.1.2 Biomembranas para cultura celular..... | 61 |
| 6.2. Estudo in vitro..... | 61 |
| 6.2.1 Cultura purificada de Células de Schwann..... | 61 |
| 6.2.2 Expressão do S-100..... | 62 |
| 6.2.3 Expressão da laminina tipo I ($\alpha 1\beta 1$)..... | 62 |
| 6.2.4 Expressão da laminina tipo II ($\alpha 2\beta 1$)..... | 62 |
| 6.2.5 Expressão do colágeno tipo IV..... | 63 |
| 6.2.6 Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células de Schwann..... | 63 |
| 6.3 Estudo in vivo..... | 64 |
| 6.3.1 Microscopia de luz do nervo regenerado no interior do tubo de polietileno..... | 64 |
| 6.3.2 Microscopia de luz do nervo regenerado no interior do tubo de PCL extrusão..... | 64 |
| 6.3.3 Microscopia de luz do nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente..... | 65 |
| 6.3.4 Microscopia luz do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente..... | 65 |
| 6.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo de polietileno..... | 66 |
| 6.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo PCL extrusão..... | 66 |
| 6.3.7 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo PCL solvente..... | 67 |

| | |
|---|-----|
| 6.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo PLLA solvente..... | 68 |
| 6.4 Contagem dos axônios mielínicos..... | 68 |
| 6.5 Parâmetros morfométricos..... | 69 |
| 6.5.1 Diâmetro dos axônios mielínicos..... | 69 |
| 6.5.2 Diâmetro das fibras mielínicas..... | 72 |
| 6.5.3 Espessura da bainha de mielina..... | 74 |
| 6.5.4 Razão "g"..... | 77 |
| 6.6 Expressão do S-100..... | 79 |
| 6.7 Expressão do colágeno tipo IV..... | 79 |
| 6.8 Expressão da laminina e neurofilamento..... | 80 |
| | |
| 7. Discussão..... | 81 |
| | |
| 8. Conclusões..... | 88 |
| | |
| 9. Figuras e tabela..... | 91 |
| | |
| 10. Referências Bibliográficas..... | 120 |
| | |
| 11. Artigos..... | 147 |
| 11.1 Artigo aceito para publicação – Tissue Engineering..... | 148 |
| 11.2 Artigo Submetido..... | 177 |
| | |
| 12. Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)..... | 187 |

Agradecimientos

À Lucirléia, minha esposa, ao seu lado
conheci os momentos maravilhosos da
vida, esses são os motivos para o
crescimento interior.

À minha família, dedico este trabalho como prova de minha gratidão, pelo grande apoio e incentivo a minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Professor, Orientador e um grande amigo especial, agradeço por me ajudar nos experimentos, nos inúmeros momentos de dúvidas, por motivar-me a pesquisar e mostrar-me a formação de um pesquisador sério e competente.

Ao Prof. Dr. José Meciano Filho, Professor de Anatomia e grande amigo, agradeço pelos ensinamentos didáticos em Anatomia Humana e pela realização da Pré-banca deste trabalho.

A Profa. Dra. Eliana Duek, Professora da Engenharia Mecânica, agradeço pela amizade e por ceder os biomateriais necessários para realização do experimento.

À Profa. Dra. Glauce do Depto. de Anatomia Patológica por ceder alguns anticorpos necessários para o desenvolvimento da tese.

Aos Professores Doutores Arnaldo Rodrigues Santos Júnior e Edson Rosa Pimentel, agradeço pelo incentivo a pesquisa, ensinamentos e pela grande amizade.

Aos Professores Doutores da pré-banca, agradeço por mais uma etapa desta conquista.

À Bioterista Marlene Lima por cuidar dos “infinitos” animais durante a fase experimental.

Aos técnicos e amigos Marcos Aurélio, Nori pelo auxílio nos serviços de rotina para microscopia eletrônica das amostras.

À Secretária Lílian Panagio pelo atendimento e cuidados com a documentação da pós-graduação.

À Secretária Ana Floriana pela atenção e ajuda diversa.

Aos técnicos Paulo Bernades, Paulo Francisco e Toni pela amizade e montagem das aulas para o estudo no laboratório de Anatomia Humana.

À Maria Antonia, Adriane, Cidinha, e Aurora do laboratório de microscopia eletrônica do IB pela realização dos cortes ultra-finos empregados na análise ultraestrutural deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Anatomia pelo incentivo e amizade nesta etapa de minha vida.

Aos colegas do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Histologia e Engenharia de Materiais pela amizade.

Em especial aos colegas e amigos do Laboratório de Regeneração Nervosa: Karina, Mário, Amanda, Renata, Rafaela, Camila, Gabriel, Gustavo, Ana, Jéssica, Ricardo, Sheila, Monalisa, Juliana, fundamentais pelos momentos de descontração durante o Mestrado e Doutorado.

Ao CNPq pela ajuda financeira para a realização do experimento.

Abreviaturas

Abreviaturas

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

CNTF - fator neurotrófico ciliar

Col - colágeno

SC - células de Schwann

Cy-2 – cianina-2

Cy-3 – cianina-3

DAM - diâmetro do axônio mielínico

DFM - diâmetro da fibra mielínica

EBM - espessura da bainha de mielina

FN - fibronectina

GDNF - fator neurotrófico derivado da glia

GAGs - glicosaminoglicanos

HSPG - heperam sulfato proteoglicano

LAM - laminina

MEC - matriz extracelular

MET - microscopia eletrônica de transmissão

MEV - microscopia eletrônica de varredura

NGF - fator de crescimento do nervo

NT-3 - fator neurotrófico 3

PB - tampão fosfato

PCL - poli caprolactona

PGA - poli ácido glicólico

PLA - poli ácido láctico

PDLA - poli _D-ácido láctico

PDLLA - poli _{D, L}-ácido láctico

PLGA - poli ácido láctico-co-ácido glicólico

PLLA - poli _L- ácido láctico

RZG - razão “g”

SNP - sistema nervoso periférico

S-100 - proteína de membrana específico das células de Schwann

Resumo

A regeneração periférica é um fenômeno intrincado que envolve diferentes tipos celulares, dentre os quais as células de Schwann são os componentes celulares não neurais mais importantes. Após a lesão periférica, as células de Schwann proliferam e, juntamente com os macrófagos, participam na fagocitose dos fragmentos de mielina e dos axônios em degeneração. Essas auxiliam na orientação axonal em direção ao órgão alvo através da formação das bandas de Büngner. Ainda, atuam no rearranjo dos componentes da matriz extracelular do microambiente do nervo lesado, bem como na produção de vários fatores neurotróficos, entre eles, o fator neurotrófico do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico de crescimento ciliar (CNTF), visando à manutenção, desenvolvimento e regeneração dos neurônios após a lesão.

As lesões nervosas que acometem no nervo periférico podem ser resultado de traumas como esmagamento, transecção parcial ou completa do nervo. Quando ocorre a transecção completa do nervo, há a perda de continuidade e forma-se uma fenda entre o coto proximal e o coto distal. No sentido de reparar-se o nervo lesionado, foram desenvolvidas diversas técnicas, incluindo-se o emprego de autoenxertos, próteses tubulares não absorvíveis e inertes (polietileno) e biorreabsorvíveis (biomateriais). Essas últimas têm a vantagem de sustentarem o início do processo regenerativo, orientando o brotamento axonal em direção ao coto distal, além de serem degradadas à medida que o nervo cresce em diâmetro. Podem ainda ser confeccionadas com as dimensões, formatos e porosidade desejados.

Devido às características positivas destas próteses reabsorvíveis, a importância das células de Schwann e dos componentes da matriz extracelular, o presente trabalho tem como objetivos estudar a influência dos biomateriais poli L-ácido láctico e poli caprolactona sobre a expressão, pelas células de Schwann, das cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$ que compõem as lamininas tipo I e II, bem

como a expressão de colágeno tipo IV, através do emprego das técnicas de imunohistoquímica realizadas após a tubulização e imunocitoquímica através da cultura purificada de células de Schwann sobre os diferentes biomateriais. Além disso, avaliamos o comportamento das células de Schwann sobre os biomateriais, através da microscopia eletrônica de varredura. Já o resultado da regeneração axonal foi estudado através de uma análise morfológica pela microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e morfometria dos nervos regenerados.

Comparando-se estruturalmente os tubos confeccionados pelo método de extrusão e solvente, pôde-se observar que o último apresentava espessura reduzida em comparação às próteses confeccionadas pelo método de extrusão. Ainda, a transparência dos tubos, ora propostos em nossa metodologia, influenciou positivamente durante o processo de implantação da prótese na tubulização. Após a regeneração, observou-se que o número de fibras regeneradas no interior dos tubos derivados das membranas de PCL foi significativamente maior, 30 e 60 dias após tubulização. Ainda, uma intensa marcação com S-100, colágeno tipo IV e laminina foi observada no nervo regenerado no interior das próteses, em cujos grupos utilizaram-se os biomateriais (PCL e PLLA). De fato, a imunomarcação demonstrou que os biomateriais e o microambiente no interior dos tubos foram capazes de estimular positivamente as células de Schwann em resposta à lesão nervosa periférica.

Em conjunto, nossos resultados evidenciam que os tubos de PCL e PLLA derivados da membrana podem ser considerados um método alternativo na preparação de próteses tubulares visando o reparo do nervo periférico.

Abstract

The present study proposed a new approach to produce tubular conduits designed for peripheral nerve repair. In this sense, membranes of PLLA and PCL were obtained after solvent evaporation and wrapped around a mandrel. The effectiveness of the nerve regeneration was compared with polyethylene and PCL extruded prosthesis 30 and 60 days after surgery. The comparison between extrusion and solvent tubes cleared shown structural differences which were directly proportional to the hardness and transparency. An important factor to be considered is that the fiber counting indicated that solvent PCL tubes provided a significantly greater number of axons 30 days after repair. Sixty days after operation, the greatest regenerative performance was obtained with PCL, regardless the method of construction of the tube. An intense labeling against S-100, type IV collagen and laminin could be observed in the tissue obtained from solvent PCL and PLLA groups, indicating that such constructions are able to positively stimulate Schwann cell responses. Overall, the present results provide evidence that solvent conduits may be regarded as an alternative preparation method for tubular prosthesis aiming peripheral nerve regeneration.

In the *in vitro* study, PCL and PLLA solvent polymers were used for culturing purified of Schwann cells. The immunolabeling revealed an up-regulation of the expression of collagen IV, laminin I, laminin II and S-100 by the Schwann cells, showing that biodegradable polymers enhance the activity of such cells, positively influencing the peripheral nerve regeneration process.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais

A regeneração do Sistema Nervoso Periférico (SNP) é considerada um fenômeno altamente complexo, o qual resulta numa sucessão de eventos expressa de forma cronológica e sincronizada, visando o reajuste do microambiente do nervo lesionado. Contudo, há a dependência da expressão de fatores de crescimento celular, síntese e reajustes dos componentes da matriz extracelular (MEC), e a interação entre axônios em regeneração com as células não neuronais presentes no nervo (Barnes, 1985; Ide, 1996).

Logo após uma lesão nervosa periférica, ocorre uma série de mudanças na porção proximal e na porção distal do axônio lesado. Na porção proximal, os neurônios lesados entram em cromatólise e iniciam a produção de proteínas relacionadas ao reparo dos axônios (Cajal, 1959; Terenghi, 1999; Zochodne, 2000).

Já na porção distal do nervo lesionado, desenvolve-se o processo conhecido como degeneração Walleriana, tendo como característica principal a degeneração da bainha de mielina dos axônios lesados (Lunn *et al.*, 1990). Dos tipos celulares presentes no nervo, os macrófagos juntamente com as células de Schwann (SC) atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamento dos axônios em degeneração (Beuche & Fried, 1984; Stoll *et al.*, 1989; Sunderland, 1990; Bruck *et al.*, 1995; Ide, 1996; Bruck, 1997; Cheng & Zochodne, 2002; Stoll *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003). As SC por sua vez, produzem vários fatores neurotróficos como o fator neurotrófico de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), entre outros, fundamentais para que ocorra a regeneração axonal (Jessen & Mirsky, 1999; Zochodne, 2000).

Além disso, os componentes da MEC como o colágeno (Col), laminina (LAM) e as fibronectina (FN) são importantes para o processo regenerativo, pois os axônios que crescem do

coto proximal em direção ao órgão alvo são orientados, em parte, por essas moléculas (Barnes, 1985; Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999).

Apesar da grande capacidade regenerativa do SNP (Barnes, 1985; Ide, 1996), há casos onde o tipo de lesão impossibilita a reconexão entre os cotos. Uma das técnicas de reparo empregada é a tubulização, essa consta de uma prótese tubular onde os cotos são fixados nas extremidades do tubo por pontos cirúrgicos. Essa técnica pode ser otimizada com a adição de moléculas da MEC, células não neurais (e.g. SC), fatores neurotróficos para o preenchimento do tubo a fim de aumentar a eficiência do processo regenerativo (Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Tong *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1998; Labrador *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Schimdt & Leach, 2003; da Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.* 2004).

Contudo, há a procura de materiais com propriedades físicas e mecânicas cada vez mais adequadas para a sua aplicação no corpo humano. Materiais bioabsorvíveis como o poli caprolactona (PCL), poli L-ácido láctico (PLLA), entre outros, vêm sendo amplamente utilizados em muitos experimentos na área da bioengenharia (Widmer *et al.*, 1998; An, 2000; Sundback *et al.*, 2003).

1.2 Composição do Nervo Periférico

O nervo periférico apresenta como componentes celulares as células perineurais, fibroblastos, macrófagos e especialmente as SC as quais envolvem os axônios formando a bainha de mielina (Garbay *et al.*, 2000; Schimdt & Leach, 2003). Os axônios são projeções dos neurônios motores presentes na coluna anterior da medula espinhal e neurônios sensitivos localizados no gânglio sensitivo (espinhal). Esses podem ser mielínicos ou amielínicos, ambos

são capazes de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. Nos axônios mielínicos, as SC formam em seu redor, uma estrutura tubular com múltiplas camadas, denominada bainha de mielina. As SC são separadas uma das outras, ao longo dos axônios, por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma, denominados nodos de Ranvier (Ladon & Hall, 1976; Peters *et al.*, 1976).

Já os axônios amielínicos apresentam um tipo especial de relação com a SC. Neste caso, uma única SC, através de projeções citoplasmáticas, envolve totalmente ou parcialmente cerca de 5 a 25 axônios, não havendo a formação da bainha de mielina. Como resultado, estes axônios encontram-se individualmente alocados no interior de sulcos ou canais formados pelas projeções do citoplasma das SC (Peters *et al.*, 1976).

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

1.3 Anatomia do Nervo Periférico

Anatomicamente o axônio juntamente com a bainha de mielina, denomina-se fibra nervosa. Estas fibras periféricas são envolvidas por três camadas de tecido conjuntivo as quais juntamente com os componentes da MEC entram na composição do nervo periférico. A camada mais externa é chamada de epineuro, formada por tecido conjuntivo frouxo, possui fibras de Col

tipo I, fibroblastos e vasos sanguíneos em sua constituição. Já a camada média é denominada de perineuro, encontram-se as células pavimentosas (isto é, fibroblastos e células perineurais) unidas fortemente por “tight junctions” e Col I e III, os quais se dispõem concentricamente em relação aos grupos de axônios originando os fascículos. Esta camada é importante na manutenção da homeostase do nevo, pois, atua como 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. Contém axônios mielínicos envolvidos pela bainha de mielina e axônios amielínicos, envolvidos pelas projeções citoplasmáticas das SC e fibras de Col III orientadas longitudinalmente em relação ao axônio. Nesse tecido conjuntivo podem residir macrófagos, poucos fibroblastos dispersos e, eventualmente, mastócitos (Guth, 1956; Cajal, 1959; Lundborg, 1993; Schimdt & Leach, 2003).

1.4 Lesão Nervosa Periférica

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

Após a transecção nervosa, na porção do coto proximal ocorre o vazamento do material axoplasmático em virtude do rompimento da membrana celular destes axônios, os corpos celulares dos neurônios lesados entram em cromatólise, tendo seus núcleos deslocados para a

periferia do pericário. Além disso, há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela síntese de proteínas relacionadas ao reparo do axônio lesado (Cajal, 1959; Terenghi, 1999; Zochodne, 2000).

Já no coto distal desenvolve-se um processo degenerativo, descrito em 1850 por Waller, sendo denominado degeneração Walleriana (Waller, 1850). Durante esse processo ocorre a fragmentação da bainha de mielina dos axônios lesados (Lunn *et al.*, 1990). Concomitantemente, ocorre o recrutamento dos macrófagos em direção ao local da lesão, bem como a proliferação e multiplicação das SC. Ambos os tipos celulares atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamento dos axônios em degeneração (Guth, 1956; Cabaud *et al.*, 1982; Beuche & Fried, 1984; Stoll *et al.*, 1989; Sunderland, 1990; Bruck *et al.*, 1995; Ide, 1996; Bruck, 1997; Cheng & Zochodne, 2002; Stoll *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003), criando, dessa forma, um microambiente favorável ao crescimento e orientação axonal em direção ao órgão alvo, fundamental ao sucesso do processo regenerativo (Frisen, 1997; Zochodne, 2000).

1.5 Células de Schwann

Subseqüentemente a uma lesão nervosa periférica, as SC adquirem características de células proliferativas e fagocíticas, sendo vitais durante o processo de degeneração Walleriana (Ide, 1996). Estas células não neurais dão suporte ao crescimento axonal, servindo como interface entre os axônios e a MEC do endoneuro (Ide, 1996). Além disso, as SC expressam várias integrinas receptoras de membrana, entre elas a $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, importantes para a interação dessas células com as moléculas da MEC (Milner *et al.*, 1997).

Ainda, provém um substrato rico para o crescimento axonal, pois sintetizam fatores de crescimento nervoso para os axônios em regeneração e realizam a mielinização dos axônios em

brotamento (Le Beau *et al.*, 1988; Taniuchi *et al.*, 1988; Garbay *et al.*, 2000; Schimdt & Leach, 2003).

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

Além disso, as SC são responsáveis pela produção de diversos fatores neurotróficos como o NGF, BDNF, o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fundamentais ao desenvolvimento, manutenção e regeneração das células nervosas (Jessen & Mirsky, 1999; Zochodne, 2000). Contudo, regulam a expressão de receptores de alta e baixa afinidade para os fatores neurotróficos (Heumam *et al.*, 1987; Acheson *et al.*, 1991; Distefano *et al.*, 1992; Funakoshi *et al.*, 1993; Taniuchi *et al.*, 1998). O estudo da dinâmica de expressão temporal dos diferentes fatores neurotróficos em resposta a uma lesão periférica, tais como o BDNF, neurotrofina-3 (NT-3), CNTF e GDNF, vem sendo um importante e ativo campo de pesquisa nos últimos anos (Beck *et al.*, 1994; Shirley *et al.*, 1996; Utley *et al.*, 1996; Lewin *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 1998; Bloch *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 2001).

Tendo-se em vista a importância das SC para a homeostasia do sistema nervoso, alguns estudos comprovaram que a falta destes componentes celulares não neurais após a lesão nervosa resulta na ausência de crescimento axonal em direção ao órgão alvo, não havendo, portanto, sucesso no processo regenerativo (Hall, 1986; Berry *et al.*, 1988). Porém, quando estas células

acompanham os axônios nos eventos regenerativos, o crescimento axonal é otimizado e restabelece o contato com o órgão alvo (Torigoe *et al.*, 1996).

Devido às características positivas das SC em ensaios de lesões no sistema nervoso, alguns pesquisadores utilizaram-nas em transplantes aplicados no sistema nervoso central e em segmentos de nervo, estes obtiveram resultados promissores em ambos os estudos com o reparo do sistema nervoso (Berry *et al.*, 1988; Levi & Bunge, 1994; Smith & Stevenson, 1998; Symons *et al.*, 2001; Dezawa, 2002).

Ainda, quando as SC foram utilizadas no modelo da tubulização, demonstrou-se que essas células participavam efetivamente do processo regenerativo, corroborando ainda mais para os estudos de lesão nervosa (Abernithy *et al.*, 1994; Madison & Archibald, 1994). Além disso, o emprego das SC para o preenchimento de tubos confeccionados a partir de biomateriais como o poli ácido láctico co-glicólico (PLGA) e poli L-ácido láctico (PLLA), contribui positivamente e acelerou ainda mais o processo regenerativo (Evans *et al.*, 2002; Schlosshauer *et al.*, 2003).

Adicionalmente, o uso da engenharia de tecido (TEN) com adição de SC, resulta num número de axônios igual ao relatado no uso do autoenxerto e significativamente superior ao encontrado no tubo de polietileno, após a consolidação do processo regenerativo (Komiyama *et al.* 2004).

1.6 Reparo de lesões nervosas

A regeneração do SNP é considerada um fenômeno altamente complexo, resultante de uma sucessão de eventos visando o reajuste do microambiente do nervo lesado, produzindo as condições necessárias para o crescimento axonal direcionado. Dessa forma, o SNP apresenta grande potencial regenerativo após uma lesão. Contudo, tal capacidade, é altamente dependente

da correta expressão temporal dos diversos fatores de crescimento e componentes da MEC, bem como da interação entre os axônios em regeneração com as células não neuronais presentes no nervo (Barnes, 1985; Ide, 1996).

Apesar da grande capacidade regenerativa do SNP (Barnes, 1985; Ide, 1996), há casos onde a extensão da lesão impossibilita a reconexão entre os cotos. Nesse intuito, vários materiais como os ossos, fâscias, tendões, músculos estriados esqueléticos, vasos sanguíneos foram utilizados no reparo do nervo periférico, entretanto, há necessidade de remoção do tecido do paciente para tal implante (Fields *et al.*, 1989; Evans *et al.*, 1999; Yannas & Hill, 2004). Tecidos não-autólogos (aloenxertos) e até mesmo de outras espécies (xenoenxertos) foram utilizados, contudo há a desvantagem de reação imune do hospedeiro (Barker & Widner 2004; Wennersten *et al.*, 2006). Comprovadamente, o autoenxerto de nervos cutâneos (e.g. nervo cutâneo sural ou safeno) resulta numa melhor recuperação motora e sensitiva (Nichols *et al.*, 2004). O autoenxerto (autógeno) apresenta características de biocompatibilidade, atoxicidade, promove a adesão e migração celular, é utilizado quando a extensão da lesão impede a ligação dos cotos e a sua anastomose. Porém, quando utilizado tal técnica há a perda da sensibilidade da área do nervo retirado para o transplante (Evans *et al.*, 2002; Bellamkonda, 2006; Sinis *et al.*, 2006).

Outras técnicas para o reparo do nervo periférico são amplamente utilizadas nos casos de lesões periféricas, como a sutura das bainhas conjuntivas (neurorrafia) e a tubulização. Dentre a neurorrafia, temos a nervosa onde é suturado tecido epineural do nervo. Já na neurorrafia fascicular, os fascículos nervosos são alinhados e suturados através do tecido perineural nervoso (Lundborg *et al.*, 1982; Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Lundborg *et al.*, 1994; Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004).

Entretando, na maioria das lesões nervosas periféricas há a necessidade de remoção de parte do nervo dilacerado causado pelo acidente. Ainda, quando ocorre a secção do nervo, há a

retração dos cotos que torna a prática da neurorrafia inviável, pois resultaria na tensão nervosa e culminaria numa degeneração secundária. Contudo, a tubulização é uma técnica de reparo realizada quando a distância que separa os dois cotos não excede alguns milímetros. O processo da tubulização consta de uma prótese tubular onde o coto distal e proximal são introduzidos e fixados através de pontos cirúrgicos em suas extremidades, permitindo um realinhamento dos cotos, deixando-se um espaço de poucos milímetros entre os mesmos, geralmente 10mm de extensão (Lundborg *et al.*, 1982; Fields *et al.*, 1989, Lundborg *et al.*, 1991; Lundborg, 1993; Lundborg *et al.*, 1994; Labrador *et al.*, 1995; Lundborg *et al.*, 1997; Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004). Os objetivos desta técnica são criar um ambiente favorável à regeneração, orientar o crescimento das fibras em direção ao coto distal, proteger as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitar a formação de neuromas. Além disso, possibilita o emprego de moléculas da MEC como Col, FN, LAM, heparam sulfato proteoglicano (HSPG), agregam, ácido hialurônico, células fundamentais para o processo regenerativo (e.g. SC), e fatores de neurotróficos como o GDNF, NGF, BDNF, NT-3, CNTF, para o preenchimento do tubo a fim de aumentar a eficiência do processo regenerativo (Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Tong *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1998; Labrador *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Dohm *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Verdú *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003; Keith *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004; Vögelin *et al.*, 2006). É importante ressaltar que a técnica da tubulização apresenta algumas desvantagens. Uma delas é a elevação gradativa da pressão no interior da prótese, à medida que o nervo regenerado aumenta em espessura. Como resultado, dificulta-se a vascularização, o que resulta em degeneração axonal secundária (Fields *et al.*, 1989; Terrisa *et al.*, 1999). Dessa forma, em muitos casos, torna-se obrigatória a realização de uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do tubo. Outro fator limitante dessa técnica é a distância máxima entre os cotos, que não pode ser superior

a alguns milímetros (Lundborg, 1982; Butí *et al.*, 1996; Schimdt & Leach, 2003; da Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004). Vale a pena ressaltar que os materiais mais comumente utilizados na tubulização são próteses tubulares sintéticas e impermeáveis, como por exemplo, o polietileno e o silicone o que corrobora para a problemática referida acima (Fields *et al.*, 1989; Yannas & Hill, 2004).

Particularmente, a busca por materiais biocompatíveis e reabsorvíveis (biomateriais) para reparo do nervo periférico e o emprego de estratégias capazes de minimizar os pontos negativos da tubulização vem se tornando um campo de estudo amplo nesses últimos anos (Widmer *et al.*, 1998; Sundback *et al.*, 2003).

1.7 Biomateriais

Atualmente, vários materiais sintéticos não degradáveis têm sido usados no reparo do nervo periférico, sendo o silicone o mais comum. Este se mostrou eficiente em vários ensaios quando a distância entre os cotos não excedia os 10 mm (Lundbog *et al.*, 1982; Madison *et al.*, 1988; Buti *et al.*, 1996; Labrador *et al.*, 1998; Lundborg *et al.*, 2004). Apresenta a vantagem de ser um material inerte e impermeável, isolando o nervo do tecido cicatricial, porém, há a necessidade de uma intervenção cirúrgica posterior para a retirada do tubo.

Vários materiais sintéticos biodegradáveis (biomateriais) têm sido pesquisados através do modelo da tubulização. Os poli (α -hidróxi ácidos) vêm se tornando uma das famílias de polímeros mais promissoras e estudadas na área dos materiais bioreabsorvíveis. A grande vantagem desses polímeros está na sua forma de degradação, que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos resultantes da degradação completamente absorvidos pelo organismo (Rezwan *et al.*; 2006). Dentre esse grupo podemos destacar o poli ácido glicólico

(PGA), PLLA, PLGA e PCL, por atuarem positivamente em vários ensaios (Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002, Schimdt & Leach, 2003; Schlosshauer *et al.*, 2003; Yannas & Hill, 2004). Os biomateriais apresentam propriedades de grande interesse no campo da reconstituição nervosa periférica, tal como o tempo de degradação, porosidade, biocompatibilidade e resistência mecânica (Evans, *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003). Além disso, estes polímeros podem ser confeccionados com as mais variadas formas e dimensões (e.g. diâmetro, comprimento), permitindo-se a fixação dos cotos no processo da tubulização (Widmer *et al.*, 1998).

A confecção de próteses a partir de biopolímeros para a tubulização tem ênfase na substituição do enxerto autógeno de nervos cutâneos, evitando-se a perda da sensibilidade da área cujo nervo foi retirado para implante e a formação de neuromas dolorosos (Aldini *et al.*, 1996; Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram excelentes resultados no processo regenerativo quando utilizados biomaterias na técnica da tubulização (Madison *et al.*, 1985; Aldini *et al.*, 1996; Kiyotani *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002). Tubos porosos biodegradáveis construídos a partir de PLLA propiciaram uma melhora na resposta funcional, refletindo em um número significativo de axônios regenerados (Evans *et al.*, 1999). Ainda, na tentativa de melhorar o processo regenerativo, os mesmos foram preenchidos com SC (Evans *et al.*, 2002). Quando utilizados tubos bioreabsorvíveis preenchidos com matrigel e SC, este resultou numa regeneração periférica semelhante ao autoenxerto (Navarro *et al.*, 2003). Ainda, observou-se que a regeneração nervosa a uma distância de 12mm, superando a distância crítica entre os cotos (10 mm), foi bem sucedida quando utilizado o tubo de PLLA e Epsilon-caprolactona preenchido com SC (Koshimune *et al.*, 2003).

Outro biopolímero, o PCL, destacou-se por ser biocompatível em vários ensaios e surge como uma alternativa ao autoenxerto (Aldini *et al.*, 1996). Demonstrando a eficiência do biomaterial PCL, outros trabalhos ao preencher o tubo com matriz de fibrina, SC e fator

neurotrófico inibidor de leucemia (LIF) melhoraram qualitativamente e quantitativamente a regeneração periférica (Galla *et al.* 2004). Quando as próteses construídas de polímeros biodegradáveis PLLA/PCL e PGA foram preenchidas com colágeno, essas se mostraram eficazes ao processo regenerativo (Rosen *et al.*, 1990; Aldini *et al.*, 1996; Kyotani *et al.*, 1996). Ensaios obtiveram bons resultados na propriedade de adesão celular quando confeccionado um tubo com multi-camadas constituída por diferentes biomaterias, o PCL, quitosana, poli-uretano e poli-lisina, contribuindo significativamente para a regeneração nervosa (Ciardelli & Chiono, 2006).

Recentemente, tubos construídos com blendas de poli ácido láctico _{D,L} co-ácido glicólico (PDLLA e PLGA) preenchidos com SC e a exposição ao ultra-som de baixa intensidade contribuiu para o aumento no número de axônios mielínicos regenerados (Chang & Hsu, 2004).

Da mesma forma, tubos bioreabsorvíveis de PDLLA preenchidos com laminina mostraram efeitos positivos na regeneração axonal (Madison *et al.*, 1985). Outro copolímero, o poli _{L-co-D}, _L-ácido láctico (PLDLA) mostrou ser biocompatível em ensaios *in vitro* (Ignatius e Claes, 1996). Estudos com o biopolímero PLGA comprovaram que este foi capaz de sustentar o crescimento axonal *in vivo*, além de manter a viabilidade celular *in vitro* (Hadlock *et al.*, 2000; Bryan *et al.*, 2003; Schlosshauer *et al.*, 2003). De maneira semelhante, o copolímero PLLA/PGA (LactoSorb) e PCL/PLLA, contribuíram para a regeneração do nervo ciático (den Dunnen *et al.*, 1993; Francel *et al.*, 2003).

Mais recentemente, próteses construídas com hidrogel de poli (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) (PHEMA-MMA), preenchidas com gel de colágeno contendo fator de crescimento de fibroblastos (FGF-1), foram apresentadas como uma alternativa ao autoenxerto no reparo de lesões a nervos periféricos (Midha *et al.*, 2003).

Por outro lado, Flynn *et al.* (2003) confeccionaram canais longitudinais orientados de hidrogéis de poli (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) visando a aplicação no tecido neural,

os quais podem orientar o crescimento axonal e a migração de células não neurais no tecido lesionado.

Atualmente, outro biomaterial ainda pouco estudado no campo da bioengenharia é o biovidro. Este é composto de fosfato de cálcio e sódio, pode ser confeccionado em vários formatos, como por exemplo, fibras, grânulos, membranas e tubos (Gilchrist *et al.*, 1998; Lenihan *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 2001; Bosetti *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005; Bunting *et al.*, 2005). A confecção de tubos a partir de polímeros inorgânicos de vidro, onde o tempo de degradação pode ser ajustado ao processo regenerativo axonal, surgiram como uma alternativa na gama de materiais bioabsorvíveis utilizados na cirurgia de reparo nervoso (Gilchrist *et al.*, 1998).

Quando utilizados tubos confeccionados a partir de biovidro no reparo do nervo facial, observou-se que a velocidade de condução e a morfometria são próximos aos valores do nervo não lesionado (Gilchrist *et al.*, 1998). Adicionalmente, o preenchimento do mesmo com autoenxerto muscular obteve bons resultados (Lenihan *et al.*, 1998).

Outros modelos utilizando os biomateriais são amplamente estudados a fim de melhorar o reparo do nervo periférico. Um exemplo é a confecção de fibras a partir do biovidro estudado *in vivo* e *in vitro* por Bunting (2005). Observou-se que as fibras de biovidro além de serem biocompatíveis e bioreabsorvíveis, surgem como uma solução alternativa em casos cuja distância entre as porções do nervo transecionado excedesse alguns milímetros. Já o modelo *in vitro* estudado por Boccaccini (2005) revelou uma redução na proliferação de fibroblastos, o qual refletiria positivamente na qualidade do processo regenerativo.

Vários autores, entre eles Bunting (2005), Lenihan (1998), Gilchrist (1998), sugerem que os biomateriais poderiam vir a receber diferentes tipos celulares (e.g. células tronco mesênquimais, SC) e substâncias com atividade biológica comprovada, como fatores de

crescimento celulares (fatores neurotróficos) encapsulados e com liberação controlada integrados ao polímero para melhora da eficácia do processo regenerativo.

1.8 Matriz extracelular

A MEC pode ser definida como sendo um substrato extracelular que permite a migração, proliferação e diferenciação celular *in vivo*. Além disso, permite interações entre os componentes celulares e a manutenção da citoarquitetura de diferentes tecidos. É composta por várias macromoléculas, entre elas o Col, a FN, a LAM e o HSPG, esses se localizam no interstício celular do tecido nervoso periférico, fazendo parte de sua MEC (Rutka *et al.* 1988; Tona *et al.*, 1993; Timpl & Brown 1996; Terrisa *et al.*, 1999). São fundamentais para regular a viabilidade, diferenciação, organização e migração celular, durante o crescimento do brotamento axonal do coto proximal em direção ao órgão alvo (Ide *et al.* 1983; Barnes, 1985; Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999).

A membrana basal das SC é caracterizada por uma forma especializada de MEC, onde podem ser encontradas várias moléculas, como a LAM, a FN, o Col tipo IV, o proteoglicano de condroitin sulfato (CSPG), e o heparam sulfato proteoglicano (HSPG) (Ide *et al.*, 1983; Timpl & Brown, 1996; Zuo *et al.*, 1998; Thyboll *et al.* 2002). Essas macromoléculas são ativamente produzidas pelas SC e influenciam fortemente na adesão dessas células, crescimento, diferenciação e regulação axonal durante o desenvolvimento e após uma lesão (Chernousov & Carey, 2000).

Subseqüentemente a uma lesão nervosa, a lâmina basal não sofre degradação, permanece como tubos vazios servindo como substrato para o crescimento, maturação e orientação dos axônios em regeneração (Ide *et al.*, 1983; Gulati, 1988). Somente algumas moléculas MEC, como

o hialuronam, tenascina C, fosfacam, LAM e a FN, têm seus níveis alterados após lesão periférica (Matesz *et al.* 2005). Outros estudos mostraram que durante a migração das SC na fase de desenvolvimento do SNP, os níveis na LAM e FN aumentavam, comprovando a sua importância na migração celular (Milner *et al.*, 1997).

Um dos principais componentes da MEC são as lamininas, essas são caracterizadas como sendo grandes glicoproteínas formadas por três cadeias de polipeptídeos α , β e γ . Podemos encontrar 5 tipos de cadeia α , 4 tipos de cadeia β e 3 tipos de cadeia γ , com peso molecular de aproximadamente 800kDa. As diferentes cadeias combinam-se para formar até 14 diferentes isoformas de lamininas, como por exemplo, a laminina I é formada por $\alpha1\beta1\gamma1$. Essas glicoproteínas apresentam 3 domínios celulares, um domínio para o fator de crescimento epidermal (EGF), outro domínio N-terminal, importante local para polimerização da LAM e um domínio G-globular localizado na cadeia C-terminal (Thyboll *et al.* 2002). São importantes na membrana basal por atuarem na ligação entre as células e moléculas de colágeno (Rutka *et al.* 1988).

Para demonstrar a importância das lamininas, alguns pesquisadores modificaram os genes responsáveis pela produção destas macromoléculas. Os resultados observados nos animais foram deficiência motora e paralisia. Desta forma, comprovaram indiretamente que as lamininas são fundamentais para a mielinização axonal, bem como, são importantes na qualidade da regeneração periférica (Chen & Strickland, 2003). Outros trabalhos demonstraram que as SC juntamente com os axônios orientam-se e crescem num substrato rico em laminina (Thompson & Buettner, 2001).

Um outro componente importante da MEC é o Col. Este constitui numa glicoproteína representadas por 11 isoformas diferentes, entre eles, temos o colágeno I, II, III, IV. O Col tipo I é encontrado na pele, ossos e tecido conjuntivo. Já o Col tipo II é encontrado somente nas

cartilagens. O Col tipo III aparece nos vasos sangüíneos, pele, tecido conjuntivo do nervo, pulmão e intestino. Já o Col tipo IV é encontrado especialmente na membrana basal das SC (Rutka *et al.* 1988).

Cada molécula de Col é formada por 3 polipeptídios de cadeia α em tripla hélice, com peso molecular de aproximadamente 95kDa. Cada tipo de colágeno apresenta uma cadeia α com uma seqüência de aminoácidos específica. Por exemplo, o Col tipo I é formado por duas cadeias $\alpha 1$ e por uma cadeia $\alpha 2$ (Rutka *et al.* 1988).

Por outro lado, o Col tipo IV, possui prolina em sua cadeia de carboidrato em vez de hidroxilisina, normalmente encontrado nos outros tipos de colágeno (Rutka *et al.* 1988).

Para confirmar os efeitos positivos destas moléculas da MEC, trabalhos empregando o substrato de matrigel com LAM e Col tipo IV mostraram a eficiência destas no crescimento axonal, aumentando o número de axônios regenerados (Tonge *et al.*, 1997).

Outras pesquisas com os componentes da MEC como a LAM, Col, FN e glicosaminoglicanos (GAGS) mostraram que estas moléculas têm influência positiva no processo regenerativo (Madison *et al.*, 1985; Glasby *et al.*, 1986; Salonen *et al.*, 1987; Yoshii *et al.*, 1987; Gulati, 1988; Madison *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1990; Bailey *et al.*, 1993; Bryan *et al.*, 1993; Tona *et al.*, 1993; Tong *et al.*, 1994; Gorio *et al.*, 1996; Lesma *et al.*, 1996; Ohbayashi *et al.*, 1996; Challacombe & Elam, 1997; Gorio *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1997; Chamberlain *et al.*, 1998(a); Chamberlain *et al.*, 1998(b); Gorio *et al.*, 1998; Labrador *et al.*, 1998; Di Giulio *et al.*, 2000; Verdú *et al.*, 2002; Yoshii *et al.*, 2002).

Trabalhos *in vitro* utilizando Col associado ou não a GAGS também obtiveram efeitos positivos sobre a migração, proliferação e à viabilidade dos componentes celulares não neurais (Santos *et al.*, 2000; Spilker *et al.*, 2001).

Até mesmo a confecção de tubos a partir de Col preenchidos com elementos da MEC mostrou efeitos promissores na regeneração axonal (Tong *et al.*, 1994; Chamberlain *et al.*, 1998 (a, b); Keilhoff *et al.*, 2003; Ashley *et al.*, 2006).

2. Justificativa

A superficialidade no trajeto de alguns nervos periféricos, em diferentes regiões do corpo humano, torna-se um fator de risco para a ocorrência de vários tipos de lesões, como por exemplo, o esmagamento e a transecção. Atualmente, as lesões nervosas periféricas são amplamente corrigidas cirurgicamente com o autoenxerto de nervos cutâneos (e.g. nervo sural ou safeno), resultando numa recuperação motora e sensitiva. Porém, há a perda da sensibilidade na área do nervo retirado para o transplante. Com o objetivo de se evitar as lesões secundárias, vários materiais como os tendões, fâscias, músculos e vasos sanguíneos têm sido propostos como alternativas para o autoenxerto de nervo periférico. Com o advento da bioengenharia, surge uma nova gama de pesquisas com materiais biomateriais, esses são fontes alternativas na substituição do autoenxerto autógeno de nervos cutâneos. Entre esses biomateriais podemos destacar o PGA, PLLA, PLGA e PCL. Esses apresentam propriedades de grande interesse no campo da reconstituição nervosa periférica, tais como o tempo de degradação, porosidade, biocompatibilidade, resistência e podem ser confeccionados com as dimensões desejadas.

Em virtude da problemática referida acima, este projeto tem a finalidade de estudar a utilização de próteses confeccionadas pelo método do solvente (os polímeros foram dissolvidos em solvente) a partir dos biomateriais PCL e PLLA, sobre a regeneração nervosa periférica empregando-se o modelo da tubulização. Ainda, sabe-se que as células de Schwann são de grande importância para a homeostase do nervo, nos eventos pós-lesão e na consolidação do processo regenerativo. Portanto, este presente trabalho avaliou a influência destes biomateriais sobre as SC na expressão dos componentes da MEC, como o colágeno IV e as lamininas I e II. A expressão de neurofilamento *in vivo* através da imunohistoquímica e, os axônios regenerados foram estudados através da microscopia eletrônica de transmissão e morfometria. Já no estudo *in vitro* foi realizada a microscopia eletrônica de varredura e imunocitoquímica na cultura purificada de SC sobre os biomateriais referidos acima.

Espera-se que a presente investigação propicie informações relevantes para futuras estratégias de tratamento de pacientes com trauma nervoso periférico. Especificamente, a confecção de próteses bioativas aplicadas na tubulização, capazes de interagir com as células não neurais, de acordo com a expressão temporal de moléculas fundamentais ao processo regenerativo, visando, futuramente, substituir com sucesso o uso de autoenxertos.

3. Objetivos Gerais

Devido à eficiência e às características positivas dos biomateriais, a importância das SC e dos componentes da MEC, estudou-se *in vivo* e *in vitro*, a influência dos biomateriais PLLA e PCL sobre a expressão, pelas SC, das cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$ que compõem as lamininas tipo I e II, bem como a expressão de Col tipo IV e neurofilamento através do emprego das técnicas de imunohistoquímica realizadas após a tubulização e imunocitoquímica através da cultura purificada de SC sobre os diferentes biomateriais. Além disso, avaliou-se o comportamento das células de Schwann sobre os biomateriais, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A regeneração axonal foi estudada através de uma análise morfológica pela microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e morfometria dos nervos regenerados.

4. Objetivos Específicos

In vivo

1) Análise morfológica das próteses confeccionadas a partir do PCL extrusão (o polímero foi fundido e injetado em um molde específico), solvente e PLLA solvente, sem implante, 30 e 60 dias após a tubulização, através da MEV;

2) Estudo dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL extrusão e solvente e PLLA solvente após o período de 30 e 60 dias após a tubulização, através da microscopia de luz;

3) Análise morfológica dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL extrusão e solvente e PLLA solvente após o período de 30 e 60 dias após a tubulização, através da MET;

4) Análise morfométrica dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL extrusão e solvente e PLLA solvente após o período de 30 e 60 dias após a tubulização;

5) Estudar a expressão da S-100 através da imunohistoquímica dos nervos regenerados no interior das próteses de polietileno, PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

6) Estudar a expressão da LAM através da imunohistoquímica dos nervos regenerados no interior das próteses de polietileno, PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

7) Estudar a expressão do Col tipo IV através da imunohistoquímica dos nervos regenerados no interior das próteses de polietileno, PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

8) Estudo do brotamento axonal pelo anticorpo anti-neurofilamento, através da imunohistoquímica dos nervos regenerados no interior das próteses de polietileno, PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

In vitro

1) Análise morfológica da cultura purificada das células de Schwann sobre as membranas de PCL e PLLA solvente após o período de 7 dias de cultivo celular, através da MEV;

2) Estudar a expressão do S-100 através da imunocitoquímica das SC sobre as membranas PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

3) Estudar a expressão da cadeia $\alpha 1\beta 1$ para a LAM tipo I através da imunocitoquímica das SC sobre as membranas PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

4) Estudar a expressão da cadeia $\alpha 2\beta 1$ para a LAM tipo II através da imunocitoquímica das SC sobre as membranas PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

5) Estudar a expressão do Col tipo IV através da imunocitoquímica das células de Schwann sobre as membranas PCL e PLLA confeccionadas a partir da metodologia do solvente respectivamente;

5. Materiais e métodos

5.1 *Materiais e métodos*

5.1.1 Construção de próteses de para a tubulização

A confecção da prótese tubular foi realizada pela técnica do solvente (Aldini *et al.*, 1996). Para isto, foram utilizados 0,85g do biopolímero PLLA (Peso molecular= 300 kDa) e 1,65g de PCL (Peso molecular=100 kDa) (PURAC, Holanda). Colocou-se separadamente os biopolímeros em 33ml de solvente (dicloroetano) (Merck, Darmstadt, Alemanha), de modo que as concentrações finais fossem 2,5% e 5% respectivamente (peso/volume). A seguir, a solução foi deixada em temperatura ambiente por 12 horas para completa homogeneização. No dia seguinte, a solução foi colocada em uma placa contida no interior de uma cuba de vidro com o meio saturado de solvente. Esperou-se 12 horas para evaporação completa do material, retirou-se a membrana da cuba, sendo esta colocada em uma câmara de vácuo por 5 minutos, de forma que eventuais resíduos do solvente não permanecessem nas membranas. A seguir, as membranas foram moldadas em pinos com diâmetro de 1,6mm (Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999). Em seguida, a superfície foi selada com pequena quantidade de N-butil-2-cianoacrilato (Histoacryl; Braun Surgical, Austrália). Finalmente, retirou-se o pino central (mandril), sendo os tubos produzidos com o comprimento de 10mm.

Realizou-se adicionalmente, a construção de tubos de PCL através do método de extrusão (Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999), ou seja, o polímero foi submetido à temperatura de 140°C no interior do aparelho de injeção (Mini Max Molder, modelo LMM-2017), sendo posteriormente o produto fundido injetado no interior do molde. Para isso, construiu-se um molde de aço com o diâmetro externo de 3,2mm e o pino central com diâmetro interno de 1,6mm.

Passados alguns minutos para o resfriamento do conjunto molde mais polímero, abriu-se à peça de aço, retirou-se o pino central e coletou-se o tubo de PCL. Ambos os tubos confeccionados pela metodologia do solvente e extrusão (injeção no molde) foram mantidos em sílica gel até o momento da cirurgia.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das próteses tubulares

Os tubos produzidos a partir dos polímeros PCL e PLLA foram observados no microscópio eletrônico de varredura a fim de se avaliar a superfície interna e externa, bem como a estrutura da parede após o período de 30 e 60 dias de implante. Após a confecção e posterior retirada nos períodos pré-determinados, as próteses foram colocadas nos sputters e levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers CTD030). Em seguida, foram metalizadas com ouro-paládio por 120s a 20mA. Posteriormente, foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA 840A), operando a 10KV.

5.1.3 Confecção de membranas para cultura

As membranas foram obtidas de acordo com o método do solvente descrito no item 5.1.1. Após a evaporação do solvente e a passagem pela câmara de vácuo, as membranas foram cortadas de acordo com o tamanho dos poços da placa de cultura (24 poços), aproximadamente com 2,0mm de diâmetro. Antecedendo a preparação da cultura primária, as membranas foram desinfetadas em álcool 70% e colocadas nos respectivos poços, recebendo posteriormente as SC.

5.2 Estudo in vitro

5.2.1 Cultura de células de Schwann

A cultura de SC foi preparada pelo método modificado de Brockes *et al.*, (1979) e Assouline *et al.*, (1983). Assim, nervos ciáticos de ratos Spreague Dawley (n=10) (neonatos) foram retirados e o epineuro dissecado. Após este procedimento, os nervos foram reduzidos e incubados em colagenase 0,05% (Worthing, Freehold, NY) por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, foram lavados em solução de Hanks, e incubados com tripsina por 15 minutos a 37°C. A tripsina foi inibida com soro fetal bovino e posteriormente realizou-se a centrifugação do homogenato. Este foi ressuspenso em meio modificado Eagle (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, contendo forskolina e extrato de glândula pituitária (10µg/ml). Em seguida, as células contidas em meio foram colocadas em placas de cultura de 100mm contendo poly l-lisina (Sigma). Após o período de 24 horas, foram cultivadas por 48 horas em meio contendo antibiótico e 10nM de citosina arabinosideo.

A pureza da cultura foi avaliada com a marcação anti S-100 (policlonal; Dako, Dinamarca) para visualização das células de Schwann. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para contagem do número de células adicionadas na placa de cultura foi utilizada a seguinte fórmula: número de quadrantes contados (câmara de Neubauer) X 10.000 (fator de correção) = número de células por mililitro (cel/ml).

5.2.2 Imunocitoquímica para as células de Schwann

Após 7 dias de cultura, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavadas 2 vezes em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4 por 5 minutos. Para evitar marcações

inespecíficas, as culturas foram incubadas por 45 minutos em uma solução contendo albumina bovina (Sigma) 1% e triton X (0,25%) em PB. Em seguida, as preparações foram incubadas com os anticorpos primários (anti-S-100, anti-Lam α 1, anti- Lam α 2, anti- Lam β 1 e anti-Col tipo IV) por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas 2 vezes em PB 0,1M, pH 7,4 por 5 minutos, e incubadas com anticorpo secundário fluorescente (CY-2 ou CY-3) por 45 minutos. A seguir, o material foi novamente lavado 2 vezes em PB 0,1M, pH 7,4 por 5 minutos. Posteriormente, os espécimes foram montados em glicerol e observados em microscópio invertido (Nokon TS100) equipado com sistema de epifluorescência.

5.2.3 Processamento e análise para Microscopia Eletrônica de Varredura

As culturas foram fixadas em Karnovsky (2% glutaraldeído e 1% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4) por 15 minutos. Posteriormente, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% por 20 minutos e lavadas cuidadosamente em tampão cacodilato. Em seguida, a cultura foi desidratada em concentração crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 15 minutos cada lavagem), antes de serem levadas até o aparelho de ponto crítico (Balzers CTD 030). Após a passagem pelo ponto crítico, as amostras foram armazenadas em sílica gel até o momento de serem colocadas nos sputters. Em seguida, foram metalizadas com ouro-paládio e, posteriormente observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA 840A), operando a 10KV.

5.3. *Estudo in vivo*

5.3.1 Animais e grupos experimentais

| Microscopia óptica e eletrônica de transmissão | | Imunohistoquímica | |
|---|--------------------|----------------------------|--------------------|
| Grupo Polietileno | | Grupo Polietileno | |
| 30 dias | 60 dias | 30dias | 60 dias |
| n=5 animais | n=5 animais | n=5 animais | n=5 animais |
| Grupo PCL extrusão | | Grupo PCL solvente | |
| 30 dias | 60 dias | 30dias | 60 dias |
| n=5 animais | n=5 animais | n=5 animais | n=5 animais |
| Grupo PCL solvente | | Grupo PLLA solvente | |
| 30 dias | 60 dias | 30dias | 60 dias |
| n=5 animais | n=5 animais | n=5 animais | n=5 animais |
| Grupo PLLA solvente | | | |
| 30 dias | 60 dias | | |
| n=5 animais | n=5 animais | | |

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados ratos da linhagem Spreague Dawley, fêmeas e adultas (n=70). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Os animais dos grupos controle tiveram o nervo ciático implantado numa prótese tubular constituída de polietileno e numa prótese tubular de PCL construída pelo método de extrusão. Nos outros grupos, o nervo ciático foi implantado no tubo construído respectivamente a partir do biopolímeros PLLA e PCL através do método do solvente. Os animais operados tiveram um período de sobrevivência de 30 e 60 dias. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Experimentos com Animais (CEEA/IB/Unicamp, proc. 801-1).

5.3.2 Procedimento cirúrgico para a tubulização

Após anestesia (0,2ml de ketamina e 0,2ml de xylazina, 0,2ml/100g peso corpóreo, ip), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo ciático foi exposto e transeccionado. Após a retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados, com um ponto cirúrgico (fio mononylon 9-0, ethicon) (Lundborg, 1982), no interior de um tubo de polietileno, PCL extrusão (controles) ou dos tubos de PCL e PLLA solvente, deixando-se um espaço de 6-7mm entre os cotos. Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele fechada com 3 pontos cirúrgicos (fio mononylon 4-0, Ethicon). Os animais foram mantidos em biotério por um período de 30 e 60 dias, recebendo ração e água *ad libitum*.

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

Após o período de sobrevivência de 30 e 60 dias, os animais dos grupos experimentais polietileno, PCL extrusão, PCL e PLLA solvente respectivamente, foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (0,1 ml/20g, i.p.), submetidos à toracotomia e a seguir perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando à lavagem dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 150ml de uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em PB 0,1M, pH 7,4). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 300ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PB 0,1M, pH 7,4.

Posteriormente à fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo de polietileno, PCL extrusão, PCL e PLLA solvente foram dissecados e imersos em solução fixadora por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e dissecados sob lupa, sendo os cotos proximal e distal separados. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo PB 0,1M, pH 7,4. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio 1%, diluído em PB 0,2M, pH 7,4. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS). Os blocos foram desbastados e as secções semi-finas (0,5µm) obtidas foram coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio de luz. A seguir, algumas regiões foram selecionadas e os blocos retrimados sendo realizados os cortes ultra-finos (500Å; Ultramicrótomo LKB, Bromma 8800) os quais foram coletados em telas de cobre (200 Mesh).

Após contraste em acetato de uranila e citrato de chumbo, os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico Zeiss Leo 906, operando a 60kv.

5.3.4 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para imunohistoquímica

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

Após fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas e mantido a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e dissecados sob lupa. Os nervos foram colocados individualmente em frascos contendo uma solução de sacarose 20% em PB 0,1M, pH 7,4 por 12 horas, sendo em seguida imersos em tissue-tek (Miles Inc., USA) e congelados em n-hexano (Merk), mantido em nitrogênio líquido a -196°C. Cortes congelados com 12µm de espessura foram obtidos em criostato (Leica) e as seções foram transferidas para lâminas silanizadas e estocadas a -20°C até o momento da realização das imunomarcações. Para realização da imunohistoquímica, os espécimes, após atingirem a temperatura ambiente, foram imersos em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram incubadas em uma solução de soro de albumina bovina (BSA) 1% em PB 0,1M, pH 7,4 por 1 hora. Após, foram feitas três lavagens em PB 0,1M, pH 7,4, sendo posteriormente os anticorpos primários (anti-S-100, anti-LAM, anti-Col tipo IV e anti-neurofilamento) aplicados e incubados por 12 horas a 4°C. Em seqüência, após lavagem em PB 0,1M, pH 7,4, os respectivos anticorpos

secundários conjugados com CY-2 ou CY-3 foram aplicados por 45 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PB 0,1M, pH 7,4 e montadas em PB/glicerol (3:1), sendo observadas em microscópio de fluorescência.

5.3.5 Morfometria e contagem das fibras regeneradas

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: 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 relacionado à recuperação funcional do nervo, tendo sido utilizado na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (Lundborg *et al.*, 1982; Oliveira & Langone, 2000). A RZG 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, 4 campos representativos de cada nervo regenerado (n=5) foram digitalizados com o auxílio de uma vídeo câmera digital (Olympus U-Cmad-2) conectada a um microscópio olympus BX60 (Obj. 100x). O número total de fibras foi estimado a partir de uma regra de três simples, levando-se em conta a área total do nervo regenerado.

Os quatros campos amostrados em cada nervo regenerado foram empregados para obtenção das medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos. Estas foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula $D=P/\pi$. A diferença entre o DFM e o DAM forneceu a EBM (Mayhew & Sharma, 1984). A morfometria foi realizada empregando-se um sistema computadorizado, utilizando-se o programa Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics).

5.3.6 Análise estatística

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

6. Resultados

6.1 Resultados

6.1.1 Microscopia eletrônica de varredura das próteses sem implantação, após o período de 30 e 60 dias de tubulização e imagem da cirurgia na implantação dos tubos (Figura 1)

A metodologia de construção das próteses tubulares a partir do método de extrusão com o biomaterial PCL, mostrou que essas tinham a parede muito espessa refletindo em dificuldades na sutura do nervo no interior do tubo durante a tubulização. Além disso, não se observou sinal de degradação no período de 30 e 60 dias de implantação. Ainda, notaram-se algumas falhas na parede do tubo devido a problemas no preenchimento do molde de aço com o biomaterial fundido, porém, não houve alteração na superfície interna do tubo, o que poderia culminar em problemas na orientação axonal.

As próteses tubulares confeccionadas a partir da técnica do solvente apresentaram a espessura reduzida de sua parede, facilitando a sutura do nervo no interior do tubo durante a prática cirúrgica. Além disso, graças à reduzida espessura de sua parede, os tubos apresentaram certa transparência, o que facilitou a visualização e orientação dos cotos durante a cirurgia. Ainda, foi necessário menos biomaterial para a confecção dos tubos em comparação com o método de extrusão, cerca de aproximadamente 95% a menos de polímero utilizado. Um outro aspecto positivo encontrado foi a manutenção da estrutura física, bem como a coesão das camadas constituintes da parede do tubo, durante os períodos de 30 e 60 dias de tubulização.

6.1.2 Biomembranas para cultura celular (Figura 12)

As membranas foram obtidas de acordo com o protocolo descrito no item 5.1.1 e 5.1.3. As membranas de ambos os polímeros foram cortadas com forma circular e 2,0mm de diâmetro, de tal forma que se encaixassem no interior dos poços da placa de cultura contendo 24 poços. Devido a sua leveza, foram colocadas arruelas de titânio sobre a biomembranas a fim de evitar que ocorresse a flutuação destas durante e após a colocação das SC. Posteriormente ao lançamento da cultura realizou-se a troca de meio glial a cada dois dias. Inicialmente, adicionou-se 100 µL de meio sobre o biomaterial. Passados 45 minutos para adesão celular no substrato, completou-se com 100 µL de meio glial. Devido à opacidade da membrana de PCL, não se pode observar e monitorar as células de Schwann. Contudo, a transparência do PLLA permitiu tal fato, o qual nos orientou a respeito de sua confluência.

6.2. Estudo *in vitro*

6.2.1 Cultura purificada de Células de Schwann (Figura 11)

A cultura celular purificada realizada a partir dos nervos de 10 animais neonatos com 1-3 dias de vida pode ser observada na figura 11. O número de células lançadas em cada poço foi estimado através da câmara de Neubauer, resultando em cerca de 30×10^4 células em cada poço da placa de cultura com 24 poços. Essas foram avaliadas durante todo o período de cultivo e todo o experimento foi realizado em triplicata. As células foram cultivadas durante o período de 7 dias sobre as membranas dos biomateriais PCL e PLLA confeccionadas pelo método do solvente.

Observou-se, em contraste de fase, que essas células tinham como características a morfologia bipolar com finos prolongamentos citoplasmáticos, típicas de células de Schwann.

6.2.2 Expressão do S-100 na Imunocitoquímica (Figuras 11 e 13)

A imunomarcção anti S-100 revelou que a cultura celular tinha um alto grau de pureza, observada pela intensa marcação com o anticorpo (Fig. 11). Observou-se que a concentração de SC era maior sobre a membrana de PLLA do que na membrana de PCL, observados pelo número de células marcadas positivamente com o anticorpo S-100. Isso mostra que os biomateriais influenciam diferentemente na adesão celular destas células (Fig 13).

Ainda, notou-se que as SC sobre o PCL tinham morfologia ovóide e/ou esférica com curtos prolongamentos citoplasmáticos. Já as células sobre o biomaterial PLLA tinham morfologia bipolar e/ou triangular com longas projeções citoplasmáticas. Portanto, a cultura celular sobre os biomateriais mostrou que as células de Schwann interagiram de forma mais positiva com o substrato de PLLA do que de PCL (Fig 13).

6.2.3 Expressão da laminina tipo I na Imunocitoquímica ($\alpha 1\beta 1$) (Figuras 13)

A visualização da laminina I se deu pela dupla-marcação com os anticorpos anti-cadeia $\alpha 1$ e anti-cadeia $\beta 1$, resultando numa colocalização alaranjada para a LAM tipo I. Observou-se que houve a marcação para a LAM I pelas SC cultivadas em ambos os polímeros PCL e PLLA. Ainda constatou-se que estas células apresentavam várias morfologias. Ainda, notou-se que algumas células expressavam somente marcação para a cadeia $\alpha 1$ para laminina.

6.2.4 Expressão da laminina tipo II na Imunocitoquímica ($\alpha 2\beta 1$) (Figuras 13)

Da mesma forma como o mencionado no item acima, a imunomarcção para a laminina II foi realizada pela dupla-marcação do anticorpo anti-cadeia $\alpha 2$ com o anticorpo anti-cadeia $\beta 1$, resultando numa marcação co-localizada alaranjada para a LAM tipo II. Observou-se que as SC

marcadas para a LAM II tinham a morfologia celular bipolar e formavam agregados celulares sobre a biomembrana. Esta marcação foi mais intensa sobre o PLLA, visto que havia um contingente celular maior em comparação ao biomaterial PCL.

6.2.5 Expressão do colágeno tipo IV na imunocitoquímica (Figura 13)

Após 7 dias de cultivo celular sobre as biomembranas de PCL e PLLA, realizou-se a imunomarcação para o Col tipo IV. Observou-se que as SC lançadas sobre ambos os biomateriais expressaram o Col tipo IV. Notou-se que as células apresentaram várias morfologias, esféricas, bipolares, triangulares. Ainda, evidenciou-se que havia um número maior de células presentes e marcadas sobre a membrana de PLLA, colaborando para uma marcação total mais intensa.

6.2.6 Microscopia eletrônica de varredura da cultura de células de Schwann (Figura 12)

O cultivo da SC sobre os biopolímeros PCL e PLLA confeccionados a partir do método do solvente demonstrou que essas células apresentam comportamento diferente, dependendo do substrato.

Observou-se que as culturas sobre o PCL tinham uma densidade celular inferior às aquelas cultivadas sobre o PLLA, deixando claro que o biomaterial PCL tinha certa influência na taxa de adesão celular e/ou em sua proliferação. Além disso, notou-se que as SC sobre o PCL tinham várias morfologias, entre elas a bipolar, caracterizada pelos longos prolongamentos citoplasmáticos (Fig 13).

6.3 Estudo in vivo

6.3.1 Microscopia de luz do nervo regenerado no interior do tubo de polietileno

(Figura 2)

Nos cortes transversais do nervo regenerado após 30 dias de tubulização, pôde-se observar a presença de um epineuro delgado contendo vasos sanguíneos de diversos calibres em seu interior. Constatou-se a presença de diversas fibras nervosas regeneradas envoltas por tecido endoneural, assim como vasos sanguíneos perineurais e endoneurais.

Após 60 dias de tubulização evidenciou-se, nos cortes transversais, um maior diâmetro seccional do nervo em relação ao período de 30 dias de tubulização, devido ao aumento do número de axônios, suas dimensões e maior quantidade de MEC. Ainda, observou-se uma grande quantidade de vasos epineurais, perineurais e endoneurais.

6.3.2 Microscopia de luz do nervo regenerado no interior do tubo de PCL extrusão (Figura 2)

Pode-se observar que nos cortes transversais do nervo regenerado após 30 dias de tubulização, a presença de um epineuro ligeiramente mais espesso em relação ao tubo de polietileno. Além disso, o nervo apresentou uma grande área seccional com grande quantidade de vasos epineurais. Evidenciou-se a presença de diversas fibras nervosas regeneradas contidas no endoneuro.

Após 60 dias de tubulização, evidenciou-se uma evolução do processo regenerativo, tendo-se em vista o aumento relativo da área dos nervos regenerados, bem como um aumento significativo do número de fibras.

6.3.3 Microscopia de luz do nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente (Figura 2)

Após o período de 30 dias de tubulização, observou-se grande espessura do epineuro, contendo vasos sanguíneos homogeneamente dispersos. Ainda, os espécimes apresentaram uma quantidade significativa de fibras regeneradas presentes no microambiente do endoneuro, comparativamente aos demais grupos controle.

Quando realizados cortes transversais do nervo regenerado após 60 dias de tubulização, observou-se a presença de um epineuro espesso circundado por células inflamatórias, possivelmente atuando na degradação do material.

6.3.4 Microscopia luz do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente (Figura 2)

Observou-se nos cortes transversais do nervo regenerado após 30 dias de tubulização, a presença de um epineuro delgado contendo vasos sanguíneos de diversos calibres em seu interior. Notou-se um número significativo de fibras regeneradas, assim como vasos sanguíneos perineurais e endoneurais.

Após 60 dias de tubulização evidenciou-se, nos cortes transversais, um epineuro mais espesso, com uma pequena área do nervo regenerado contendo vasos perineurais e endoneurais e fibras nervosas.

6.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo de polietileno (Figura 3)

Passados 30 dias após a tubulização do nervo ciático no interior do tubo de polietileno, observou-se que os mini-fascículos apresentavam-se claramente delimitados pelas células perineurais. Estas apresentaram morfologia fusiforme, com pequena quantidade de cromatina condensada.

Observou-se a presença de axônios mielínicos e axônios amielínicos no endoneuro. Os mielínicos possuíam maiores dimensões, sempre se apresentando relacionados a uma única SC. Já os axônios amielínicos apresentavam-se organizados em pequenos grupos, compartilhando projeções de uma mesma SC.

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

Após o período de 60 dias de tubulização, evidenciou-se vários mini-fascículos envolvendo axônios mielínicos com maior diâmetro e calibre axonal e, além disso, constatou-se a presença de axônios amielínicos. As células perineurais mantiveram sua morfologia fusiforme e seus prolongamentos formavam várias camadas concêntricas, compondo os fascículos. Ainda, observou-se com a pequena quantidade de fibras de colágeno no interior do endoneuro.

6.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo PCL extrusão (Figura 3)

Ao microscópio eletrônico, após o período de 30 dias de tubulização, observou-se grupos de axônios regenerados delimitados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células perineurais. Notou-se a presença, nas adjacências dos axônios mielínicos, de uma pequena quantidade de

fibras colágenas endoneurais. Ainda, os axônios mielínicos relacionavam-se às projeções de uma única SC. Por sua vez, os axônios amielínicos, possuíam diâmetro inferior aos mielínicos e estavam envolvidos por processos citoplasmáticos de uma única SC.

Após o período de 60 dias de sobrevivência dos animais que tiveram seu nervo implantado numa prótese tubular confeccionada de PCL pelo método de extrusão, notou-se a formação de fascículos pelos prolongamentos das células perineurais. Observou-se também uma grande quantidade de axônios mielínicos regenerados com maiores diâmetros e, portanto, calibre axonal superior ao observado com 30 dias de tubulização. Ainda constatou-se, no microambiente endoneural, a presença de axônios amielínicos envolvidos pelas projeções citoplasmáticas das SC e poucas fibras de colágeno.

6.3.7 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo PCL solvente (Figura 3)

Posteriormente ao período de 30 dias após tubulização, observou-se grande número de células perineurais delimitando os fascículos nervosos. Estas apresentaram morfologia fusiforme e apresentavam grande quantidade de cromatina condensada.

Quanto ao número de fibras regeneradas, constatou-se que neste grupo havia um maior contingente de axônios mielínicos regenerados presentes no interior dos fascículos. Pôde-se observar axônios mielínicos e uma pequena quantidade de fibras colágenas endoneurais. Ainda, grupos de axônios amielínicos envolvidos por processos citoplasmáticos de uma única SC foram observados.

No grupo cujos animais tiveram período de 60 dias de sobrevivência e seus nervos implantados na prótese de PCL solvente, notou-se axônios mielínicos com diâmetros e calibre

superiores ao observado com 30 dias de tubulização. Entretanto, observou-se poucos axônios amielínicos e uma escassez de fibras colágenas endoneurais.

6.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão do nervo regenerado no interior do tubo PLLA solvente (Figura 3)

Passados 30 dias após a tubulização, somente os prolongamentos citoplasmáticos das células perineurais delimitando grandes fascículos nervosos foram observados. Em seu interior haviam axônios mielínicos, um grande grupo de amielínicos regenerados e, nas adjacências desses axônios, a presença de pouca quantidade de fibras colágenas endoneurais.

Após o período de 60 dias de tubulização notou-se axônios mielínicos com maiores diâmetros e a presença de axônios amielínicos. Nenhuma alteração na quantidade de fibras colágenas endoneurais foi constatada.

6.4 Contagem dos axônios mielínicos (Tabela 1 e Figura 4)

A tabela apresenta o número de axônios mielínicos regenerados e obtidos no interior do tubo de polietileno, nos grupos PCL extrusão, PCL e PLLA solvente respectivamente, após um período de 30 e 60 dias de tubulização.

Observou-se que após o período de 30 dias de tubulização, o grupo polietileno apresentou um número médio de $1455 \pm 110,32$ axônios mielínicos regenerados. No grupo PCL extrusão obteve-se $3094 \pm 376,63$ axônios mielínicos. Já no grupo PCL solvente houve a regeneração de $4787 \pm 217,46$ axônios mielínicos, enquanto que o grupo PLLA solvente teve $3490 \pm 220,88$ axônios. Estatisticamente todas as próteses tubulares confeccionadas a partir dos biomateriais foram superiores ao grupo polietileno. Não houve significância entre o número de fibras

regeneradas no interior da prótese de PCL extrusão e PLLA solvente. Somente o grupo PCL solvente foi estatisticamente superior aos demais grupos de biomateriais.

Após 60 dias de tubulização, constatou-se que o grupo polietileno apresentou um número médio de $3198 \pm 252,67$ axônios mielínicos. No grupo PCL extrusão obteve-se $4831 \pm 663,80$ axônios mielínicos regenerados, enquanto que no PCL solvente, $5491 \pm 439,64$ axônios mielínicos. O grupo PLLA solvente apresentou uma média de $3732 \pm 270,62$ axônios regenerados. Avaliando-se estatisticamente os grupos com 60 dias de implante, observa-se que o grupo PCL solvente e extrusão foram superiores ao polietileno. Quanto ao método de confecção do tubo, não houve diferença entre os grupos experimentais.

6.5 Parâmetros Morfométricos (Figuras 5, 6, 7, 8 e Tabela 1)

O estudo morfométrico teve como objetivo analisar a distribuição de frequência dos seguintes parâmetros: DFM (correspondendo ao axônio sem a sua bainha de mielina), DAM, EBM e a RZG. Para estudar o comportamento das SC, estudou-se a EBM e RZG, enquanto que o processo regenerativo foi avaliado pelo DFM e DAM. As médias e os respectivos desvios-padrão foram obtidos a partir dos dados amostrados dos nervos regenerados no interior das próteses tubulares de polietileno, PCL extrusão e solvente e PLLA solvente, após o período de 30 e 60 dias de tubulização.

6.5.1 Diâmetro dos axônios mielínicos (Tabela 1 e Figura 5)

Os animais do grupo polietileno, 30 dias após a tubulização, apresentaram axônios com diâmetros variando entre $0,50\mu\text{m}$ e $8,5\mu\text{m}$ e média igual a $2,53 \pm 1,07\mu\text{m}$. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre $1,51\mu\text{m}$ e $2,50\mu\text{m}$ e entre $2,51\mu\text{m}$

e 3,50 μ m, correspondendo a 32,68% e 37,16% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 29,72% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 2,27% possuíam diâmetro entre 0,50 e 1,5 μ m, 17,91% possuíam diâmetros de 3,51 μ m até 4,5 μ m, 7,35% entre 4,51 e 5,5 μ m, 1,8% entre 5,51 μ m e 6,5 μ m e 0,79% dos diâmetros eram maiores a 6,51 μ m.

Os axônios do grupo PCL extrusão 30 dias após tubulização apresentaram diâmetros variando entre 0,50 μ m e 7,5 μ m e média igual a 2,43 \pm 0,99 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 1,51 μ m e 2,5 μ m e entre 2,51 μ m e 3,5 μ m, correspondendo a 34,76% e 36,79% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 28,45% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 2,74% possuíam diâmetros de 0,50 μ m até 1,5 μ m, 19,54% entre 3,51 e 4,50 μ m, 5,05% entre 4,51 μ m e 5,5 μ m e 1,12% diâmetros eram maiores do que 5,51 μ m.

A distribuição de frequência do DAM do nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente 30 dias após tubulização variou de 0,50 a 7,5 μ m e média igual a 2,89 \pm 0,94 μ m. Neste grupo, 42,74% dos axônios mielínicos apresentaram diâmetro entre 2,51 e 3,5 μ m, 27,40% entre 3,51 e 4,5 μ m, 16,62% entre 1,51 e 2,5 μ m, 0,11% entre 0,50 e 1,5 μ m e 10,39% entre 4,51 a 5,5 μ m. Os demais, 2,50% apresentam-se entre 5,51 μ m e 6,5 μ m, 0,22% entre 6,51 μ m e 7,50 μ m.

Já a distribuição de frequência do DAM do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente, 30 dias após tubulização, variou de 0,50 a 7,5 μ m e média igual a 2,58 \pm 1,02 μ m. Neste, 36,38% dos axônios mielínicos apresentaram diâmetro entre 2,51 e 3,5 μ m, 32,56% entre 1,51 e 2,5 μ m, 19,79% entre 3,51 e 4,5 μ m, 8,48% entre 4,51 e 5,5 μ m. Os demais 2,79% tinham a frequência de distribuição de 0,73% entre 0,50 a 1,5 μ m, 1,62% apresentam-se entre 5,51 μ m e 6,5 μ m e 0,41% entre 6,51 μ m e 7,50 μ m.

Ainda, avaliou-se a distribuição das frequências das fibras regeneradas após 60 dias de tubulização no interior de diferentes tubos.

Os animais do grupo polietileno, 60 dias após a tubulização, apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,50 μ m e 8,5 μ m e média igual a 2,86 \pm 1,16 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 1,51 μ m e 2,50 μ m, 2,51 μ m e 3,50 μ m e entre 3,51 μ m e 4,50 μ m, correspondendo a 23,65%, 32,96% e 24,85% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 18,54% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo 1,91% dos diâmetros estavam distribuídos entre 0,50 e 1,5 μ m, 11,6% possuíam diâmetros de 4,51 μ m até 5,5 μ m, 3,91% entre 5,51 e 6,5 μ m, 0,89% entre 6,51 μ m e 7,5 μ m e 0,17% dos demais diâmetros eram maiores do que 7,51 μ m.

Os axônios do grupo PCL extrusão, 60 dias após tubulização, apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,50 μ m e 7,5 μ m e média igual a 2,86 \pm 1,06 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 2,51 μ m e 3,5 μ m e entre 3,51 μ m e 4,5 μ m, correspondendo a 36,21% e 27,37% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 36,46% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo 0,58% possuíam diâmetros de 0,50 μ m até 1,5 μ m, 21,70% entre 1,51 e 2,50 μ m, 10,57% entre 4,51 μ m e 5,5 μ m e 2,75% entre 5,51 μ m e 6,5 μ m. Os 0,77% restantes tinham diâmetros maiores do que 6,51 μ m.

A distribuição de frequência do DAM do nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente, 60 dias após tubulização, variou de 0,50 a 6,5 μ m e média igual a 2,67 \pm 0,97 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 1,51 μ m e 2,5 μ m, 2,51 e 3,5 μ m e 3,51 μ m e 4,5 μ m, correspondendo a 26,11%, 38,56% e 24,11% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 11,22% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo 1,04% possuíam diâmetros de 0,50 μ m até 1,5 μ m, 8,49% entre 4,51 e 5,50 μ m, 1,04% entre 5,51 μ m e 6,5 μ m e 0,28% dos diâmetros se distribuíram entre 6,51 e 7,5 μ m.

Já a distribuição de frequência do DAM do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente, 60 dias após tubulização, variou de 0,50 a 7,5 μ m e média igual a 2,87 \pm 1,14 μ m. Neste, 34,78% dos axônios mielínicos apresentaram diâmetro entre 2,51 e 3,5 μ m, 24,43% entre 1,51 e 2,5 μ m, 23,19% entre 3,51 e 4,5 μ m, 11,59% entre 4,51 e 5,5 μ m. Os demais 6,01% tinham a frequência de distribuição de 0,52% entre 0,51 a 1,5 μ m; 4,45% apresentam-se entre 5,51 μ m e 6,5 μ m e 1,0% entre 6,51 μ m e 7,50 μ m.

6.5.2 Diâmetro das fibras mielínicas (Tabela 1 e Figura 6)

Os animais 30 dias após a tubulização e cujo tubo utilizado foi o polietileno, apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,50 a 8,5 μ m e média igual a 3,31 \pm 1,12 μ m. As maiores porcentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 2,51 a 3,5 μ m e 3,51 a 4,5 μ m, correspondendo a 36,94% e 31,86% do total, respectivamente. As demais fibras mielínicas, que representam os 31,2% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 7,83% possuíam diâmetro entre 1,50 e 2,5 μ m, 14,65% entre 4,51 e 5,5 μ m e 6,62% entre 5,51 μ m e 6,5 μ m. Os restantes 2,05% distribuíam-se entre 6,51 e 8,5 μ m.

Os animais 30 dias após a tubulização e cujo tubo utilizado foi o PCL extrusão, apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,50 a 8,5 μ m e média igual a 3,07 \pm 0,99 μ m. As maiores porcentagens das fibras foram observadas nos intervalos de 2,51 a 3,5 μ m e 3,51 a 4,5 μ m, correspondendo a 39,42% e 29,19% do total, respectivamente. As demais fibras mielínicas, que representam os 31,39% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 13,19% possuíam diâmetro entre 1,50 e 2,5 μ m, 14,18% possuíam diâmetro entre 4,51 e 5,5 μ m, 3,46% entre 5,51 e 6,5 μ m e 0,49% entre 6,51 μ m e 7,5 μ m e finalmente 0,16% entre 7,51 μ m e 8,5 μ m.

Os nervos obtidos no interior do tubo de PCL solvente, 30 dias após cirurgia, apresentaram fibras mielínicas variando de 1,50 a 8,5 μ m e média igual a 3,56 \pm 0,98 μ m. Destas, 40,02% apresentaram diâmetro num intervalo de 3,51 a 4,5 μ m, 28,73% entre 2,51 e 3,5 μ m e 20,40% entre 4,51 e 5,5 μ m. Os 10,85% restantes estavam distribuídos nos seguintes intervalos: 2,33% entre 1,50 e 2,5 μ m, 6,39% entre 5,51 e 6,5 μ m e 1,94% entre 6,51 e 7,5 μ m. Ainda foram observadas 0,16% de fibras entre 7,51 e 8,5 μ m.

Já os nervos obtidos no interior do tubo de PLLA, 30 dias após cirurgia, apresentaram fibras mielínicas variando de 1,50 a 8,5 μ m e média igual a 3,56 \pm 1,11 μ m. Destas, 34,49% e 37,31% apresentaram diâmetro num intervalo de 2,51 a 3,5 μ m e 3,51 a 4,5 μ m, respectivamente. Os demais se distribuíram nos seguintes intervalos: 4,60% entre 1,50 e 2,5 μ m, 20,04% entre 4,51 e 5,5 μ m, 10,71% entre 5,51 e 6,5 μ m, 2,18% entre 6,51 e 7,5 μ m e 0,62% entre 7,51 a 8,5 μ m.

Ainda, avaliou-se a distribuição das frequências dos nervos regenerados após 60 dias de tubulização no interior de diferentes tubos.

Os animais do grupo polietileno, 60 dias após a tubulização, apresentaram fibras mielínicas com diâmetros variando entre 1,50 μ m e 8,5 μ m e média igual a 3,79 \pm 1,29 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 2,51 μ m e 3,50 μ m, 3,51 μ m e 4,50 μ m e entre 4,51 μ m e 5,50 μ m, correspondendo a 25,38%, 28,45% e 23,46% do total, respectivamente. As demais fibras, que representaram os 22,71% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 5,65% possuíam diâmetro entre 1,50 a 2,5 μ m, 10,82% possuíam diâmetros de 5,51 μ m até 6,5 μ m, 4,31% entre 6,51 e 7,5 μ m, 1,77% das demais fibras se localizavam entre 7,51 μ m e 8,5 μ m.

As fibras do grupo PCL extrusão, 60 dias após tubulização, apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,50 μ m e 8,5 μ m e média igual a 3,68 \pm 1,23 μ m. As maiores porcentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 2,51 μ m e 3,5 μ m, entre 3,51 μ m e

4,5 μ m e 4,51 μ m e 5,5 μ m, correspondendo a 26,15%, 33,50% e 20,96% do total, respectivamente. As demais fibras, que representaram os 22,39% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo 0,07% possuíam diâmetros de 0,50 μ m até 1,5 μ m, 5,42% entre 1,51 e 2,50 μ m, 9,12% entre 5,51 μ m e 6,5 μ m e 3,46% entre 6,51 μ m e 7,5 μ m. Os 1,29% restantes tinham diâmetros maiores do que 7,51 μ m.

A distribuição de frequência do DFM do nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente, 60 dias após tubulização, variou de 1,50 a 8,5 μ m e média igual a 3,76 \pm 1,11 μ m. As maiores porcentagens de fibras foram observadas nos intervalos entre 2,51 μ m e 3,5 μ m, 3,51 e 4,5 μ m e 4,51 μ m e 5,5 μ m, correspondendo a 24,03%, 34,16% e 24,71% do total, respectivamente. As fibras restantes estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 3,04% possuíam diâmetros de 1,50 μ m até 2,5 μ m, 10,57% entre 5,51 e 6,50 μ m, 3,0% entre 6,51 μ m e 7,5 μ m e 0,48% dos diâmetros se distribuíram entre 7,51 e 8,5 μ m.

Já a distribuição de frequência do DFM do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente, 60 dias após tubulização, variou de 1,50 a 8,5 μ m e média igual a 4,05 \pm 1,25 μ m. Neste grupo, 32,0% dos axônios mielínicos apresentaram diâmetro entre 3,51 e 4,5 μ m, 21,37% entre 2,51 e 3,5 μ m, 22,99% entre 4,51 e 5,5 μ m, 14,13% entre 5,51 e 6,5 μ m. Os demais 9,47% tinham a frequência de distribuição de 0,91% entre 1,50 a 2,5 μ m, 6,56% entre 6,51 a 7,5 μ m, e 2,0% entre 7,51 μ m e 8,50 μ m.

6.5.3 Espessura da bainha de mielina (Tabela 1 e Figura 7)

Os animais com sobrevida de 30 dias e tubulizados com o tubo de polietileno tiveram os valores de EBM distribuídos entre 0,05 e 1,85 μ m e média igual a 0,64 \pm 0,17 μ m. Destes, o intervalo que apresentou maior frequência, correspondendo a 26,74%, foi aquele entre 0,66 a

0,75 μ m, sendo seguido pelo intervalo entre 0,56 e 0,65 μ m, que representou 20,94%. Os demais, 17,39% entre o intervalo de 0,76 e 0,85 μ m, 12,38% entre 0,46 e 0,55 μ m e 10,73% entre 0,86 e 0,95 μ m. Quatro pequenos contingentes apresentaram 0,13%, 0,26% e 0,79% e 2,78% cuja bainha de mielina tinha espessura entre 0,05 e 0,15 μ m, entre 0,16 e 0,25 μ m e 0,26 e 0,35 μ m, 0,36 e 0,45 μ m respectivamente. Somente 3,88% das espessuras amostradas apresentaram-se entre 0,96 e 1,05 μ m e as demais 1,8% se distribuíram entre 1,051 e 1,85.

A distribuição de frequência da EBM dos animais do grupo PCL extrusão, 30 dias após tubulização, variou de 0,05 a 1,55 μ m e média de 0,53 \pm 0,16 μ m. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,56 e 0,65 μ m e 0,46 e 0,55 μ m corresponderam a 30,58% e 28,54% do total. Dos 40,83% restantes, 16,17% possuíam espessura entre 0,66 μ m e 0,75 μ m, enquanto que 11,38% tinham distribuição entre a 0,36 μ m e 0,45 μ m. Os valores que somavam 2,74% encontravam-se entre 0,05 e 0,35 μ m e os demais 10,54% estavam entre 0,96 e 1,55 μ m.

No grupo PCL solvente, a distribuição de frequência da EBM dos animais variou de 0,05 a 1,65 μ m e média igual a 0,55 \pm 0,17 μ m. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,56 e 0,65 μ m corresponderam a 28,57% do total. Os 26,95% restantes variaram entre 0,46 e 0,55 μ m onde 19,39% possuíam espessura entre 0,66 a 0,75 μ m, enquanto que 12,44% se distribuíram entre 0,05 e 0,45 μ m; 12,46% foram superiores a 0,76 μ m.

Os nervos obtidos no interior do tubo de PLLA, 30 dias após cirurgia, apresentaram EBM variando de 0,15 a 1,55 μ m e média igual a 0,49 \pm 0,11 μ m. Destas, 41,98% e 33,57% apresentaram diâmetro num intervalo de 0,46 a 0,55 μ m e 0,56 a 0,65 μ m, respectivamente. Os demais se distribuíram nos seguintes intervalos: 17,79% entre 0,36 e 0,45 μ m, 10,94% entre 0,66 e 0,75 μ m, 2,07% entre 0,15 e 0,35 μ m, 2,46% entre 0,76 e 0,85 μ m e 0,78% entre 0,86 a 1,55 μ m.

A EBM do grupo polietileno, 60 dias após tubulização, apresentou variação entre 0,05 μ m e 1,75 μ m e média igual a 0,60 \pm 0,20 μ m. As maiores porcentagens foram observadas nos

intervalos entre 0,56 μ m e 0,65 μ m, entre 0,46 μ m e 0,555 μ m e 0,66 μ m e 0,75 μ m, correspondendo a 23,43%, 19,42% e 18,72% do total, respectivamente. As demais, 9,77% restantes se distribuíam nas demais classes, desde 0,05 μ m até 0,45 μ m. Os outros contingentes de 27,06% localizavam-se entre 0,76 μ m e 0,95 μ m, os demais 13,01% restantes tinham diâmetros maiores do que 0,96 μ m.

A distribuição de frequência do EBM do nervo regenerado no interior do tubo de PCL extrusão 60 dias após tubulização variou de 0,05 a 1,95 μ m e média igual a 0,51 \pm 0,39 μ m. As maiores porcentagens foram observadas nos intervalos entre 0,56 μ m e 0,65 μ m, 0,66 μ m e 0,75 μ m e 0,46 μ m e 0,55 μ m, correspondendo a 28,95%, 20,52% e 20,27% do total, respectivamente. As demais, 9,33% estavam distribuídas nas classes que correspondiam de 0,05 μ m até 0,45 μ m, 10,74% entre 0,76 e 0,85 μ m, 5,43% entre 0,86 μ m e 0,95 μ m, 2,4% entre 0,96 e 1,05 μ m e 2,28% se distribuíram entre 1,051 e 1,95 μ m.

Já a distribuição de frequência do EBM do nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente 60 dias após tubulização variou de 0,25 a 1,95 μ m e média igual a 0,73 \pm 0,20 μ m. Neste, 26,51% apresentaram espessura da bainha de mielina entre 0,66 e 0,75 μ m, 22,91% entre 0,76 e 0,85 μ m, 16,90% entre 0,56 e 0,65 μ m, 12,85% entre 0,86 e 0,95 μ m. Os demais 6,08% tinham a frequência de distribuição entre 0,25 a 0,55 μ m, 6,32% entre 0,96 a 1,05 μ m, 3,08% entre 1,06 μ m e 1,15 μ m. Os demais 5,32% estavam situados no intervalo entre 1,16 e 1,95 μ m.

Por outro lado, a EBM do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente 60 dias após tubulização variou de 0,05 a 1,95 μ m e média igual a 0,59 \pm 0,18 μ m. Neste, 33,41% e 25,85% apresentaram-se entre 0,56 a 0,65 μ m e 0,66 a 0,75 μ m. Os 13,22% estavam entre 0,76 e 0,85 μ m, enquanto que, 4,73% entre 0,05 e 0,45 μ m. O restante 5,91% tinham a frequência de distribuição entre 0,86 a 1,95 μ m.

6.5.4 Razão "g" (Tabela 1 e Figura 8)

Animais com sobrevida de 30 dias e tubulizados com o tubo de polietileno tiveram os valores de RZG distribuídos entre 0,35 e 1,45 e média igual a $0,74 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Destes, o intervalo que apresentou maior frequência, correspondendo a 47,86%, foi aquele entre 0,76 a 0,85, sendo seguido pelo intervalo entre 0,86 e 0,95, que representou 25,13% e 0,66 e 0,75 com 19,65%. Os demais, 5,86% localizam-se entre o intervalo de 0,35 e 0,65. Apenas 1,39% das amostras localizavam-se entre 0,96 e 1,45.

A distribuição da RZG dos animais do grupo PCL extrusão, 30 dias após tubulização, variou de 0,25 a 1,15 e média igual a $0,70 \pm 0,07 \mu\text{m}$. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,76 e 0,85 e 0,86 e 0,95 corresponderam a 41,79% e 40,36% do total. Dos 17,81% restantes, 13,12% possuíam estavam entre 0,66 e 0,75, enquanto que 2,34% tinham distribuição entre a 0,25 e 0,65. Os valores que somavam 2,35% ocupavam-se entre 0,96 e 1,15.

No grupo PCL solvente, a distribuição de frequência da RZG dos animais variou de 0,15 a 1,05 e média igual a $0,80 \pm 0,06 \mu\text{m}$. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,86 e 0,95 corresponderam a 56,08% e 35,69% estavam entre 0,76 e 0,85. Os 6,22% correspondem entre 0,15 e 0,75 e 2,45% localizavam-se entre 0,96 a 1,05.

Os nervos obtidos no interior do tubo de PLLA, 30 dias após cirurgia, apresentaram RZG variando de 0,25 a 0,95 e média igual a $0,70 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Destas, 46,13% e 33,35% apresentaram-se entre 0,76 a 0,85 e 0,66 a 0,75 respectivamente. Os demais se distribuíram nos seguintes intervalos: 9,25% entre 0,56 e 0,65 e 0,67% com valores entre 0,25 e 0,45. Já, 10,89% ficavam entre 0,86 e 0,95 e, finalmente, 0,10% entre 0,66 e 1,05.

A RZG do grupo polietileno 60 dias após tubulização apresentou variação entre 0,15 e 1,85 e média igual a $0,73 \pm 0,08 \mu\text{m}$. As maiores porcentagens foram observadas nos intervalos

entre 0,76 e 0,85, entre 0,86 e 0,95 e 0,66 e 0,75, correspondendo a 50,47%, 22,05% e 20,71% do total, respectivamente. As demais, 5,24% restantes se distribuíam nas demais classes, desde 0,15 até 0,65. Os outros contingentes de 0,62% localizavam-se entre 0,96 e 1,85.

Já a distribuição das amostras do nervo regenerado no interior do tubo de PCL extrusão 60 dias após tubulização variou de 0,25 a 1,95 e média igual a $0,78 \pm 0,21\mu\text{m}$. Neste, 35,35% apresentaram a razão “g” entre 0,76 e 0,85, 27,27% entre 0,86 e 0,95, 21,0% entre 0,66 e 0,75, 6,93% entre 0,56 e 0,65. Os demais 1,0% tinham a frequência de distribuição entre 0,25 a 0,55, e 8,36% entre 0,96 a 1,95.

A distribuição de frequência da razão “g” nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente 60 dias após tubulização variou de 0,35 a 0,95 e média igual a $0,69 \pm 0,08\mu\text{m}$. As maiores porcentagens foram observadas nos intervalos entre 0,76 e 0,85, 0,66 e 0,75, correspondendo a 42,45%, 33,48% do total, respectivamente. Os demais, 13,41% estavam distribuídas nas classes que correspondiam de 0,35 até 0,65, sendo que 12,17% entre 0,56 e 0,65. Os demais valores 1,24% localizam-se entre 0,36 e 0,55. Os 10,65% restantes estavam distribuído entre 0,86 e 1,05.

Por outro lado, a RZG do nervo regenerado no interior do tubo de PLLA solvente 60 dias após tubulização variou de 0,15 a $1,75\mu\text{m}$ e média igual a $0,69 \pm 0,10\mu\text{m}$. Neste, 41,561% e 36,96% apresentaram-se entre 0,76 a 0,85 e 0,66 a 0,75. Os 12,75% estavam entre 0,56 e 0,65, enquanto que, 5,41% entre 0,86 e 0,95. O restante 2,13% e 1,2% tinham a frequência de distribuição entre 0,15 a 0,45 e 0,86 e 1,85.

6.6 Expressão do S-100 na Imunohistoquímica (Figuras 9 e 10)

A imunomarcção com o anticorpo S-100 foi realizada em cortes longitudinais dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL e PLLA solvente respectivamente, após o período de 30 dias de tubulização. Observou-se uma discreta imunorreatividade somente no grupo polietileno. Por outro lado, constatou-se uma intensa marcação quando utilizados os biomateriais como próteses tubulares. Ainda, notou-se um maior número de fibras regeneradas imunomarcadas quando utilizado o polímero PCL.

Já a imunomarcção realizada nos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL e PLLA solvente respectivamente, após o período de 60 dias de tubulização, observou-se que a utilização dos biomateriais como próteses, favoreceu o maior crescimento do nervo em diâmetro.

6.7 Expressão do colágeno tipo IV na Imunohistoquímica (Figuras 9 e 10)

Quando utilizada a marcação com o anticorpo para o Col tipo IV em cortes longitudinais dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL e PLLA solventes, após o período de 30 dias de tubulização, observou-se uma marcação superior nos nervos regenerados no interior das próteses confeccionadas a partir de biomateriais em relação à prótese de polietileno.

Após o período de 60 dias de tubulização, observou-se que a imunomarcção nos cortes transversais dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL e PLLA solvente tinham a mesma intensidade de marcação. Porém, observou-se que os nervos regenerados no interior das próteses tubulares confeccionadas a partir dos biomateriais apresentavam uma área do nervo regenerado superior ao encontrado no grupo polietileno.

6.8 Expressão da laminina e neurofilamento na imunohistoquímica (Figuras 9 e 10)

Quando utilizado a dupla marcação com os anticorpos primários anti-laminina e anti-neurofilamento, em cortes longitudinais de nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno, PCL e PLLA solventes, após o período de 30 dias de tubulização, observou-se uma área superior no nervo regenerado no interior dos tubos de PCL e PLLA, em relação ao polietileno. Ainda, pode-se observar que houve uma intensa marcação para laminina em toda área do nervo.

Posteriormente ao período de 60 dias de tubulização, evidenciou-se uma grande área seccional dos nervos regenerados no interior dos diferentes tubos. Contudo, houve uma menor intensidade na imunomarcção para a laminina no nervo regenerado no interior do polietileno em relação ao PCL e PLLA. Ainda, constatou-se uma imunomarcção mais intensa com o anticorpo para o neurofilamento nos três grupos.

7. Discussão

A tubulização há vários anos tem sido uma técnica amplamente estudada e aplicada em lesões de nervos periféricos cuja extensão impede a regeneração nervosa periférica, e surge como alternativa para a substituição do autoenxerto de nervo periférico (Lundborg *et al.*, 1982; Madison *et al.*, 1988; Fields *et al.*, 1989; Lundborg *et al.*, 1991; Lundborg *et al.*, 1993; Chamberlain *et al.*, 1998; Lundborg *et al.*, 2004). Nesse intuito, vários materiais foram testados ao longo dos anos, entre eles, vasos sanguíneos, fáscia, lâmina basal de músculo estriado esquelético, tubo de polietileno e, mais recentemente, os biomateriais (Fields *et al.*, 1989; Lundborg *et al.*, 1991; Bryan *et al.*, 1993; Aldini *et al.*, 1996; Kelleher *et al.*, 2001; Schmidt & Leach, 2003; Lundborg *et al.*, 2004; Mersa *et al.*, 2004; Yannas & Hill, 2004; Boccaccini *et al.*, 2005; Ciardelli & Chiono, 2006; Chang *et al.*, 2007; Luis *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2007; Yoshitani *et al.*, 2007). O uso de biomateriais surge como alternativa ao autoenxerto, estabelecendo um microambiente adequado para os axônios em regeneração, além de evitar a necessidade de uma nova cirurgia para retirada da prótese tubular, comumente observado quando utilizadas próteses de polietileno e silicone (Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002). Além disso, o uso de biomateriais diminui o risco de rejeição tecidual e inflamação local, observado quando realizados implantes com xenoenxertos (Guest *et al.*, 1997; Borlongan *et al.*, 2004; Wennersten *et al.*, 2006).

A metodologia de confecção das próteses tubulares aliada às características do biomaterial, como o tempo de degradação e a flexibilidade podem atuar positivamente para o processo regenerativo (Aldini *et al.*, 1996; Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999; Koshimune *et al.*, 2003; Schlosshauer *et al.*, 2003; Sundback *et al.*, 2003; Rezwani *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2007; Yoshitani *et al.*, 2007). No sentido de aumentar-se a eficiência do processo regenerativo, tais próteses podem ser preenchidas com diferentes moléculas da MEC entre elas o COL, FN, LAM e HSPG, células fundamentais para o processo

regenerativo (e.g. SC) e fatores de neurotróficos como o GDNF, NGF, BDNF, NT-3 e CNTF (Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Tong *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1998; Labrador *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Schimdt & Leach, 2003; da Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004). Ainda, a confecção de próteses por extrusão e solvente com adição de um sal, com a finalidade de obtenção de tubos porosos, apresenta-se como alternativa positiva para otimização do processo regenerativo (Aldini *et al.*, 1996; Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002; Schlosshauer *et al.*, 2003; Sundback *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2007). Porém, persistem alguns problemas quanto ao uso de biomateriais, como o controle da espessura da parede da prótese, ora apresentada por diversos autores, bem como as características de rigidez, resistência mecânica e a baixa taxa de degradação que (Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002). Isso representa um problema crítico durante o procedimento cirúrgico, pois dificulta a sutura do nervo e o alinhamento dos cotos no interior da prótese, aumentando a possibilidade de formação de neuromas. Ainda, tendo-se em vista a baixa taxa de degradação apresentada por alguns biomateriais, à medida que o nervo consolidado aumenta em espessura, ocorre compressão do mesmo no interior da prótese, culminando com uma degeneração nervosa secundária.

Considerando-se a espessura da prótese, os trabalhos apresentados por Widmer *et al.* (1998) e Evans *et al.* (1999), descrevem a construção de tubos a partir dos polímeros PLGA e PLLA com 3,2mm de diâmetro externo, 1,6mm de diâmetro interno e 1,6mm de espessura de parede tubular, com a combinação das técnicas de extrusão e solvente. Ainda, junto a demais autores, descreveram os benefícios do implante do tubo biodegradável e o seu sucesso na regeneração nervosa periférica, comparável ao autoenxerto de nervo periférico (Evans *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2000; Midha *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2004;

Belkas *et al.*, 2005; Clavijo-Alvarez *et al.*, 2007). Entretanto, pode haver limitações ao processo regenerativo, como a tensão mecânica de compressão do tubo locado entre a musculatura adjacente bem como a possibilidade de perda da estrutura física da prótese. Neste sentido, uma alternativa seria uma significativa diminuição da quantidade de polímero para a síntese do tubo, resultando na construção de próteses com paredes reduzidas e estáveis, capazes de garantir o crescimento do nervo. De fato, o trabalho apresentado por Aldini *et al.* (1996), enfocou a preparação de próteses tubulares com a técnica do solvente contendo o polímero e pinos imersos em solução de solvente. Após a evaporação do solvente e a retirada dos pinos, observou-se que o tubo apresentou parede com cerca de 175 micrômetros de espessura, o suficiente para dar estabilidade para o implante. Outros autores relatam em seus trabalhos a confecção de próteses transparentes e flexíveis, as quais repercutiram positivamente para o processo da tubulização (Gámez *et al.*, 2003; Bini *et al.*, 2004). A confecção da prótese tubular, ora proposta em nosso trabalho, reduziu significativamente a aderência do tecido adjacente ao redor do biomaterial e manteve o microambiente adequado a regeneração nervosa. Contudo, alguns autores usaram os polímeros PLLA e PCL e não apresentaram a análise morfométrica dos nervos regenerados nem detalhes da expressão das proteínas pelas células de Schwann em resposta ao processo regenerativo.

Esse trabalho direcionou a atenção para a construção de um efetivo e bioativo tubo adequado à sustentação da regeneração e com excelente desempenho cirúrgico. Neste sentido, propusemos a preparação de membranas de PLLA e PCL pela técnica de evaporação do solvente. As próteses foram confeccionadas a partir de membranas moldadas ao redor de pinos (mandril). A estabilidade do tubo foi assegurada pela adesão da parede externa com histoacril. Como resultado final, obteve-se tubos com espessura de aproximadamente 200 micrômetros,

transparentes e flexíveis, adequados à sutura na microcirurgia, similarmente ao observado por Aldini *et al.* (1996), mas com a vantagem de não terem camadas, observadas na técnica de imersão, que poderia causar o descolamento e deslocamento das camadas internas e ocasionar o colapso da prótese ou a compressão do nervo formado. Outro aspecto positivo, observado em nossos experimentos e citado como aspecto positivo por Butí *et al.*, (1996), foi a manutenção da estrutura física da prótese e ausência de descolamento das camadas constituintes da parede do tubo, durante os períodos de 30 e 60 dias de tubulização. Tal fato é relevante para a orientação e crescimento axonal em direção ao coto distal e para recuperação funcional do nervo. Além disso, o tubo apresentou uma superfície interna uniforme, contribuindo para um maior brotamento axonal. Adicionalmente, apresentamos a análise ultraestrutural e morfométrica bem como a imunohistoquímica, imunocitoquímica e caracterização da expressão de S-100, LAM e Col tipo IV pelas SC presentes no interior da prótese.

Considerando-se a contagem de fibras regeneradas, o nervo regenerado no interior do tubo de PCL solvente apresentou, estatisticamente, um maior número de axônios após 30 dias de cirurgia, superando os tubos de polietileno, PLLA e PCL extrusão. Após 60 dias, ambos os tubos confeccionados a partir do PCL, apresentaram o mesmo desempenho no processo regenerativo. Porém, a metodologia do solvente está associada ao baixo consumo de polímero, o qual reduz o impacto financeiro e abre uma perspectiva para construção de próteses em maior escala. Além disso, vale a pena ressaltar que o biomaterial PCL possui custo inferior ao PLLA.

A menor espessura do tubo é particularmente benéfica para o processo de degradação do biomaterial, além de gerar menos compostos secundários e fragmentos da degradação (principalmente o ácido láctico) os quais podem adversamente afetar o crescimento axonal e a função nervosa, como mencionado por Evans *et al.* (1999). A análise morfométrica está de

acordo com os dados da contagem de fibras, indicando a metodologia de preparação da prótese atua positivamente na regeneração nervosa periférica.

Assim como mencionado por Aldini *et al.* (1996), o sucesso do processo regenerativo usando tubos bioreabsorvíveis foi similar ao reparo com autoenxerto. Nossos resultados corroboram com trabalhos mostrando excelentes resultados no processo regenerativo, quando utilizados os biomateriais na técnica da tubulização (Madison *et al.*, 1985; Aldini *et al.*, 1996; Kiyotani *et al.*, 1996; Widmer *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002, Koshimune *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2003; Schimdt & Leach, 2003; Yannas & Hill, 2004).

A análise da ultraestrutura, bem como os dados morfométricos foram reforçados pela análise da expressão de S-100, Col tipo IV e LAM através da imunohistoquímica no microambiente do nervo regenerado. Interessantemente, a expressão destes elementos, quando utilizados os biomateriais, foi superior ao observado na tubulização com o polietileno. Contudo, não houve diferenças significativas entre os grupos PCL e PLLA, sugerindo que próteses derivadas de caprolactona e do ácido láctico atuam de forma igualmente positiva sobre o processo regenerativo. Dessa forma, o aumento da expressão de moléculas da MEC, como demonstrado em trabalhos com colágeno e laminina resulta num incremento da migração celular, da produção de proteínas e fatores que estimulam o crescimento axonal (Madison *et al.*, 1988). Ainda, Letourneau (1975), comprovou que a interação entre os brotamentos, a orientação e o crescimento axonal são fortemente influenciados por moléculas de adesão, neurotróficas e pelo substrato adjacente. Sendo assim, a presença de SC bem como a síntese de moléculas da MEC, como laminina e colágeno são indispensáveis para a orientação axonal *in vivo* (Lietz *et al.*, 2006).

Hurtado *et al.* (2006) demonstraram em estudos *in vitro* que o cultivo de SC sobre o polímero PDLA poroso resultou na síntese de neurotrofinas, moléculas fundamentais para o

processo regenerativo. De fato, a importância das moléculas neurotróficas, assim como as de adesão, entre elas o colágeno e a laminina, expressas sobre os biomateriais estudados em nossa imunohísquímica e imunocitoquímica, repercurtem positivamente sobre a regeneração nervosa periférica e reforçam os nossos resultados morfométricos, no que diz respeito ao número de fibras regeneradas no interior do tubo e ao possível estímulo na migração e multiplicação das SC.

Além disso, Miller *et al.*, (2001) observaram em seus experimentos que a adição de LAM na superfície do biomaterial PDLA resultou num aumento da adesão celular assim como da orientação das SC *in vitro*, justificando o benefício dessas moléculas e células para a regeneração nervosa periférica.

Um outro aspecto apontado em nossos resultados e observado em outros experimentos, (Sangsanoh *et al.*, 2007) foi a morfologia celular apresentada pelas SC sobre as superfícies poliméricas. A morfologia das SC variou de acordo com o tipo do biomaterial, a forma da superfície e a proliferação celular. A adesão das células de Schwann sobre os biomateriais PCL e PLLA, a expressão de LAM e Col tipo IV bem como a possível síntese de fatores neurotróficos contribuíram para um maior brotamento axonal *in vivo* em comparação com o polietileno.

Dessa forma, acreditamos que a nova metodologia ora apresentada para confecção de próteses a partir de biomateriais, possa ser uma alternativa à técnica de extrusão e ao autoenxerto de nervo periféricos utilizados no reparo do nervo periférico e útil no procedimento da tubulização.

8. Conclusões

-
- Os tubos desenvolvidos pelo método do solvente facilitaram a visualização e orientação dos cotos durante a cirurgia;
 - A técnica do solvente diminui a espessura da parede dos tubos, reduziu o consumo de biomaterial, refletindo na diminuição do tempo de degradação do biomaterial;
 - Os tubos confeccionados pelo método do solvente não apresentaram perda da forma física nem descolamento das camadas constituintes de suas paredes e mantiveram a superfície interna uniforme durante os períodos de 30 e 60 dias de tubulização;
 - Os tubos confeccionados pelo método do solvente propiciam um ambiente favorável à regeneração e orientação do crescimento das fibras em direção ao coto distal;
 - A contagem do número de axônios regenerados após 30 e 60 dias de tubulização mostrou-se significativamente superior no interior do tubo de PCL construído pela técnica do solvente e extrusão quando comparado com o grupo controle (polietileno) e ao PLLA solvente;
 - A morfometria e a microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a utilização dos biomateriais, a longo prazo, propiciou uma maior consolidação do processo regenerativo quando comparado ao grupo polietileno;

- A imunomarcção realizada em cortes histológicos dos nervos regenerados no interior dos tubos demonstrou que houve a produção superior dos componentes da matriz extracelular (colágeno IV e laminina), naqueles confeccionados a partir dos biomateriais;
- A imunomarcção realizada em cultura celular demonstrou que houve a produção dos componentes da matriz extracelular (colágeno IV, laminina I e laminina II) pelas células de Schwann sobre as biomembranas, propiciando uma melhor qualidade na regeneração nervosa periférica;
- A imunomarcção realizada em cortes histológicos e também na cultura celular demonstrou que houve a expressão do S-100 pelas células de Schwann;
- Houve diferenças no comportamento das células de Schwann no que se diz respeito à adesão e a morfologia celular sobre as membranas de poli L.ácido láctico (PLLA) e poli caprolactona (PCL), podendo os diferentes biomateriais repercutir na taxa de adesão celular e/ou em sua proliferação;
- As membranas confeccionadas pelo método do solvente podem ser integradas com as células de Schwann e serem aplicadas em várias técnicas de reconstrução nervosa;
- A nova metodologia apresentada na confecção de próteses a partir dos biomateriais pode ser uma alternativa no procedimento da tubulização;

9. Figuras e Tabela

Figura 1: Fotomicrografia eletrônica de varredura mostrando em cortes transversais os tubos, 0, 30 e 60 dias após a tubulização. Prótese de poli caprolactona (PCL) confeccionada pelo método de extrusão e solvente respectivamente. Prótese de poli L-ácido lático (PLLA) confeccionada pelo método do solvente. Escala = 1 μ m.

Observe o tubo de PCL confeccionado pelo método da extrusão (A), retirado 30 dias (D) e 60 dias após a cirurgia respectivamente (G). Note as diferenças de espessura quando os tubos foram feitos pelo método do solvente (B, E, H, C, F, I) quando comparados com o método de extrusão (A, D, G). Observe os tubos de PCL solvente (B), retirado 30 dias após a cirurgia (E), 60 dias após cirurgia (H) e o tubo de PLLA solvente (C), retirado 30 dias (F) e 60 (I) dias após a cirurgia respectivamente. Ainda, note as imagens retiradas dos cotos alinhados no interior das próteses tubulares de PCL (J) e PLLA (K) solventes durante a tubulização do nervo ciático. Em destaque, (no quadrante superior e a direita das imagens) observamos, em menor aumento, uma vista interna dos tubos seccionados longitudinalmente. As setas “D e P” na figura (J e K) indicam a porção dos cotos distal e proximal implantados no interior da prótese tubular respectivamente.

Figura 1

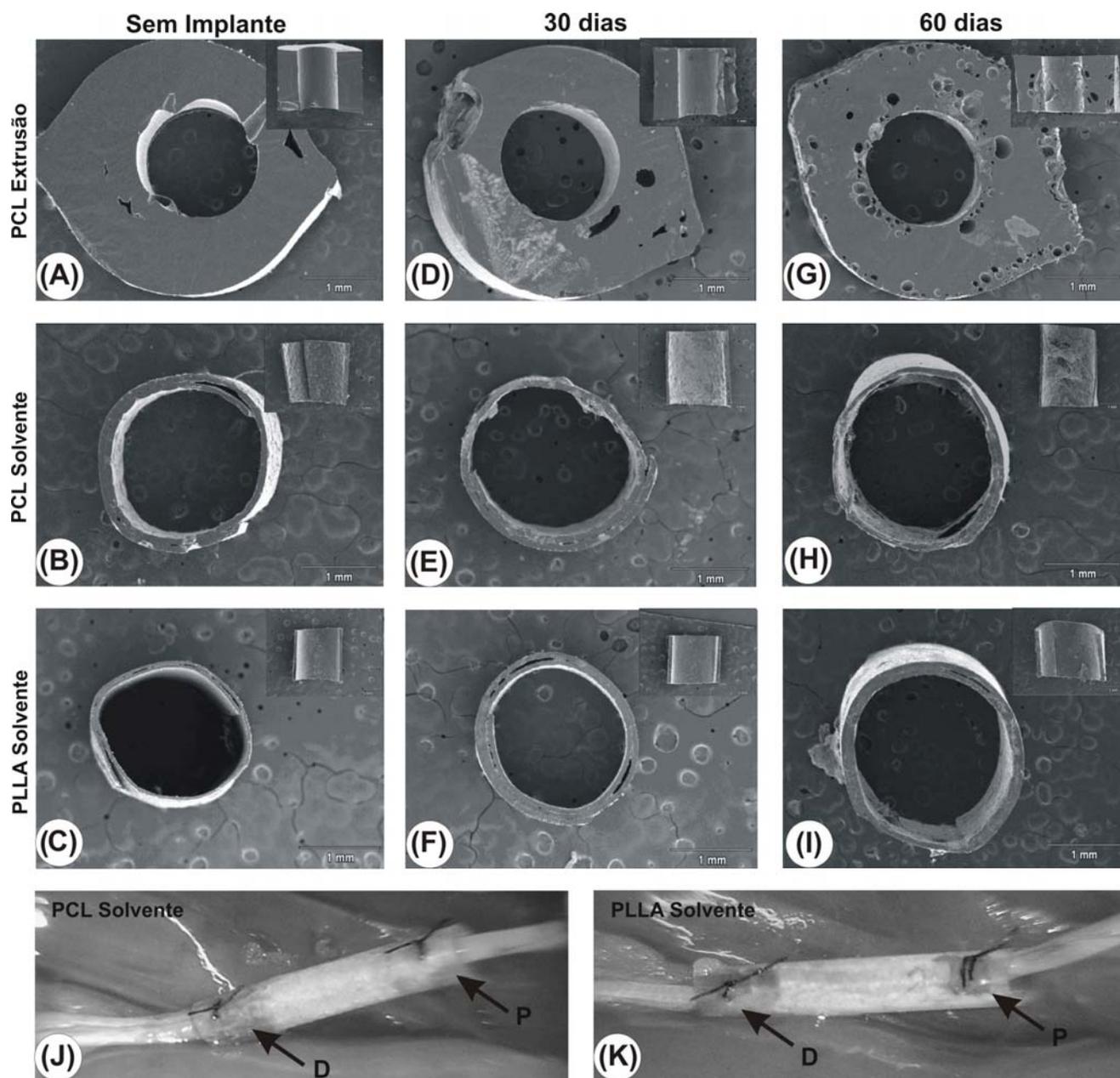


Figura 2: Vista panorâmica dos nervos regenerados observados através da microscopia óptica, 30 e 60 dias após tubulização. (A) No interior do tubo de polietileno. (B) Tubo de PCL confeccionado pelo método de extrusão. (C) Tubo de PCL construído pelo método do solvente. (D) Tubo de PLLA construído pelo método do solvente, 30 dias após tubulização; (E) No interior do tubo de polietileno. (F) Tubo de PCL confeccionado pelo método de extrusão. (G) Tubo de PCL construído pelo método do solvente. (H) Tubo de PLLA construído pelo método do solvente, 60 dias após tubulização; Observe a grande área do nervo regenerado quando o polímero utilizado foi o PCL, tanto confeccionado pelo método de extrusão como solvente (B, C, F, G); Escala = 15 μ m.

Observe a intensa vascularização dos nervos organizados no epineuro do nervo 30 e 60 dias após regeneração.

Figura 2

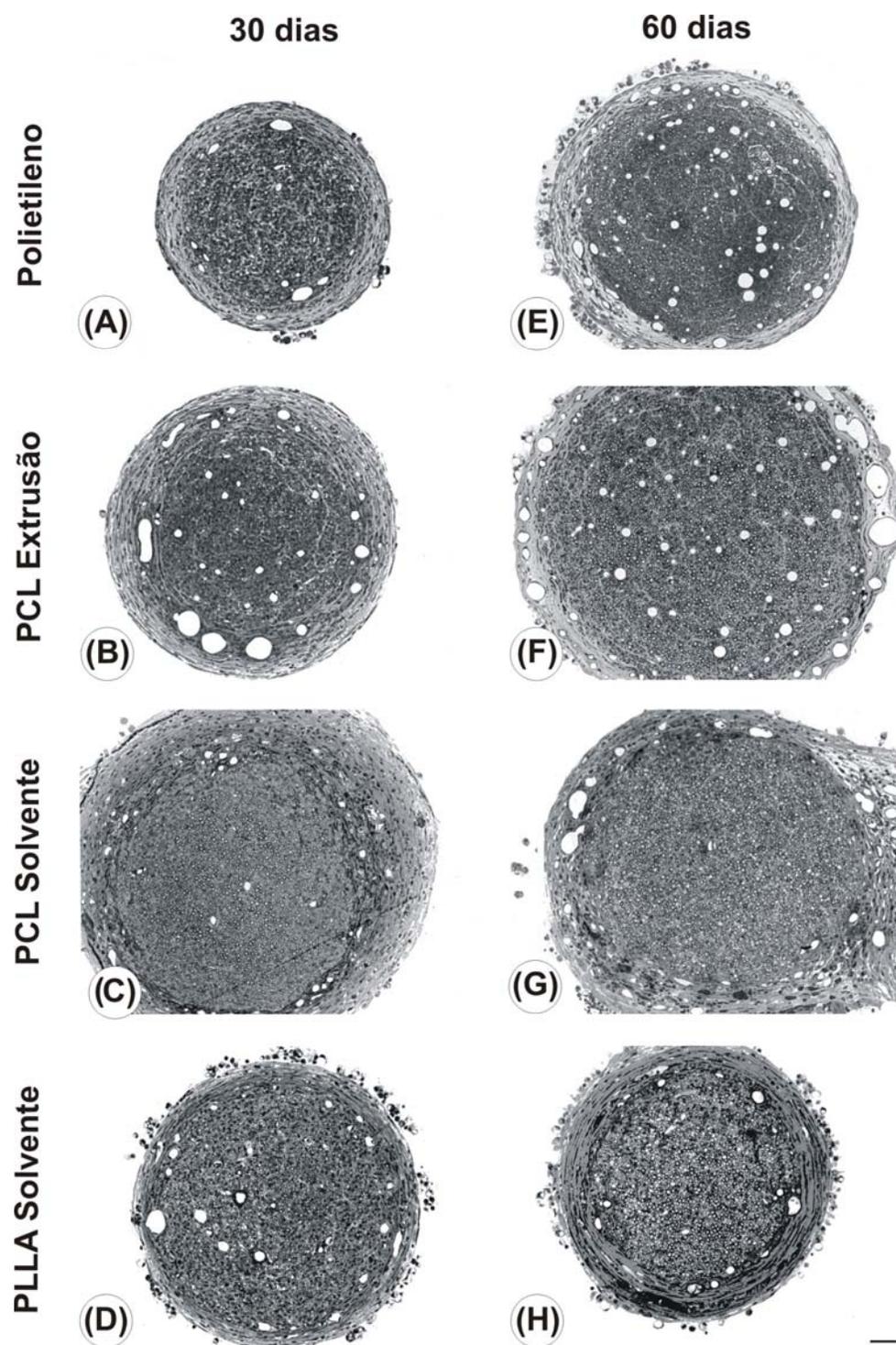


Figura 3: Fotomicrografia eletrônica de transmissão de cortes transversais dos nervos regenerados 30 e 60 dias após a tubulização, no interior da prótese de polietileno (A e E). No interior da prótese de poli caprolactona (PCL) confeccionada pelo método de extrusão (B e F) e solvente (C e G) respectivamente. No interior da prótese de poli L-ácido lático (PLLA) (D e H) confeccionada pelo método do solvente. Escala = 2 μ m.

Figura 3

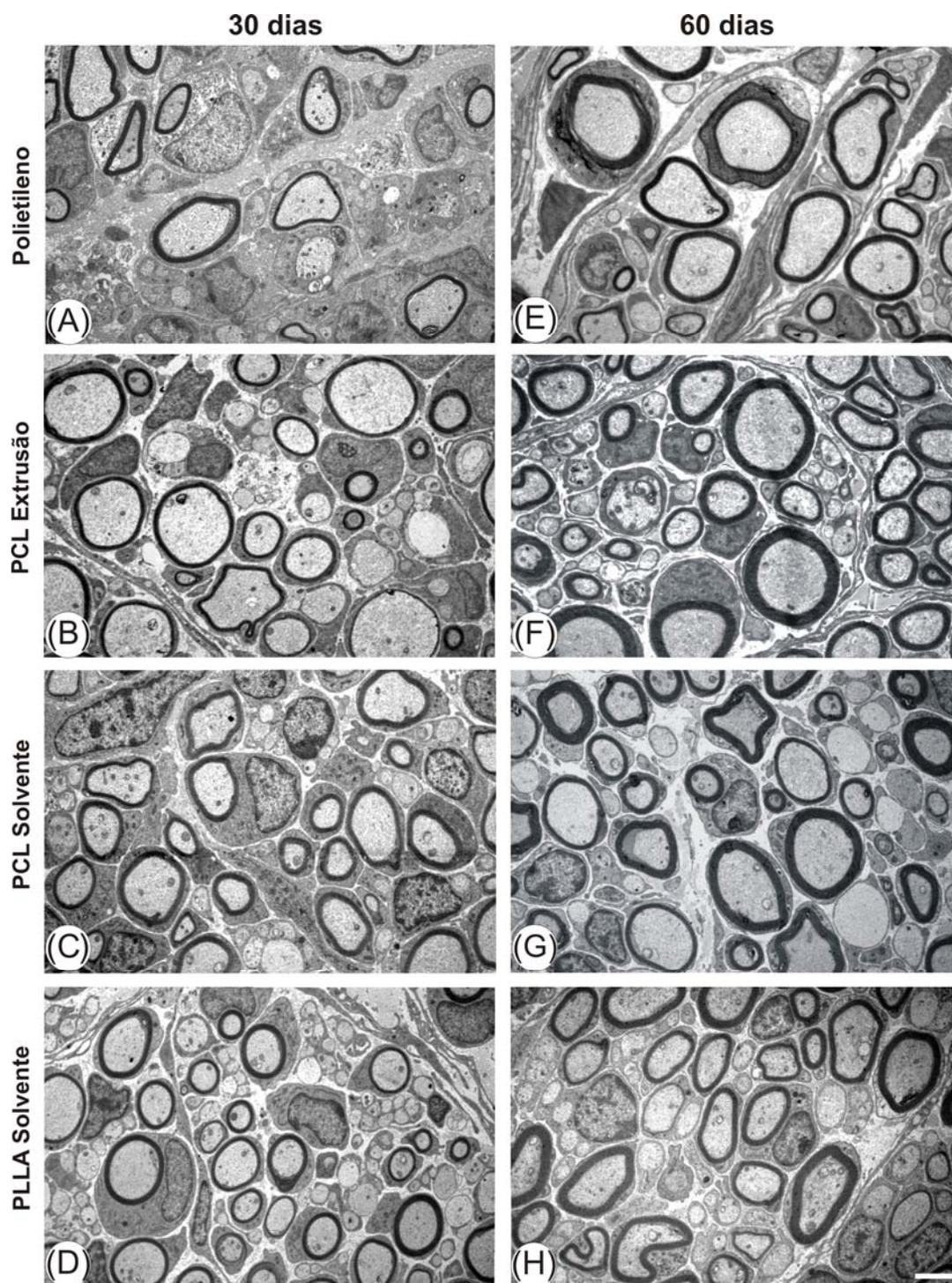


Figura 4: Contagem de fibras regeneradas 30 e 60 dias após a tubulização. (A) Observe que o número de axônios regenerados durante o período de 30 dias no interior da prótese tubular confeccionada com o biopolímero PCL pelo método do solvente foi significativamente superior quando comparado ao grupo PCL extrusão e polietileno e PLLA solvente. Note que após o período de 60 dias, o número de axônios regenerados no interior da prótese cujo biomaterial era o PCL foi superior aos grupos polietileno e PLLA. Já após o período de 60 dias de tubulização, o número de axônios regenerados no grupo polietileno e PCL extrusão foram significativamente superiores quando comparado ao período de 30 dias (B). Note que nos biomateriais PCL e PLLA, ambos confeccionados pelo método solvente, não tiveram diferenças significativas quando comparados os períodos de tubulização (* $P < 0,05$, ** $P < 0.001$ e *** $P < 0.001$, Teste T e teste “U” de Mann-Whitney).

Figura 4

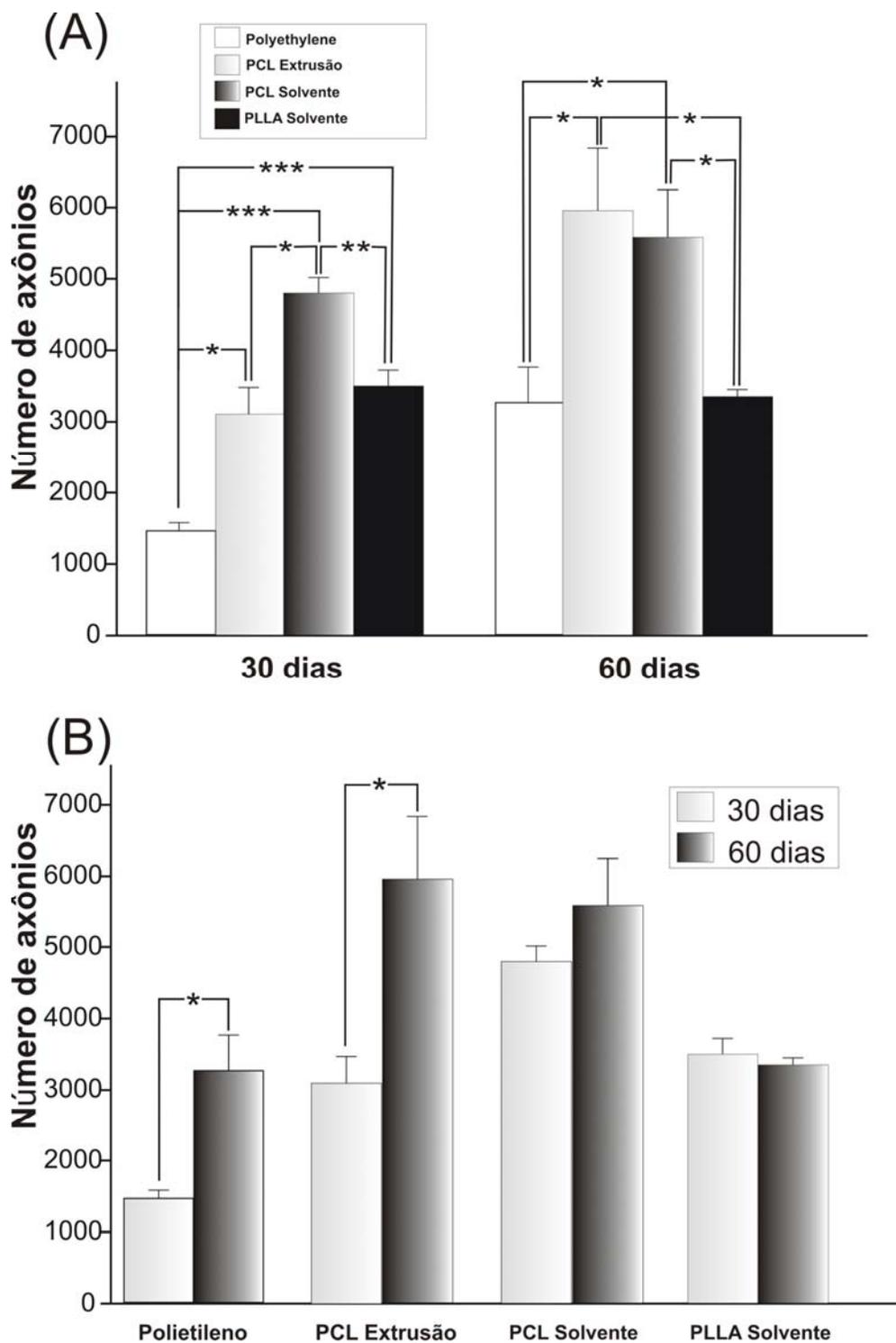


Figura 5: Distribuição da frequência do diâmetro dos axônios mielínicos regenerados obtidos na porção média do tubo de polietileno (A e E), poli caprolactona (PCL) pelo método de extrusão (B e F) e solvente (C e G) respectivamente e poli _L-ácido lático (PLLA) (D e H), 30 e 60 dias após a tubulização.

Figura 5

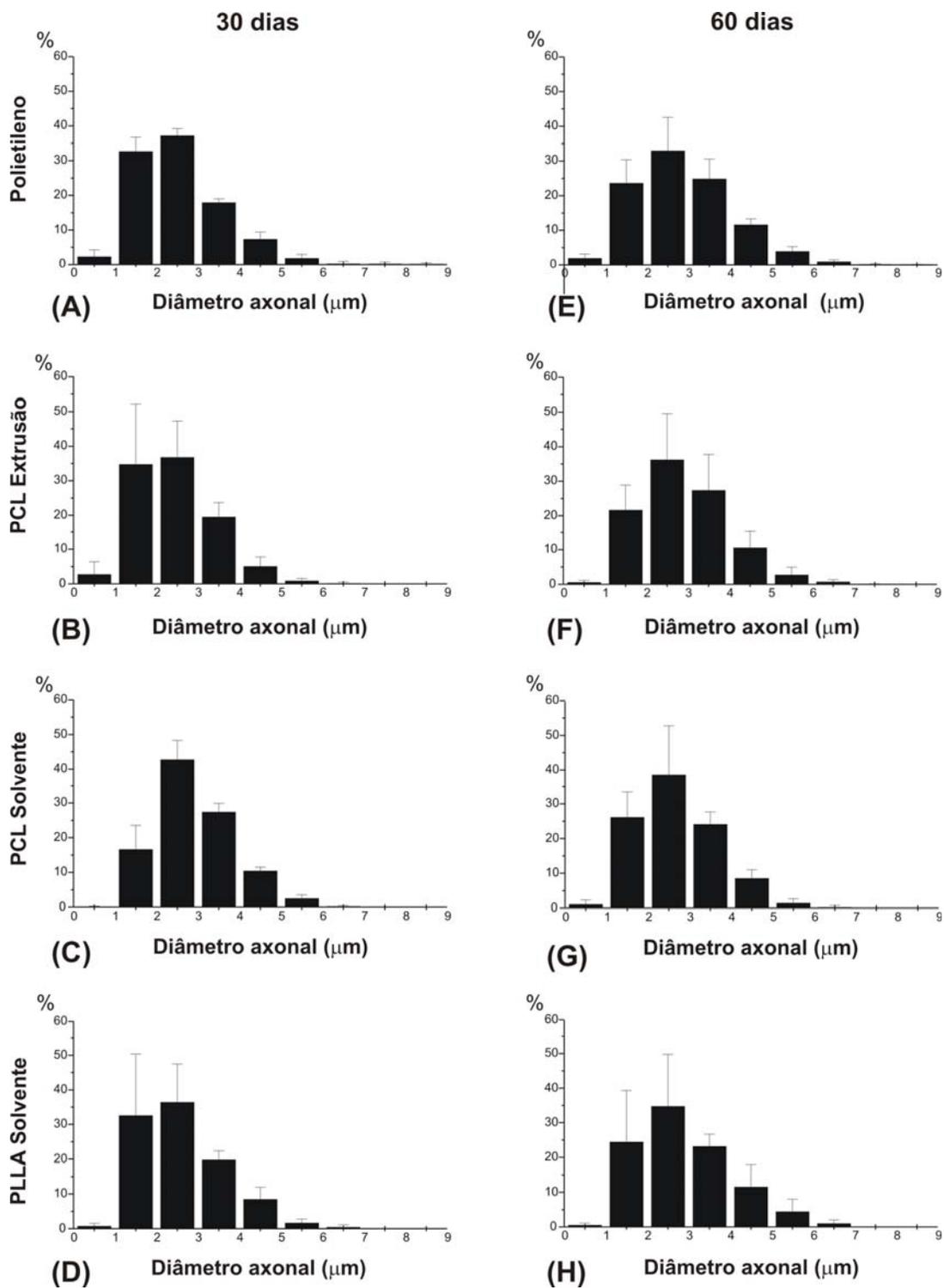


Figura 6: Distribuição da frequência do diâmetro das fibras mielínicas regeneradas obtidas na porção média do tubo de polietileno (A e E), poli caprolactona (PCL) pelo método de extrusão (B e F) e solvente (C e G) respectivamente e poli _L-ácido lático (PLLA) (D e H), 30 e 60 dias após a tubulização.

Figura 6

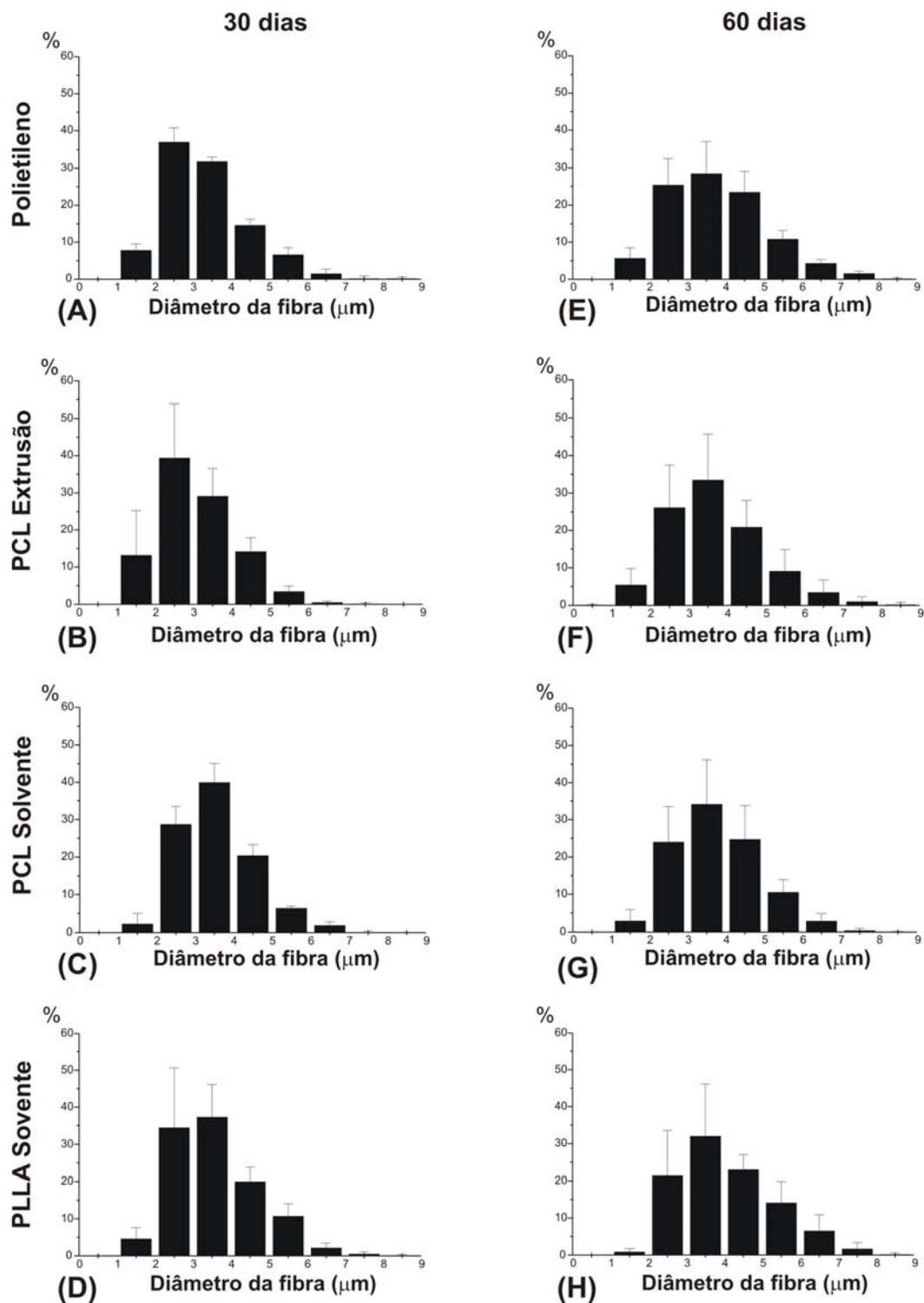


Figura 7: Distribuição da frequência da espessura da bainha de mielina dos axônios regenerados obtidos na porção média do tubo de polietileno (A e E), poli caprolactona (PCL) pelo método de extrusão (B e F) e solvente (C e G) respectivamente e poli L-ácido lático (PLLA) (D e H), 30 e 60 dias após a tubulização.

Figura 7

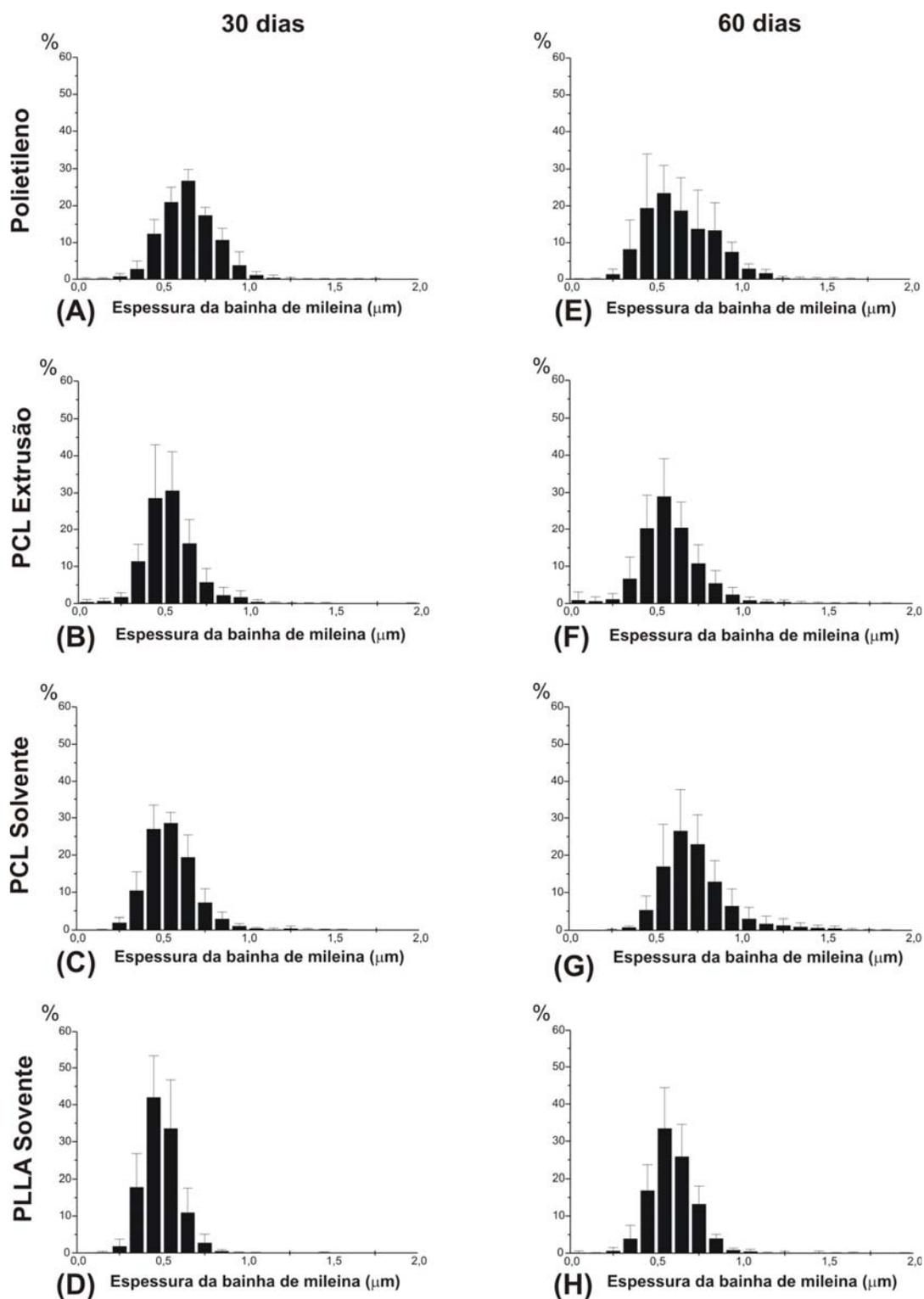


Figura 8: Distribuição da frequência da razão “g” dos axônios regenerados obtidos na porção média do tubo de polietileno (A e E), poli caprolactona (PCL) pelo método de extrusão (B e F) e solvente (C e G) respectivamente e poli _L-ácido lático (PLLA) (D e H), 30 e 60 dias após a tubulização.

Figura 8

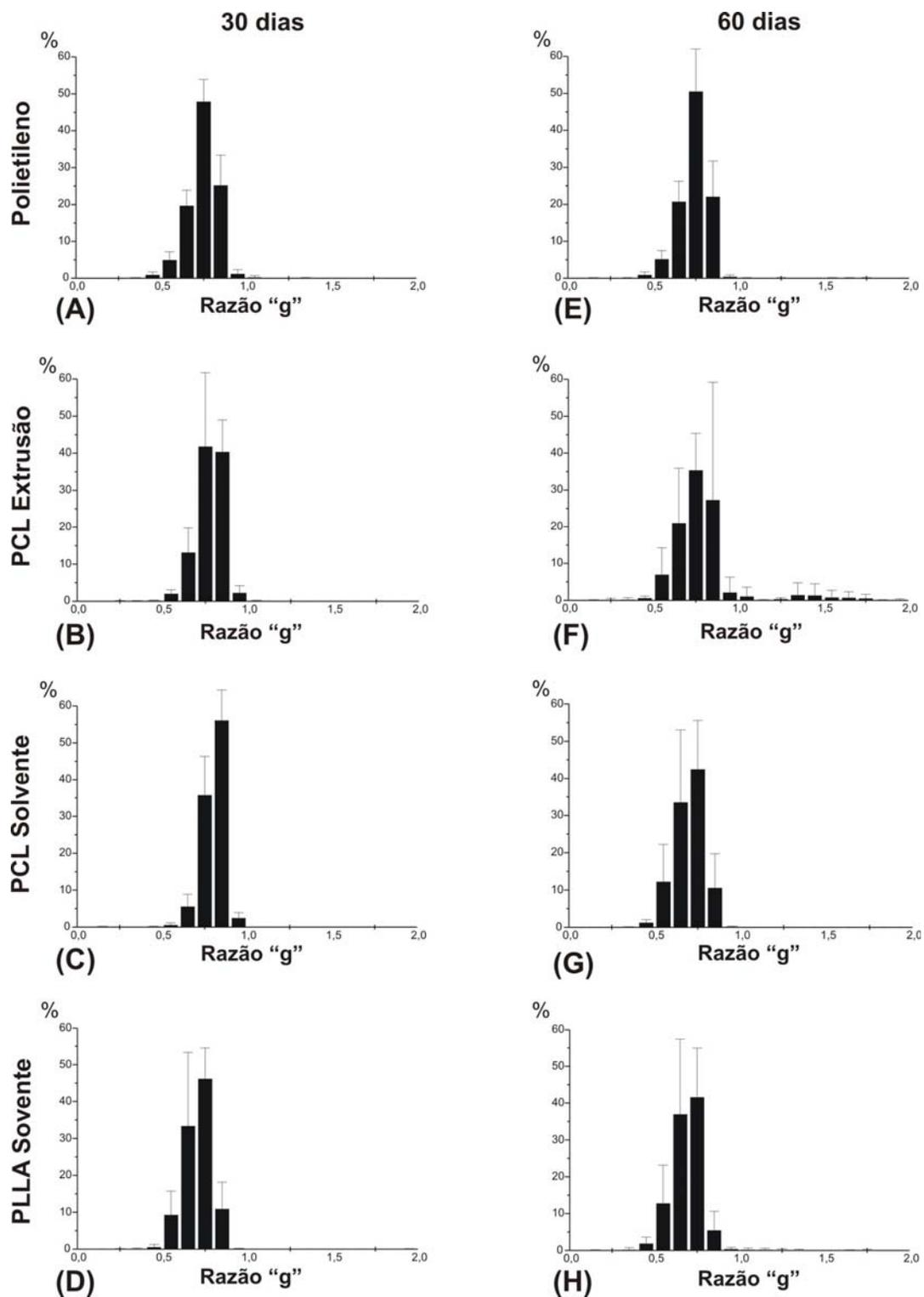


Tabela 1: Dados morfométricos obtidos dos axônios regenerados, 30 e 60 dias após a tubulização. O valor **n** significa o número de axônios contados e “**g**” significa a razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. Valores apresentados como média \pm SD.

Tabela 1

| Grupos | n | Diâmetro do axônio (μm) | Diâmetro da fibra (μm) | Bainha de mielina (μm) | Razão “g” |
|------------------------------------|----------|--|---|---|------------------|
| Poliétileno (30 dias) | 1496 | 2,53 \pm 1,07 | 3,31 \pm 1,12 | 0,64 \pm 0,17 | 0,74 \pm 0,08 |
| PCL Extrusão (30 dias) | 1821 | 2,43 \pm 0,94 | 3,07 \pm 0,99 | 0,53 \pm 0,16 | 0,77 \pm 0,07 |
| PCL Solvente (30 dias) | 1799 | 2,89 \pm 0,94 | 3,56 \pm 0,98 | 0,55 \pm 0,17 | 0,80 \pm 0,06 |
| PLLA Solvente (30 dias) | 1910 | 2,58 \pm 1,02 | 3,56 \pm 1,11 | 0,49 \pm 0,11 | 0,70 \pm 0,08 |
| Poliétileno (60 dias) | 2245 | 2,86 \pm 1,17 | 3,79 \pm 1,29 | 0,60 \pm 0,20 | 0,73 \pm 0,08 |
| PCL Extrusão (60 dias) | 2544 | 2,86 \pm 1,06 | 3,68 \pm 1,23 | 0,51 \pm 0,35 | 0,78 \pm 0,21 |
| PCL Solvente (60 dias) | 2497 | 2,67 \pm 0,97 | 3,76 \pm 1,11 | 0,73 \pm 0,20 | 0,69 \pm 0,08 |
| PLLA Solvente (60 dias) | 2087 | 2,87 \pm 1,14 | 4,05 \pm 1,25 | 0,59 \pm 0,18 | 0,69 \pm 0,10 |

Figura 9: Imunohistoquímica para S-100, colágeno, e dupla marcação para laminina e neurofilamento realizadas em secções longitudinais do nervo regenerado após 30 dias de tubulização, no interior do tubo de polietileno (A, D e G) e dos confeccionados pelo método do solvente com o biomaterial poli caprolactona (PCL) (B, E e H) e poli _L-ácido láctico (PLLA) (C, F e I); Escala = 50µm.

Figura 9

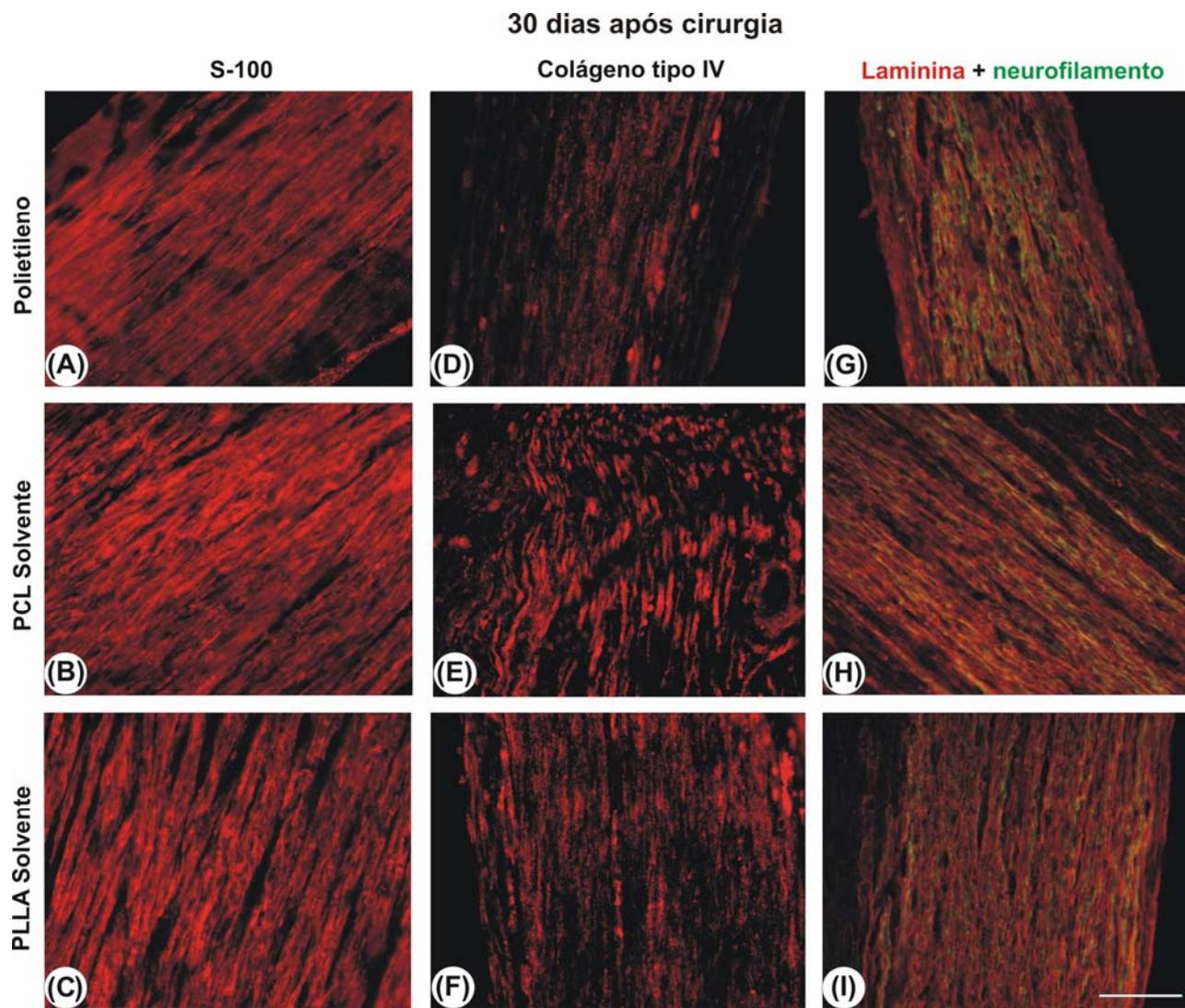


Figura 10: Imunohistoquímica S-100, colágeno, e dupla marcação para laminina e neurofilamento realizadas em secções longitudinais do nervo regenerado após 60 dias de tubulização, no interior do tubo de polietileno (A, D e G) e dos confeccionados pelo método do solvente com o biomaterial poli caprolactona (PCL) (B, E e H) e poli _L-ácido láctico (PLLA) (C, F e I); Escala = 50µm.

Figura 10

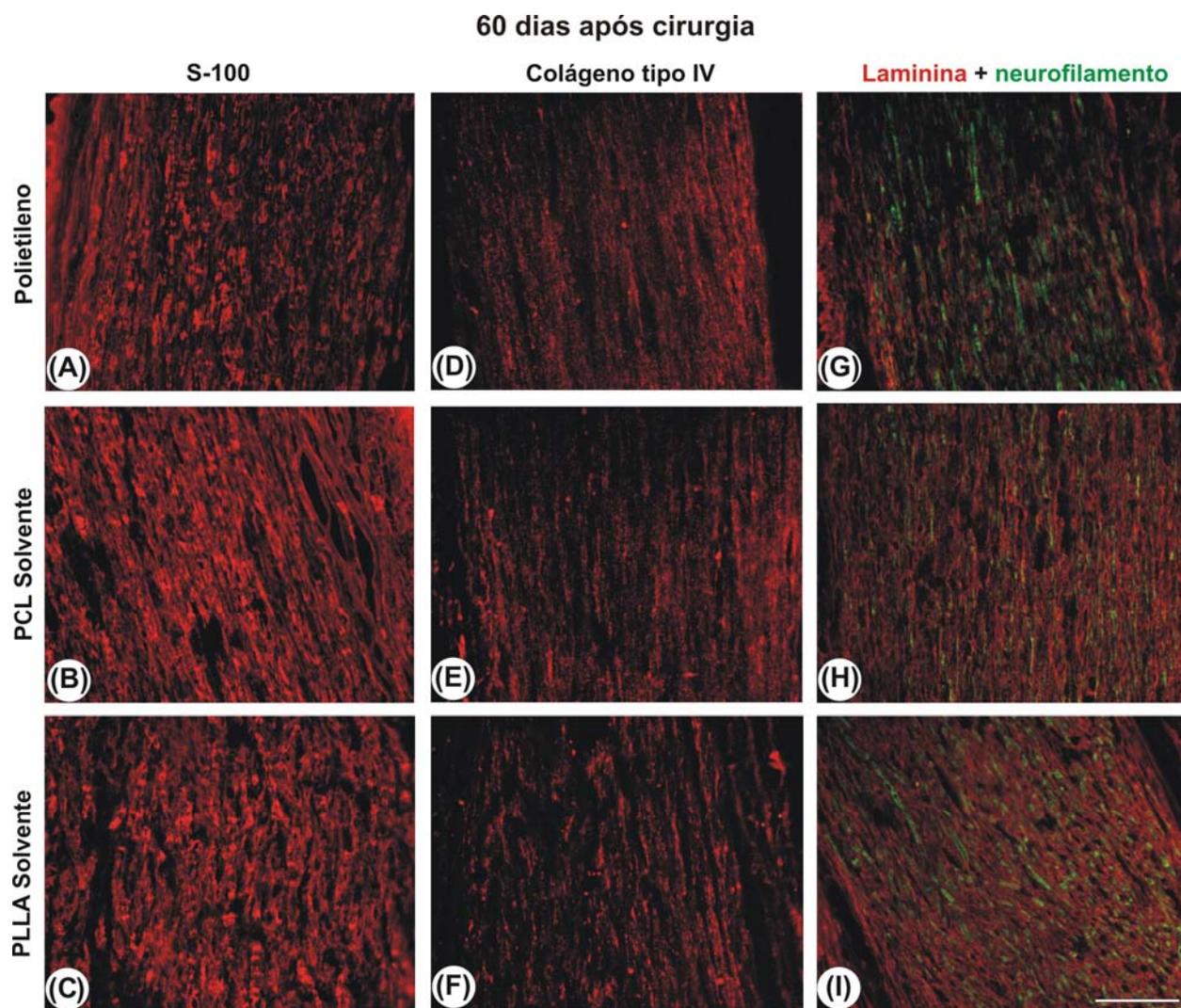


Figura 11: Fotomicrografia de fluorescência da cultura purificada de células de Schwann imunomarcadas com o anticorpo anti S-100. Escala = 100 μ m.

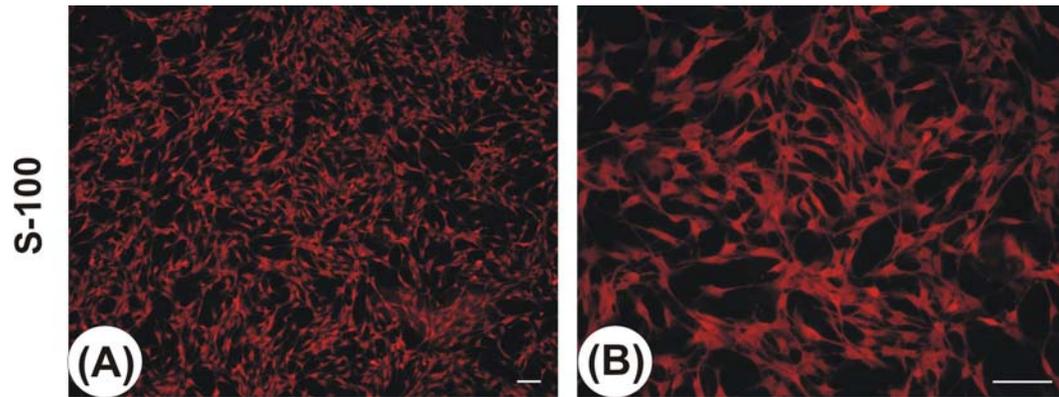
Figura 11

Figura 12: Fotomicrografia eletrônica de varredura das células de Schwann, cultivadas sobre as membranas de poli caprolactona (PCL) (A) e poli _L-ácido lático (PLLA) (B), confeccionadas pelo método solvente respectivamente. Escala = 10 μ m.

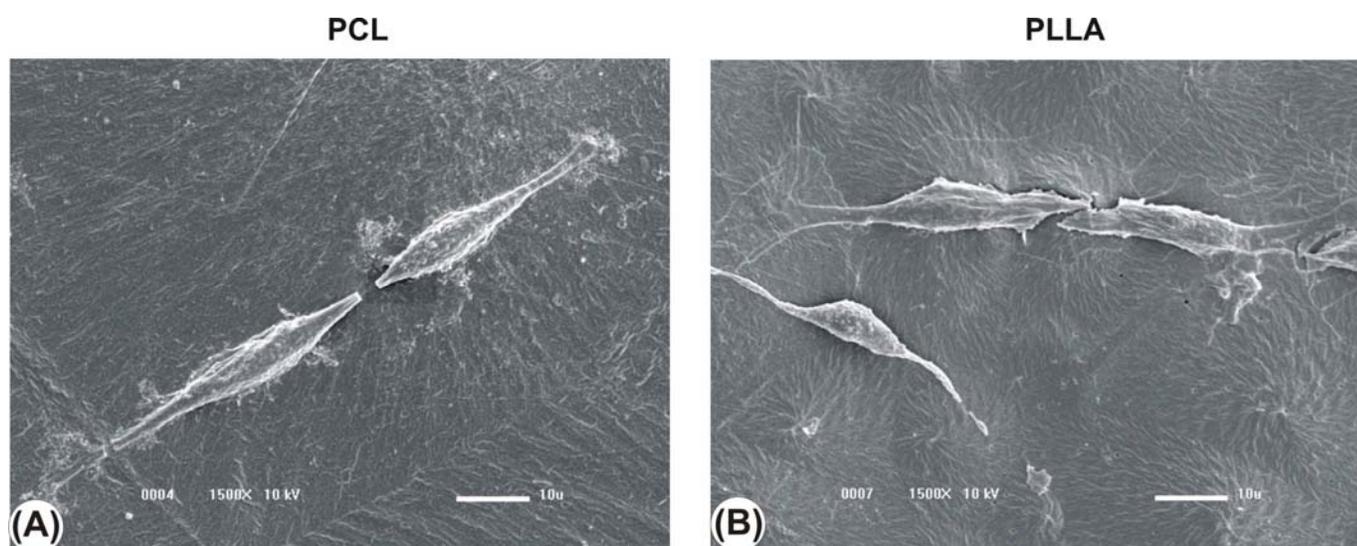
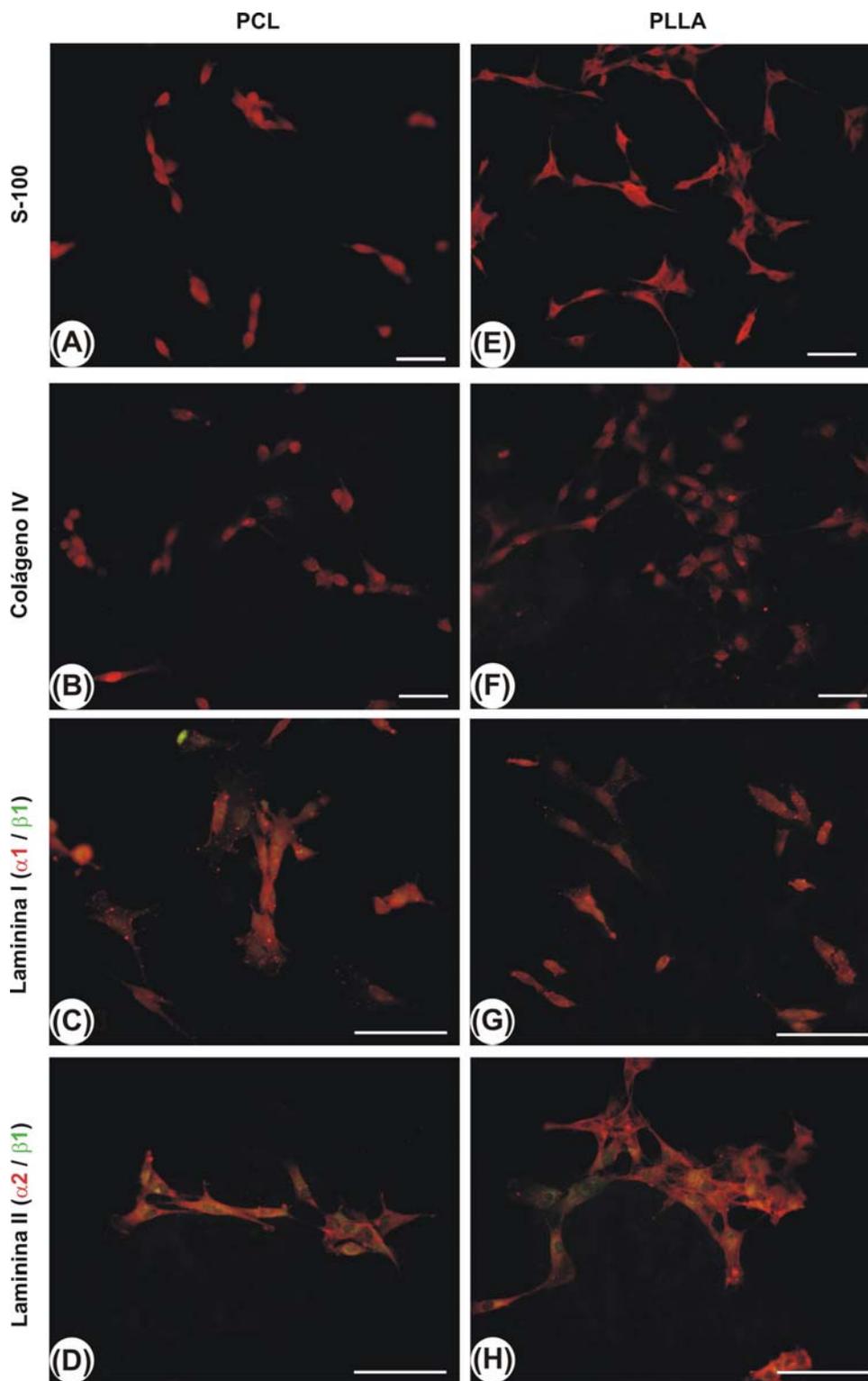
Figura 12

Figura 13: Imunocitoquímica em cultura purificada de células de Schwann utilizando o anticorpo S-100, colágeno IV, $\alpha 1\beta 1$ (laminina tipo I), $\alpha 2\beta 1$ (laminina tipo II), cultivadas 7 dias em meio proliferativo a 10% de soro fetal bovino (SFB) sobre o biomaterial poli caprolactona (PCL) (A, B, C, e D) e poli L-ácido lático (PLLA) (E, F, G e H); Escala = 100 μ m.

Figura 13



10. Referências bibliográficas

-
1. Abernethy, DA; Thomas, PK; Rud, A; King, RH. 1994. Mutual attraction between emigrant cells from transected denervated nerve. *J. Anat.* 184(**Pt 2**): 239-249.
 2. Acheson, A; Barker, PA; Alderson, RF; Miller, FD; Murphy, RA. 1991. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 7(**2**): 265-275.
 3. Aldini, NN; Perego, G; Cella, GD; Maltarello, MC; Fini, M; Rocca, M; Giardino, R. 1996. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials* 17(**10**): 959-962.
 4. An, YH; Woolf, SK; Friedman, RJ. 2000. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 21(**24, 15**): 2635-2365.
 5. Ashley, WW; Weatherly, T; Park, TS. 2006. Collagen nerve guides for surgical repair of brachial plexus birth injury. *J. Neurosurg.* 105(**6 Suppl**): 452-456.
 6. Assouline, JG; Bosch, EP; Lim, R. 1983. Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve: an immunoselective method using surfaces coated with anti-immunoglobulin antibodies. *Brain Res.* 277(**2**): 389-392.

-
7. Bailey, SB; Eichler, ME; Villadiego, A; Rich, KM. 1993. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J. Neurocytol.* 22(3): 176-184.
 8. Barker, RA. & Widner, H. 2004. Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx.* 1(4): 472-481.
 9. Barnes, DM. 1985. What makes nerves regenerate? Many experimental strategies revolve around a central issue: What conditions promote regeneration and functional recovery in mammalian nerves? *Science* 230(4729): 1024-1025.
 10. Beck, KD. 1994 Functions of brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Prog. Neurobiol.* 44(5): 497-516.
 11. Belkas, JS; Munro, CA; Shoichet, MS; Midha, R. 2005. Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restor Neurol. Neurosci.* 23(1): 19-29.
 12. Bellamkonda, RV. 2006. Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy, *Biomaterials* 27(19): 3515-3518.
 13. Berry, M; Hall, S; Follows, R; Rees, L; Gregson, N; Sievers, J. 1988. Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *J. Neurocytol.* 17(6): 727-744.

-
14. Beuche, W & Friede, RL. 1984. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.* 13(5): 767-796.
 15. Bini, TB; Gao, S; Xu, X; Wang, S; Ramakrishna, S; Leong, KW. 2004. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly (L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed. Mater. Res. A.* 68(2): 286-95.
 16. Bloch, J; Fine, EG; Bouche, N; Zurn, AD; Aebischer, P. 2001. Nerve growth factor- and neurotrophin-3- releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. *Exp. Neurol.* 172(2): 425-432.
 17. Boccaccini, AR; Blaker JJ; Maquet, V; Day, RM; Jérôme, R. 2005. Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering* 25(1): 23-31.
 18. Borlongan, CV; Skinner, SJ; Geaney, M; Vasconcellos, AV; Elliott, RB; Emerich, DF. 2004. Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke* 35(9): 2206-2210.
 19. Bosetti, M. & Cannas, M. 2005. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* 26(18): 3873-3879.

-
20. Brockes, JP; Fields, KL; Raff, MC. 1979. Studies on culture rat Schwann cell. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165(1): 105-128.
 21. Bruck, W. 1997. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 7(2): 741-752.
 22. Bruck, W; Bruck, Y; Maruschak, B; Friede, RL. 1995. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol.* 89(4): 363-367.
 23. Bryan, DJ; Miller, RA; Costas, PD; Wang, KK; Seckel, BR. 1993. Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* 92(5): 927-940.
 24. Bryan, DJ; Tang, JB; Holway AH; Rieger-Christ KM; Trantolo DJ; Wise DL; Summerhayes IC. 2003. Enhance peripheral nerve regeneration elicited by cell- mediated events delivered via a bioresorbable PLGA guide. *J. Reconstr. Microsurg.* 19(2): 125-134.
 25. Buti, M; Verdu, E; Labrador, RO; Vilches, JJ; Fores, J; Navarro, X. 1996. Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Exp. Neurol.* 137(1): 26-33.

-
26. Bunting, S; Di Silvio, L; Deb, S; Hall, S. 2005. Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration. *Hand Surg. [Br]*. 30(3): 242-247.
 27. Cabaud, HE; Rodkey, WG; Nemeth, TJ. 1982. Progressive ultrastructural changes after peripheral nerve transection and repair. *J. Hand Sur.* 7(4): 353-365.
 28. Cajal, SR. 1959. Degeneration and regeneration of the nervous system. *New York, Hafner*, pp. 469.
 29. Challacombe, J & Elam, JS. 1997. Chondroitin 4-sulphate stimulates regeneration of goldfish retinal axons. *Exp. Neurol.* 143(1): 10-17.
 30. Chamberlain, LJ; Yannas, IV; Arrizabalaga, A; Hsu, HP; Norregaard, TV; Spector, M. 1998. Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: myofibroblasts and the cellular response. *Biomaterials* 19(15): 1393-1403.
 31. Chamberlain, LJ; Yannas, IV; Hsu, HP; Strichartz, G; Spector, M. 1998. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp. Neurol.* 154(2): 315-329.
 32. Chang, CJ & Hsu, SH. 2004. The effects of low-intensity ultrasound on peripheral nerve regeneration in poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits seeded with Schwann cells. *Ultrasound Med. Biol.* 30(8): 1079-1084.

-
33. Chang, CJ; Hsu, SH; Yen, HJ; Chang, H; Hsu, SK. 2007. Effects of unidirectional permeability in asymmetric poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits on peripheral nerve regeneration: An in vitro and in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 83(1): 206-15.
34. Chen, ZL & Strickland, S. 2003. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J. Cell Biol.* 163(4): 889-899.
35. Chen, ZY; Chai, YF; Cao, L; Lu, CL; He, C. 2001. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rat. *Brain Res.* 902(2): 272-276.
36. Chen, YS; Hsieh, CL; Tsai, CC; Chen, TH; Cheng, WC; Hu, CL; Yao, CH. 2000. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 21(15): 1541-1547.
37. Cheng, C & Zochodne, DW. 2002. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience* 115(1): 321-329.
38. Cheng, ET; Utley, DS; Ho, PR; Tarn, DM; Coan, GM; Verity, AN; Sierra, DH; Terris, DJ. 1998. Functional recovery of transected nerves treated with systemic BDNF and CNTF. *Microsurg.* 18(1): 35-41.

-
39. Chernousov, MA & Carey, DJ. 2000. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol. Histopathol.* 15(2): 593-601.
40. Ciardelli, G & Chiono, V. 2006. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol. Biosci.* 6(1): 13-26.
41. Clavijo-Alvarez, JA; Nguyen, VT; Santiago, LY; Doctor, JS; Lee, WP; Marra, KG. 2007. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plast. Reconstr. Surg.* 119(6): 1839-51.
42. Da Silva, CF; da Gama, SA; Júnior, RM; Pereira, FC. 2003. Influence of highly purified of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration in vivo. *Braz. J. of Morfol. Sci.* 20(2): 121-124.
43. Den Dunnen, WF; van der Lei, B; Schakenraad, JM; Blaauw, EH; Stokroos, I; Pennings; AJ; Robinson, PH. 1993. Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide. *Microsurgery* 14(8): 508-15.
44. Dezawa, M. 2002. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anat. Sci. Int.* 77(1): 12-25.
45. Di Giulio, AM; Germani, E; Lesma, E; Muller, E; Gorio, A. 2000. 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. Dev. Neurosci.* 18(4-5): 339-346.
46. Distefano, PS; Friedman, B; Radziejewski, C; Alexander, C; Boland, P; Schick, CM; Lindsay, RM; Wiegand, SJ. 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8(5): 983-993.
47. Dohm, S; Streppel, M; Guntinas-Lichius, O; Pesheva, P; Probstmeier, R; Walther, M; Neiss, WF; Stennert, E; Angelov, DN. 2000. Local application of extracellular matrix proteins fails to reduce the number of axonal branches after varying reconstructive surgery on rat facial nerve. *Restor Neuro.l Neurosci.* 16(2): 117-126.
48. Evans, GR; Brandt, K; Katz, S; Chauvin, P; Otto, L; Bogle, M; Wang, B; Meszlenyi, RK; Lu, L; Mikos, AG; Patrick, CW Jr. 2002. Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seed with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 23(3): 841-848.
49. Evans, GR; Brandt, K; Widmer, MS; Lu, L; Meszlenyi, RK; Gupta, PK; Mikos, AG; Hodges, J; Williams, J; Gurlek, A; Nabawi, A; Lohman, R; Patrick, CW Jr. 1999. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 20(12): 1109-1115.
50. Fields, RD; Le Beau, JM; Longo, FM; Ellisman, MH. 1989. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog. Neurobiol.* 33(2): 87-134.

-
51. Flynn, L; Dalton, PD; Shoichet, MS. 2003. Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 24(23): 4265-72.
52. Francel, PC.; Smith, KS; Stevens, FA; Kim, SC; Gossett, J; Gossett, C; Davis, ME; Lenaerts, M; Tompkins, P. Regeneration of rat sciatic nerve across a LactoSorb bioresorbable conduit with interposed short-segment nerve grafts. *J. Neurosurg.* 99(3): 549-554.
53. Frisen J. 1997. Determinants of axonal regeneration. *Histol. Histopathol.* 12(3): 857-68.
54. Funakoshi, H; Frisen, J; Barbany, G; Timmusk, T; Zachrisson, O; Verge, VM; Persson, H. 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J. Cell Biol.* 123(2): 455-465.
55. Galla, TJ; Vedecnik, SV; Halbgewachs, J; Steinmann, S; Friedrich, C; Stark, GB. 2004. Fibrin/Schwann cell matrix in poly-epsilon-caprolactone conduits enhances guided nerve generation. *Int. J. Artif. Organs* 27(2): 127-36.
56. Gámez, E; Ikezaki, K; Fukui, M; Matsuda, T. 2003. Photoconstructs of nerve guidance prosthesis using photoreactive gelatin as a scaffold. *Cell Transplant.* 12(5): 481-490.
57. Garbay, B; Heape, AM; Sargueil, F; Cassagne, C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 61(3): 267-304.

-
58. Gilchrist, T; Glasby, MA, Healy, DM; Kelly, G; Lenihan, DV; McDowall, KL; Miller, IA; Myles, LM. In vitro nerve repair-in vivo. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradable glass tubes-a preliminary report. *Br. J. Plast. Surg.* 51(3): 231- 237.
59. Glasby, MA; Gschmeissner, SE, Huang, CL; De Souza, BA. 1986. Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. *J. Hand Surg.* 11(3): 347-351.
60. Gorio, A; Lesma, E; Vergani, L; Di Giulio, AM. 1997. Glycosaminoglycan supplementation promotes nerve regeneration and muscle reinnervation. *Eur. J. Neurosci.* 9(8): 1748-1753.
61. Gorio, A; Vergani, L; Lesma, E; Di Giulio, AM. 1998. Neuroprotection, neuroregeneration, and interaction with insulin-like growth factor-I: novel non-anticoagulant action of glycosaminoglycans. *J. Neurosci. Res.* 51(5): 559-562.
62. Gorio, A; Vergani, L; Ferro, Prino, G; Di Giulio, AM. 1996. Glycosaminoglycans in nerve injury: II. Effects on transganglionic degeneration and on the expression of neurotrophic factors. *J. Neurosci. Res.* 46(5): 572-580.
63. Guest, JD; Rao, A; Olson, L; Bunge, MB; Bunge, RP. 1997. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 148(2): 502-522.

-
64. Gulati, AK. 1988. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J. Neurosurg.* 68(1): 117-123.
65. Guth, L. 1956. Regeneration in mammalian peripheral nervous system. *Peripheral Nervous System Regeneration* 36: 441-478.
66. Hadlock, T; Sundback, C; Hunter, D; Cheney, M; Vacanti, JP. 2000. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 6(2): 119-127.
67. Hall, SM. 1986. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12(1): 27-46.
68. Harley, SD; Timothy, AK; Samuel, CL. 2005. Facial Nerve Regeneration Using Collagen Conduit Entubulation in a Cat Model. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 133(2): 164.
69. Heumann, R; Lindholm, D; Bandtlow, C; Meyer, M; Radeke, MJ; Misko, TP; Shooter, E; Thoenen, H. 1987. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(23): 8735-8739.
70. Ho, PR; Coan, GM; Cheng ET; Niell, C; Tarn, DM; Zhou, H; Sierra, D; Terris, DJ. 1998. Repair with collagen tubules linked with brain- derived neurotrophic factor and ciliary

-
- neurotrophic factor in a rat sciatic nerve injury model. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 124(7): 761-766.
71. Hurtado, A.; Moon, L. D. F.; Maquet V.; Blits, B.; Jérôme R.; Oudega, M. 2006. Poly (d,l-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* 27(3): 430-442.
72. Ide, C. 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.* 25(2): 101-121.
73. Ide, C; Tohyama, K; Yokota, R; Nitatori, T; Onodera, S. 1983. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.* 288(1-2): 61-75.
74. Ignatius, AA & Claes, LE. 1996. In vitro biocompatibility bioresorbable polymers: poly (L, DL- lactide) and poly (L- lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17(8): 831-839.
75. Jessen, KR & Mirsky, R. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.* 22(9): 402-410.
76. Keilhoff, G; Stang, F; Wolf, G; Fansa, H. 2003. Bio- compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* 24(16): 2779-2787.

-
77. Keith, GS; Julian, MY; Peter, PR. 2004. The effect of nerve growth factor on functional recovery after injury to the chorda tympani and lingual nerves. *Brain Research* 1020(1-2): 62-72.
78. Kelleher, MO; Al-Abri, RK; Eleutério, ML; Myles, LM; Lenihan, DV; Glasby, MA. 2001. The use of conventional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. *British Journal of Plastic Surgery* 54(1): 53-57.
79. Kiyotani, T; Teramachi, M; Takimoto, Y; Nakamura, T; Shimizu, Y; Endo, K. 1996. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.* 740(1-2): 66-74.
80. Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, Vacanti CA, Vacanti MP, Ignatz RA. 2004. Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit. *J. Neurosci. Methods* 134(2):133-40.
81. Koshimune, M; Takamatsu, K; Nakatsuka, H; Inui, K; Yamano, Y; Ikada, Y. 2003. Creating bioabsorbable Schwann cell coated conduits through tissue engineering. *Biomed. Mater. Eng.* 13(3): 223-229.
82. Labrador, RO; Buti, M; Navarro, X. 1995 Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery. *Neuroreport* 6(15): 2022-2026.

-
83. Labrador, RO; Butí, M, Navarro, X. 1998. Influence of collagen and laminin gels concentration nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp. Neurol.* 149(1): 243-252.
84. Landon, D & Hall, S. 1976. The myelinated nerve fiber. In: The peripheral nerve. *Ed. D. N. Landon. London. Chapman and Hall*, pp. 1-105.
85. Le Beau, JM; La Corbiere, M; Powell, HC; Ellisman, MH; Schubert, D. 1988. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. *Brain Res.* 459(1): 93-104.
86. Lenihan, DV; Carter, AJ; Gilchrist, T; Healy, DM; Miller, IA; Myles, LM; Glasby, MA. 1998. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. *J. Hand Surg. [Br].* 23(5): 588-93.
87. Lesma, E; Di Giulio, AM; Ferro, L; Prino, G; Gorio, A. 1996. Glycosaminoglycans in nerve injury: 1. Low doses of glycosaminoglycans promote neurite formation. *J. Neurosci. Res.* 46(5): 565-571.
88. Letourneau, PC. 1975. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev. Biol.* 44(1): 92-101.

-
89. Levi, AD & Bunge, RP. 1994. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. *Exp. Neurol.* 130(1): 41-52.
90. Lewin, SL; Utley, DS; Cheng, ET; Verity, AN; Terris, DJ. 1997, Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 107(7): 992-999.
91. Lietz, M; Dreesmann, L; Hoss, M; Oberhoffner, S; Schlosshauer, B. 2006. Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials* 27(8):1425-36.
92. Luis, AL; Rodrigues, JM; Lobato, JV; Lopes, MA; Amado, S; Veloso, AP; Armada-da-Silva, PA; Raimondo, S; Geuna, S; Ferreira, AJ; Varejão, AS; Santos, JD; Maurício, AC. 2007. Evaluation of two biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. *Biomed. Mater. Eng.* 17(1): 39-52.
93. Lundborg, G. 1993. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *J. Hand Ther.* 6(3): 179-188.
94. Lundborg, G; Dahlin, LB; Danielsen, N. 1991. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique: Case report. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 25(1): 79-82.

-
95. Lundborg, G; Dahlin, LB; Danielsen, N; Gelberman, RH; Longo, FM; Powell, HC; Varon, S. 1982. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp. Neurol.* 76(2): 361-375.
96. Lundborg, G; Rosen, B; Abrahamson, SO; Dahlin, L; Danielsen, N. 1994. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J. Hand Sur.* 19(3): 273-276.
97. Lundborg, G; Rosen, B; Dahlin, L; Danielsen, N; Holmberg, J. 1997. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study. *J. Hand Surg.* 22(1): 99-106.
98. Lundborg, G; Rosen, L; Dahlin, L; Holmberg, J; Rosen, I. 2004. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg.* 29(2): 100-107.
99. Lunn, ER; Brown, MC; Perry, VH. 1990. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neurosci.* 35(1): 157-165.
100. Madison, RD; Da Silva, CF; Dikkes, P. 1988. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res.* 447(2): 325- 334.
101. Madison, R; Da Silva, CF; Dikkes, P; Chiu, TH; Sidman, RL. 1985. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp. Neurol.* 88(3): 767-772.

-
102. Madison, RD. & Archibald, SJ. 1994. Point sources of Schwann cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons- Effects of freeze thawing. *Exp. Neurol.* 128 (2): 266-275.
103. Matesz, C; Modis, L; Halasi, G; Szigeti, ZM; Felszeghy, S; Bacskai, T; Szekely, G. 2005. Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull.* 66(4-6): 526-31.
104. Mayhew, TM & Sharma, AK. 1984. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 139(Pt 1): 59-66.
105. Mersa, B; Ađir, H; Aydin, A; Sen, C. 2004. Comparison of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) with autogenous vein as a nerve conduit in rat sciatic nerve defects. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 13(5-6): 103-11.
106. Midha, R; Munro, CA; Dalton, PD; Tator, CH; Shoichet, MS. 2003. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hidrogel tube. *J. Neurosurg.* 99(3): 555-565.
107. Milner, R; Wilby, M; Nishimura, S; Boylen, K; Edwards, G; Fawcett, J; Streuli, C; Pytela, R; ffrench-Constant, C.1997. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev. Biol.* 185(2): 215-228.

-
108. Miller, C; Shanks, H; Witt A; Rutkowski G; Mallapragada, S. 2001. Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrate. *Biomaterials* 22(11): 1263-1269.
109. Navarro, X; Rodriguez, FJ; Ceballos, D; Verdu, E. 2003. Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries. *Med. Biol. Eng. Comput.* 41(2): 220-226.
110. Nichols, CM; Brenner, MJ; Fox, IK; Tung, TH; Hunter, DA; Rickman, SR; Mackinnon, SE. 2004. Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration, *Experimental Neurology* 190(2): 347-355.
111. Oh, SH & Lee, JHF. 2007. Fabrication and characterization of hydrophilized porous PLGA nerve guide conduits by a modified immersion precipitation method. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 80(3): 530-538.
112. Ohbayashi, K; Inoue, HK; Awaya, A; Kobayashi, S; Kohga, H; Nakamura, M; Ohye, C. 1996. Peripheral nerve regeneration in silicone tube: effect of collagen sponge prosthesis, laminin, and pyrimidine compound administration. *Neurol. Med. Chir.* 36(7): 428-433.
113. Oliveira, ALR & Langone, F. 2000. Non-neural cells are not the main limiting factor for the low axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Braz. Journal of Med. and Biol. Res.* 33(12): 1467-1475.

-
114. Oliveira, ALR; Pierucci, A; Pereira, KB. 2004. Review: Peripheral nerve through the nerve tubulization technique. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(4): 225-231.
115. Pierucci, A; Faria, AM; Pimentel, ER; Santos, AR Jr.; Oliveira, ALR. 2004. Effects of agrecan on Schwann cell migration *in vitro* and nerve regeneration *vivo*. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(3): 125-130.
116. Peters, A; Palay, S.L.; Webster, H. F. 1976. The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells. *Philadephia, Sauders*; pp: 406.
117. Rezwan, K; Chen, QZ; Blaker, JJ; Boccaccini, AR. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(18): 3413-3431.
118. Rodríguez, FJ; Verdú, E; Ceballos, D; Navarro, X. 2000. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 161(2): 571-584.
119. Rosen, JM; Padilla, JA; Nguyen, KD; Padilla, MA; Sabelman, EE; Pham, HN. 1990. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. *Ann. Plast. Surg.* 25(5): 375-387.
120. Rutka, JT; Apodaca, G; Stern, R; Rosenblum, M. 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J. Neurosurg.* 69(2): 155-70.

-
121. Salonen, V; Peltonen, J; Roytta, M; Virtanen, I. 1987. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J.Neurocytol.* 16(5): 713-720.
122. Sakai, Y; Matsuyama, Y; Takahashi, K; Sato, T; Hattori, T; Nakashima, S; Ishiguro, N. 2007. New artificial nerve conduits made with photocrosslinked hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration. *Biomed. Mater. Eng.* 17(3): 191-197.
123. Santos Jr, AR; Wada, ML; Langone, F; Oliveira, ALR. 2000. Differential schwann cell migration in adult and old mice: an in vitro study. *Brain Res.* 881(1): 73-76.
124. Sangsanoh, P; Waleetorncheepsawat, S; Suwantong, O; Wutticharoenmongkol, P; Weeranantanapan, O; Chuenjitbuntaworn, B; Cheepsunthorn, P; Pavasant, P; Supaphol, P. 2007. In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds. *Biomacromolecules* 8(5): 1587-94.
125. Schlosshauer, B; Muller, E; Schroder, B; Planck, H; Muller, HW. 2003. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res.* 963(1-2): 321-326.
126. Schmidt, CE & Leach, JB. 2003. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5: 293-347.

-
127. Shirley, DM; Williams, SA; Santos, PM. 1996. Brain-derived neurotrophic factor and peripheral nerve regeneration: a functional evaluation. *Laryngoscope* 106(5 Pt 1): 629-632
128. Sinis, N; Schaller, HE; Becker, ST; Lanaras, T; Schulte-Eversum, C; Müller, HW; Vonthein, R; Rösner, Haerle, HM. 2006. Cross-chest median nerve transfer: A new model for the evaluation of nerve regeneration across a 40 mm gap in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 156(1-2):166-172.
129. Smith, GV & Stevenson, JA. 1988. Peripheral nerve grafts lacking viable Schwann cells fail to support central nervous system axonal regeneration. *Exp. Brain. Res.* 69(2): 299-306.
130. Smith, RS & Koles, ZJ. 1970. Myelinated nerve fibers-computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am. J. Physiol.* 219(5):1256-1260.
131. Spilker, MH; Asano, K; Yannas, IV; Spector, M. 2001. Contraction of collagen-glycosaminoglycan matrices by peripheral nerve cells in vitro. *Biomaterials* 22(10): 1085-1093.
132. Stoll, G; Griffin, JW; Li, CY; Trapp, BD. 1989. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* 18(5): 671-683.

-
133. Stoll, G; Jander, S; Myers, RR. 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7(1): 13-27.
134. Sundback, C; Hadlock, T; Cheney, M; Vacanti, J. 2003. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials* 24(5): 819-830.
135. Sunderland, S. 1990. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve* 13(9): 771-784.
136. Symons, NA; Danielsen, N; Harvey, AR. 2001. Migration of cells into and out of peripheral nerve isografts in the peripheral and central nervous systems of the adult mouse. *Eur. J. Neurosci.* 14(3): 522-532.
137. Taniuchi, M; Clark, HB; Schweitzer, JB; Johnson, EM Jr. 1988. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J. Neurosci.* 8(2): 664-681.
138. Terenghi, G. 1999. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* 194(Pt 1): 1-14.

-
139. Terrisa, DJ; Cheng ET; Utley, DS; Tarn, DM; Ho, PR; Verity, AN. 1999. Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx*. 26(2): 117-122.
140. Thompson, DM & Buettner, HM. 2001. Schwann cell response to micropatterned laminin surfaces. *Tissue Eng*. 7(3): 247-265.
141. Thyboll, J; Kortesmaa, J; Cao, R; Soininen, R; Wang, L; Iivanainen, A; Sorokin, L; Risling, M; Cao, Y; Tryggvason, K. 2002. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol. Cell. Biol*. 22(4): 1194-202.
142. Timpl, R & Brown, JC. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18(2): 123-132.
143. Tona, A; Perides, G; Rahemtulla, F; Dahl, D. 1993. Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on the localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. *J. Histochem. Cytochem*. 41(4): 593-599.
144. Tong, XJ; Hirai, K; Shimada, H; Mizutani, Y; Izumi, T; Toda, N; Yu, P. 1994. Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. *Brain Res*. 663(1): 155-162.

-
145. Tonge, DA; Golding, JP; Edbladh, M; Kroon, M; Ekstrom, PE; Edstrom, A. 1997. Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. *Experimental Neurol.* 146(1): 81-90.
146. Torigoe, K; Tanaka, HF; Takahashi, A; Awaya, A; Hashimoto, K. 1996. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 137(2): 301-308.
147. Utley, DS; Lewin, SL; Cheng, ET; Verity, AN; Sierra, D; Terris, DJ. 1996. Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122(4): 407-413.
148. Verdú, E; Labrador, RO; Rodríguez, FJ; Ceballos, D; Forés, J; Navarro, X. 2002. Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes. *Restor Neurol. Neurosci.* 20(5): 169-79.
149. Vogel, M; Voigt, C; Gross, UM; Muller-Mai, CM. 2001. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials* 22(4): 357-62.
150. Vögelin, E; Baker, JM; Gates, J; Dixit, V; Constantinescu, MA; Jones, NF. 2006. Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology* 199(2): 348-353.

-
151. Waller, AV. 1850. 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.* 140: 423-429.
152. Waxman, SG. 1980. 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, pp: 186-198.
153. Wells, MR; Kraus, K; Batter. DK; Blunt, DG; Weremowitz, J; Lynch, SE; Antoniades, HN; Hansson, HA. 1997. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Exp. Neurol.* 146(2): 359-402.
154. Wennersten, A; Holmin, S; Al Nimer, F; Meijer, X; Wahlberg, LU; Mathiesen, T. 2006. Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. *Exp. Neurol.* 199(2): 339-47.
155. Widmer, MS; Gupta, PK; Lu, L; Meszlenyi, RK; Evans, GR; Brandt, K; Savel, T; Gurlek, A; Patrick, CW Jr; Mikos, AG. 1998. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 19(21): 1945-1955.
156. Yannas, IV & Hill, BJ. 2004. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials* 25(9): 1593-1600.

-
157. Yao, J; Radin, SS; Leboy, P; Ducheyne, P. 2005. The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials* 26(14): 1935-43.
158. Yoshii, S; Oka, M; Shima, M; Taniguchi, A; Akagi, M. 2002. 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Res.* 949(1-2): 202-208.
159. Yoshii, S; Yamamuro, T; Ito, S; Hayashi, M. 1987. In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. *Exp. Neurol.* 96(2): 469-473.
160. Yoshitani, M; Fukuda, S; Itoi, S; Morino, S; Tao, H; Nakada, A; Inada, Y; Endo, K; Nakamura, T. 2007. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 133(3): 726-32.
161. Young, C; Miller, E; Nicklous, DM; Hoffman, JR. 2001. Nerve growth factor and neurotrophin-3 affect functional recovery following peripheral nerve injury differently. *Restor. Neurol. Neurosci.* 18(4): 167-175.
162. Zochodne, DW. 2000. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl.* 9: 33-38.
163. Zuo, J; Hernandez, YJ; Muir, D. 1998. Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. *Journal Neurobiol.* 34(1): 41-54.

11. Artigos

11.1 Artigo aceito para publicação – Tissue Engineering

Peripheral nerve regeneration through biodegradable conduits prepared by solvent evaporation

Amauri Pierucci¹, Eliana Aparecida Rezende de Duek²,

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira¹

¹Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas, (UNICAMP) and

²Department of Materials Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, State University of Campinas, (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Running title: Nerve regeneration via bioabsorbable prostheses

Correspondence to: Dr. Alexandre L.R. Oliveira, Department of Anatomy, State University of Campinas (UNICAMP); CP 6109, CEP 13083-970; Campinas, SP, Brazil. Tel: (55) (19) 3521-6295 Fax: (55) (19) 3521-6101. E-mail: alroliv@unicamp.br

Abstract

The present study proposed a new approach for the production of tubular conduits designed for peripheral nerve repair. In this sense, PLLA and PCL membranes were obtained after solvent evaporation and wrapped around a mandrel. The effectiveness of nerve regeneration was compared with that obtained with polyethylene and PCL extruded prostheses 30 and 60 days after surgery. The comparison between extrusion and membrane-derived tubes clearly showed structural differences, which were directly proportional to the hardness and transparency. An important factor to be considered is that the fiber count indicated that membrane-derived PCL tubes provided a significantly greater number of axons 30 days after repair. Sixty days after the operation, the greatest regenerative performance was obtained with PCL, regardless of the tube construction method. An intense labeling against S100, type IV collagen and laminin could be observed in the tissue obtained from membrane-derived PCL and PLLA groups, indicating that such constructions were able to positively stimulate Schwann cell responses. Overall, the present results provided evidence that membrane-derived conduits could be regarded as an alternative preparation method for tubular prostheses aimed at peripheral nerve regeneration.

Key words: nerve repair, tubulization, polylactic acid, poly caprolactone, biomaterials.

Introduction

The development of conduits to bridge peripheral nerve lesions has become an important field of research in recent years.¹⁻⁹ Nevertheless, autologous nerve grafting is currently the most used technique when end-to-end anastomosis is not possible due to extensive injury.¹⁰⁻¹² Although autografting is the therapeutic option of choice for repairing a complex injury, it has considerable disadvantages for the patient, including painful neuroma formation at the donor site, loss of donor nerve function, and, frequently, a mismatch between nerve and graft dimensions. In this sense, both natural and synthetic materials have been investigated in order to permit the construction of prostheses able to bridge the gap between the transected stumps and, at the same time, enhance the regeneration process, avoiding the need for nerve autografting.¹³⁻¹⁸

Regarding the availability of biocompatible materials, collagen¹⁸⁻²⁰, ethylene-vinyl acetate copolymer (EVA)²¹, poly lactic acid (PLLA)^{22,23}, poly glycolic acid (PGA)²⁴, Poly (L-lactic acid co-glycolic acid) (PLGA),^{25,26} and LA/CPL (a copolymer of lactic acid and caprolactone)^{27, 28} have yielded good results in nerve regeneration. More recently, Flynn *et al.* [2003]²⁹ developed a method to create longitudinally oriented channels within poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) hydrogels for neural tissue engineering applications. Such technological advances, combined with the use of tubulization, growth factors, cells fundamental to the regenerative process (e.g. Schwann cells) and extracellular matrix components, have provided a promising alternative to autografts.^{2,30-43}

Amongst the synthetic biomaterials, saturated aliphatic polyesters (e.g. poly(L-lactic acid) - PLLA) have provided promising results, with the great advantage of being bioabsorbable, and for not eliciting significant immune responses.^{22,23} In this sense, such polymers allow for hydrolytic

degradation through de-esterification, and the resultant monomers of each polymer are metabolized. In the case of PLLA, for example, monomers are cleared by entering the tricarboxylic acid cycle. It is important to emphasize, however, that different factors affect the degradation kinetics, resulting in significantly diverse degradation rates.^{44,45} Amongst these, the porosity and crystallinity are relevant factors in the construction of tubular prostheses to be used in peripheral nerve regeneration.^{22,39,46-48} Also, the amount of polymer used, associated with the degree of compactness may delay the degradation process for several months. Of particular significance to the long-term success of the nerve regeneration process is the fact that the tube does not degrade in a way that generates large amounts of debris or crystalline by-products, which may harm the newly formed tissue as well as triggering local inflammation.

Up to date, the thickness of the tube walls as well as the hardness of the prosthesis have represented a critical problem which makes the surgical procedures difficult as well as decreasing the stability of the preparation, since the nerve stumps may detach or loose their alignment, increasing the possibility of neuroma formation.

In the present work we proposed a technique for the construction of tubular prostheses with thin yet resistant walls, based on the use of PLLA and PCL membranes. The results showed that such tubes presented sufficient transparency to allow for the correct positioning of the nerve stumps as well as sufficient flexibility to permit the correct fixation of the nerve extremities. Also, the regeneration parameters were significantly superior as compared to the extrusion constructed tubes.

Material and methods

Conduit preparation

In order to obtain prostheses with thin, transparent and yet resistant walls, a series of dilutions of the biopolymers were tested (1%, 2.5%, 5% and 10%) with the aim of obtaining homogeneous membranes. In the case of PLLA (300 kDa), the best results were obtained at 2.5% w/w in 1,1-dichloroethane. For PCL (100 kDa), the best dilution was at 5% w/w in dichloroethane. Above such concentrations, the obtained membranes were not flexible enough for the prosthesis construction. On the other hand, lower dilutions provided tubes with thin walls which could collapse during surgery or throughout the regeneration process. An important point regarding the membrane thickness was the possibility of obtaining tubes that would facilitate the suturing of the stumps.

The biopolymers were diluted in the solvent and homogenized for 12 hours. The solution was then poured into a flat glass chamber so that, after evaporation of the dichloroethane, a thin and uniform membrane was obtained. Eventual solvent residues were removed by placing the membranes in a vacuum chamber for 5 minutes. The tubes were then constructed by wrapping the membranes around a 1.6mm metal mandrel and the outer end sealed with a small quantity of N-butyl-2-cyanoacrylate (Histoacryl; Braun Surgical, Sydney, Australia) so that the prostheses were stable during surgical manipulation as well as after implantation (Figures 1J and 1K). By using such a technique, it was possible to produce several 10mm long tubes with a single membrane, consuming approximately 95% less polymer, when compared to the extrusion technique, described below. Since the prostheses were produced manually, special care was taken to keep the inner diameter (ID) constant. However, small variations were unavoidable. In this

sense, all tubes were measured with a caliper and only those with an ID around 2.0 mm were implanted. In this case, the thickness of the tubes was around 200 μ m.

In order to compare the regenerative performance as well as the surgical procedures for implantation, tubes were also fabricated using the extrusion technique. In this case, only PCL prostheses were constructed and the thinnest possible walls were approximately 1mm thick. In this way, the polymer was heated in a container up to 140°C and extruded in a Minimax molder (model LMM-2017), generating tubes with a constant ID of 1.6mm.

Figure 1 shows the aspect of the membrane-derived tubes made with caprolactone (PCL) and poly-lactic acid (PLA) as well as the extrusion-derived implants.

All tubes were kept in a desiccator under vacuum until used and were disinfected with 70% ethanol for 1 hour prior to the surgical procedures.

The polyethylene tubes were obtained from Becton Dickinson and Company (Intramedic®, Clay Adams®) with dimensions of 1.57 \times 2.08 mm (inner \times outer diameter).

Animals

Eighty 8 week-old female Sprague Dawley rats were used for the surgical procedures. Before surgery they were housed under standard conditions, receiving food and water *ad libitum*, and all the procedures were approved by the local Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEA/IB/Unicamp, proc. 801-1). The experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

The animals were divided into experimental groups according to the composition of the implanted prosthesis as follows: polyethylene control group (n=10); extrusion poly-caprolactone tube (PCL – n=10); membrane-derived PCL tube (n=10) and membrane-derived poly L-acid

lactic tube (PLLA – n=10). In every group, half of the animals were allowed to survive for 4 weeks, while the other half was maintained for 8 weeks after the prosthesis implant.

Surgical procedures

Under deep anesthesia obtained with a mixture of Kensol (xylasin, Köning, 10mg/Kg) and Vetaset (Cetamin, Fort Dodge, 50mg/kg; 1:1, 0.2ml/250g, i.p.), the left sciatic nerve was exposed through a gluteus muscle splitting incision and the common trunk transected at the mid-thigh level. The proximal stump was introduced into a 10mm long tubular prosthesis, and sutured with an epineural stitch (9-0 nylon suture) to the end of the tube. The distal stump was then sutured to the distal end of the tube, leaving a 7 mm gap. The musculature and the skin were closed (4-0 nylon suture) and the rats were kept in separate cages. In order to avoid autotomy after surgery, animals were treated for one week with amitriptyline, diluted in the drinking water (25mg/L).

Analysis of the tubular prostheses by Scanning Electron Microscopy

The structure of the biomaterial-derived tubes was analyzed by scanning electron microscopy in order to access details regarding the compactness as well as the conformation of the inner and outer surfaces of the walls, before surgery and 30 and 60 days after surgery. Thus the tubes were obtained soon after construction or after the predetermined implant periods, and the prostheses taken at the critical point (Balzers, CTD030) and coated with gold for 120s at 20mA using a sputter coater, resulting in an approximate coating thickness of 40nm. The specimens were then viewed under a scanning electron microscope (Jeol, JXA 840A) operated at 10kV.

Specimen preparation and morphometrical analysis

After tubulization, the rats were perfused transcardially with phosphate buffered saline (0.1M, pH 7.4), followed by Karnovsky solution (2% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde). The regenerated nerves were carefully dissected out from the tubes under a surgical microscope, post-fixed with 1% osmium tetroxide and processed for Araldite embedding. Transverse semi-thin sections (0.5 μm thick) were obtained at the midpoint of the prosthesis for the different experimental groups, stained with toluidine blue and the total number of regenerated axons counted. For each specimen, four fields were photographed with a light microscope (100X), corresponding to an area of at least 30% of the nerve cross-section. Sampling bias was avoided by spreading the micrographs systematically over the entire cross-section, according to the scheme proposed by Mayhew and Sharma (1984)⁴⁹. Using the Image Tool software (Version 2.00, The University of Texas Health Center, USA), the diameter of the myelinated fibers (FD) and of the regenerated axons (AD), and the myelin thickness (MT), were calculated. The axon diameter (D) was calculated from the perimeter (P) by applying the formula $D=P/\pi$. The data are shown as the mean \pm SE.

Following the morphometrical analysis, ultrathin sections (500 \AA) were obtained with a diamond knife on an ultratome (LKB ultratome, Bromma, Sweden) from the distal end of the nerves regenerated on the prosthesis. The sections were observed in a transmission electron microscope (Leo 906, Zeiss, Oberkochen, Germany, operated at 60kv) after counter staining with uranyl acetate and lead citrate.

Immunohistochemistry

The animals were sacrificed with an over-dose of anesthetic, perfused transcatheterially with a 0.1M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, followed by 10% formaldehyde in 0.1M PB. The sciatic nerves that regenerated into the polyethylene (n=10), membrane-derived PCL (n=10) and membrane-derived PLLA (n=10) tubes after four and eight weeks of implantation, were dissected out and postfixed in the same fixative overnight. The samples were then rinsed in PBS, cryoprotected in 20% sucrose in PBS overnight, freeze-mounted in tissue-tek and cut into 12 μ m sections in a cryostat. To minimize background staining, the sections were incubated for 1 hour in a blocking solution containing 1% bovine serum albumin (BSA) and Triton X-100 in PBS, and then incubated overnight at 4°C with primary antiserum diluted in PBS with 1% BSA and Triton X-100.

The following primary antibodies were used: anti-S-100 (dilution 1:1000, Dako), anti-laminin (1:200, Santa Cruz), anti-neurofilament (1:200, Dako) and anti-type IV collagen antibodies (1:200, Santa Cruz).

After several rinses in PBS, the sections were incubated for 45 minutes at room temperature with the secondary antibodies Cy3- or Cy2- conjugated anti-rabbit, anti-goat (diluted 1:250, Jackson ImmunoResearch). The samples were rinsed several times in PBS, and the sections mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1). The slides were examined using a Nikon eclipse TS100 microscope equipped with a fluorescence system.

Statistics

Data were analyzed with a paired two-tailed t test for parametric data or with a two-tailed Mann-Whitney U test for non-parametric data. The level of significance for the data presented in the graphs is indicated with asterisks; *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

Results

Structure of the prostheses 30 and 60 days after implantation

The tubular prostheses were analyzed with a scanning electron microscope before surgery and 30 and 60 days after implantation. The comparison between extruded and membrane-derived tubes clearly showed structural differences, which were directly proportional to the hardness and transparency. In this sense, the greater compactness and thickness of the extruded caprolactone tube implied in the use of a significantly larger amount of polymer (~95% more) and resulted in prostheses with a long degradation period. This was evident both at 30 and 60 days after tubulization, where no signs of internal or external degradation could be detected. On the contrary, the membrane-derived tubes displayed thin but even walls, which provided transparency and flexibility to the prostheses. As shown in Figure 1, both PCL and PLA provided morphologically similar prostheses, which were stable during the post surgical periods studied. However, the PCL tubes displayed visible signs of degradation after 60 days of implantation, mostly on the inner surface. However, apart from the degradation process the overall structure of the prostheses was maintained, providing adequate support to the regenerating nerve bridge within the lumen.

Nerve regeneration within the prostheses

In order to have a reference regarding the regenerative performance after applying the tubulization technique, a group of animals received polyethylene implants. The quality of the regeneration process was initially assessed by counting the number of myelinated fibers and by analyzing the ultrastructure of the regenerated axons and the surrounding microenvironment. In a

further analysis, described below, different morphometrical parameters were studied in the myelinated axons.

Thirty days after surgery, it was possible to observe a nerve cable inside the tubes, bridging the gap between the proximal and distal stumps. There was no significant adhesion to the adjacent tissue. However, the conduits were covered outside and inside by a thin layer of connective tissue, usually seen after nerve tubulization. Regarding the nerve cables within the lumen of the prostheses, they were very easily taken out by bisecting the tube. In this way, the proximal and distal stumps could be obtained without any damage to the nervous tissue.

The nerve cable was present in all the tubes analyzed, regardless of the nature of the conduit. However, the dimensions of the newly formed nerves varied amongst the experimental groups, as seen in Figure 2, and the nerves regenerated across the polyethylene tubes presented the smallest cross section 30 days post surgery, indicating the presence of fewer axons. On the other hand, overall, the biopolymer tubes showed better regeneration performance, with the development of more regeneration cables. Such an observation was reinforced by the ultrastructural analysis of the nerves, which were better developed, presenting axons organized into fascicules (Figure 3). Another important factor to be considered is the regenerated fiber count, which is presented in Table I and figures 4A and B, also reinforcing the morphological data.

Morphometrical analysis of the regenerated myelinated axons

An important issue is that the tube should provide the conditions for the growth and maintenance of the regenerating axons. Such a property may be indirectly evaluated by an analysis of the morphometrical parameters of the nerve fibers grown inside the prosthesis. In this sense, the axonal diameter (AD) and the myelin thickness are of importance when evaluating the effectiveness of the nerve repair technique.

Figures 5 and 6 represent the frequency distribution of the axonal diameter and the myelin thickness under the different experimental conditions, 30 and 60 days after surgery. Interestingly, there was significant similarity amongst the regenerated nerves, independent of the type of tubular prostheses used. Also, the increased frequency of greater values, 60 days after implantation, indicates the development and maturation of the regenerative process.

It is relevant to emphasize that the number of regenerated axons was statistically greater inside the membrane-derived PCL (30 and 60 days) and extruded PCL (60 days), indicating a better regenerative performance. In this sense, the combination of the count and morphometrical data reinforces the effectiveness of PCL membrane-derived tubes.

Expression of Schwann cell basal lamina constituents

The immunolabeling analysis of basal lamina components 30 and 60 day after tubulization with polyethylene, membrane-derived PCL and PLLA, is represented in Figures 7 and 8. An initial analysis of the Schwann cell reactivity by S100 staining during the regenerative process is shown in Figure 7 A-C (30d) and Figure 8 A-C (60). Interestingly, a significantly more intense labeling could be observed in the tissue obtained from membrane-derived PCL and PLLA groups, indicating that such biomaterials are able to positively stimulate Schwann cell responses, which is in line with the numerical data regarding the number of regenerating axons. The S100 immunolabeling remained more intense in the biopolymer-implanted groups 60 days after surgery. At this stage, however, the overall intensity of the staining decreased as compared to 30days after implantation. Such a fact could be explained by the increasing number of axons, which displayed greater dimensions at that stage.

The immunolabeling against type IV collagen and laminin followed the same pattern described for S100, displaying a more intense labeling in biomaterial-derived groups, especially 30days post tubulization repair.

Discussion

The tubulization technique has been studied for many years in an attempt to substitute the need for autografting following extensive nerve injuries.^{1,13,15,19,30-32} A number of materials have been tested, from fascia, vein grafts and muscle basal lamina to polyethylene and, more recently, bioabsorbable materials.^{1,3,5-7,13-18,26,48,50}

The use of bioabsorbable materials opened a new perspective in providing the regenerating axons with an adequate microenvironment, speeding up the process as well as avoiding the need for later surgery to excise the prosthesis which, with time, may compress the newly formed nerve.^{22,23} Also, the use of synthetic materials minimizes the risk of tissue rejection and local inflammation, as seen in allo and xenografts.⁵¹⁻⁵³

However, the prosthesis effectiveness is also associated with some characteristics that are a combination of the adequate biomaterial together with the construction method used.^{7,18,22,28,37,39,45-48} The dense walls of most prostheses do not allow interactions between the nerve in the lumen and surrounding tissue. Thus extrusion, solvent casting and leaching techniques have been used alone or in combination with a variable salt weight fraction in order to obtain adequate porosity.^{7,22,23,28,39,46-48} Also, even with the introduction of pores in the structure of the tube by adding different quantities of salt to the polymer before casting or extruding, the final thickness of the tube walls is too thick and hard. Such hardness affects the surgical

procedures, such as aligning the stumps and suturing the epineurium to the tube walls, which increases the possibility of disconnection of the stumps from the tube.

Regarding the thickness of the prosthesis, the works of Widmer *et al.* (1998)⁴⁶ and of Evans *et al.* (1999)²², described the construction of PLGA and PLLA tubes with 3.2mm external diameter and 1.6mm wall thickness, produced by a combination of extrusion or casting and leaching techniques. The authors described the beneficial effects of implanting biodegradable conduits and presented successful nerve regeneration data, comparable to nerve isografting.^{2,4,8,22,34,38,54} However, the presence of firm adhesion to the adjacent musculature as well as the possibility of the tube collapsing due to mechanical stress may be interpreted as limitations to the regenerative process. In this sense, the construction of prostheses with thinner walls, but which would give the necessary stability to the growing nerve, containing significantly less polymer, would be an alternative to overcome the above-cited problems. In fact, the work of Aldini *et al.* (1996)²⁸ already addressed these issues by preparing the tubular conduit using the coating technique, which consists of slowly pulling a mandrel in and out of a polymer solution. After drying, the tube presented very thin walls of about 175 micrometers and the necessary stability for being implanted. Also, these authors reported that the conduits were transparent and flexible, which was in line with previous works.^{55,56} By the use of such a technique, it was possible to significantly reduce adherence to the surrounding tissues and to maintain an adequate microenvironment for the regenerated nerve. Nevertheless, the authors used a copolymer of PLLA and PCL, and presented no morphometrical analyses of the regenerated fibers, nor a more detailed analysis of the Schwann cells response regarding protein expression, for example.

The present work addressed the important issue of constructing an effective and bioactive conduit designed to adequately support nerve regeneration and, at the same time, having excellent microsurgical performance. In this sense, we propose the preparation of PLLA and PCL

membranes by solvent evaporation. Such membranes, showing an even thickness of about 200 micrometers, allowed for the confection of tubes by being wrapped around a mandrel. The stability of the conduit was assured by gluing the outer sheet with Histoacryl. The final result was transparent and flexible tubes adequate for microsurgical suturing, similar to that reported by Aldini et al. (1996)²⁸, but with the advantage of not having layers (as in the dipping technique) that could detach from each other and cause either the collapse of the prosthesis or the compression of the newly formed nerve. Also, in addition to the ultrastructural analysis shown by Aldini and colleagues, we presented a thorough morphometric analysis as well as an immunohistochemical characterization of the expression of the S100, laminin and type IV collagen by the Schwann cells present inside the prosthesis.

Regarding the regenerated fiber count, the membrane-derived PCL tube presented a statistically greater number of axons 30 days after surgery, surpassing those of the polyethylene and extruded PCL tubes. After 60 days the extruded and membrane-derived tubes (PCL) presented the same performance, indicating that the preparation proposed herein provides the same regenerative conditions to the nerve under repair, associated with the use of significantly less polymer. This may be particularly beneficial at later survival times, since the degradation process will probably generate less fragments and secondary products (mainly lactic acid), which may adversely affect axonal growth and nerve function, as mentioned by Evans et al. (1999)²². The morphometrical analysis was consonant with the count data, indicating that biomaterial-derived conduits supported the peripheral nerve regeneration regardless of the method of prosthesis preparation. Also, as shown by Aldini et al. (1996)²⁸, the regenerative performance using bioabsorbable tubes was similar to that of autograft repair, with the considerable advantage of eliciting less fibrosis by proliferation of fibroblastic cells.

The ultrastructural and morphometrical data herein are reinforced by the analysis of the expression of the S100, type IV collagen and laminin in the regenerated nerve microenvironment. Interestingly, the expression of such elements was enhanced in the presence of the biopolymers and significantly greater than that observed after polyethylene tubulization. Once more, no visible differences could be detected between the PCL and PLLA-derived prostheses, which is in line with the idea that microsurgery optimized conduits may provide substantial benefits during the implantation procedure, without jeopardizing the regenerative process.

In summary, data was presented regarding a new approach for the preparation of bioabsorbable conduits to be used in peripheral nerve reconstruction. Such prostheses possess thin but resistant walls and provide transparency as well as flexibility for suturing and correctly aligning the nerve stumps. The regenerative performance was comparable to extruded tubes and significantly superior to polyethylene conduits. Nevertheless, a further long-term study is necessary in order to provide more elements regarding axonal survival and myelination as well as functional recovery, which were not addressed in the present investigation.

References

1. Fields, R.D., Le Beau, J.M., Longo, F.M., and Ellisman, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol* **33**, 87, 1989.
2. Navarro, X., Rodriguez, F.J., Ceballos, D., and Verdú, E. Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries. *Med Biol Eng Comput* **41**, 220, 2003.
3. Schmidt, C.E., and Leach, J.B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* **5**, 293, 2003.
4. Komiyama, T., Nakao, Y., Toyama, Y., Vacanti, C.A., Vacanti, M.P., and Igotz, R.A. Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit. *J Neurosci Methods* **134**, 133, 2004.
5. Yannas, I.V., and Hill, B.J. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials* **25**, 1593, 2004.
6. Ciardelli, G., and Chiono, V. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci* **6**, 13, 2006.
7. Chang, C.J., and Hsu, S.H. The effect of high outflow permeability in asymmetric poly(dl-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. **27**, 1035, 2006

-
8. Clavijo-Alvarez, J.A., Nguyen, V.T., Santiago, L.Y., Doctor, J.S., Lee, W.P., and Marra, K.G. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plast Reconstr Surg* **119**, 1839, 2007.
 9. Sakai, Y., Matsuyama, Y., Takahashi, K., Sato, T., Hattori, T., Nakashima, S., and Ishiguro, N. New artificial nerve conduits made with photocrosslinked hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration. *Biomed Mater Eng* **17**, 191, 2007.
 10. Nichols, C.M., Brenner, M.J., Fox, I.K., Tung, T.H., Hunter, D.A., Rickman, S.R., and Mackinnon, S.E. Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology* **190**, 347, 2004.
 11. Bellamkonda, R.V. Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials* **27**, 3515, 2006.
 12. Sinis, N., Schaller, H.E., Becker, S.T., Lanaras, T., Schulte-Eversum, C., Müller, H.W., Vonthein, R., Rösner, H., and Haerle, M. Cross-chest median nerve transfer: A new model for the evaluation of nerve regeneration across a 40 mm gap in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* **156**, 166, 2006.
 13. Lundborg, G., Dahlin, L.B., and Danielsen, N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique: Case report. *Scand. J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **25**, 79, 1991.

-
14. Kelleher, M.O., Al-Abri, R.K., Eleutério, M.L., Myles, L.M., Lenihan, D.V., and Glasby MA. The use of conventional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. *British Journal of Plastic Surgery* **54**, 53, 2001.
15. Lundborg, G., Rosen, L., Dahlin, L., Holmberg, J., and Rosen, I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J Hand Surg* **29**, 100, 2004.
16. Mersa, B., Ağır, H., Aydin, A., Sen, C. Comparison of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) with autogenous vein as a nerve conduit in rat sciatic nerve defects. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* **13**, 103, 2004.
17. Luis, A.L., Rodrigues, J.M., Lobato, J.V., Lopes, M.A., Amado, S., Veloso, A.P., Armada-da-Silva, P.A., Raimondo, S., Geuna, S., Ferreira, A.J., Varejão, A.S., Santos, J.D., and Maurício, A.C. Evaluation of two biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. *Biomed Mater Eng* **17**, 39, 2007.
18. Yoshitani, M., Fukuda, S., Itoi, S., Morino, S., Tao, H., Nakada, A., Inada, Y., Endo, K., and Nakamura, T. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. *J Thorac Cardiovasc Surg* **133**, 726, 2007.
19. Keilhoff, G., Stang, F., Wolf, G., and Fansa, H. Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* **24**, 2779, 2003.

-
20. Ashley, W.W.Jr., Weatherly, T., and Park, T.S. Collagen nerve guides for surgical repair of brachial plexus birth injury. *J Neurosurg* **105**, 452, 2006.
21. Hoffman, D., Wahlberg, L., and Aebischer, P. NGF released from a polymer matrix prevents loss of ChAT expression in basal forebrain neurons following a fimbria-fornix lesion. *Exp Neurol* **110**, 39, 1990
22. Evans, G.R., Brandt, K., Widmer, M.S., Lu, L., Meszlenyi, R.K., Gupta, P.K., Mikos, A.G., Hodges, J., Williams, J., Gurlek, A., Nabawi, A., Lohman, R., and Jr Patrick, C.W. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **20**, 1109, 1999.
23. Evans, G.R., Brandt, K., Katz, S., Chauvin, P., Otto, L., Bogle, M., Wang, B., Meszlenyi, R.K., Lu, L., Mikos, A.G., and Jr Patrick, C.W. Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seed with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **23**, 841, 2002.
24. Kiyotani, T., Teramachi, M., Takimoto, Y., Nakamura, T., Shimizu, Y., and Endo, K. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res* **740**, 66, 1996.
25. Bryan, D.J., Tang, J.B., Holway, H.A., Rieger-Christ, K.M., Trantolo, D.J., Wise, D.L., and Summerhayes, I.C. Enhance peripheral nerve regeneration elicited by cell-mediated events delivered via a bioresorbable PLGA guide. *J Reconstr Microsurg* **19**, 125, 2003.

-
26. Boccaccini, A.R., Blaker, J.J., Maquet, V., Day, R.M., and Jérôme, R. Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering* **25**, 23, 2005.
27. den Dunnen, W.F., van der Lei, B., Schakenraad, J.M., Blaauw, E.H., Stokroos, I., Pennings, A.J., and Robinson, P.H. Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide. *Microsurgery* **14**, 508, 1993.
28. Aldini, N.N., Perego, G., Cella, G.D., Maltarello, M.C., Fini, M., Rocca, M., and Giardino, R. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials* **17**, 959, 1996.
29. Flynn, L., Dalton, P.D., and Shoichet, M.S. Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4265, 2003.
30. Lundborg, G., Dahlin, L.B., Danielsen, N., Gelberman, R.H., Longo, F.M., Powell, H.C., and Varon, S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol* **76**, 361, 1982.
31. Lundborg, G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *J Hand Ther* **6**, 179, 1993.

-
32. Madison, R.D., da Silva, C.F., and Dikkes, P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res* **447**, 325, 1988.
33. Dohm, S., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O., Pesheva, P., Probstmeier, R., Walther, M., Neiss, W.F., Stennert, E., and Angelov, D.N. Local application of extracellular matrix proteins fails to reduce the number of axonal branches after varying reconstructive surgery on rat facial nerve. *Restor Neurol Neurosci* **16**, 117, 2000.
34. Rodríguez, F.J., Verdú, E., Ceballos, D., and Navarro, X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* **161**, 571, 2000.
35. Verdú, E., Labrador, R.O., Rodríguez, F.J., Ceballos, D., Forés, J., and Navarro, X. Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes. *Restor Neurol Neurosci* **20**, 169, 2002.
36. Yoshii, S., Oka, M., Shima, M., Taniguchi, A., and Akagi, M. 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Res* **949**, 202, 2002.
37. Koshimune, M., Takamatsu, K., Nakatsuka, H., Inui, K., Yamano, Y., and Ikada, Y. Creating bioabsorbable Schwann cell coated conduits through tissue engineering. *Biomed Mater Eng* **13**, 223, 2003.

-
38. Midha, R., Munro, C.A., Dalton, P.D., Tator, C.H., and Shoichet, M.S. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* **99**, 555, 2003.
39. Schlosshauer, B., Muller, E., Schroder, B., Planck, H., and Muller, HW. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res* **963**, 321, 2003.
40. Dresner, H.S., King, T.A., Clark, H.B., Juhn, S.K., and Levine, S.C. Peripheral facial nerve regeneration using collagen conduit entubulation in a cat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **115**, 631, 2006.
41. Matesz, C., Modis, L., Halasi, G., Szigeti, Z.M., Felszeghy, S., Bacskai, T., and Szekely, G. Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull* **66**, 526, 2005.
42. Keith, G.S., Julian, M.Y., and Peter, P.R. The effect of nerve growth factor on functional recovery after injury to the chorda tympani and lingual nerves. *Brain Research* **1020**, 62, 2004.
43. Vögelin, E., Baker, J.M., Gates, J., Dixit, V., Constantinescu, M.A., and Jone, N.F. Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology* **199**, 348, 2006.

-
44. An, Y.H., Woolf, S.K., and Friedman, R.J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* **21**, 2635, 2000.
45. Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., and Boccaccini, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* **27**, 3413, 2006.
46. Widmer, M.S., Gupta, P.K., Lu, L., Meszlenyi, R.K., Evans, G.R., Brandt, K., Savel, T., Gurlek, A., Jr Patrick, C.W., and Mikos, A.G. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* **19**, 1945, 1998.
47. Sundback, C., Hadlock, T., Cheney, M., and Vacanti, J. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials* **24**, 819, 2003.
48. Oh, S.H., and Lee, J.H. Fabrication and characterization of hydrophilized porous PLGA nerve guide conduits by a modified immersion precipitation method. *J Biomed Mater Res A* **80**, 530, 2007.
49. Mayhew, T.M., and Sharma, A.K. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J Anat* **139**, 59, 1984.
50. Bryan, D.J., Miller, R.A., Costas, P.D., Wang, K.K., and Seckel, B.R. Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* **92**, 927, 1993.

-
51. Borlongan, C.V., Skinner, S.J., Geaney, M., Vasconcellos, A.V., Elliott, R.B., and Emerich, D.F. Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke* **35**, 2206, 2004.
52. Guest, J.D., Rao, A., Olson, L., Bunge, M.B., and Bunge, R.P. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp Neurol* **148**, 502, 1997.
53. Wennersten, A., Holmin, S., Al Nimer, F., Meijer, X., Wahlberg, L.U., and Mathiesen, T. Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. *Exp Neurol* **199**, 339, 2006.
54. Belkas, J.S., Munro, C.A., Shoichet, M.S., and Midha, R. Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restor Neurol Neurosci* **23**, 19, 2005.
55. Bini, T.B., Gao, S., Xu, X., Wang, S., Ramakrishna, S., and Leong, K.W. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res A* **68**, 286, 2004.
56. Gámez, E., Ikezaki, K., Fukui, M., and Matsuda, T. Photoconstructs of nerve guidance prosthesis using photoreactive gelatin as a scaffold. *Cell Transplant* **12**, 481, 2003.

Figure captions

Figure 1 – Scanning electron microscopy view of tubular prostheses constructed by extrusion or membrane modeling. Observe the significant difference regarding the tube wall thickness in the extruded PCL conduit when compared to the alternative solvent-derived membrane technique. A-C represent the non-implanted tubes; D-F show the conduits 30 days after surgery. The insets show that the extruded PLC inner wall is completely preserved, while in the membrane-derived case, initial signs of degradation are already visible. Nevertheless, membrane-derived PLLA tubes showed no signs of degradation. G-I illustrate the tubes 60 days after surgery. Although the extruded PCL prosthesis displayed no perceptible indication of degradation, both PCL and PLLA membrane-derived tubes showed clear signs of degradation, as seen in the insets. Scale bar = 1.0 μ m. J-K represent the conduit immediately after implantation (J – membrane-derived PCL and K – membrane-derived PLLA). Observe that the membrane-derived tubes are transparent and the thin walls allow the proper fixation of the stumps. P = proximal stump; D = distal stump.

(Figura 1, página 92)

Figure 2 – Toluidine blue transverse semi-thin sections of the regenerated nerves inside the prostheses 30 and 60 days after surgery. In all groups implanted with biopolymers, the regenerative performance was significantly greater than with polyethylene. However, membrane-derived PCL conduits gave the best results 30 days after implantation. This performance was equaled by the extruded PCL tubes, 60 days after surgery. Scale bar = 15 μ m.

(Figura 2, página 94)

Figure 3 – Transmission electron microscopy view of the regenerated nerves inside the tubular prostheses 30 and 60 days after surgery. The morphology of regenerated axons as well as the surrounding microenvironment suggested a better regenerative performance by the PCL tubes. In this sense, axonal growth was faster in membrane-derived PCL tubes (30 days), which was equaled by extruded PCL 60 days after surgery. Nevertheless, no significant morphological differences were observed amongst the biopolymer-derived experimental groups. Scale bar = 1 μ m.

(Figura 3, página 96)

Figure 4 – **A.** The number of regenerated myelinated axons 30 and 60 days after tubulization in the different experimental groups. An initially better regenerative performance was observed by the membrane-derived PCL tubulization group. This difference was equaled by the extruded PCL group 60 days after surgery. However, both maintained a statistically significant better performance over the polyethylene tube as well as over the membrane-derived PLLA experimental groups. *=p<0.05; **=p<0.01; ***p<0.001. **B.** Comparison of the regenerative performance for each experimental group, 30 and 60 days after surgery. It is possible to observe that the membrane-derived PCL tube induced a faster and more prominent axonal regeneration in the first 30 days after implantation. *=p<0.05.

(Figura 4, página 98)

Figure 5 – Frequency distribution of the axonal diameter 30 and 60 days after surgery in the different experimental groups. In all cases, a similar pattern was observed, which indicates that the new method proposed herein gives the same standard results as compared to the extrusion technique. The mean values are presented with the standard error.

(Figura 5, página 100)

Figure 6 – Frequency distribution of the myelin thickness 30 and 60 days after surgery for the different experimental groups. In all cases, a similar pattern was observed, which indicates that the new method proposed herein gives the same regenerative conditions as compared to the extrusion technique. The mean values are presented with the standard error.

(Figura 6, página 104)

Figure 7 – Immunohistochemical analysis of regenerated nerves 30 days after surgery under the different experimental conditions. The expression of S100, a Schwann cell marker, as well as that of type IV collagen, laminin and neurofilament, revealed that the membrane derived tubes provided a regenerative microenvironment which resulted in an enhanced expression of such proteins, supporting the morphometrical data. Scale = 250 μ m.

(Figura 7, página 110)

Figure 8 - Immunohistochemical analysis of regenerated nerves 60 days after surgery, under the different experimental conditions. The expression of S100, a Schwann cell marker, as well as that of type IV collagen, laminin and neurofilament, was greater in comparison to the polyethylene conduits. Such results provide evidence that membrane-derived conduits may be regarded as an

alternative preparation method for tubular prostheses aiming at peripheral nerve regeneration.

Scale = 250 μ m.

(Figura 8, página 112)

Table I – Regenerated fiber count indicating that membrane-derived PCL tubes provided a significantly greater number of axons at 30 days after repair. Additionally, although less effective than membrane-derived PCL, membrane-derived PLLA and extruded PCL prostheses provided better regenerative performances as compared to the polyethylene tubes. Sixty days after surgery, there was a significant increase in the number of axons in the polyethylene and extruded PCL groups. On the other hand, this number was unaltered for the membrane-derived PCL and membrane-derived PLLA groups. At this survival point, the greatest regenerative performance was obtained with PCL, regardless of the tube construction meth

(Tabela 1, página 108)

11.1 Artigo Submetido

**EXPRESSION OF BASAL LAMINA COMPONENTS BY SCHWANN CELLS
CULTURED ON POLY(LACTIC ACID) (PLLA) AND POLY(CAPROLACTONE) (PCL)
MEMBRANES**

Amauri Pierucci¹; Eliana A. R. Duek² & Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira¹

¹Dep. de Anatomia / Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP,

²Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,

Campinas, SP / Brasil.

E-mail: alroliv@unicamp.br

Abstract

The present in vitro study investigated the expression of basal lamina components by Schwann cells cultivated on membranes produced with PLLA and PCL after solvent evaporation. Cultures of Schwann cells were prepared by a slight modification of the methods described by Brockes et al. (1979) and Assouline et al. (1983). Sciatic nerves from 1 or 2 day-old, decapitated Sprague Dawley rat pups were aseptically removed and dissected free from epineurium and contaminating tissue. Nerve segments were incubated in collagenase and further incubated in trypsin, all in hepes buffered Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium (HHBSS). After incubation, enzymes were inactivated by the addition of fetal calf serum. Cells were recovered by centrifugation in 3% BSA and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum. After centrifugation and resuspension in glial medium, the cells were seeded (15×10^4 cells/well) on PCL and PLLA membranes placed at the bottom of 24-well plates and maintained at 37°C with 5% CO₂. The purity of the cultures was evaluated with a Schwann cell marker antibody (anti-S-100). After one week, the cultures were fixed and processed for immunocytochemistry by using antibodies against type IV collagen, laminin I and II. Positive labeling against the studied molecules was observed, indicating that such biomaterials positively stimulate Schwann cell adhesion and proliferation. Overall, the present results provide evidence that membrane-derived of biodegradable polymers enhance the activity of such cells, positively influencing the peripheral nerve regeneration process. Moreover, such polymer-derived membranes may be regarded as an alternative for the construction of tubular prosthesis aiming at peripheral nerve regeneration.

Keywords: Laminin, type IV collagen, Biomaterials, PNS, Cell culture

INTRODUCTION

Peripheral nervous system regeneration is considered a highly complex phenomenon, which results in a chain of events expressed in a chronological and synchronized fashion, aiming at the readjustment of the lesioned nerve microenvironment (Barnes, 1985; Ide, 1996). Following a peripheral nerve lesion, a series of changes occur in the distal stump, namely the Wallerian degeneration. The main events at this stage are degeneration of myelin sheath and axons that were disconnected from the neuron cell body (Lunn *et al.*, 1990; Zochodne, 2000).

Schwann cells (SC) are the most important element during the events after peripheral nerve lesion. Soon after lesion there is an intense proliferation of such cells which together with macrophages, phagocytose myelin and axon debris in the degenerating axotomized microenvironment. Of pivotal importance is that SC organize themselves longitudinally forming the so called bands of Büngner (BB), that guide the growing axons to the target denervated organ (Ide, 1996; Stoll *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003).

Additionally to the BB formation, SC actively modify and reorganize the extracellular microenvironment of the lesioned nerve, as well as synthesize different neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), contributing to the recovery of the nerve homeostasis and providing support to the growing axons (Jessen & Mirsky, 1999; Zochodne, 2000).

Among the factors described above, certain elements of the extracellular matrix (ECM, e.g. collagen and laminins) effectively contribute to the regenerative process, since the nerve sprouts from the proximal stump express receptors which recognize these molecules that serve as substrate to the guided axonal elongation (Ide et al. 1983; Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999).

Up to date, several biodegradable synthetic materials have been investigated and implanted in different tissues. Among the studied polymers, the poly (-hydroxy acid) constitutes one of the most up-and-coming group of biomaterials. The important advantage of such biopolymers is the degradation process, based on de-esterification. In this sense, once degraded, the monomeric components of each polymer are removed from the body by natural pathways (Rezwan et al.; 2006). The most often utilized synthetic polymers are the poly(glycolic acid) (PGA), the poly(lactic acid) (PLA), the poly(lactic-co-glycolide) (PLGA) and the poly(caprolactone) (PCL) (Evans et al., 2002, Schimdt & Leach, 2003; Schlosshauer et al., 2003). These biomaterials display important properties regarding degradation rates, porosity and resistance to stress. Also, a critical characteristic is that they can be molded in different sizes and shapes (Evans, et al., 2002; Schimdt & Leach, 2003).

Taking into account the different properties of the biomaterials, the importance of the SC, as well as the components of the ECM to the success of the PNS regeneration, the present study investigated the expression of type I and II laminins and type IV collagen by SC cultured on membranes of PLLA and PCL. Such membranes were produced by solvent evaporation, providing a homogeneous and yet thin and resistant substrate for cell culturing. The results were analyzed by immunocytochemistry and scanning electron microscopy (SEM).

MATERIAL AND METHODS

Biopolymer membrane preparation

The membranes used in the present study were produced by the technique of solvent evaporation, as described by Aldini *et al.*, 1996. Briefly, 0.85g of PLLA (molecular weight = 300 kDa) and 1.65g of PCL (molecular weight = 100 kDa) (PURAC - Gerinchem, Holland). The biopolymers were dissolved separately in 33ml of solvent (dichloroethane, Merck, Darmstadt, Germany), so that the final concentrations were 2.5% and 5%, respectively (weight/volume). The solutions were left at room temperature for 12h and then poured into a flat glass chamber so that, after evaporation of the dichloroethane, a thin and uniform membrane was obtained (200µm). Eventual solvent residues were removed by placing the membranes in a vacuum chamber for 5 minutes. The obtained PLLA and PCL membranes were then cut to fit the diameter of the culture wells and were disinfected in 70% alcohol.

Culture of Schwann Cells

The SC cultures were prepared following the method described by Brookes *et al.*, (1979) e Assouline *et al.*, (1983), with slight modifications. Briefly, sciatic nerves from neonatal Sprague Dawley rats (n=10) were dissected out and freed from the epineurium and contaminating tissue. The nerves were then reduced into small fragments and incubated in collagenase and trypsin for 30 minutes at 37°C. The enzymes were inhibited with fetal calf serum and the tissue was triturated, filtrated, centrifuged and resuspended in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum. The medium was enriched with forskolin and pituitary

extract (10µg/ml, Sigma). The obtained cells were then seeded on 24 well culture plates containing the polymer membranes. After 24h of culturing, a further cell purification was performed by adding 10nM of cytosine arabinoside for 48h. The purity of the cultures was evaluated with the anti-S100 antibody (Dako, Glostrup, Denmark). The cultures, once purified, were maintained for one week and the medium was changed every second day.

Imunocitochemistry for basal lamina components

Following one week of culturing, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes (Merk) and washed twice in 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for 5 minutes. Preincubation with 1% bovine albumin for 45 minutes was followed by overnight incubation at 4°C with primary antisera (anti-S-100, anti-laminin I – double labeling against alpha 1 and beta 1 chains, anti-laminin II - double labeling against alpha 2 and beta 1 chains e anti-type IV collagen). After three rinses in PB, the cultures were incubated for 45 minutes at room temperature with secondary antibodies Cy-2 or Cy-3 conjugated donkey anti-goat or anti-rabbit according to the primary antibodies. After rinsing in PB, the preparations were mounted in a mixture of glycerol/PB (3:1) and examined in a Nikon inverted microscope equipped with epifluorescence and appropriate filter combinations for the fluorophores used.

Preparation for Scanning Electron Microscopy

The cultures were fixed in Karnovsky (2% glutaraldehyde e 1% paraformaldehyde in 0,1M cacodylate buffer, pH 7,4) for 15 minutes. A secondary fixation with 1% osmium tetroxide was performed, followed by buffer washing and dehydration in ethanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 15 minutes each step). The specimens were then taken at the critical point (Balzers, CTD030) and coated with gold for 120s at 20mA using a sputter coater, resulting in an approximate coating thickness of 40nm. The specimens were then viewed under a scanning electron microscope (Jeol, JXA 840A) operated at 10kV

RESULTS

Under phase contrast it was possible to observe that SC displayed the characteristic bipolar morphology with thin cell processes. The immunolabeling against S-100 revealed that the cultures were highly pure, as seen in Fig. 1.

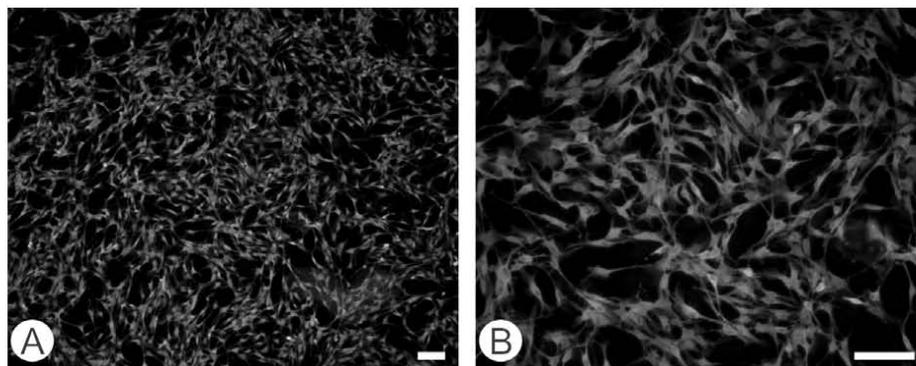


Figure 1 – A and B- Representative examples of purified Schwann cell cultures stained with anti-S100 antibody. Scale = 100 μ m.

An important observation was that the number of SC adhered to the PLLA was significantly greater when compared to the PCL biomembranes. Such a fact was also reinforced by the immunostaining against S-100, indicating that the tested biomaterials provided different adhesion conditions to the SC.

The scanning electron microscopy further revealed that the SC cultured on PCL presented less cytoplasmic branches over the substrate so that the cell body was less attached to the membrane. On the contrary, cells cultured on PLLA displayed several small cytoplasmic projections and were visibly more attached to the membrane. (Fig.2).

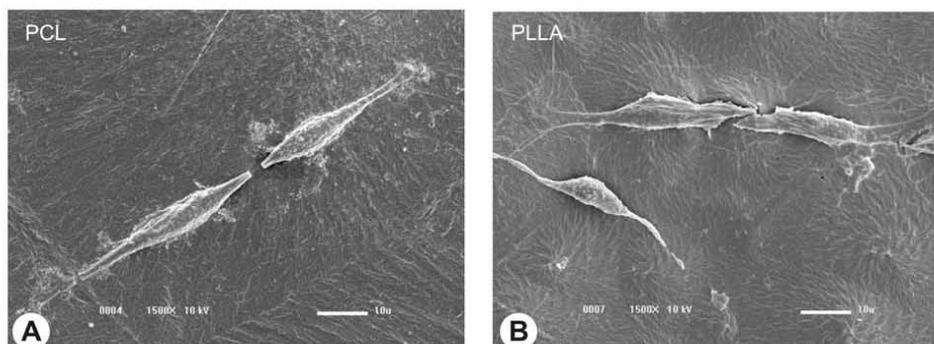


Figure 2 – A. Schwann cells cultured on PCL membranes. Observe that cells are not fully adhered to the substrate. B. Schwann cells cultured on PLLA membranes. Note the better adhesion to the substrate in comparison to PCL. Scale = 10 μ m.

The immunolabeling against laminin I and II was similarly intense regardless the biopolymer used (Fig. 3). Also, a strong immunoreactivity with the anti-collagen antiserum was observed in the SC culture in both PCL and PLLA membranes.

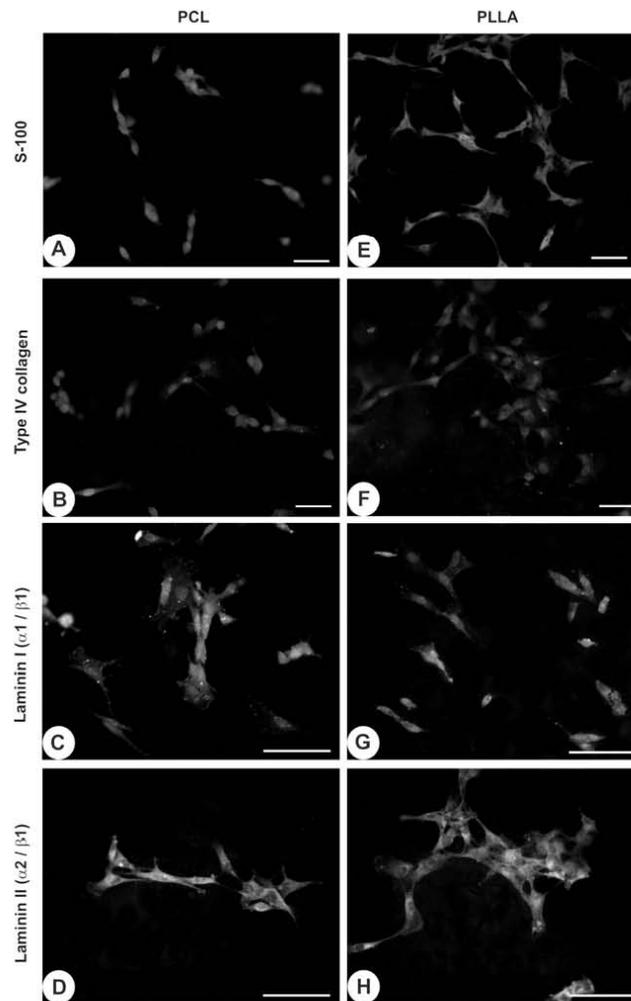


Figure 3 – Schwann cell culture immunolabeling on PCL and PLLA membranes. Observe the greater cell density of the cultures developed on PLLA substrate. Regarding laminin I and type IV collagen, immunostaining was similarly intense. Scale = 100 μ m.

DISCUSSION

The use of biomaterials has been regarded as an efficient alternative to allograft since it significantly reduces the risk of rejection and local inflammation (Guest *et al.*, 1997; Borlongan *et al.*, 2004; Wennersten *et al.*, 2006).

Also, the method of preparation of the biopolymer together with its intrinsic properties may influence its degradation rate, flexibility and cell adhesion, which in turn may positively stimulate the nerve regeneration process. (Aldini *et al.*, 1996; Rezwani *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2007). Additionally, Letourneau (1975), described that the interaction between axonal sprouts, orientation and growth are strongly influenced by adhesion molecules, neurotrophic factors and the adjacent substrate. In this way, the presence of SC as well as the synthesis of ECM molecules, such as laminin and collagen are of pivotal importance for axonal guided growth *in vivo* (Lietz *et al.*, 2006).

In line with this concept, the SC cultured on PLLA presented better adhesion, which provided a greater density of cells producing basal lamina components that are fundamental for the axonal regeneration. An important fact to be highlighted is that the better adhesion to the substrate results in synthesis of neurotrophic factors. In fact, Hurtado *et al.* (2006) demonstrated *in vitro* that SC cultured on porous PDLA resulted in greater production of neurotrophins.

Interestingly, Miller *et al.*, (2001) observed that addition of laminin to the surface of PDLA resulted in an increased cell adhesion as well as orientation of SC, similarly to that observed during the BB formation *in vivo*. Our results are in accordance to that since SC cultured on PLLA proliferated more and displayed a general parallel organization, compatible to what happens *in vivo* during the initial steps of the nerve regeneration process.

Another important aspect observed herein and by other authors (e.g., Sangsanoh *et al.*, 2007) is that the SC morphology may vary depending on the polymeric surface. As observed in our results, SC cultivated on a more hydrophobic substrate, namely the PCL membranes, displayed different morphologies than the ordinary bipolar profile. This may reflect negatively in the synthesis of neurotrophic factors and cell proliferation. Nevertheless, no difference was observed regarding laminin and collagen expression.

In summary, the present work shows that SC cultured on PCL and PLLA membranes display similar levels of laminin I and II and type IV collagen. However cell adhesion was better on PLLA indicating that such membranes may be used as a substrate for construction of prosthesis aiming at peripheral nerve repair after transaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), proc. 471832/2004-9. A.L.R.O. receives a fellowship from CNPq, proc. 304834/2006-8.

REFERENCES

- Aldini, N.N., Perego, G., Cella, G.D., Maltarello, M.C., Fini, M., Rocca, M., Giardino, R. (1996), "Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves", *Biomaterials*, 17(10), 959-962.
- Assouline, J.G., Bosch, E.P., Lim, R. (1983), "Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve: an immunoselective method using surfaces coated with anti-immunoglobulin antibodies", *Brain Res.*, 277(2), 389-392.
- Barnes, D.M. (1985), "What makes nerves regenerate? Many experimental strategies revolve around a central issue: What conditions promote regeneration and functional recovery in mammalian nerves?", *Science*, 230(4729), 1024-1025.
- Borlongan, C.V., Skinner, S.J., Geaney, M., Vasconcellos, A.V., Elliott, R.B., Emerich, D.F. (2004), "Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke", *Stroke*, 35(9), 2206-2210.
- Brookes, J.P., Fields, K.L., Raff, M.C. (1979) "Studies on culture rat Schwann cell. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve", *Brain Res*, 165(1), 105-128.
- Bunting, S., Di Silvio, L., Deb, S., Hall, S. (2005) "Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration", *Hand Surg. [Br]*, 30(3), 242-247.
- Evans, G.R., Brandt, K., Katz, S., Chauvin, P., Otto, L., Bogle, M., Wang, B., Meszlenyi, R.K., Lu, L., Mikos, A.G., Patrick, C.W. Jr. (2002) "Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seed with Schwann cells for peripheral nerve regeneration", *Biomaterials*, 23(3), 841-848.
- Guest, J.D., Rao, A., Olson, L., Bunge, M.B., Bunge, R.P. (1997) "The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord", *Exp Neurol.*, 148(2), 502-522.
- Hurtado, A., Moon, L.D.F., Maquet, V., Blits, B., Jérôme, R., Oudega, M. (2006) "Poly (d,l-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord", *Biomaterials*, 27(3), 430-442.
- Ide, C. (1996) "Peripheral nerve regeneration", *Neurosci. Res.*, 25(2), 101-121.
- Ide, C., Tohyama, K., Yokota, R., Nitatori, T., Onodera, S. (1983) "Schwann cell basal lamina and nerve regeneration", *Brain Res.*, 288(1-2), 61-75.
- Jessen, K.R. e Mirsky, R. (1999) "Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development", *TINS*, 22(9), 402-410.
- Letourneau, P.C. (1975) "Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation", *Dev. Biol.*, 44(1), 92-101.

- Lietz, M., Dreesmann, L., Hoss, M., Oberhoffner, S., Schlosshauer, B. (2006) "Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types", *Biomaterials*, 27(8), 1425-1436.
- Lundborg, G. (1993), "Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment", *J. Hand Ther.*, 6(3), 179-188.
- Lunn, E.R., Brown, M.C., Perry, V.H. (1990), "The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion", *Neurosci.*, 35(1), 157-165.
- Madison, R.D., Da Silva, C.F., Dikkes, P. (1988), "Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses", *Brain Res.*, 447(2), 325- 334.
- Miller, C., Shanks, H., Witt, A., Rutkowski, G., Mallapragada, S. (2001), "Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrate", *Biomaterials*, 22(11), 1263-1269.
- Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R. (2006), "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 27 (18), 3413-3431.
- Sakai, Y., Matsuyama, Y., Takahashi, K., Sato, T., Hattori, T., Nakashima, S., Ishiguro, N. (2007), "New artificial nerve conduits made with photocrosslinked hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration", *Biomed. Mater. Eng.*, 17(3), 191-7.
- Sangsanoh, P., Waleetorncheepsawat, S., Suwantong, O., Wutticharoenmongkol, P., Weeranantanapan, O., Chuenjitbuntaworn, B., Cheepsunthorn, P., Pavasant, P., Supaphol, P. (2007), "In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds", *Biomacromolecules*, 8(5): 1587-1594.
- Schlosshauer, B., Muller, E., Schroder, B., Planck, H., Muller, H.W. (2003), "Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration", *Brain Res.*, 963(1-2), 321-326.
- Schmidt, C.E. e Leach, J.B. (2003), "Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 5, 293-347.
- Stoll, G., Jander, S., Myers, R.R. (2002), "Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation", *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 7(1), 13-27.
- Sunderland, S. (1990), "The anatomy and physiology of nerve injury", *Muscle & Nerve*, 13(9), 771-784.
- Terenghi, G. (1999), "Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors", *J. Anat.*, 194, 1-14.

Wennersten, A., Holmin, S., Al Nimer, F., Meijer, X., Wahlberg, L.U., Mathiesen, T. (2006), "Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression", *Exp Neurol.*, 199(2), 339-47.

Zochodne, D.W. (2000), "The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves", *Muscle Nerve*, 9, S33-S38.

DECLARAÇÃO

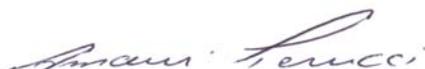
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de mestrado/doutorado intitulada "Influência dos polímeros poli caprolactona (PCL) e poli L-ácido lático (PLLA), sobre a expressão de componentes da membrana basal de células de Schwann *in vitro* e *in vivo*";

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 801-1). *ap 61412005*

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



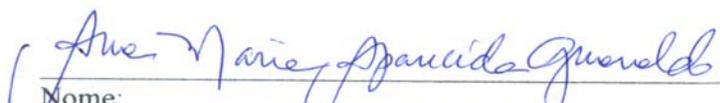
Aluno: Amauri Pierucci



Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEE/IB - UNICAMP