



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
MORFOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DA GALECTINA-3 EM EVENTOS  
DEGENERATIVOS E REGENERATIVOS DO  
NERVO CIÁTICO  
DE CAMUNDONGO**

***MARCELO SAMPAIO NARCISO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas

Rio de Janeiro

Abril, 2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**MORFOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DA GALECTINA-3 EM EVENTOS**  
**DEGENERATIVOS E REGENERATIVOS DO NERVO**  
**CIÁTICO DE CAMUNDONGO**

*MARCELO SAMPAIO NARCISO*

Tese de doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Morfológicas da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, desenvolvida no  
Laboratório de  
Neurodegeneração e Reparo

**Orientador: Prof<sup>ª</sup> Ana Maria Blanco Martinez**

**Rio de Janeiro**

**Abril, 2009**

**INFLUÊNCIA DA GALECTINA-3 EM EVENTOS DEGENERATIVOS E  
REGENERATIVOS DO NERVO CIÁTICO DE CAMUNDONGO**

***MARCELO SAMPAIO NARCISO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Morfológicas

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009 pela banca examinadora.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Blanco Martinez – Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cury El-Cheikh – Revisora e Suplente

---

Prof. Dr. Roger Chammas – Examinador

---

Prof. Dr. Mauro Pavão – Examinador

---

Prof. Dr. Jean-Christophe Houzel – Examinador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Rumjanek – Suplente

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Narciso, Marcelo Sampaio

**INFLUÊNCIA DA GALECTINA-3 EM EVENTOS DEGENERATIVOS E  
REGENERATIVOS DO NERVO CIÁTICO DE CAMUNDONGO/Marcelo**

Sampaio Narciso, Rio de Janeiro: UFRJ/PCM, 2009

xvii, 147 Páginas, 37 ilustrações, anexo (artigo)

Tese (Doutorado) – apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Área de Concentração: Neurociências.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Blanco Martinez

Referências Bibliográficas: páginas 129 a 134

Palavras-chave:

1. Nervo ciático. 2. Degeneração Walleriana. 3. Regeneração nervosa. 4. Célula de Schwann. 5. Galectina-3. 6.  $\beta$ -Catenina. 7. Macrófago

Esta tese de doutorado é absolutamente dedicada às duas pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais não haveria sentido para tanto:

Minha amada esposa Patricia Narciso, e meu amado “pixote”, Bernardo Narciso

Com todo o meu amor a vocês.

Como toda obra, uma tese de doutorado tem seus percalços, suas dificuldades, mas também oferece seus prazeres – principalmente com relação à convivência com as pessoas em um laboratório; apesar de qualquer eventual desalinho, é extremamente importante que mantenhamos sempre uma coisa que deve nos mover, e nos moverá sempre que puder – o bom humor. E não há síntese melhor para o bom humor do que um sorriso. Por isso, sempre que eu puder, eu vou oferecer o meu sorriso a você.

*Smile,*

*Though your heart is aching*

*Smile,*

*Even though it's breaking,*

*When there are clouds in the sky,*

*you'll get by*

*Sorria, embora seu coração esteja doendo*

*If you smile*

*Sorria, mesmo que ele esteja partido*

*Through your fears and sorrow, smile*

*Quando há nuvens no céu*

*And maybe tomorrow*

*Você sobreviverá...*

*You'll see the sun come shining through for you*

*Light up your face with gladness,*

*Se você apenas sorri*

*Hide ev'ry trace of sadness,*

*Apesar de sua aflição e seus medos, sorria*

*Altho' a tear may be ever so near,*

*E talvez amanhã*

*That's the time you must keep on trying,*

*Você verá o sol brilhando para você*

*Smile,*

*What's the use of crying,*

*Ilumine sua face com alegria*

*You'll find that life is still worthwhile,*

*Esconda qualquer sinal de tristeza*

*If you just smile*

*Mesmo que uma lágrima esteja próxima*

*É o momento em que você deve continuar tentando*

*Sorria,*

*Para que serve o choro?*

*Você vai descobrir que a vida ainda vale a pena*

*(Charles Chaplin)*

*Se você apenas sorrir.*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo na minha vida. Minha vida, minha saúde, meu trabalho, minha família e meus amigos. Muito obrigado, sempre.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Blanco Martinez, minha querida orientadora. Durante minha trajetória como orientando neste doutorado, uma das principais coisas que aprendi com a convivência com Ana foi ter um sentimento: o de devoção. Devoção à sua dedicação na forma como trata a nós, meros aprendizes da ciência. Devoção ao seu talento como orientadora, pesquisadora, professora, e “mãe científica”. Devoção ao seu espírito empreendedor para uma constante evolução no nosso aprendizado científico. Por imaturidade e ingenuidade, quase a perdi como orientadora, por causa de uma ilusão (e que ilusão!...). No entanto, soube voltar atrás e muito humildemente retomei meu caminho com Ana; por sorte, não tive que lidar com a sensação do arrependimento de ter jogado fora tamanha oportunidade. Muito pelo contrário, só tenho todo o orgulho do mundo em ter feito o mestrado e o doutorado com ela. Por isso, como sendo seu “filho mais velho”, quero lhe render uma breve e justa homenagem de ter tido a honra de ser seu orientando (e ainda o sou...), apesar de minhas falhas, teimosias, ataques e outras coisas. De quem certamente você nunca vai se livrar (no bom sentido!...), pois ainda vamos realizar muita coisa, porque nosso time tá “bombando” – e dele eu quero mais é vestir a camisa! –, meu eterno obrigado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Allodi, minha “dinda científica”, pela amizade e pelo carinho, e principalmente pela competência na arte de ser uma pessoa voltada para o ensino e a pesquisa, nunca deixando de nos estimular a trilhar direto e reto no caminho nesta universidade.

À Profa. Dra. Márcia Cury El-Cheikh, pela amizade e pela dignidade de uma grande profissional dedicada à ciência. Você é um exemplo a ser seguido, com sua honestidade e honradez de trabalhar com pesquisa. MUITÍSSIMO obrigado pela concessão dos animais *knockout* para galectina-3.

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo – Suelen Adriani Marques, Fernanda Almeida e Silmara Lima. No início, formávamos – eu, Suelen e Fernanda – um triângulo perigoso... E aí surgiu a Silmara, que rompeu um vértice desse triângulo e construiu nosso quadrado – mais perigoso ainda...

- a você, Suelen, pela amizade e companheirismo, pelos lanchinhos na happy hour assistindo ao terrível engarrafamento se formar em frente ao CCS, pelas dicas de sabedoria em momentos tão pertinentes, e pela ajuda fabulosa nas imunocitoquímicas, muito obrigado!

- a você, Fernanda, minha 2<sup>a</sup>. ariana favorita (a primeira é minha mulher, é claro...). O que seria de mim sem você toda vez que eu quisesse fazer paraformaldeído ou tampão fosfato????? Agora, lá vai você fazer tampão fosfato pro Benowitz....(risos...). Fora isso, meu muito obrigado por você ser minha amigona do peito! E que certamente vai me ajudar a escrever um capítulo do Narcisão...

- a você, Silmara, misto de doçura e seriedade, um verdadeiro exemplo de personalidade forte e poder de decisão, juntamente com uma simpatia irresistível. Bem-vinda ao “quadrado perigoso”, sempre!

Às demais colegas do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo: Fátima Rosalina, Flávia (muito obrigado pelos dias marcados no microscópio eletrônico!), Paula, Júlia, Cíntia (cintilante!!!), Bruna, Rafaela, pelos dias de convívio a continuar no nosso dia-a-dia no laboratório.

A Klaus Mostacada, super-cara, gênio das imagens. Sem ele, muita coisa do nosso super-trabalho não teria a beleza que tem. Valeu, irmão!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Mermelstein, juntamente com sua aluna de mestrado (hoje mestra) Carolina Soares, pela ajuda na confecção do immunoblotting em seu laboratório.

A Marco e a Venício, técnicos do laboratório da Profa. Dra. Taís Souto-Padrón, pela fundamental ajuda no manejo do microscópio eletrônico, sem a qual eu não adquiriria a confiança que tenho hoje em usar esse “monstro”.

E, finalmente, ao meu amigo Bruno Mietto.

O que é que eu vou falar desse cara?

Vocês, leitores, tenham a certeza de uma coisa: esse garoto vale ouro, prata, platina, e todo e qualquer metal precioso que alguém possa ter. Digo isso com toda a sinceridade de quem teve uma ajuda de 1000% (é, mil por cento!) durante quase toda a minha tese de doutorado. Esse cara, quando começou a participar do meu trabalho, entrou com uma garra que primeiramente me espantou, mas no melhor sentido, pois foi ele quem me estimulou a mergulhar de cabeça no contexto do nosso trabalho e, melhor ainda, no mundo da pesquisa. Com seu raciocínio rápido, suas perguntas incessantes, e sua inquietação interminável, Bruno me fez perceber que a pesquisa pode ser extremamente gratificante. Explico: minha essência, em função de minha formação, é de professor extremamente voltado para a didática e a graduação, através do que me preocupo com a formação de meus alunos. E o que o Bruno me proporcionou foi uma transformação: ele me ajudou a me transformar em um professor que também pode se dedicar à pesquisa. E isso me deixou extremamente feliz. Talvez eu não seja tão dedicado quanto ele é, pois seu futuro é brilhante como pesquisador (e, quem sabe, como professor também!). Mas, realmente, o melhor disso tudo foi ganhar um grande amigo, certamente para toda a vida.

Por isso, muito obrigado, Brunão! Valeu! Taí a tese que você ajudou a montar!

E, copiando a Silmara, “TAMU JUNTU!!!!!!”

## RESUMO

O sucesso da regeneração de nervos periféricos depende das propriedades intrínsecas dos neurônios e de um microambiente favorável, embora os mecanismos responsáveis pelos eventos moleculares durante a degeneração e a regeneração ainda não estejam completamente elucidados. As células de Schwann são consideradas como um dos melhores candidatos envolvidos no sucesso da regeneração de nervos periféricos. Estas células e macrófagos afluentes ao nervo periférico em degeneração são responsáveis pela remoção de resíduos de mielina e de axônios degenerados, criando uma rota apropriada para uma regeneração bem sucedida. Após injúria, as células de Schwann expressam galectina-3, e esta molécula tem sido correlacionada a eventos de fagocitose; além disso, em presença de galectina-3, existe uma inibição à proliferação das células de Schwann *in vitro*. No presente estudo, foram explorados os efeitos *in vivo* da ausência da galectina-3 sobre a degeneração Walleriana e a regeneração de fibras nervosas periféricas. Nervos ciáticos de camundongos normais e *knockout* para galectina-3 foram esmagados, e o padrão dos eventos de degeneração e regeneração foi acompanhado de 24 horas a 3 semanas. Foram analisados o número de fibras mielínicas, a área do axônio, a área da fibra nervosa, a área da mielina, e a razão G (*G-ratio*), além de microscopia eletrônica, e imunofluorescência para  $\beta$ -catenina, macrófagos e células de Schwann em cortes contracorados com DAPI. Camundongos *knockout* para galectina-3 apresentaram uma regeneração mais rápida das fibras nervosas periféricas, o que pode estar associado a um crescimento aumentado de células de Schwann e a expressão de  $\beta$ -catenina. Isto poderia favorecer a sobrevivência neuronal, seguido de uma mielinização mais rápida, e culminando em resultados morfológicos e funcionais melhores.

## ABSTRACT

The success of peripheral nerve regeneration depends on intrinsic properties of neurons and a favorable environment, although the mechanisms underlying the molecular events during degeneration and regeneration are still not elucidated. Schwann cells are considered one of the best candidates to be closely involved in the success of peripheral nerve regeneration. These cells and invading macrophages are responsible for clearing myelin and axon debris, creating an appropriate route for a successful regeneration. After injury, Schwann cells express galectin-3, and this has been correlated with phagocytosis; also, in the presence of galectin-3, there is inhibition of Schwann cell proliferation *in vitro*. In the present study we explored, *in vivo*, the effects of the absence of galectin-3 on Wallerian degeneration and nerve fiber regeneration. We crushed the sciatic nerves of galectin-3 knockout and wild-type mice, and followed the pattern of degeneration and regeneration from 24 h up to 3 weeks. We analyze the number of myelinated fibers, axon area, fiber area, myelin area, G-ratio, as well as electron microscopy, and immunofluorescence for  $\beta$ -catenin, macrophages and Schwann cells in DAPI counterstained sections. Galectin-3 knockout mice showed earlier functional recovery and faster regeneration than the wild-type animals. We concluded that the absence of galectin-3 allowed faster regeneration, which may be associated with increased growth of Schwann cells and expression of  $\beta$ -catenin. This would favor neuron survival, followed by faster myelination, culminating in a better morphological and functional outcome.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1 – Nervo periférico – esquema.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2 – Feixe nervoso – esquema.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 3 – Fotomicrografias de nervo periférico.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 4 – Feixe nervoso – fibras mielínicas e amielínicas – esquema.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 5 – Degeneração Walleriana – esquema.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 6 – Galectinas.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 7 – Nervos ciáticos – 48 horas pós-lesão – cortes semifinos.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 8 – Nervos ciáticos – 96 horas pós-lesão – cortes semifinos.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9 – Nervos ciáticos – 1 semana pós-lesão – cortes semifinos.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 10 – Nervos ciáticos – 3 semanas pós-lesão – cortes semifinos.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 11 – Nervos ciáticos – análise comparativa dos cortes semifinos.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 12 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>59</b>

<b>Figura 13 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 14 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 15 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 16 – Célula de Schwann em divisão – microscopia eletrônica.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 17 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 18 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 19 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 20 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 21 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 22 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>79</b>

<b>Figura 23 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 24 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 25 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 26 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 27 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal selvagem – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 28 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 29 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 30 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 31 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 32 – Nervo ciático – microscopia eletrônica – animal <i>knockout</i> para galectina-3 – 3 semanas pós-lesão.....</b>	<b>99</b>

**Figura 33 – Análise quantitativa.....102**

**Figura 34 – Nervos ciáticos – imuno-histoquímica para F4/80 e coloração com DAPI.....105**

**Figura 35 – Nervos ciáticos – imuno-histoquímica para  $\beta$ -catenina.....108**

**Figura 36 – Imunoblotting para F4/80 e  $\beta$ -catenina.....110**

**Figura 37 – Nervos ciáticos – imuno-histoquímica para S-100 e coloração com DAPI.....113**

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.....115**

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Estrutura Geral dos Nervos Periféricos.....</b>	<b>1</b>
<b>I.2. O Processo de Degeneração Walleriana.....</b>	<b>14</b>
<b>I.3. Regeneração de Fibras Nervosas Periféricas.....</b>	<b>19</b>
<b>I.4. As Galectinas – Galectina-3.....</b>	<b>22</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>II.1. Objetivos Gerais.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>III.1. Procedimento Cirúrgico e Obtenção de Amostras de Tecidos.....</b>	<b>31</b>
<b>III.2. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</b>	<b>32</b>
<b>III.3. Análise Quantitativa de Cortes Semifinos.....</b>	<b>33</b>
<b>III.4. Análise Funciona – Pistas de Caminhada.....</b>	<b>34</b>
<b>III.5. Imuno-Histoquímica e Quantificação de Núcleos Corados por DAPI.....</b>	<b>35</b>
<b>III.6. Immunoblotting para <math>\beta</math>-Catenina e F4/80.....</b>	<b>36</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>IV.1. Cortes semifinos.....</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.1. 48 horas pós-lesão.....</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.2. 96 horas pós-lesão.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.1.3. 1 semana pós-lesão.....</b>	<b>44</b>

IV.1.4. 3 semanas pós-lesão.....	47
IV.2. Análise Morfológica Qualitativa – Cortes Semifinos.....	50
IV.3. Cortes Ultrafinos – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	54
IV.3.1 – 96 horas pós-lesão.....	54
- Animais selvagens.....	54
- Animais <i>knockout</i> para galectina-3.....	55
IV.3.2 – 3 semanas pós-lesão.....	56
- Animais selvagens.....	56
- Animais <i>knockout</i> para galectina-3.....	56
IV.4. Análise Morfométrica.....	100
IV.5. Análise Funcional – Índice de Função do Nervo Ciático.....	100
IV.6. Análise Imuno-Histoquímica.....	103
IV.6.1. Macrófagos e $\beta$ -Catenina.....	103
IV.6.2. Células de Schwann.....	111
Tabela 1.....	115
V. DISCUSSÃO.....	116
VI. CONCLUSÕES.....	128
VII. REFERÊNCIAS.....	131
ANEXO – Artigo Científico.....	137

## I. INTRODUÇÃO

Após uma lesão em um nervo periférico, o coto distal degenera em um típico processo inflamatório conhecido como degeneração Walleriana. A capacidade do sistema nervoso periférico (SNP) em regenerar após uma injúria é bem conhecida; esta regeneração ocorre no coto proximal, o qual origina fibras regenerativas que podem ou não ter sucesso na reinervação do órgão-alvo. Um dos fatores associados ao sucesso da regeneração e da reinervação no SNP é a plasticidade das células de Schwann. No início do processo de degeneração Walleriana, estas células se destacam dos axônios e começam a fagocitar resíduos de mielina e de axônios, um processo que em seguida é continuado por macrófagos que migram para o interior do nervo lesado. Células de Schwann podem sobreviver após um trauma, e proliferam no interior de suas lâminas basais originais, formando as bandas de Büngner, que auxiliam a migração de brotamentos regenerativos em direção ao órgão-alvo a ser reinervado. Após uma injúria, as células de Schwann passam a expressar galectina-3, uma lectina específica para ligação a resíduos de galactose, e isto pode estar associado à fagocitose de mielina durante a degeneração Walleriana (Saada et al., 1996). O presente trabalho tem como objetivo geral estabelecer uma relação entre os diferentes aspectos morfológicos observados durante eventos degenerativos e regenerativos em nervo periférico de camundongos e a expressão de galectina-3 ou sua ausência.

### I.1. Estrutura Geral dos Nervos Periféricos

Os nervos periféricos são cordões esbranquiçados do sistema nervoso periférico que partem de regiões do encéfalo ou da medula espinal em direção a vários órgãos corporais. São estruturas formadas essencialmente por axônios de neurônios, organizados de forma paralela em uma quantidade variável de feixes ou fascículos nervosos (**Figura 1**); tais axônios

constituem fibras nervosas aferentes ou eferentes ao sistema nervoso central; as fibras eferentes têm origem a partir de corpos celulares de neurônios que formam aglomerados situados em diferentes regiões do encéfalo (mais especificamente o tronco encefálico, de onde parte a maioria dos 12 pares de nervos cranianos – com exceção do 1º. par [nervo olfatório], do 2º. par [nervo óptico], e do 11º. par [nervo acessório], que tem uma raiz craniana que sai do tronco encefálico, e uma raiz espinal que sai do limite entre o bulbo e a medula espinal) e da medula espinal (mais precisamente dos cornos anteriores ou ventrais) – no caso do sistema nervoso central –, ou ainda tais fibras nervosas partem de corpos celulares situados em gânglios do sistema nervoso periférico. O 2º. par de nervos cranianos (nervos ópticos) também constitui uma exceção sob um outro ponto de vista: os nervos ópticos são formados por fibras nervosas provenientes de neurônios ganglionares da retina; como a retina se desenvolve como uma projeção do diencéfalo, ela apresenta neurônios ganglionares cujos axônios têm sua bainha de mielina formada por oligodendrócitos, as quais são células gliais do sistema nervoso central. Portanto, os nervos ópticos não têm estrutura histológica típica de nervo periférico, apresentando-se com a estrutura dos tratos do sistema nervoso central. Quase todos os nervos periféricos se apresentam constituídos por fibras mielínicas e amielínicas, geralmente havendo predomínio de fibras mielínicas em nervos mais calibrosos, enquanto pequenos filetes nervosos podem ser constituídos predominantemente por fibras amielínicas. Além disso, a grande maioria dos nervos se apresenta constituída tanto por fibras nervosas motoras como por fibras nervosas sensitivas; da mesma forma, nervos de diferentes calibres (isto é, com diferentes quantidades de feixes nervosos) podem se apresentar predominantemente motores ou sensitivos, dependendo das aferências e eferências proporcionadas pela inervação específica de cada órgão ou região do corpo (Martin, 1996).

A estrutura histológica de um típico nervo periférico é baseada na organização dos envoltórios de tecido conjuntivo propriamente dito ao redor dos feixes nervosos. Cada nervo periférico apresenta-se como uma coleção de feixes ou fascículos nervosos, contendo

quantidades variáveis de axônios mielínicos e/ou amielínicos em disposição paralela, dependendo do calibre do nervo (**Figura 1**). Os feixes nervosos encontram-se agregados por um envoltório mais fibroso, formado por tecido conjuntivo denso não-modelado, denominado epineuro, contendo fibrilas colágenas geralmente em disposição paralela ao longo eixo do nervo, fibroblastos esparsos e fibras elásticas em pequena quantidade (Peters et al. 1991). O epineuro apresenta-se bastante vascularizado, contendo artérias, veias e capilares, e, dependendo do calibre do nervo, ocorre uma infiltração variável de tecido adiposo unilocular. No interior do nervo, cada feixe nervoso é individualizado dos outros a partir de um envoltório extremamente especializado, caracterizado como perineuro (**Figura 2**). O perineuro aparece nos cortes histológicos de rotina como uma fina camada que delinea o contorno de cada feixe nervoso, onde se nota uma pequena quantidade de núcleos achatados dispostos concentricamente. À microscopia eletrônica, o perineuro se apresenta constituído por cerca de 5 a 10 camadas de células achatadas (de acordo com a espessura do fascículo nervoso), unidas umas às outras na mesma camada, e cada camada é separada uma da outra por uma camada de fibrilas colágenas. O perineuro forma uma espécie de cápsula protetora de cada fascículo nervoso, impedindo que haja o acesso de eventuais substâncias tóxicas à sua estrutura íntima. Isto é proporcionado graças à ocorrência de junções de oclusão entre as células de cada camada do perineuro, formando a chamada barreira hematoneurosa. Desta forma, apesar da presença de junções de oclusão e de uma lâmina basal de cada lado de uma camada – o que fomenta a ideia de uma natureza epitelial por parte destas células – alguns autores consideram tais células como fibroblastos modificados. No interior do feixe nervoso, ocorre uma pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo, constituindo o endoneuro (**Figura 2**). No endoneuro intrafascicular ocorrem feixes dispersos de fibrilas colágenas e fibras elásticas, além de típicas células conjuntivas em pequena quantidade, tais como fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Em meio a estes componentes do tecido conjuntivo, ocorrem capilares sangüíneos do tipo contínuo. Além do tecido

**Figura 1 - Nervo periférico - esquema.** Esquema de um nervo periférico constituído por vários feixes ou fascículos de fibras nervosas (A1), sendo cada fascículo formado por um número variável de fibras nervosas (A2). Cada fascículo encontra-se individualmente envolvido pelas lamelas concêntricas do perineuro (A3); no interior de cada fascículo, as fibras nervosas encontram-se envolvidas por um delicado tecido conjuntivo, o endoneuro (A4). Em A5, observa-se a secção e remoção de parte do perineuro de um fascículo nervoso, de modo a expor o trajeto sinuoso das fibras nervosas em seu interior. Todo o conjunto de fascículos de um nervo apresenta-se envolvido pelo robusto tecido conjuntivo denso do epineuro (A6), rico em vasos sanguíneos (A7) e uma quantidade variável de tecido adiposo associado (A8). O retângulo indicado em A, e que corresponde à Figura B, mostra as fibras nervosas mielínicas (B1), com seus axônios (B2) e bainhas de mielina (B3) em corte longitudinal, além dos eventuais nodos de Ranvier (B4) perceptíveis nesse sentido de corte. Em B5 notam-se capilares em meio ao endoneuro. O quadrado indicado em C corresponde à Figura C, onde se observa um corte transversal de um feixe nervoso, onde podem ser evidenciadas estruturas tais como o perineuro (C1) deste feixe, assim como algumas fibras nervosas (C3) com seus axônios (C7) e bainhas de mielina (C6), e o tecido conjuntivo do endoneuro (C4) e seus capilares (C5). Parte do epineuro (C2) também está representada. Adaptado a partir de Krstić, 1988.

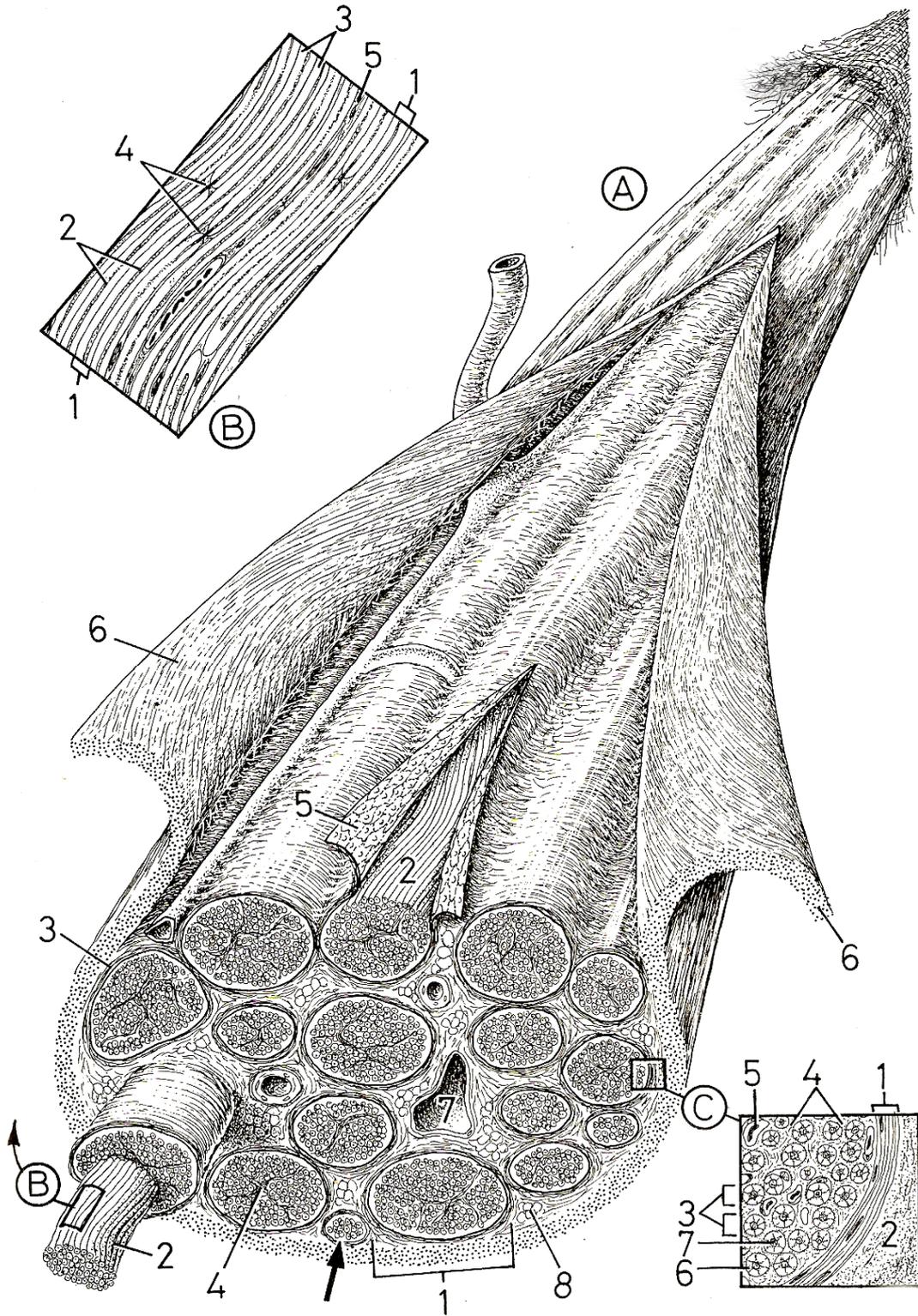


Figura 1

**Figura 2 - Feixe nervoso - esquema.** Esquema de um feixe ou fascículo nervoso de um nervo periférico. Observa-se seu perineuro (1), parcialmente seccionado e rebatido, de modo a se perceber sua organização em lamelas (2), constituídas de células alongadas e bastante adelgaçadas. As células do perineuro estão associadas umas às outras em cada lamela através de junções de oclusão (3), as quais representam em conjunto a barreira hematonervosa. Cada lamela do perineuro está apoiada sobre uma lâmina basal (5), o que sugere um caráter “epitelióide” a estas células, e cada lamela encontra-se separada uma da outra por numerosos feixes de delicadas fibrilas colágenas (6). No interior do fascículo, observa-se fibras nervosas mielínicas (7) e amielínicas (8), em meio a um delicado tecido conjuntivo frouxo, o endoneuro, contendo matriz extracelular representada, entre outros componentes, por fibrilas colágenas (12), e tipos celulares diversos, como eventuais fibroblastos (13). Células de Schwann proporcionam a organização das fibras mielínicas e amielínicas, apoiadas em sua lâmina basal (11). 4, Vesículas de pinocitose nas células perineurais; 9, Capilar com hemácia; 10, Mesaxônio externo de uma bainha de mielina formada por uma célula de Schwann mielinizante; 14, Tecido conjuntivo interfascicular proveniente do epineuro. Adaptado a partir de Krstić, 1988.

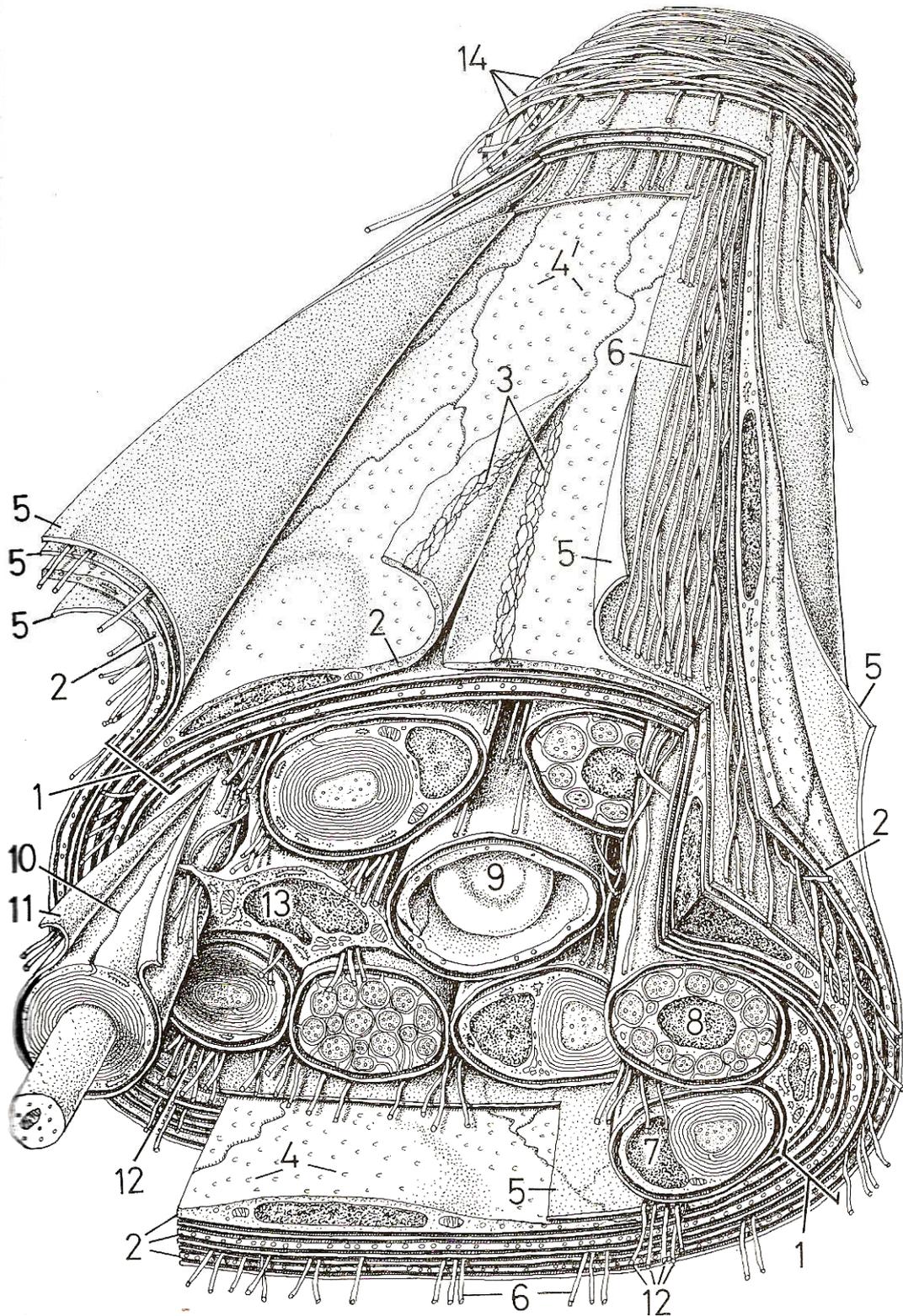
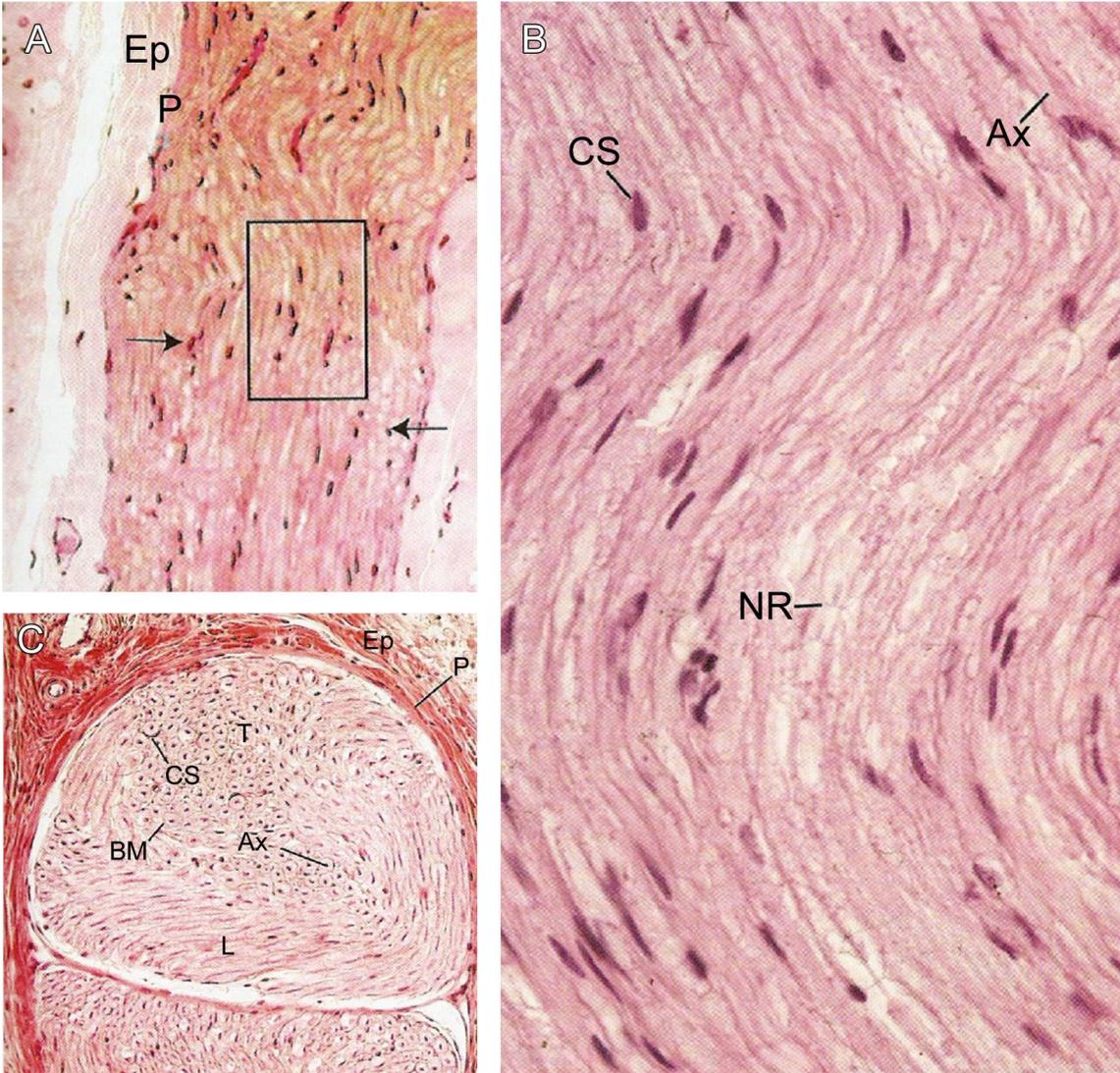


Figura 2

conjuntivo, considera-se também como parte do endoneuro o envoltório específico de cada fibra nervosa; este é constituído por uma típica lâmina basal, produzida pelas células de Schwann que se encontram associadas a cada axônio, e um delicado arcabouço de fibras reticulares (colágeno do tipo III), que se mescla com os demais componentes da matriz extracelular do endoneuro intrafascicular.

No interior de cada fascículo nervoso, as fibras nervosas se apresentam com aspectos característicos aos cortes transversais e longitudinais à microscopia de luz. Em cortes transversais corados em colorações de rotina, as fibras nervosas mielínicas geralmente apresentam o axônio retraído e, conseqüentemente, mal corado, como uma pequena estrutura central esférica, cercado por uma camada igualmente mal preservada representando a bainha de mielina, uma vez que, devido à constituição predominantemente lipídica da mielina, esta é removida em grande parte pelos solventes utilizados pelas técnicas de processamento de rotina para microscopia de luz (**Figura 3**). Fibras amielínicas, como são mais delicadas, são difíceis de serem distinguidas à microscopia de luz. O endoneuro se cora fracamente por entre as fibras nervosas. Aos cortes longitudinais, as fibras nervosas aparecem fracamente coradas em disposição paralela ou levemente ondulada; em boas preparações, é possível perceber delicadas constrições ao longo das fibras, as quais representam os nodos de Ranvier em fibras mielínicas. Os núcleos presentes são, certamente em sua maioria, de células de Schwann, os quais aparecem alongados e, portanto, dispostos paralelamente ao trajeto das fibras nervosas; tais núcleos observados entre as fibras nervosas também podem pertencer a eventuais células conjuntivas endoneurais. Cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$  de espessura) corados em azul de toluidina demonstram uma melhor preservação das fibras nervosas. Em cortes transversais, a bainha de mielina (mais bem preservada pelo tetróxido de ósmio, em função de sua constituição predominantemente lipídica) aparece como uma faixa de contorno circular bem corada ao redor de cada axônio, que se apresenta como um círculo claro centralmente localizado. Da mesma forma que em preparações em parafina, fibras amielínicas não conseguem ser bem

**Figura 3 - Fotomicrografias de nervo periférico.** A, Corte longitudinal de um feixe nervoso, circundado pelo tecido conjuntivo do epineuro (Ep) e delimitado pela camada de células achatadas do perineuro (P). O retângulo em destaque é visto em B (132x). B, Detalhe da região demarcada em A, mostrando o aspecto ondulado das fibras nervosas predominantemente mielínicas em disposição paralela com os núcleos alongados de células de Schwann (CS) em mesma disposição. Os axônios (Ax) são fracamente corados. NR, nodo de Ranvier (270x). C, Corte transversal de feixes nervosos delimitados pelo seu perineuro (P) e envoltos pelo epineuro (Ep). As fibras mielínicas aparecem em corte transversal (T) e longitudinal (L). Ao corte transversal, os axônios aparecem como um ponto central (Ax) circundado por um halo claro, que é a bainha de mielina (BM). Em corte longitudinal, os axônios são pouco aparentes em colorações de rotina. CS, células de Schwann. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Adaptado a partir de Gartner e Hiatt, 2007.



**Figura 3**

discernidas em cortes semifinos. Ao corte longitudinal, as fibras nervosas têm um trajeto levemente ondulado ou retilíneo, com as bainhas de mielina formando faixas alongadas bem coradas envolvendo os axônios, os quais aparecem como cilindros claros. Eventualmente, são percebidos nodos de Ranvier como constrições ao longo do trajeto das fibras mielínicas.

À microscopia eletrônica, as fibras nervosas do sistema nervoso periférico podem ser mais bem caracterizadas como mielínicas ou amielínicas. De modo geral, nos nervos periféricos, as fibras mielínicas costumam apresentar axônios mais calibrosos e mais abundantes, enquanto as fibras amielínicas ocorrem em quantidade menor e são representadas por axônios mais delicados (**Figura 4**). A ultra-estrutura geral do axônio demonstra a presença importante de componentes do citoesqueleto, sendo os mais facilmente caracterizáveis aos cortes ultrafinos os microtúbulos e os filamentos intermediários (tanto em cortes transversais como em cortes longitudinais). Ao corte longitudinal, os microtúbulos costumam se apresentar como delicados cilindros mais espessos que os neurofilamentos, os quais têm um aspecto mais filamentosos e delgado e ocorrem em quantidade maior em relação aos microtúbulos. Filamentos de actina também estão presentes, mas são poucos discerníveis em uma observação de microscopia eletrônica de rotina. A importância do citoesqueleto axonal remete a eventos de sustentação e manutenção do calibre axonal, visto que axônios mielínicos – os quais são frequentemente os mais calibrosos – apresentam-se com neurofilamentos mais espaçados uns dos outros, enquanto que axônios amielínicos apresentam seus neurofilamentos mais condensados. Em vertebrados, os neurofilamentos são compostos por três proteínas poliméricas relacionadas, com pesos moleculares aparentes de 68, 150, e 200 kD, por isso caracterizadas como NF-L (*light*), NF-M (*medium*) e NF-H (*heavy*), respectivamente (Peters et al., 1991). O componente NF-H pode apresentar diferentes graus de fosforilação dentro de diferentes setores de um mesmo neurônio, e, nos axônios, o espaçamento entre neurofilamentos é substancialmente maior onde se encontram níveis altos de fosforilação de NF-H. Portanto a mielinização de axônios pode estar relacionada ao

**Figura 4 - Feixe nervoso - fibras mielínicas e amielínicas - esquema.**

Representação esquemática em grande aumento de parte de um feixe ou fascículo nervoso de um nervo periférico. O perineuro (1) está representado com suas lamelas formadas por delgadas células de formato extremamente achatado (2), recobertas por sua lâmina basal (5), e feixes de fibrilas colágenas orientadas longitudinalmente (6) por entre as lamelas. Os números 3 e 4 indicam as principais junções intercelulares encontradas entre as células do perineuro, as junções de oclusão e os desmosomas, respectivamente. Muitas vesículas de pinocitose (7) podem ser vistas no citoplasma das células perineurais. A figura mostra ainda uma célula de Schwann não-mielinizante e seus delicados axônios amielínicos associados em sulcos na superfície de sua membrana plasmática (11); note o núcleo da célula de Schwann não-mielinizante em posição centralizada; abaixo, em 10, observa-se uma fibra mielínica, representada por um axônio mais calibroso envolvido por várias lamelas compactadas de mielina formadas por uma célula de Schwann mielinizante, com o núcleo situado periféricamente à mielina. 8 e 9, Componentes do tecido conjuntivo do epineuro; 12, Endoneuro intrafascicular; 13, Fibroblasto; 14, Endoneuro associado à fibra nervosa mielínica (lâmina basal e fibrilas colágenas). Adaptado a partir de Krstić, 1988.

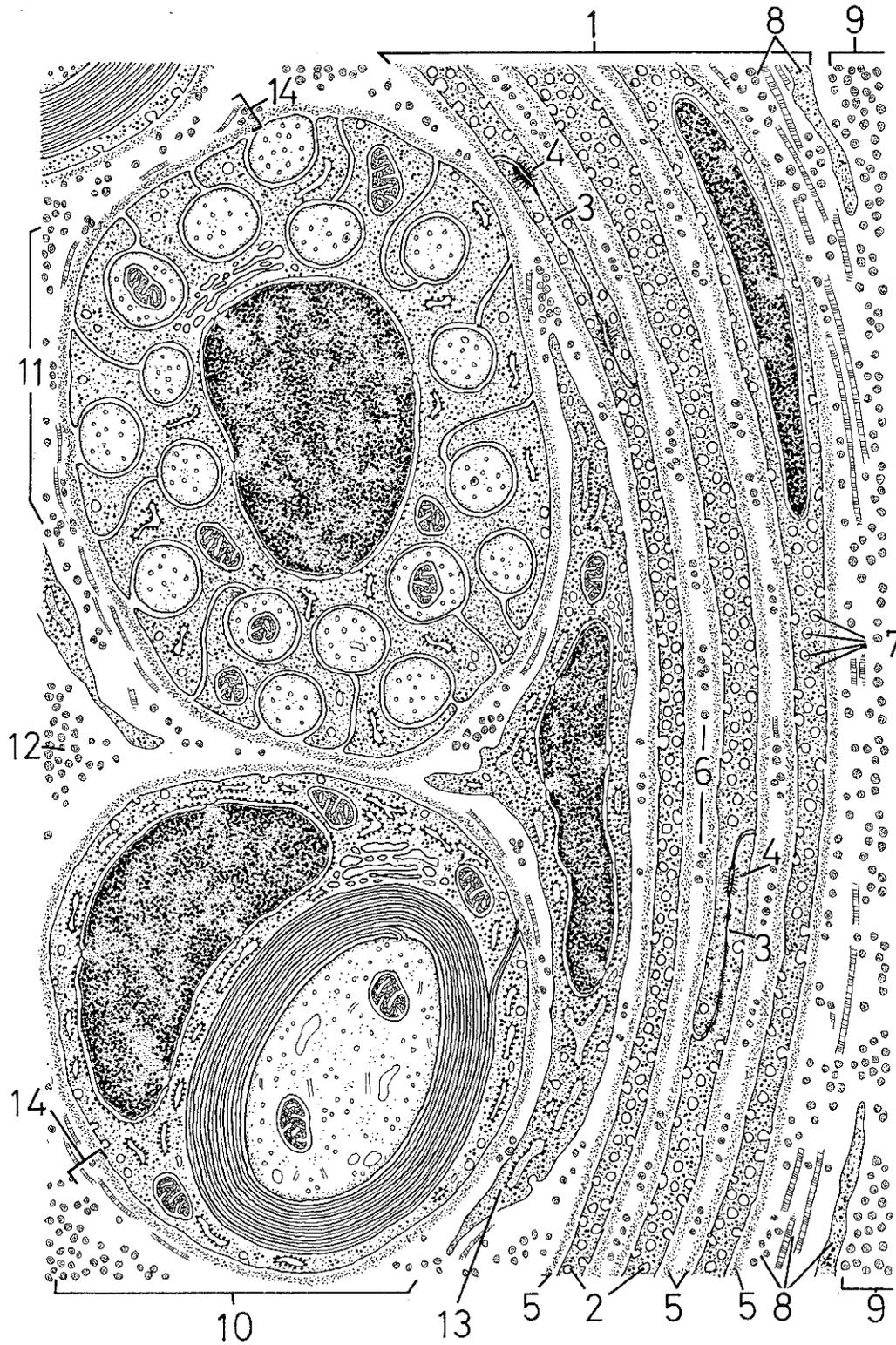


Figura 4

espaçamento e à quantidade aumentada de neurofilamentos (Hsieh et al., 1994). Por sua vez, os microtúbulos, além da sustentação intrínseca, têm um papel bastante significativo no transporte axoplasmático, os quais servem como “trilhos” para o deslocamento de organelas e vesículas em ambos os sentidos no axônio (ou seja, transporte anterógrado e retrógrado). O transporte de organelas é caracterizado como um transporte “rápido”, do qual participam proteínas motoras moleculares associadas a microtúbulos, tais como a quinesina e a dineína citoplasmática, que proporcionam o deslocamento das organelas de acordo com a polaridade apresentadas pelos microtúbulos e sua disposição no axônio, com a extremidade plus (mais) dos microtúbulos voltada para o terminal axônio e a extremidade minus (menos) direcionada para o corpo celular do neurônio (Peters et al., 1991).

## **I.2. O Processo de Degeneração Walleriana**

No contexto do sistema nervoso, o processo de degeneração Walleriana (DW) apresenta uma série de aspectos inflamatórios correlacionados ao desencadeamento e à evolução de uma lesão axonal, tanto no SNP como no SNC. A DW é caracterizada como um conjunto de alterações patológicas causadas por diferentes formas de lesão aos axônios (esmagamento, transecção, isquemia, entre outras), no qual se observa uma degradação dos segmentos distais dos axônios lesados, em relação ao local da lesão (**Figura 5**); tal degradação é representada, entre outras manifestações, por dissolução de componentes do citoesqueleto axonal, fragmentação da bainha de mielina e posterior remoção de restos celulares por células fagocitárias de caráter inflamatório (principalmente macrófagos derivados de monócitos emigrados da corrente sanguínea) e células de Schwann (Stoll e Muller, 1999). A DW tem, como uma de suas propostas, a vantagem de proporcionar aos axônios lesados a possibilidade de sua regeneração, de modo a haver o restabelecimento da função neuronal. No entanto, existem diversos fatores que influenciam de maneiras muito

**Figura 5 - Degeneração Walleriana - esquema.** Representação esquemática dos principais eventos relacionados ao processo de degeneração Walleriana no sistema nervoso periférico. O exemplo representado é de uma lesão por transecção, onde se observa que, após a separação do axônio em dois segmentos – o coto proximal (A1a) e o coto distal (A1b) – todo o coto distal sofre alterações degenerativas, de modo a sofrer uma extensa fragmentação, acompanhada com alterações da mielina. Logo em seguida, ocorre a chegada de macrófagos (B6), os quais, juntamente com as células de Schwann, se encarregam de fagocitar os resíduos mielínicos e axonais, de modo a limpar e preparar o terreno para a regeneração axonal. Nos cotos proximal e distal das fibras nervosas lesadas, as células de Schwann engrenam um processo proliferativo (B7) que culmina na formação das bandas de Büngner (C), que são colunas de células de Schwann que atuam como guias para o encaminhamento de brotamento axonais emergidos a partir do coto proximal visando o restabelecimento da inervação ao órgão-alvo. Conforme a regeneração axonal prossegue (D), brotamentos excessivos vão sendo eliminados, e o axônio regenerado sofre uma subsequente remielinização, com a formação de internodos de mielina mais delgados e mais curtos. No esquema, em 2, também podem ser observadas as alterações no corpo celular do neurônio lesado, o qual inicialmente sofre um processo de cromatólise (dissolução dos corpúsculos de Nissl = REG, que se reorganiza posteriormente). R. Nodo de Ranvier; 4, Placa motora; 8, Fibra muscular estriada esquelética. Adaptado a partir de Krstić, 1988.

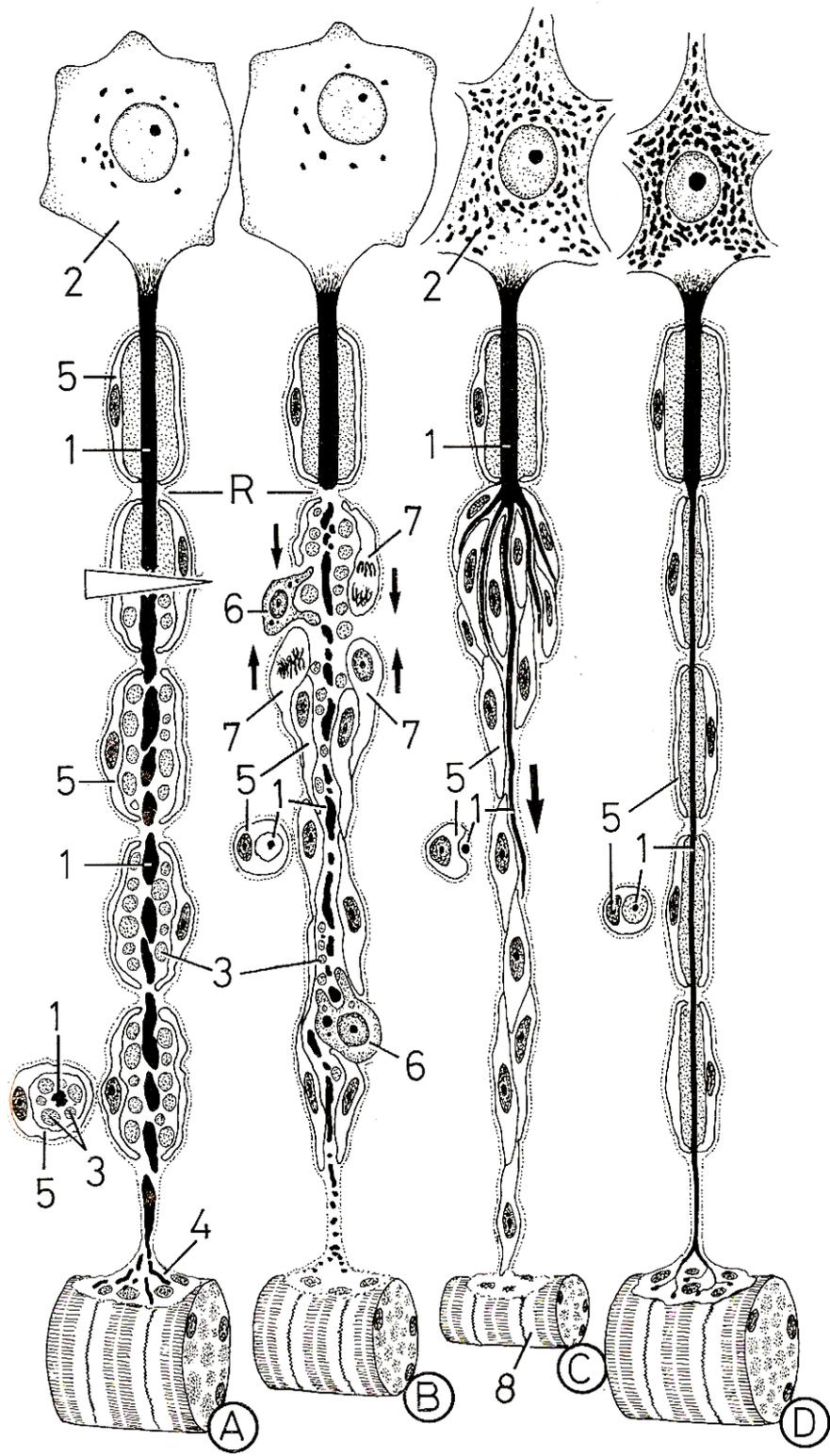


Figura 5

diferentes o potencial de regeneração das fibras nervosas. Não obstante as diferentes características inerentes ao microambiente no SNC e no SNP, que permitem diferentes comportamentos destas regiões quanto às possibilidades de regeneração, o grau e o tipo da lesão estão diretamente relacionados a estas possibilidades. No SNP, mecanismos de reparo podem restabelecer rapidamente as condições de condução de impulsos através de remielinização; tais mecanismos de reparo tendem a ser mais bem sucedidos em lesões por esmagamento.

Como uma resposta imediata à degeneração axonal no SNP, as células de Schwann inicialmente começam a ter a sua mielina fragmentada formando ovóides, e a seqüestrar pequenos fragmentos de mielina, fagocitando-os antes da chegada de macrófagos de origem hematogena no nervo lesado (Stoll e Muller, 1999). Após essa participação no auxílio à remoção de parte da própria mielina, as células de Schwann se dividem a partir do coto proximal (ou sobrevivem no coto distal) e originam as bandas de Büngner, que se organizam como colunas de células de Schwann envolvidas pela lâmina basal, as quais proporcionam uma espécie de via para a orientação de brotamentos axonais a partir do segmento proximal. A partir do 2<sup>o</sup> dia após o início do processo degenerativo, macrófagos de origem hematogena invadem o segmento distal do nervo e concluem a remoção da mielina. Os mecanismos de recrutamento de macrófagos para os sítios de DW ainda não estão totalmente esclarecidos, porém uma série de argumentos concorre para referendar a participação dessas células neste processo. Investigações recentes comprovam ainda o envolvimento de quimiocinas, como MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos-1) e seu receptor CCR2, no recrutamento específico de monócitos/macrófagos para o nervo periférico lesado (Toews et al., 1998; Siebert et al., 2000), tendo se observado, através de hibridização *in situ*, o RNAm da MCP-1 em células de Schwann (Toews et. al., 1998). A rede de citocinas correlacionadas aos processos de degeneração axonal teria como objetivo fundamental a ativação de macrófagos e de células de Schwann que proporcionem a fagocitose e a conseqüente remoção da mielina.

Ainda sobre a participação de citocinas na DW, admite-se que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sejam provavelmente as primeiras citocinas a serem produzidas após lesão axonal no SNP, *upregulated* em células de Schwann e, mais tardiamente, em macrófagos recrutados para lesão (Shamash et al., 2002).

De acordo com os experimentos de Reichert e colaboradores (1994), no decorrer da DW, tanto macrófagos como células de Schwann expressam galectina-3 (até então ainda denominada de MAC-2, considerada como uma lectina galactose-específica), a qual seria responsável pela fagocitose não-imunológica de mielina (caracterizada como lectinofagocitose, ou seja, fagocitose mediada por lectina). Tal fato foi comprovado a partir da inibição da fagocitose da mielina por galactose e lactose *in vitro* e também pela observação do curso da DW em camundongos Wld<sup>s</sup> (*slow Wallerian degeneration*), os quais apresentam um recrutamento lento de macrófagos para os segmentos distais dos nervos lesionados. Para tanto, a galectina-3 deve ser considerada como um marcador de ativação de macrófagos e de células de Schwann, muito embora estas últimas não expressem galectina-3 em nervos intactos (Reichert et al., 1994, Saada et al., 1996).

Os macrófagos desempenham um importante papel na imunidade inata e adquirida como fagócitos profissionais através da internalização e degradação de patógenos e de componentes teciduais e celulares em degeneração. Quando monócitos se diferenciam em macrófagos, ocorre um aumento da expressão de galectina-3, enquanto que, quando monócitos se diferenciam em células dendríticas, ocorre uma diminuição da expressão de galectina-3, sugerindo haver funções específicas desta proteína relacionadas a estágios de diferenciação da linhagem monocítico-macrofágica (Sano et al., 2003). A comprovação da importância da galectina-3 na fagocitose pelos macrófagos foi obtida em estudos utilizando-se animais transgênicos para galectina-3 (Sano et al., 2003). No sistema nervoso periférico, durante a degeneração Walleriana, ocorre um abundante influxo de macrófagos, provavelmente derivados de monócitos do sangue, em cerca de 24 horas após uma lesão

axonal. Com relação ao recrutamento dos monócitos/macrófagos ao local de lesões inflamatórias em tecidos não-neurais, sugere-se a interação de moléculas de adesão expressas pelo endotélio ativado (como ICAM-1) com integrinas expressas na superfície de monócitos, como a LFA-1 (ou integrina  $\alpha_L\beta_2$ ) e o CR3/MAC-1 (ou integrina  $\alpha_M\beta_2$ ), ou a interação destas integrinas com o endoneuro (Brown et al., 1997). Segundo investigações mais recentes (Avellino et al., 2004), os mecanismos de adesão entre monócitos e endotélio visando uma transmigração na invasão durante a DW parecem não depender de interações entre a ICAM-1 expressa pelo endotélio e as integrinas expressas pelos monócitos, embora tais moléculas sofram um aumento de expressão quando os monócitos/macrófagos começam a se infiltrar no nervo lesado. Além do mais, a atividade de citocinas hematopoiéticas, tais como GM-CSF, durante lesões em axônios periféricos, estaria também relacionado à ativação de macrófagos (Mirski et al., 2003). Apesar dos estudos, os mecanismos responsáveis pelo recrutamento de macrófagos durante a DW permanecem ainda não totalmente esclarecidos.

### **I.3. Regeneração de Fibras Nervosas Periféricas**

Os eventos regenerativos no sistema nervoso periférico são fundamentais para a recuperação estrutural e funcional das fibras nervosas. Antes de tudo, tais eventos merecem uma extensa atenção pelo fato de as fibras nervosas lesadas no sistema nervoso central não apresentarem o mesmo desempenho regenerativo, embora sejam dotadas de um relativo potencial para sua reestruturação morfológica e funcional. Em seguida, é preciso entender que diversas circunstâncias específicas estimulam de maneiras diferentes os processos regenerativos no sistema nervoso periférico. Após a interrupção axonal, o axônio distal na lesão começa a degenerar em 24 a 48 horas; em 72 horas após lesão, há uma robusta invasão do nervo por macrófagos, os quais, juntamente com células de Schwann, fagocitam os resíduos axonais e mielínicos, ao mesmo tempo em que estas últimas iniciam a formação de

fileiras celulares, conhecidas como bandas de Büngner, proporcionando assim um substrato para a regeneração, a qual ocorre a partir de brotamentos axonais derivados do segmento proximal do nervo lesado, onde são observados cones de crescimento em direção ao segmento distal (Waxman et al., 1995)

Além da ativação da capacidade de crescimento intrínseca por uma injúria em um nervo periférico, um dos fatores que mais bem propiciam esta capacidade regenerativa das fibras nervosas periféricas é o microambiente proporcionado pelas células de Schwann e seus eventuais produtos liberados. Conforme acima mencionado, as células de Schwann são capazes de sobreviver após um trauma, e proliferam no interior de suas lâminas basais originais, desprendem-se de seus axônios originais, e formam as bandas de Büngner, as quais servem de guias para o crescimento de brotamento axonais regenerativos. Conseqüentemente, a proliferação das células de Schwann é um objeto particular de interesse na compreensão dos eventos regenerativos do sistema nervoso periférico, uma vez que, o aumento das células de Schwann no ambiente neural é considerado como especificamente benéfico para a regeneração das fibras nervosas periféricas, além de o pico de proliferação de tais células ocorrer em torno de 4 dias após a injúria (Liu et al., 1995a; Liu et al., 1995b). Trabalhos recentes demonstram a sensibilidade *in vitro* das células de Schwann à presença de galectina-3 introduzida no meio de cultura de explantes de nervos, onde esta proteína inibiu a proliferação de tais células, fato que em modelos *in vivo* poderia apresentar um impedimento ou retardo à regeneração de fibras nervosas (Gustavsson et al., 2007). Apesar de tal proliferação ser enfatizada com relação à regeneração das fibras nervosas periféricas, experimentos com animais mutantes para ciclina D1 apresentaram regeneração e mielinização normais, sugerindo que a proliferação de células de Schwann não seria necessária para a recuperação funcional de nervos lesados (Yang et al., 2008).

Outros aspectos que favorecem a regeneração de fibras nervosas periféricas remetem à influência de componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento e citocinas

presentes no microambiente em um nervo lesado. Uma das moléculas mais frequentemente estudadas com relação à regeneração bem-sucedida de fibras nervosas periféricas é a laminina, de cujas 15 isoformas conhecidas a laminina 2 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ ) e a laminina 8 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) são expressas no endoneuro de nervos periféricos (Patton et al., 1997; Chen et al., 2007). Armstrong e colaboradores (2008, 2007) mostraram *in vitro* a ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B em células de Schwann em resposta à laminina como benéfica ao crescimento de neuritos, e também uma gradação comparativa da proliferação de células de Schwann em resposta a diferentes componentes da matriz extracelular (laminina > fibronectina > colágeno), igualmente como promotores do crescimento de neuritos. Apesar de tais experimentos, o papel da laminina na regeneração axonal não está claramente definido (Chen et al., 2007).

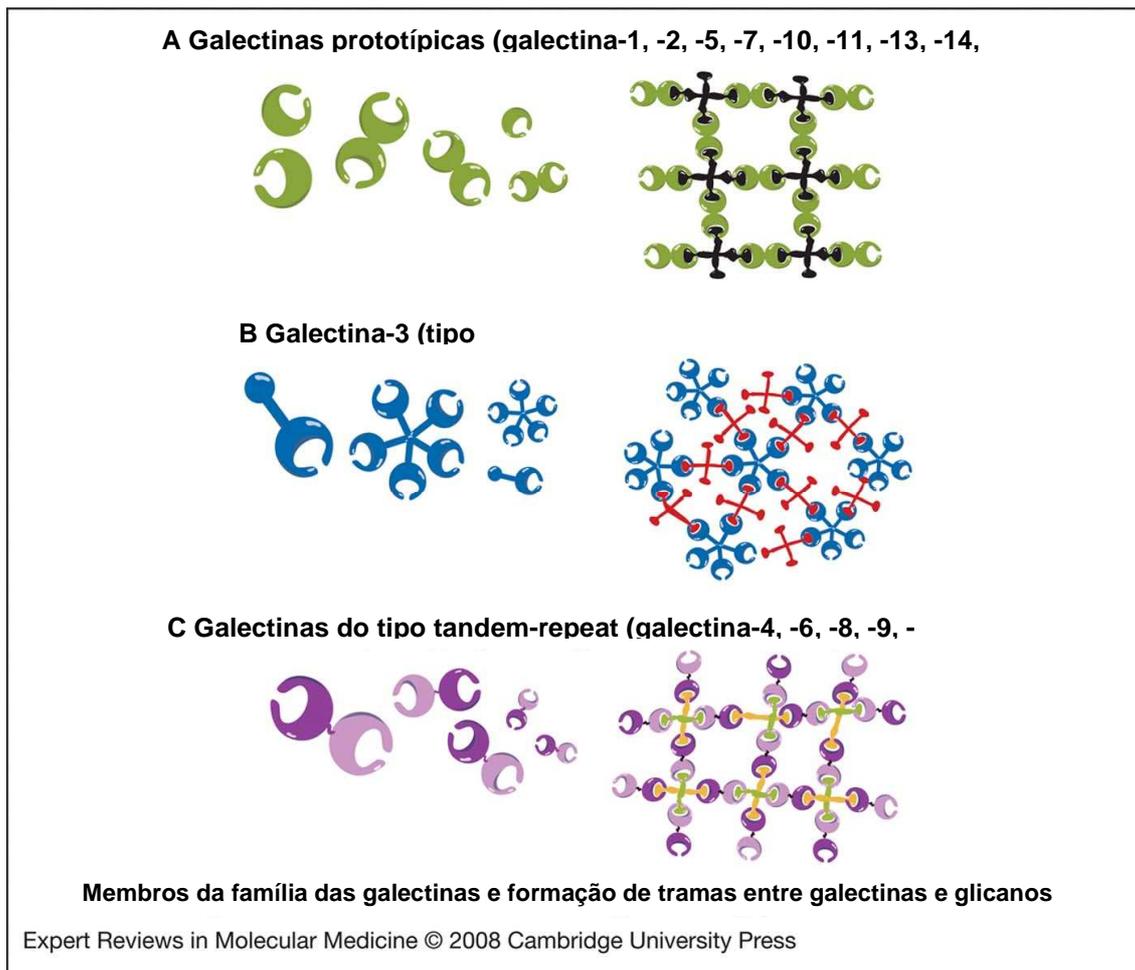
Vários fatores neurotróficos e citocinas vêm sendo implicados no estímulo à regeneração do sistema nervoso periférico. Neurotrofinas, tais como NGF e BDNF são *upregulated* após injúria em nervos periféricos, mas seu papel na regeneração de axônios periféricos ainda não está totalmente esclarecido (Makwana e Raivich, 2005; Markus et al., 2002; Snider et al., 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o fator de necrose tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) pode modular a resposta de células de Schwann à lesão no nervo e aumentar o efeito trófico das células de Schwann sobre axônios em crescimento (Sulaiman e Gordon, 2002), assim como a incubação deste fator de crescimento com células de Schwann cronicamente denervadas restabeleceu o fenótipo de sustentação do crescimento por essas células, consistente com a ideia de que a interação entre macrófagos e células de Schwann denervadas durante a DW seja essencial para sustentar a regeneração axonal por promover tal fenótipo em células de Schwann (Gordon et al., 2003).

#### I.4. As Galectinas – Galectina-3

As lectinas são proteínas de ligação a carboidratos, com uma forte afinidade por oligossacarídeos; elas são uma família moderadamente conservada de proteínas presente em organismos filogeneticamente distantes (Hsu e Liu, 2004). Entre os membros desta família, as galectinas são as mais bem caracterizadas; elas têm uma afinidade específica por  $\beta$ -galactosídeos, com pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, *carbohydrate recognition domain*) na extremidade carbóxi, a qual tem 135 aminoácidos de comprimento (Wada e Makino, 2001; Krześlak e Lipińska, 2004). As funções das galectinas têm sido extensamente estudadas a respeito de suas localizações variáveis nas células (citossol, núcleo, e outros compartimentos celulares). Como as galectinas podem ser secretadas na matriz extracelular, elas têm funções extracelulares, mediando uma variedade de processos, tais como desenvolvimento dos rins, angiogênese, função neural, metástases tumorais, e doenças autoimunológicas (Wada e Makino, 2001; Ochieng et al., 2004), incluindo processos inflamatórios, principalmente relacionados ao recrutamento de células e ativação fagocitária (Rabinovich e Rubinstein, 2001; Almkvist e Karlsson, 2004).

De acordo com o número e a organização dos CRDs, os membros da família das galectinas são classificados em três subtipos: o grupo protótipo, o grupo químera e o grupo tandem-repeat (Rabinovich et al., 2002, Yang et al., 2008). Os membros do grupo protótipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, e -14) contêm um domínio de reconhecimento de carboidratos. Os membros do grupo tandem-repeat (galectina-4, -6, -8, -9, e -12) são formados por uma única cadeia polipeptídica que forma dois CRDs distintos, porém homólogos, separados por uma sequência de ligação de até 70 aminoácidos. A galectina-3 é o único representante do grupo químera, contendo apenas um CRD conectado a um domínio N-terminal incomumente longo, rico em prolina e glicina (Dumic et al., 2006, Yang et al., 2008) (**Figura 6**). A galectina-3 possui afinidade pela lactose e pela N-acetil-lactosamina (LacNAc).

**Figura 6 - Galectinas.** Membros da família das galectinas e formação de tramas entre galectinas e glicanos. As galectinas podem ser divididas em três grupos: (a) as galectinas prototípicas, que contêm um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, carbohydrate-recognition domain); b) a galectina-3, uma galectina do tipo químera, a qual consiste em sequências em repetição (“tandem-repeat”) incomuns de curtos trechos ricos em prolina e glicina fundidos ao CRD; e c) galectinas do tipo “tandem-repeat”, as quais contêm dois CRDs distintos em sequência (“tandem”), conectados por um ligador. Muitas galectinas são bivalentes ou multivalentes com relação a suas atividades de ligação a carboidratos: galectinas com um CRD frequentemente existem como dímeros; a galectina-3 forma pentâmeros sob a ligação a carboidratos multivalentes; e galectinas com dois CRDs têm dois sítios de ligação a carboidratos. Desta forma, as galectinas podem formar tramas com glicoconjugados multivalentes. Adaptado a partir de Yang et al., 2008.



**Figura 6**

Como a maioria dos membros das famílias de galectinas, a galectina-3 atua como um receptor para ligantes contendo seqüências de poli-N-acetil-lactosamina, podendo também apresentar afinidade por oligossacarídeos mais complexos (Krześlak e Lipińska, 2004, Yang et al., 2008). Muitos estudos demonstraram a presença e a localização da galectina-3 em diferentes tipos celulares, tais como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, epitélios dos tratos respiratório e digestório, alguns neurônios sensoriais, e fibroblastos (Liu et al., 2002; Krześlak e Lipińska, 2004). A galectina-3 também pode se ligar a componentes da matriz extracelular (Krześlak e Lipińska, 2004; Ochieng et al., 2004). Dodd e Jessel (1986) relataram a expressão de moléculas de carboidratos na superfície de subpopulações funcionais de

neurônios de gânglios da raiz dorsal e do corno dorsal da medula espinal, muitos dos quais sendo reconhecidos por anticorpos monoclonais para epitopos de  $\beta$ -galactosídeos, de maneira similar à galectina-3.

As reais propriedades biológicas da galectina-3 são controversas, seja em sítios extracelulares ou intracelulares, ou mesmo no interior do núcleo (Dumic et al., 2006). Uma das hipóteses mais intrigantes sobre as funções da galectina-3 está relacionada à apoptose; em geral, a galectina-3 intracelular atua como um fator antiapoptótico, enquanto a galectina-3 extracelular apresenta uma ação pró-apoptótica (Yang et al., 2008). Achados recentes indicaram que a enzima glicogênio-sintetase-quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) fosforila tanto a galectina-3 como a  $\beta$ -catenina no citossol; este fenômeno pode ser um pré-requisito para a translocação da galectina-3 para o interior do núcleo, o que poderia sugerir um papel funcional para a galectina-3 na via de sinalização Wnt (Shimura et al., 2005). De acordo com relatos clássicos, as proteínas Wnt são moléculas sinalizadoras que atuam como mediadores locais que controlam aspectos do desenvolvimento animal. Os receptores para as proteínas Wnt pertencem à família Frizzled, os quais interagem com uma proteína intracitoplasmática caracterizada como *Dishevelled*; juntamente com um co-receptor (LRP, LDL-receptor related protein), o receptor Frizzled ativa a proteína *Dishevelled*. Em última análise, este mecanismo inativa a GSK-3 $\beta$ , resultando na inibição à degradação da  $\beta$ -catenina e seu acúmulo no citoplasma e núcleo (Alberts et al., 2002). Outros mecanismos da translocação nuclear da galectina-3 estão envolvidos com a expressão de genes relacionados ao câncer, e são governados por difusão passiva e transporte ativo (Nakahara et al., 2006; Nakahara e Raz, 2007). Uma ligação entre as funções intracelulares e extracelulares da galectina-3 pode ser avaliada pela regulação do ciclo celular; um exemplo foi demonstrado por Kim e colaboradores (1999), o qual induziu a superexpressão de galectina-3 em células epiteliais BT549 de mama humana, e observou que estas células sofriam uma perda da ancoragem celular (anoikis) sem morte celular detectável. Ademais, uma alta concentração de galectina-3

na superfície celular reduz a capacidade de adesão celular a proteínas da matriz extracelular, tais como laminina-1, colágeno do tipo IV, e fibronectina (Ochieng et al., 1998). Foi observado também que a galectina-3 no meio extracelular poderia mediar a adesão e/ou o crescimento de neuritos de células neurais e células tumorais, de forma similar a moléculas de adesão celular (Pesheva et al., 1998). Ademais, a expressão de galectina-3 tem sido freqüentemente relacionada à progressão de tumores malignos em diferentes órgãos (tireóide, mama, tubo digestivo, pâncreas, próstata, sistema nervoso, entre outros) (Krzéslak e Lipínska, 2004), e também a processos auto-imunes e inflamatórios (Rabinovich e Rubinstein, 2001). Devido aos múltiplos papéis da galectina-3 na tumorigênese (Liu e Rabinovich, 2005) e em outras funções celulares, incluindo os processos acima mencionados, é importante investigar os possíveis mecanismos responsáveis por tais processos.

A possibilidade de que as galectinas pudessem ser relevantes no contexto dos processos inflamatórios foi sugerida pela primeira vez para a galectina-3, que foi descrita como um antígeno de diferenciação (MAC-2) sobre a superfície de macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato, um potente agente inflamatório (Sato e Hughes, 1994; Rabinovich e Rubinstein, 2001). Além disso, a galectina-3 pode servir de elo entre neutrófilos e moléculas da matriz extracelular, através de sua ligação a carboidratos, ou ainda atuar como potente fator quimiotático ou até mesmo como opsonina, formando ligações cruzadas entre lipopolissacarídeos bacterianos (Almkvist e Karlsson, 2004). Experimentos com animais *knockout* para galectina-3 apresentaram uma marcante redução no número de leucócitos infiltrantes em resposta a agentes inflamatórios não-infectantes (Colnot et al., 1998; Almkvist e Karlsson, 2004). A galectina-3 parece ser de crucial importância para a manutenção dos neutrófilos no tecido inflamado. Estudos prévios demonstraram que a galectina-3 se liga às superfícies celulares de monócitos e macrófagos (Frigeri e Liu, 1992). Não obstante o fato de que a galectina-3 seja altamente “*upregulated*” em monócitos quando estes se diferenciam em macrófagos *in vitro* (Liu et al., 1995a), esta proteína pode estar

envolvida em processos de endocitose e apresentação de antígenos, pois experimentos com camundongos *knockout* para galectina-3 mostraram um retardo na fagocitose de eritrócitos por macrófagos (Sano et al., 2003). Além disso, existe uma habilidade cada vez mais comprovada de a galectina-3 promover o recrutamento e o conseqüente influxo de células inflamatórias e células apresentadoras de antígenos (APCs) para os sítios inflamatórios, atuando como molécula quimiotática e quimiocinética (Sano et al., 2000). Recentemente, foram demonstradas funções da galectina-3 relacionadas à remoção de neutrófilos apoptóticos, as quais enfatizam a atuação da galectina-3 como uma opsonina durante a remoção destas células por macrófagos, e a presença de altos níveis de galectina-3 em fluidos extracelulares nos sítios inflamatórios (Farnworth, 2008), fato considerado como crucial para a resolução do processo inflamatório (Karlsson et al., 2009). É notável ainda a capacidade de a galectina-3 exercer um importante papel na organização e na distribuição do colágeno em reações inflamatórias do tipo granulomatosa, onde são observadas alterações de tamanho e disposição de fibras colágenas em granulomas de fase crônica em animais *knockout* para galectina-3 (Oliveira et al., 2007). Finalmente, o artigo de Ferraz e colaboradores (2008) enfatiza o controle do equilíbrio de vias da imunidade inata pela galectina-3 por interferir na produção de IL-1 $\beta$ , onde foi demonstrado que camundongos gal-3<sup>-/-</sup> são mais resistentes a infecções pela bactéria *Rhodococcus equi* e que esta resistência está associada a uma produção mais alta de citocinas por macrófagos de animais gal-3<sup>-/-</sup>.

A realização deste trabalho foi grandemente motivada por trabalhos clássicos desenvolvidos por Rotshenker e colaboradores (1994, 1996), nos quais foi enfatizada a descrição da expressão de galectina-3 (até então mais conhecida como MAC-2) por células de Schwann e macrófagos após uma lesão em nervo periférico, além de seu envolvimento no mecanismo não-imunológico de fagocitose de resíduos mielínicos (lectinofagocitose). Partindo do pressuposto de que a expressão de galectina-3 seria fundamental para uma boa remoção de resíduos mielínicos durante os eventos precoces da degeneração Walleriana, a

utilização de um modelo animal que não expressasse a galectina-3 proporcionaria um importante contraste com relação aos processos degenerativo e regenerativo normais no sistema nervoso periférico, uma vez que, após uma lesão, a regeneração no sistema do sistema nervoso periférico – normalmente bem sucedida em circunstâncias adequadas – é bastante dependente de um adequado processo de limpeza dos resíduos axonais e mielínicos, tanto por macrófagos mobilizados da partir de monócitos recrutados da corrente como por células de Schwann, o que proporcionaria uma rota ideal para o restabelecimento estrutural de axônios a partir de brotamentos advindos do coto proximal, juntamente com seus envoltórios efetuados por células de Schwann. Para tanto, este trabalho propõe os objetivos relacionados a seguir.

## II. OBJETIVOS

### II. 1. Objetivos Gerais:

- Estudar a correlação da galectina-3 com o desencadeamento e a evolução de processos intrínsecos relacionados à degeneração Walleriana e regeneração de nervos periféricos, utilizando como modelo experimental camundongos transgênicos, da linhagem C57/Black6, de genótipo negativo para a galectina-3 (Gal-3<sup>-/-</sup>), estabelecendo aspectos comparativos com animais positivos da mesma linhagem.

### II. 2. Objetivos Específicos:

- Demonstrar, através de microscopia eletrônica de transmissão, os eventos degenerativos e regenerativos de nervos ciáticos de camundongos C57/Black6, de linhagens positiva e negativa para galectina-3 (gal-3<sup>+/+</sup> e gal-3<sup>-/-</sup>, respectivamente) submetidos a lesão por esmagamento (“*crush*”), com tempos de sobrevida de 48 horas (2 dias), 96 horas (4 dias), 168 horas (7 dias – 1 semana) e 3 semanas.

- Caracterizar, através de microscopia óptica com cortes semifinos, e também a caracterização ultra-estrutural à microscopia eletrônica de transmissão, dos aspectos morfológicos das alterações estruturais sofridas pelas fibras nervosas em nervos ciáticos de camundongos C57/Black6, de linhagens positiva e negativa para galectina-3 (gal-3<sup>+/+</sup> e gal-3<sup>-/-</sup>, respectivamente) submetidos a lesão por esmagamento (“*crush*”), com tempos de sobrevida de 96 horas (4 dias) e 3 semanas.

- Caracterizar, através de imunocitoquímica e *immunoblotting*, a provável correlação entre o aumento de expressão de  $\beta$ -catenina e a de galectina-3 em fibras nervosas em nervos ciáticos de camundongos C57/Black6, de linhagens positiva e negativa para galectina-3 (gal-3<sup>+/+</sup> e

gal-3<sup>-/-</sup>, respectivamente) submetidos a lesão por esmagamento (“*crush*”).

- Comparar a recuperação funcional de nervos ciáticos de camundongos C57/Black6, de linhagens positiva e negativa para galectina-3 (gal-3<sup>+/+</sup> e gal-3<sup>-/-</sup>, respectivamente) submetidos a lesão por esmagamento, através da avaliação funcional (índice de função do nervo ciático).

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. Procedimento Cirúrgico e Obtenção de Amostras de Tecidos

Camundongos C57/Black6 selvagens e *knockout* para galectina-3 (*gal-3*<sup>-/-</sup>) foram usados (n = 12 para cada). Os camundongos C57/Black6 e *gal-3*<sup>-/-</sup> (cruzados com C57/Black6 por 10 gerações) (Hsu et al., 2000) foram obtidos de colônias produzidas no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a partir de estoque originalmente fornecido pelo Department of Dermatology, School of Medicine, University of California, Davis, Sacramento, Califórnia, EUA. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Cuidados Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo número DHEICB003). Os animais foram inicialmente anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg) por via intraperitoneal, e em seguida posicionados em decúbito ventral sobre uma plataforma de cortiça. Após uma incisão cirúrgica na pele do membro inferior e dissecação da musculatura, o nervo ciático direito foi exposto e esmagado por 30 segundos com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Em seguida, a musculatura e a pele foram suturadas, e os animais foram devolvidos para suas gaiolas. Após períodos de 48 horas (2 dias – 4 animais), 96 horas (4 dias – 4 animais), 168 horas (1 semana – 4 animais), ou 3 semanas (12 animais), os animais foram perfundidos por via intracardíaca com uma solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Foi realizada uma incisão ao nível do processo xifóide e, em seguida, o diafragma foi cortado e o gradil costal aberto, sendo devidamente rebatido para trás para a exposição do coração na caixa torácica. O coração foi segurado com o auxílio de uma pinça e teve o seu ápice ventricular

perfurado com uma agulha de “scalp” para que a solução de perfusão pudesse ser injetada no ventrículo esquerdo, de modo a ser carregada por via circulatória através da aorta para todo o organismo. A quantidade de solução fixadora a ser utilizada na perfusão variou de 50 a 100 ml por animal. Após o término da perfusão, o local de incisão prévia foi reaberto e três segmentos do nervo ciático direito lesado foram coletados para microscopia eletrônica – um primeiro segmento, mais próximo ao local da lesão, e mais longo (com cerca de 2 mm) para ser submetido a corte longitudinal, e dois outros segmentos seguintes, mais curtos (com cerca de 1 mm), os quais foram submetidos a corte transversal. O local da lesão no nervo foi desprezado com o restante do nervo. Como controle, foram coletados três segmentos de mesmo nível do nervo lesado esquerdo, não-lesado. Os segmentos dos nervos foram imersos em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de cálcio 0,1 M, e em seguida processados para microscopia eletrônica de transmissão, e incluídos em resina Polybed (Epon). Cortes semifinos (de 1  $\mu$ m de espessura) foram obtidos em um ultramicrotomo RMC MT-6000, corados em solução de azul de toluidina a 1%.

### **III.2. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão:**

Os fragmentos dos nervos direito e esquerdo (lesado e não-lesado, respectivamente) foram imersos em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de cálcio 0,1 M. Após uma fixação de cerca de 24 horas, os fragmentos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão.

Em seguida à fixação com glutaraldeído, os fragmentos foram submetidos à pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio e cloreto de cálcio, por uma hora. Após a osmicação, foi realizada a contrastação em bloco com acetato de uranila a 1%

por 2 horas, para em seguida proceder-se a desidratação na série de acetonas de 30% a 100%. Os fragmentos foram submetidos a cada acetona por 7 minutos, em duas vezes seguidas, sendo que ao final da desidratação, a acetona a 100% foi utilizada por duas vezes durante 15 minutos. A seguir, os fragmentos foram imersos em uma solução 1:1 de acetona 100%-resina Epóxi (Epon), onde foram deixados “*overnight*”. No dia seguinte, a solução de acetona 100% e Epon foi substituída por Epon puro, e o material então foi deixado “*overnight*”, quando então, no dia seguinte, foi incluído em Epon puro em forminhas e levado à estufa a 60°C por 72 horas, para que ocorresse a polimerização da resina. Os blocos confeccionados foram devidamente aparados e, posteriormente, destes foram obtidos cortes semifinos com espessura de 1 µm, em ultramicrotomo RMC MT-6000, e corados com azul de toluidina a 1% em água e observados em um microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 Plus. Os cortes ultrafinos foram obtidos do mesmo micrótomo, com espessura entre 60 a 70 nm. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre com 300 quadrículas e contrastados com acetato de uranila (solução aquosa a 5%) durante 30 minutos e citrato de chumbo durante 10 minutos. Os cortes foram analisados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Zeiss 900.

### **III.3. Análise Quantitativa de Cortes Semifinos**

Para a análise morfométrica, foram selecionadas 5 (cinco) áreas dos cortes semifinos, a um aumento de 1.000x, usando o programa Axiovision Rel. 4,5. Para cada amostra, foram calculados e comparados os seguintes parâmetros entre os grupos, usando o programa Image Java: o número de fibras mielínicas, a área da fibra nervosa, a área do axônio, e a área da mielina. A área da mielina foi calculada subtraindo-se a área do axônio da área da fibra.

Também foi calculada a razão G (*G ratio*) através da divisão da área do axônio pela área da fibra, e os resultados foram distribuídos em faixas de 0,0-0,4, 0,4-0,5, 0,5-0,6, 0,6-0,7, 0,7-0,8 e 0,8-0,9. Quando do uso destas faixas, os menores valores foram sempre incluídos e os maiores excluídos (por ex., a faixa 0,0-0,4 inclui de 0,0 a 0,399, excluindo 0,4). Os resultados destas quantificações foram analisados estatisticamente usando o programa BioEstat 4,0 (Mamirauá, Brasil) e o teste Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .

#### **III.4. Análise Funcional – Pistas de Caminhada**

Antes da cirurgia e 1, 2 e 3 semanas após a cirurgia, todos os animais foram submetidos a uma análise da caminhada pós-operatória, baseado no protocolo descrito por Inserra e colaboradores (1998). As impressões das pegadas foram registradas através do tingimento das patas traseiras de cada animal com tinta nanquim. Em seguida, os animais foram postos para caminhar ao longo de uma pista de 45 x 65 cm sobre papel branco (Canson A4 140 g/m<sup>2</sup>). As impressões das pegadas foram analisadas considerando dois diferentes parâmetros: o espalhamento dos dedos (ED), ou seja, a distância entre o primeiro e o quinto dedos; e o comprimento da pegada (CP), a distância entre o terceiro dedo e o coxim plantar da pata traseira. Todos os parâmetros foram medidos para as pegadas da pata direita e da esquerda, tanto para animais selvagens como para animais *knockout* para galectina-3. Estas medições foram calculadas de acordo com a fórmula do índice funcional do nervo ciático (IFNC), por Inserra e colaboradores (1998):

$$\text{IFNC} = 118,9 \frac{\text{EED-NED}}{\text{NED}} - 51,2 \frac{\text{ECP-NCP}}{\text{NCP}}$$

onde ED = espalhamento do dedo em mm, CP = comprimento da pegada em mm; E e N indicam a pata lesada e a pata normal, respectivamente. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste Mann-Whitney. Um valor  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

### III.5. Imuno-Histoquímica e Quantificação de Núcleos Corados por DAPI

Após dissecação e pós-fixação por 4 horas em solução fixadora fresca de paraformaldeído a 4%, os nervos ciáticos foram crioprotetidos em sacarose a 30%, e embebidos em OCT (Tissue Tek) em meio a gelo. Cortes com 10 micrômetros de espessura foram obtidos em um criostato (Leica CM 1850) e coletados em lâminas revestidas com gelatina. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M (pH 7,4) e Triton X-100 (solução de lavagem a 0,1 M) por três vezes. Logo em seguida, os cortes foram lavados na solução anterior, à qual foi adicionado soro de cabra normal a 10%, e incubados com anticorpos primários contra F4/80 (para macrófagos, 1:100, Novocastra, United Kingdom, USA),  $\beta$ -catenina (anticorpo policlonal, 1:100, Sigma, USA), e S-100 (para células de Schwann, 1:100, Sigma, USA) *overnight*. A seguir, os cortes foram enxaguados na solução de lavagem, e incubados com anticorpos secundários (Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG, e Alexa fluor 546-conjugated goat anti-rat IgG, 1:200, Molecular Probes, USA) por 2 horas. Após a reação, os cortes foram lavados uma vez com NaCl 0,9%, e o marcador nuclear DAPI (0,1  $\mu\text{g/mL}$  em NaCl 0,9%, Molecular Probes, USA) foi aplicado por 10

minutos. Finalmente, os cortes foram lavados novamente e montados com n-propil-galato (250 mg/mL, Sigma, USA). Os anticorpos primários foram omitidos para os controles negativos. Os cortes foram observados em um microscópio de fluorescência Zeiss Axioscop 2 Plus e fotografados com uma câmera Zeiss AxioCam MRC, usando o programa Axiovision, versão 4,5 (Zeiss) para aquisição de imagens.

A quantificação dos núcleos alongados (típicos de células de Schwann) em cortes longitudinais corados por DAPI em nervos lesados e não-lesados 96 horas pós-lesão foi realizada em animais selvagens e animais *knockout* para galectina-3. As imagens foram adquiridas usando-se o microscópio Axioscop 2 Plus com uma câmera Zeiss AxioCam MRC, usando o programa Axiovision, versão 4,5 (Zeiss). O número de núcleos alongados por mm<sup>2</sup> foi contado manualmente usando o software Image J. Os núcleos que não eram alongados não foram incluídos nesta quantificação. Os testes ANOVA One-way e post-hoc Tukey foram usados para comparações entre os grupos: os resultados foram expressos como média±MEP; o valor *p* foi considerado significativo quando  $\leq 0,05$ .

### **III. 6. Imunoblotting para $\beta$ -Catenina e F4/80**

Os nervos foram lavados rapidamente em PBS em gelo, picados, e 50 mL de tampão de lise de amostras (dodecil-sulfato de sódio [SDS] a 4%, glicerol a 20%, ditioetritol [DTT] 0,2 M, e Tris-HCl 125 mM, pH 6,8) foram adicionados aos extratos. Os extratos de nervos foram em seguida recuperados em um tubo, centrifugados, e fervidos por 10 minutos. As amostras foram colocadas em gel de poliacrilamida a 10% com SDS para eletroforese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). As proteínas foram transferidas para membranas de polivinilidenefluoreto (Millipore, São Paulo, Brasil). As proteínas imobilizadas nas

membranas foram imediatamente bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente com uma solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão Tris salina-Tween 20 (0,001%) (TBS-T). Em seguida, as membranas foram incubadas com um anticorpo policlonal feito em coelho anti- $\beta$ -catenina (Sigma, USA, diluição de 1:2000 em TBS-T) ou com um anticorpo monoclonal feito em rato anti-F4/80 (Serotec, USA, diluição de 1:1000 em TBS-T). Após 5 lavagens em TBS-T (3 minutos cada), as membranas foram incubadas com um anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (Promega, USA, diluição 1:1000 em TBS-T) ou com um anticorpo anti-rato conjugado com peroxidase (Promega, USA, diluição de 1:1000 em TBS-T), lavados novamente conforme descrito acima, e as bandas foram reveladas usando o kit West Pico Pierce (Pierce, USA).

Para verificar o carregamento das amostras, as membranas foram tratadas com tampão “striping” (SDS 2%, 2-mercaptoetanol 100 mM, Tris HCl 62,5 mM, pH 6,7) por 30 minutos a 50° C, lavadas 5 vezes em TBS-T, e bloqueadas novamente conforme descrito acima. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-actina feito em coelho (Sigma, USA, diluição de 1:30.000 em TBS-T). Após 5 lavagens em TBS-T (3 minutos cada), as membranas foram incubadas com um anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (Promega, USA), diluição de 1:1.000 em TBS-T-leite); em seguida, as membranas foram reveladas conforme descrito acima. As bandas de F4/80,  $\beta$ -catenina e actina foram mensuradas pelo programa Image Java (Image J 1.41o, National Institutes of Health, USA).

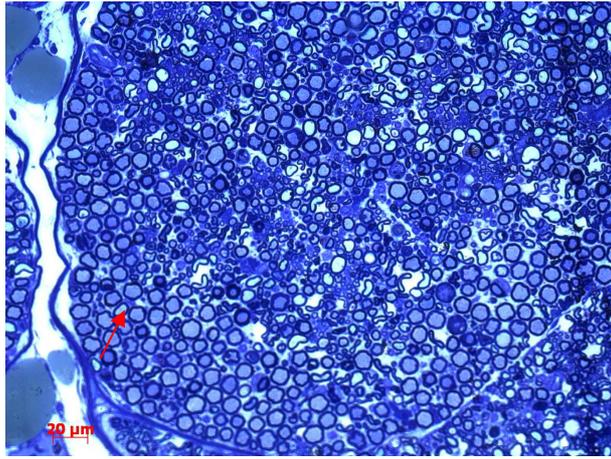
## IV. RESULTADOS

### IV.1. Cortes Semifinos

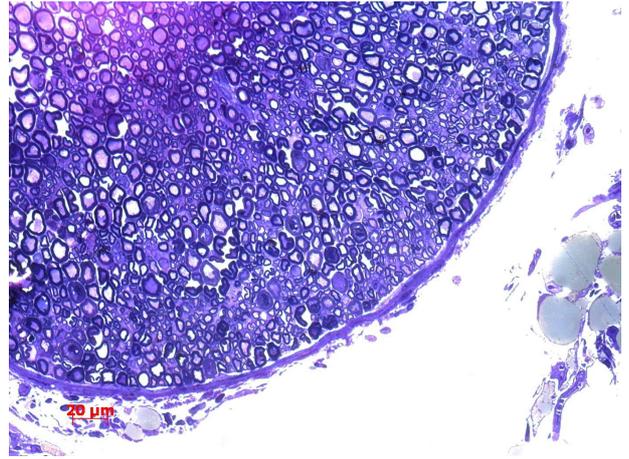
Cortes semifinos com espessura de 1  $\mu\text{m}$  foram obtidos em ultramicrotomo RMC MT-6000, e corados com azul de toluidina a 1% em água. Preferencialmente, foram analisados nervos ciáticos em cortes transversais, de modo a se ter uma melhor noção das eventuais alterações qualitativas e quantitativas das fibras nervosas. Entretanto, cortes longitudinais também foram obtidos e também contribuíram para a elucidação dos resultados.

**IV.1.1. 48 horas pós-lesão.** Tanto animais selvagens (**Figuras 7A, C e E**) como *knockout* para galectina-3 (**Figuras 7B, D e F**) apresentaram uma quantidade muito pequena de fibras degeneradas, com uma proporção levemente aumentada nos animais *knockout* para galectina-3; foram observadas pequenas quantidades de restos mielínicos em meio à predominante presença de fibras ainda com aspecto íntegro.

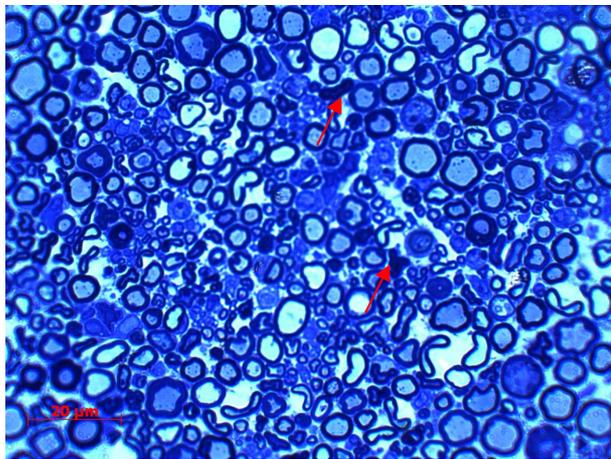
**Figura 7 - Nervos ciáticos - 48 horas pós-lesão - cortes semifinos.** Cortes de nervos ciáticos lesados por esmagamento 48 horas pós-lesão. Tanto animais selvagens (Figs. 1A, 1C e 1E) como *knockout* para galectina-3 (Figs. 7B, 7D e 7F) mostraram uma quantidade relativamente pequena de fibras degeneradas e restos mielínicos, observados tanto em cortes transversais (7A, 7B, 7C e 7D, →) como longitudinais (7E e 7F, →). Cortes semifinos, espessura de 1  $\mu$ m. Coloração: Azul de toluidina. A e B, 400x; C, D, E e F, 1000x.



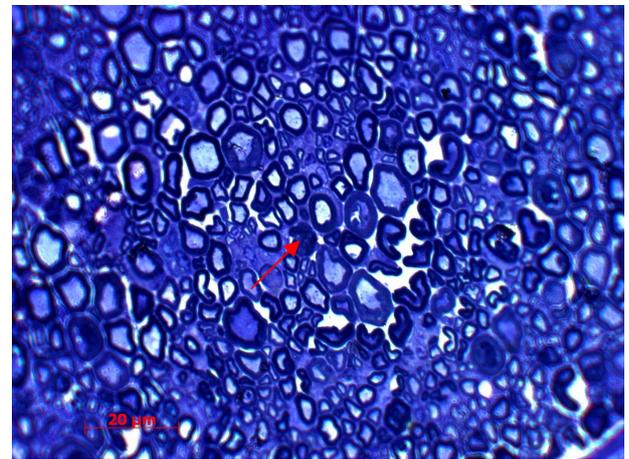
**A gal(+)**



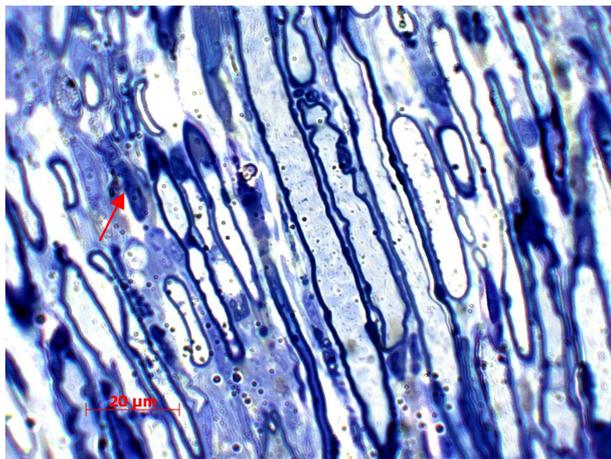
**B gal(-)**



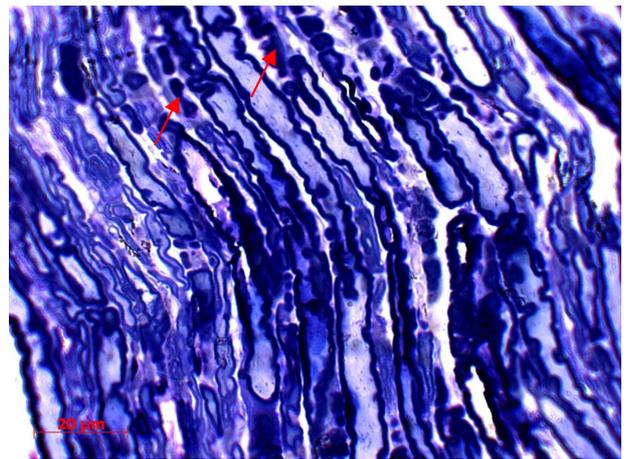
**C gal(+)**



**D gal(-)**



**E gal(+)**

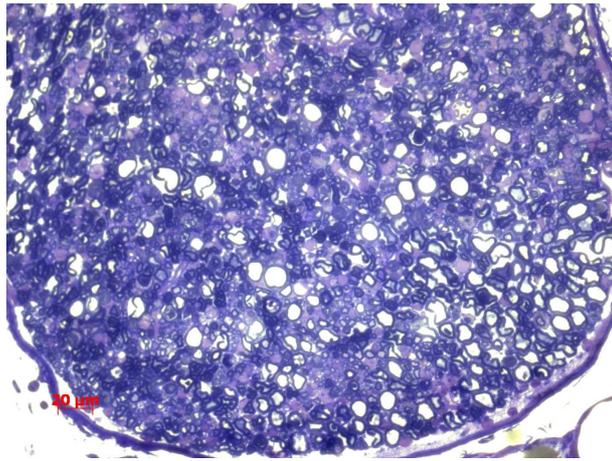
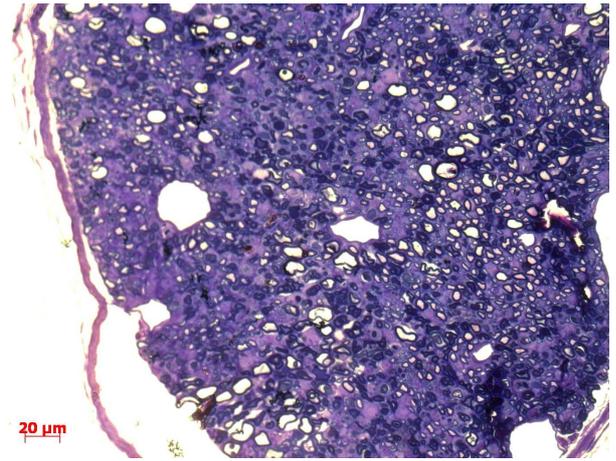
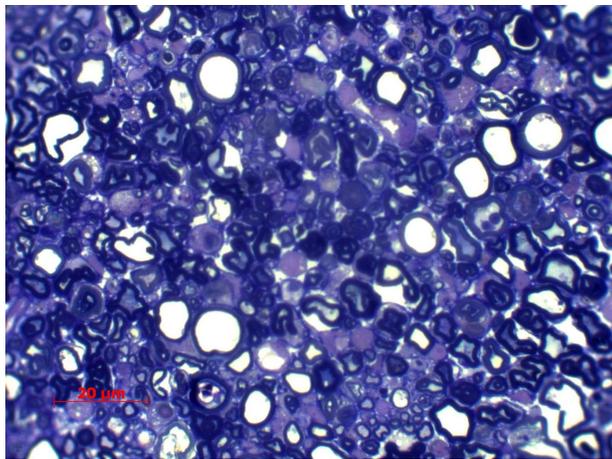
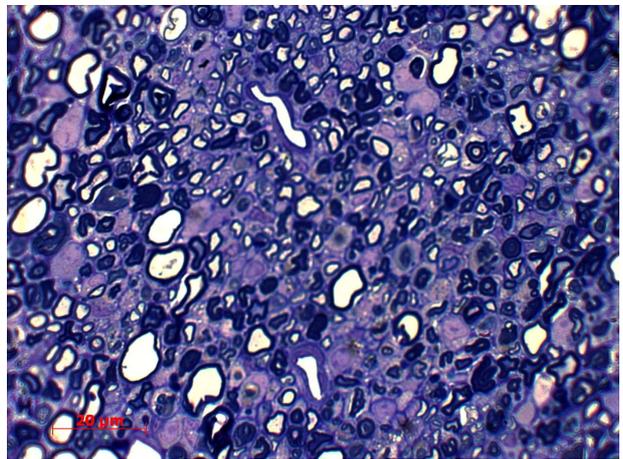
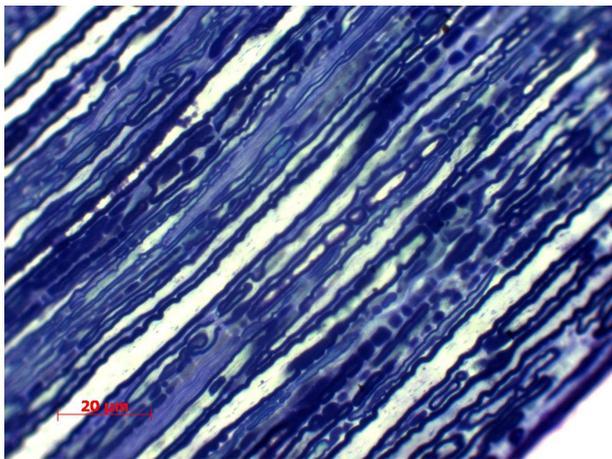
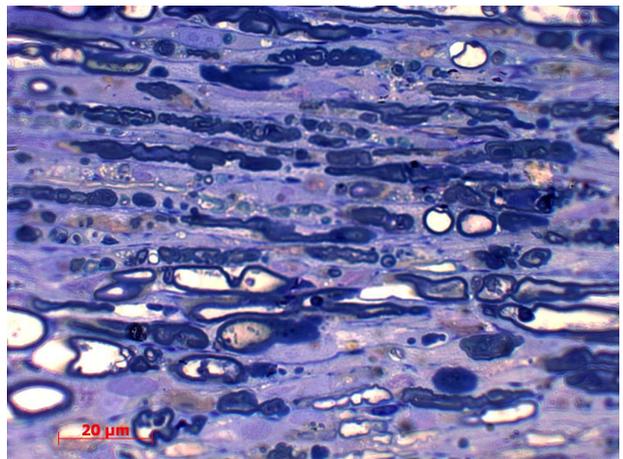


**F gal(-)**

**Figura 7**

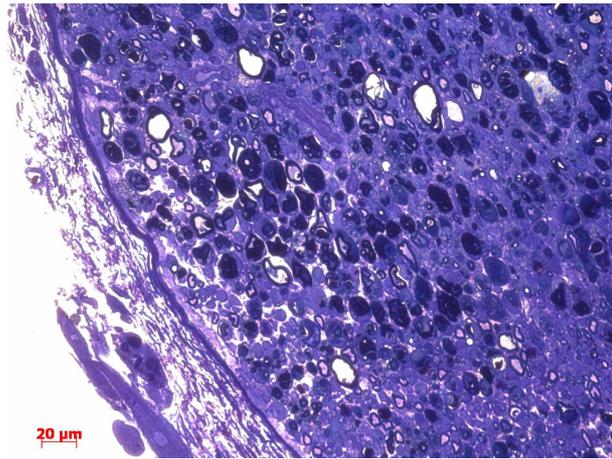
**IV.1.2. 96 horas pós-lesão.** O aspecto histológico dos nervos de animais selvagens (**Figuras 8A, 8C e 8E**) e de animais *knockout* para galectina-3 (**Figuras 8B, 8D e 8F**) se manteve semelhante, aparentemente com o mesmo padrão qualitativo de fibras degeneradas, com muitos restos axonais e mielínicos de aspecto paralelo ao trajeto das fibras no nervo, além de poucas fibras íntegras. No entanto, em aumentos maiores à microscopia óptica, percebe-se que em animais selvagens, os nervos apresentaram aparentemente um leve grau de retardo com relação à degeneração em comparação aos nervos de animais *knockout* para galectina-3. Nos cortes transversais, observa-se em animais selvagens uma aparente maior quantidade de restos mielínicos e fibras degeneradas (**Figura 8C**), o que pode ser confrontado com nervos de animais *knockout* para galectina-3, onde se nota uma prevalência menor de restos mielínicos (ovóides) em meio a áreas menos coradas que sugerem regeneração inicial (**Figura 8D**). Em cortes longitudinais, percebe-se a ocorrência de grande quantidade de fibras íntegras e com leves alterações na mielina em animais selvagens (**Figura 8E**), enquanto que em animais *knockout* para galectina-3, nota-se um aspecto que corrobora o aspecto ao corte transversal, com menor quantidade de restos mielínicos e áreas de provável regeneração inicial (**Figura 8F**).

**Figura 8 - Nervos ciáticos - 96 horas pós-lesão - cortes semifinos.** Cortes de nervos ciáticos lesados por esmagamento 96 horas pós-lesão. Animais selvagens (Figs. 8A, 8C e 8E) mostram aparentemente mais restos mielínicos e fibras íntegras, indicando um provável retardo na degeneração, em comparação a animais *knockout* para galectina-3 (Figs. 8B, 8D e 8F), onde se notam menos restos mielínicos e mais áreas claras indicativas de regeneração. Cortes semifinos, espessura de 1  $\mu$ m. Coloração: Azul de toluidina. A e B, 400x; C, D, E e F, 1000x.

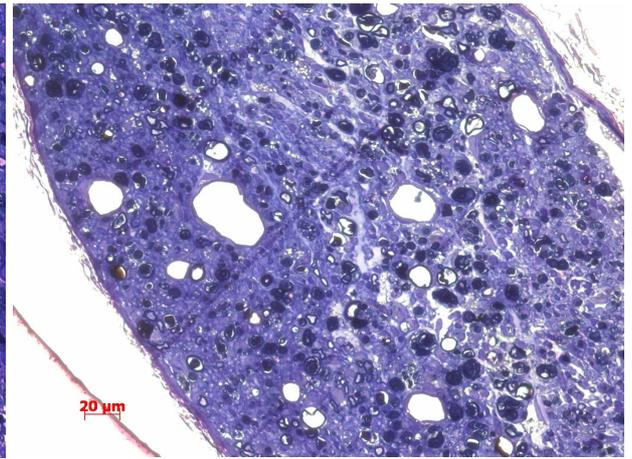
**A gal(+)****B gal(-)****C gal(+)****D gal(-)****E gal(+)****F gal(-)****Figura 8**

**IV.1.3. 1 semana pós-lesão.** Com uma semana pós-lesão, nos animais selvagens (**Figura 9A, 9C e 9E**) e *knockout* para galectina-3 (**Figura 9B, 9D e 9F**), além da quase ausência absoluta de fibras íntegras, foram observados dois aspectos particulares: ao corte transversal, muitas fibras estavam circunscritas por uma delgada linha demarcável, em processo de recuperação da bainha de mielina de fibras em regeneração, as quais ainda se apresentavam muito delgadas para serem visualizadas à microscopia óptica; outro aspecto foi a ocorrência, ainda em pequeno grau, de pequenas áreas vacuolizadas nas proximidades das fibras degeneradas/em regeneração (**Figura 9E e 9F**). Este aspecto foi incrementado nos nervos de animais selvagens. Mais uma vez, foi notado um aparente retardo na velocidade da degeneração das fibras nos nervos de animais selvagens em relação aos nervos de animais *knockout* para galectina-3. Nos animais selvagens, houve uma prevalência de fibras degeneradas em relação a áreas claras sugestivas de regeneração (**Figura 9C**); tal aspecto pôde ser observado nitidamente em nervos de animais *knockout* para galectina-3, onde restos mielínicos (ovóides) se encontravam comparativamente em menor quantidade em relação a áreas claras indicativas de regeneração (**Figura 9D**). Em cortes longitudinais, nos animais *knockout* para galectina-3 foi observada uma evidente retomada na reorganização das fibras, com nítida orientação paralela (provavelmente conduzida pelo alinhamento de fibras regenerativas) (**Figura 9F**), o que não foi observado em animais selvagens (**Figura 9E**), certamente pela ocorrência maciça de restos mielínicos e pequeno índice de regeneração.

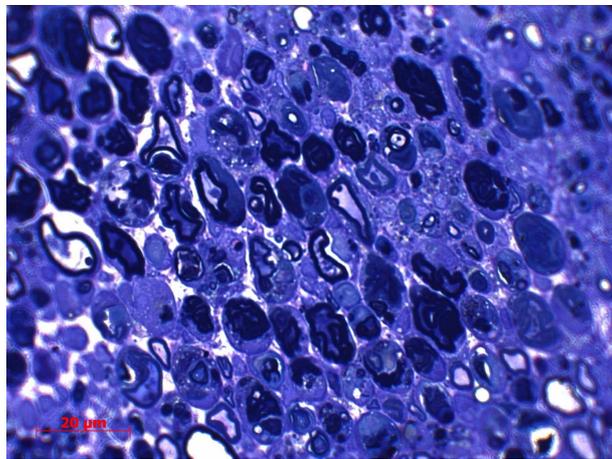
**Figura 9 - Nervos ciáticos - 1 semana pós-lesão - cortes semifinos.** Cortes de nervos ciáticos lesados por esmagamento 1 semana pós-lesão. Em aumento menor (Fig. 9A) e maior (Fig. 9C), animais selvagens ainda apresentam grande quantidade de restos mielínicos; comparativamente, animais *knockout* para galectina-3 mostram uma gradual diminuição de ovóides entremeados a áreas claras de possível regeneração (Figs. 9B e 9D). O retardo na degeneração em animais selvagens (Fig. 9E) pode ser comprovado em cortes longitudinais, onde se observa ainda uma certa desorganização das fibras nervosas, em comparação a uma progressiva ordenação paralela das fibras em animais *knockout* para galectina-3. Cortes semifinos, espessura de 1  $\mu\text{m}$ . Coloração: Azul de toluidina. A e B, 400x; C, D, E e F, 1000x.



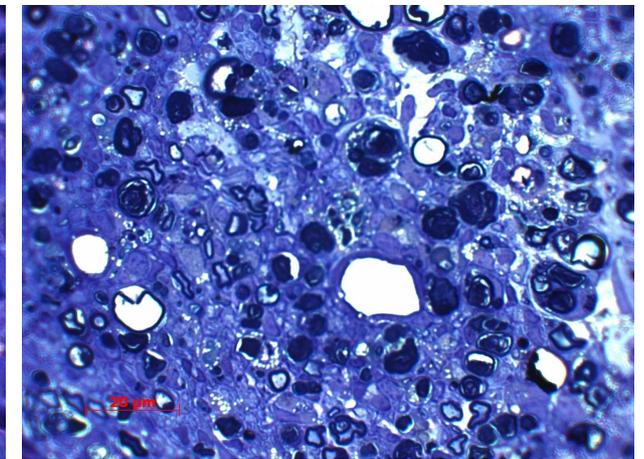
**A gal(+)**



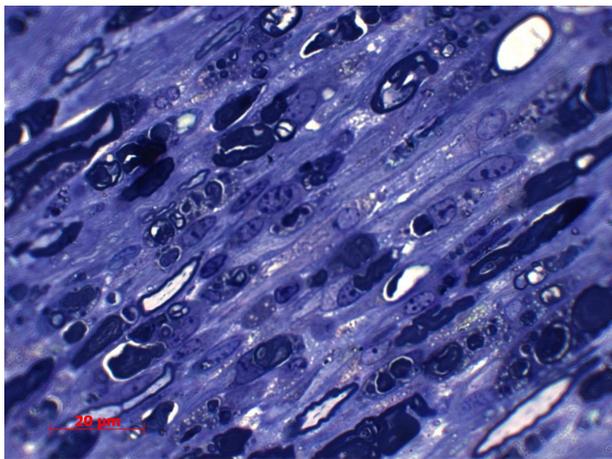
**B gal(-)**



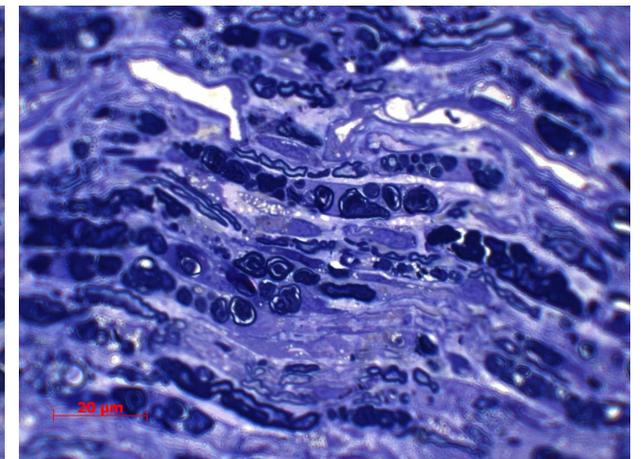
**C gal(+)**



**D gal(-)**



**E gal(+)**

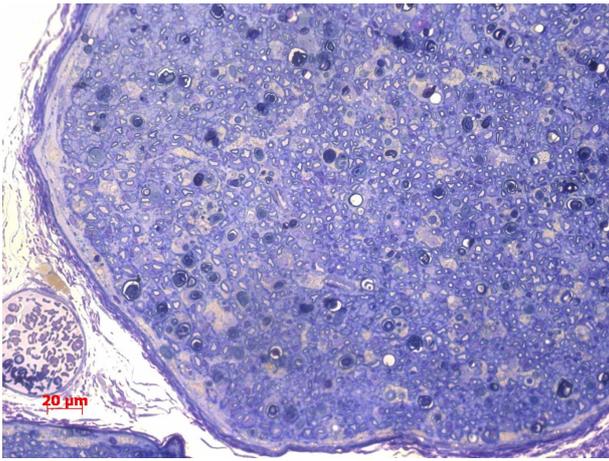


**F gal(-)**

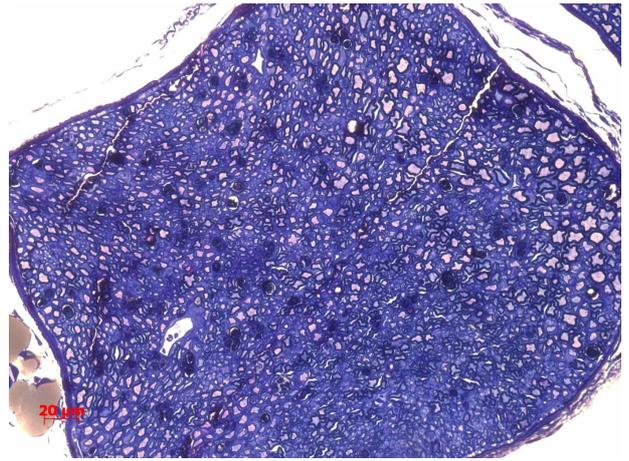
**Figura 9**

**IV.1.4. 3 semanas pós-lesão.** As comparações mais marcantes a serem ressaltadas foram observadas em nervos após 3 semanas de lesão. Em relação aos animais *knockout* para galectina-3, os animais selvagens exibiram uma quantidade comparativamente maior de restos axonais e mielínicos – ainda sugestivo de retardo no processo degenerativo – em meio a uma relativa quantidade de fibras regenerativas, as quais se apresentavam com uma delgada bainha de mielina (**Figuras 10C e 10E**). Animais *knockout* para galectina-3 exibiram um padrão maior e melhor de regeneração, onde se pôde observar que, em meio a uma pequena quantidade de restos degenerados ainda presentes, havia um quadro predominante de fibras de aspecto íntegro, tanto com axônios espessos como com axônios delgados, dotados de delgada bainha de mielina, indicativo de intensa regeneração (**Figuras 10D e 10F**). Comparativamente, os nervos de animais selvagens se apresentavam mais espessos (**Figura 10A**) do que os de animais *knockout* para galectina-3 (**Figura 10B**); isto provavelmente seria decorrente da quantidade abundante de restos degenerativos ainda presentes e de pequena evidência de regeneração. Tais observações sugerem uma conclusão prévia sobre a possível atividade inibitória da galectina-3 em processos de regeneração de fibras nervosas.

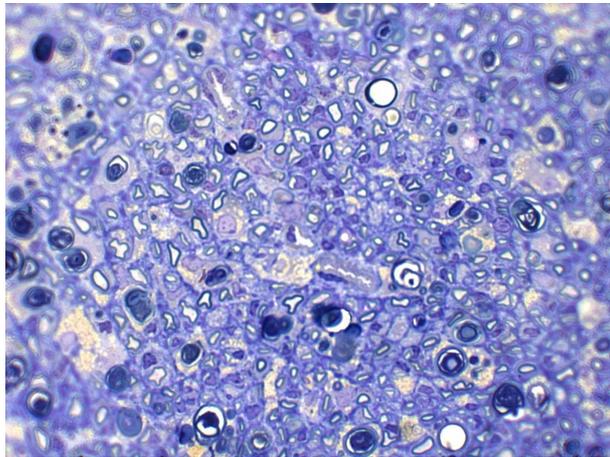
**Figura 10 - Nervos ciáticos - 3 semanas pós-lesão - cortes semifinos.** Cortes de nervos ciáticos lesados por esmagamento 3 semanas pós-lesão. Em menor aumento, pode-se notar que os nervos de animais selvagens (Fig. 10A) são mais espessos que os de animais *knockout* para galectina-3 (Fig. 10B), nos quais em maior aumento nota-se a prevalência de fibras regeneradas e pouca quantidade de ovóides mielínicos (Fig. 10D). Nervos de animais selvagens têm mais restos mielínicos e menos fibras degeneradas (Figs. 10C e 10E). Note a organização linear das fibras regeneradas e com delgada bainha de mielina no nervo do animal *knockout* para galectina-3 (Fig. 10F). Cortes semifinos, espessura de 1  $\mu\text{m}$ . Coloração: Azul de toluidina. A e B, 400x; C, D, E e F, 1000x.



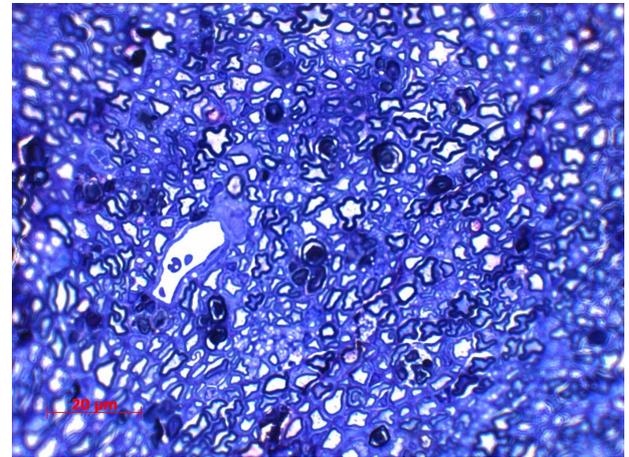
**A gal(+)**



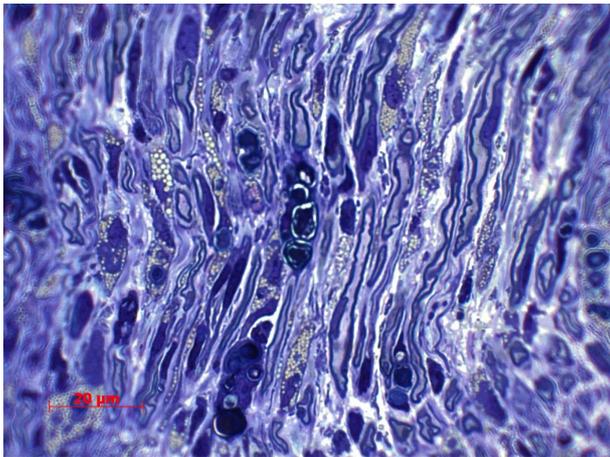
**B gal(-)**



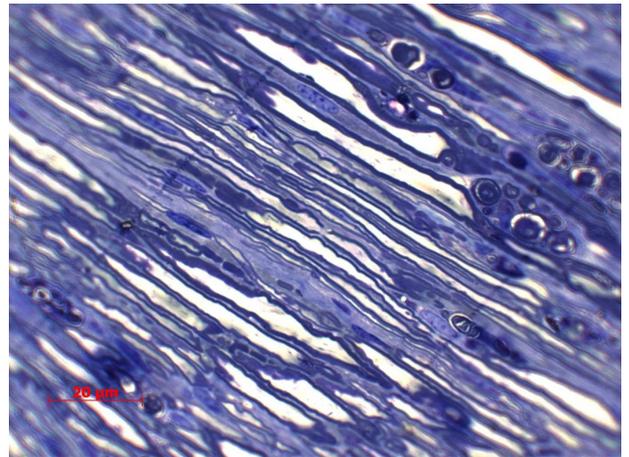
**C gal(+)**



**D gal(-)**



**E gal(+)**



**F gal(-)**

**Figura 10**

## IV.2. Análise Morfológica Qualitativa – Cortes Semifinos

A análise qualitativa foi realizada em cortes semifinos transversais e longitudinais de nervos ciáticos de todos os grupos. Os resultados da análise dos cortes semifinos estão resumidos na Figura 11. Em 48 horas após o esmagamento, tanto animais selvagens como animais *knockout* para galectina-3 mostraram fibras em processo de degeneração, mas este processo foi aparentemente mais pronunciado em animais *knockout* para galectina-3 (**Figura 11A-D**). Em 96 horas após lesão, ambos os grupos de camundongos apresentaram grandes quantidades de fibras em degeneração e resíduos mielínicos. Entretanto, neste momento, as diferenças entre os camundongos selvagens e *knockout* para galectina-3 se tornaram mais pronunciadas (**Figuras 11E-H**). Em cortes transversais e longitudinais de nervos ciáticos, os animais mostraram sinais de um estágio mais avançado na degeneração Walleriana, representado por figuras claramente visíveis de ovóides de mielina. Em animais *knockout* para galectina-3, áreas sugestivas de regeneração inicial foram observadas (**Figuras 11E-H**).

Uma semana após o esmagamento, havia quase uma ausência completa de fibras intactas tanto em animais selvagens como em animais *knockout* para galectina-3 (**Figuras 11I-L**). Áreas de formação de ovóides de mielina e de degeneração axonal ainda estavam claramente visíveis em animais selvagens, enquanto animais *knockout* para galectina-3 mostraram sinais de estágios avançados de degeneração e áreas sugestivas de regeneração axonal. Áreas vacuolizadas foram observadas próximas às fibras em degeneração; estas poderiam ser macrófagos ativados ou células de Schwann com material englobado em seu citoplasma.

As diferenças mais marcantes entre os animais foram observadas 3 semanas após o

esmagamento (**Figura 11M-P**). Animais selvagens apresentaram nervos com quantidades comparativamente maiores de resíduos axonais e mielínicos – o que é sugestivo de degeneração das fibras nervosas – entre uma quantidade relativamente pequena de fibras com bainha de mielina. Animais *knockout* para galectina-3 apresentaram uma regeneração quase completa, muito embora algumas fibras em degeneração ainda pudessem ser observadas.

**Figura 11 - Nervos ciáticos - análise comparativa dos cortes semifinos.** Cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$  de espessura) transversais e longitudinais de nervo ciático submetido a esmagamento de camundongos selvagens (A, C, E, G, I, K, M e O) e *knockout* para galectina-3 (B, D, F, H, J, L, N, e P) em diferentes tempos pós-lesão (48 horas [A-D], 96 horas [E-H], 1 semana [I-L], e 3 semanas [M-P]). As diferenças entre camundongos selvagens e galectina-3<sup>-/-</sup> após o esmagamento se tornam mais óbvias em 3 semanas pós-lesão, onde uma quantidade muito maior de fibras nervosas mielínicas está presente em animais *knockout* para galectina-3. Esta observação é evidente em cortes transversais (M e N) e longitudinais (O e P). Coloração: Azul de toluidina. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

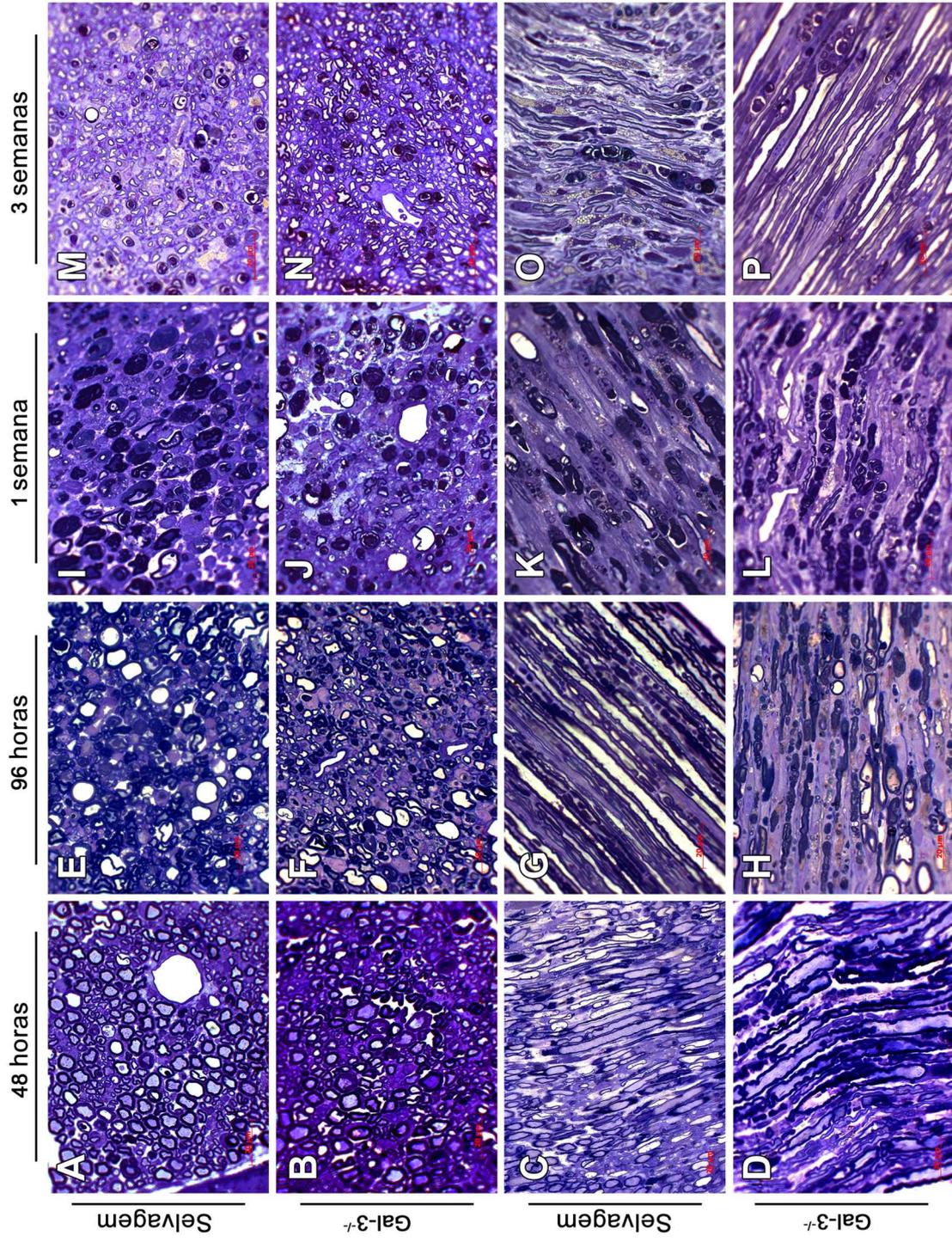


Figura 11

### IV.3. Cortes Ultrafinos – Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para fins de compreensão prática, foram utilizados dois tempos de sobrevivência dos animais selvagens e *knockout* para galectina-3, ou seja, os tempos de 96 horas e de 3 semanas, ambos pós-lesão. O critério utilizado para tal escolha segue a visualização melhor do material em microscopia eletrônica para uma melhor caracterização histológica em tais tempos, devido à intensificação dos aspectos degenerativos nas fibras nervosas em 4 dias pós-injúria, e a reorganização estrutural das fibras nervosas regeneradas após 3 semanas de lesão.

#### IV.3.1 – 96 horas pós-lesão:

- **Animais selvagens (Figuras 12-16):** Foi observada uma grande quantidade de fibras nervosas em degeneração, onde os axônios se apresentavam com o axoplasma com diferentes aspectos alterados, com degradação total ou parcial de elementos do citoesqueleto ou outras organelas ou vesículas em suposto trânsito axoplasmático, ora demonstrando um típico quadro de degeneração aquosa, com o axônio com os elementos do citoesqueleto desestruturados e o axoplasma de aspecto claro, ora com aspecto de degeneração escura, com o axoplasma ocupado por um material floculento de elétrons de densidade variável. A bainha de mielina das fibras degeneradas apresentava um nítido desfolhamento de suas lamelas, e as células de Schwann mostravam um citoplasma bastante vacuolizado. A quantidade de ovóides mielínicos se apresentava bastante significativa. O interstício endoneural era dotado de uma expressiva quantidade de fibrilas colágenas imersas em material amorfo. Havia ainda uma

pequena quantidade de delicadas fibras nervosas em regeneração, representadas por pouca quantidade ilhotas regenerativas visíveis.

- **Animais *knockout* para galectina-3 (Figuras 17-22):** Foram observadas fibras nervosas degeneradas, apresentando mielina de aspecto desfolhado, ovóides abundantes e axônios com axoplasma de aspecto predominantemente granuloso ou floculento, indicando a degradação dos componentes do citoesqueleto. Células de Schwann de fibras degeneradas apresentavam extensa vacuolização e grande quantidade de restos mielínicos internalizados. Comparativamente em animais selvagens, nota-se nos nervos de animais *knockout* para galectina-3 uma quantidade mais expressiva de ilhotas regenerativas em meio a abundantes fibrilas colágenas associadas a material amorfo no interstício endoneural; a quantidade de fibrilas colágenas se mostra nitidamente mais alta do que a observada em animais selvagens com 96 horas pós-lesão. Esta quantidade de matriz extracelular fibrilar pode estar relacionada ao provável fornecimento de um suporte por parte do microambiente, de modo a promover um arcabouço de sustentação associado às fibras nervosas em progressiva regeneração. Várias células de Schwann se encontravam não-associadas a axônios, assumindo um fenótipo semelhante a “células de Schwann não-mielinizantes”, notando-se um contorno regular de sua lâmina basal ao redor; algumas células de Schwann ainda apresentavam resquícios de materiais endocitados em seu citoplasma, ao mesmo tempo em que já se insinuavam para pequenos axônios regenerativos, certamente iniciando o processo de remielinização.

#### IV.3.2 – 3 semanas pós-lesão:

- **Animais selvagens (Figuras 23-27):** Com 3 semanas pós-lesão, os nervos de animais selvagens apresentaram fibras nervosas com axônios regenerados e mielinizados; no entanto, muitas fibras degeneradas ainda podiam ser vistas. A regeneração das fibras nervosas era bastante bem caracterizada em associação a aspectos intrínsecos dos próprios axônios, que apresentavam uma reconstituição generalizada dos elementos de seu citoesqueleto, e ao redor de vários axônios era observada uma delgada bainha de mielina, a qual sugeria um processo de mielinização recém-iniciado e ainda incipiente. Várias ilhotas regenerativas podiam ser visualizadas, as quais apresentavam um aspecto bastante irregular devido à presença de extensões do citoplasma das células de Schwann que envolvem pequenos axônios regenerativos. Eventuais ovóides podiam ainda ser encontrados de maneira difusa por entre os feixes nervosos. Podia ainda ser observada uma quantidade expressiva de feixes de fibrilas colágenas, ora de maneira desorganizada, ora em trajeto paralelo às fibras nervosas, situadas em meio a um material floculento menos abundante. Em relação aos nervos lesados após 96 horas, a quantidade de matriz extracelular endoneural é comparativamente maior sob o ponto de vista qualitativo. Eventuais macrófagos, com seu citoplasma rico em vacúolos contendo resíduos mielínicos e axonais fagocitados, podiam ser percebidos por entre as fibras.

- **Animais *knockout* para galectina-3 (Figuras 28-32):** A quantidade de fibras nervosas com aspecto íntegro, portanto regeneradas, foi significativamente maior que em nervos de animais selvagens com 3 semanas pós-lesão. Axônios apresentavam seu conteúdo axoplasmático totalmente reorganizado, incluindo os componentes do citoesqueleto e eventuais pequenos vacúolos e mitocôndrias, o que sugeria o restabelecimento do fluxo axoplasmático. A maioria

das fibras nervosas demonstrou uma boa proporção entre a espessura da bainha de mielina e o calibre do axônio, sugerindo um adequado retorno à funcionalidade do nervo. Delgadas fibras amielínicas regeneradas formavam grupos compactos em sulcos delimitados por delicados segmentos do citoplasma da célula de Schwann não-mielinizante envoltória, sem que houvesse um aspecto irregular provocado pelas extensões citoplasmáticas das células de Schwann em processo de seqüestro de axônios, conforme observado em animais selvagens com o mesmo tempo de lesão. Foram observadas poucas fibras degeneradas e eventuais ovóides mielínicos. A matriz extracelular endoneural se mostrou escassa, com pequena quantidade de feixes de fibrilas colágenas, os quais se mostraram mais compactados por entre os feixes de fibras nervosas. Em relação ao estágio de 96 horas pós-lesão previamente abordado, a menor quantidade de matriz extracelular fibrosa no interstício endoneural em nervos com 3 semanas pós-lesão sugere a formação de um arcabouço provisório para a sustentação das fibras nervosas em processo de regeneração, observado em 96 horas pós-lesão. Em estágios tardios da regeneração de fibras nervosas, a matriz extracelular endoneural fibrosa certamente parece ser reabsorvida ou modificada; por isso sua escassez em meio ao interstício do nervo após 3 semanas de lesão.

**Figura 12 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Observe a grande quantidade de fibras nervosas mielínicas com aspecto degenerado (★), mostrando principalmente alterações do citoesqueleto axonal, além de resíduos mielínicos amorfos (→) englobados por células de Schwann. Observe a grande quantidade de fibras colágenas na matriz extracelular no interstício endoneural (M). F, Fibroblastos. Barra = 1 µm.

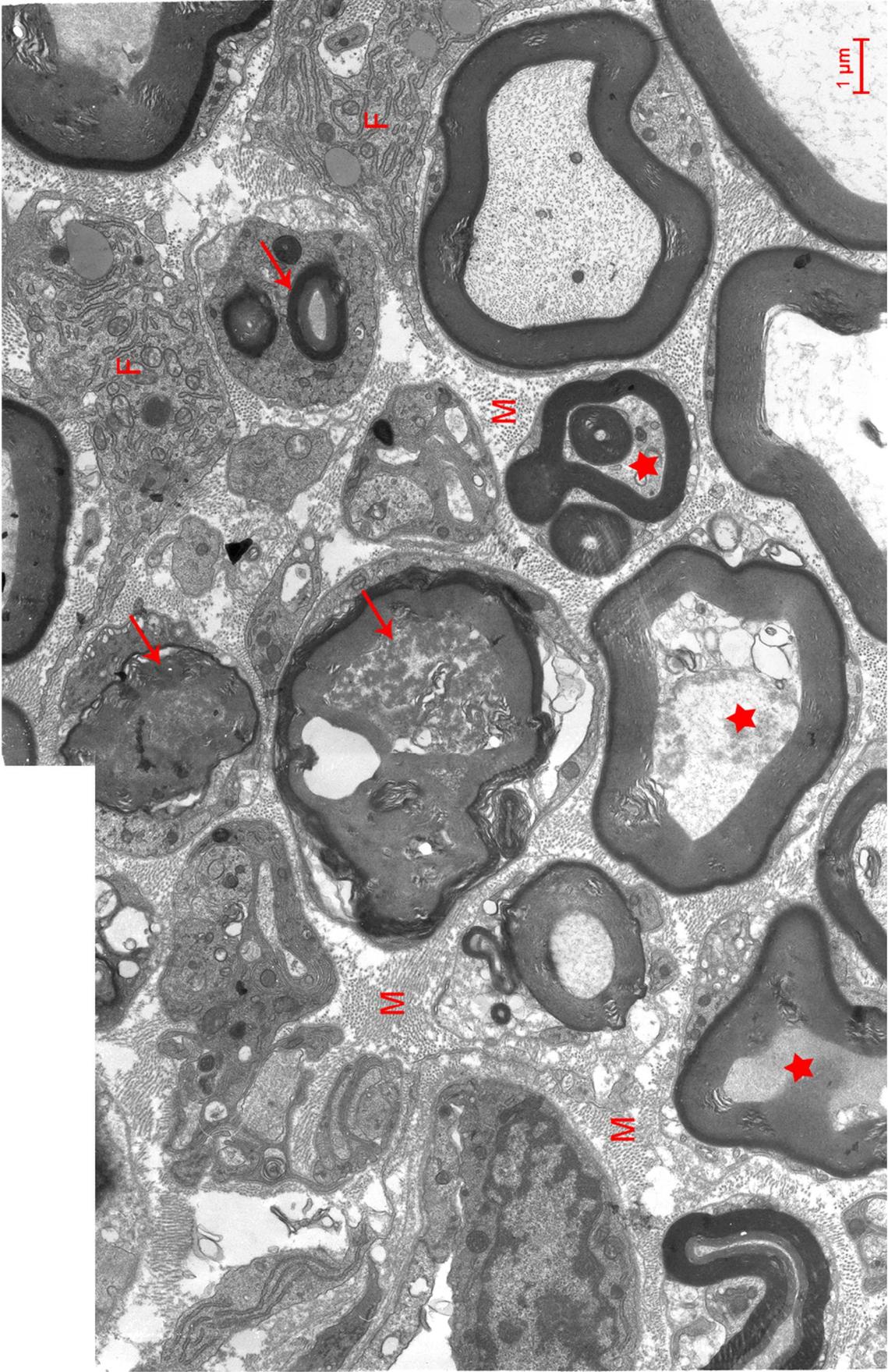


Figura 12

**Figura 13 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Fibras nervosas mielínicas alteradas, com axônios de aspecto condensado devido à desorganização do citoesqueleto (★), em meio a restos mielínicos degenerados (→) e abundantes fibrilas colágenas no interstício endoneural (M). CS, Células de Schwann com perfil não-mielinizante; F, Fibroblastos. Barra = 1 µm.

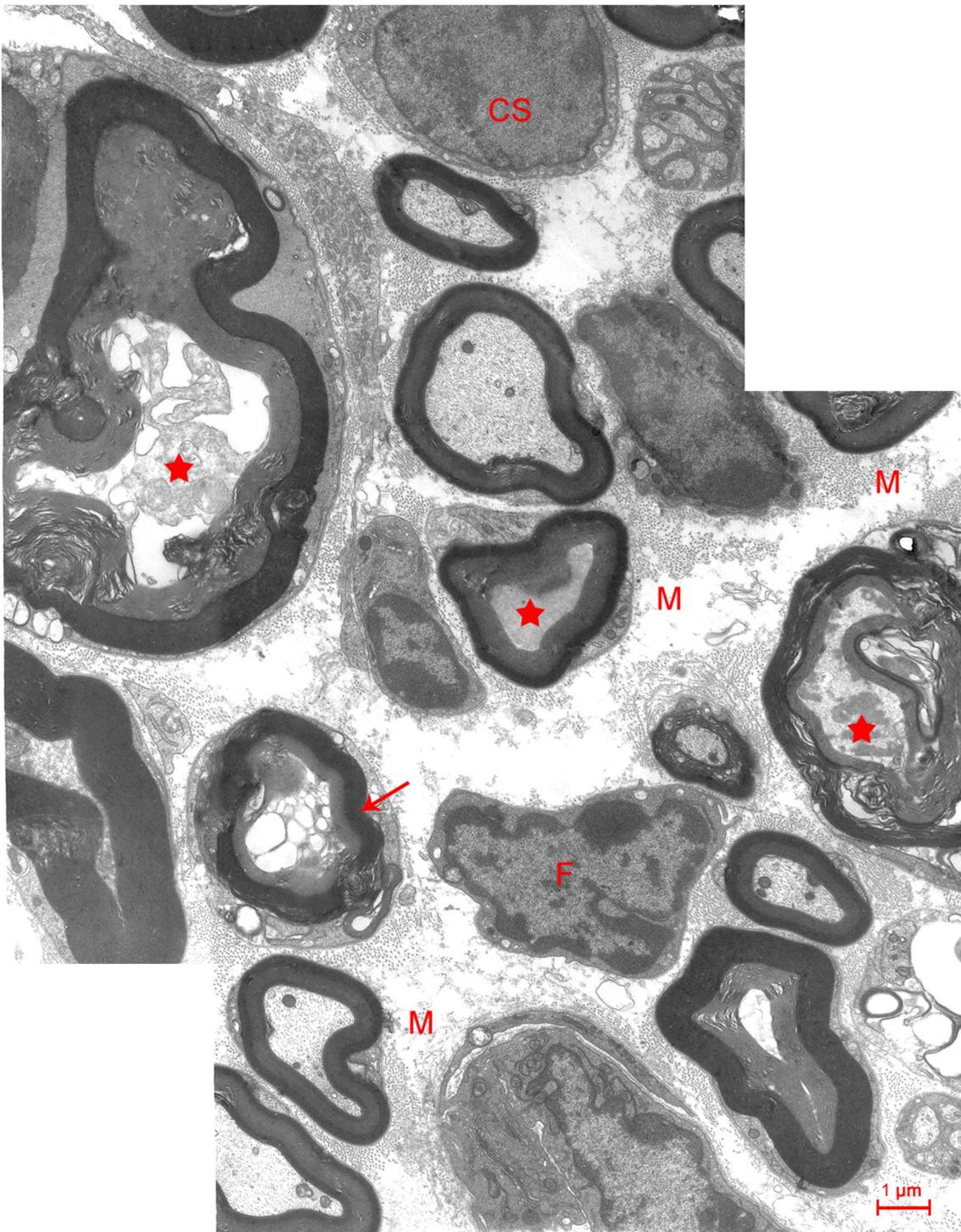


Figura 13

**Figura 14 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Diferentes padrões de alterações do citoesqueleto podem ser observadas nos axônios, onde os componentes do citoesqueleto podem se apresentar esparsos (☆) ou em progressiva condensação (★). O citoplasma das células de Schwann se apresenta com organelas dilatadas (\*), indicando uma possível alteração degenerativa, ou repleto de restos mielínicos fagocitados (▶). Observe a abundante matriz extracelular no interstício endoneural, rica em fibrilas colágenas em meio a um material amorfo (M). Poucos feixes de fibras regenerativas (Am) podem ser vistos. Barra = 3 μm.

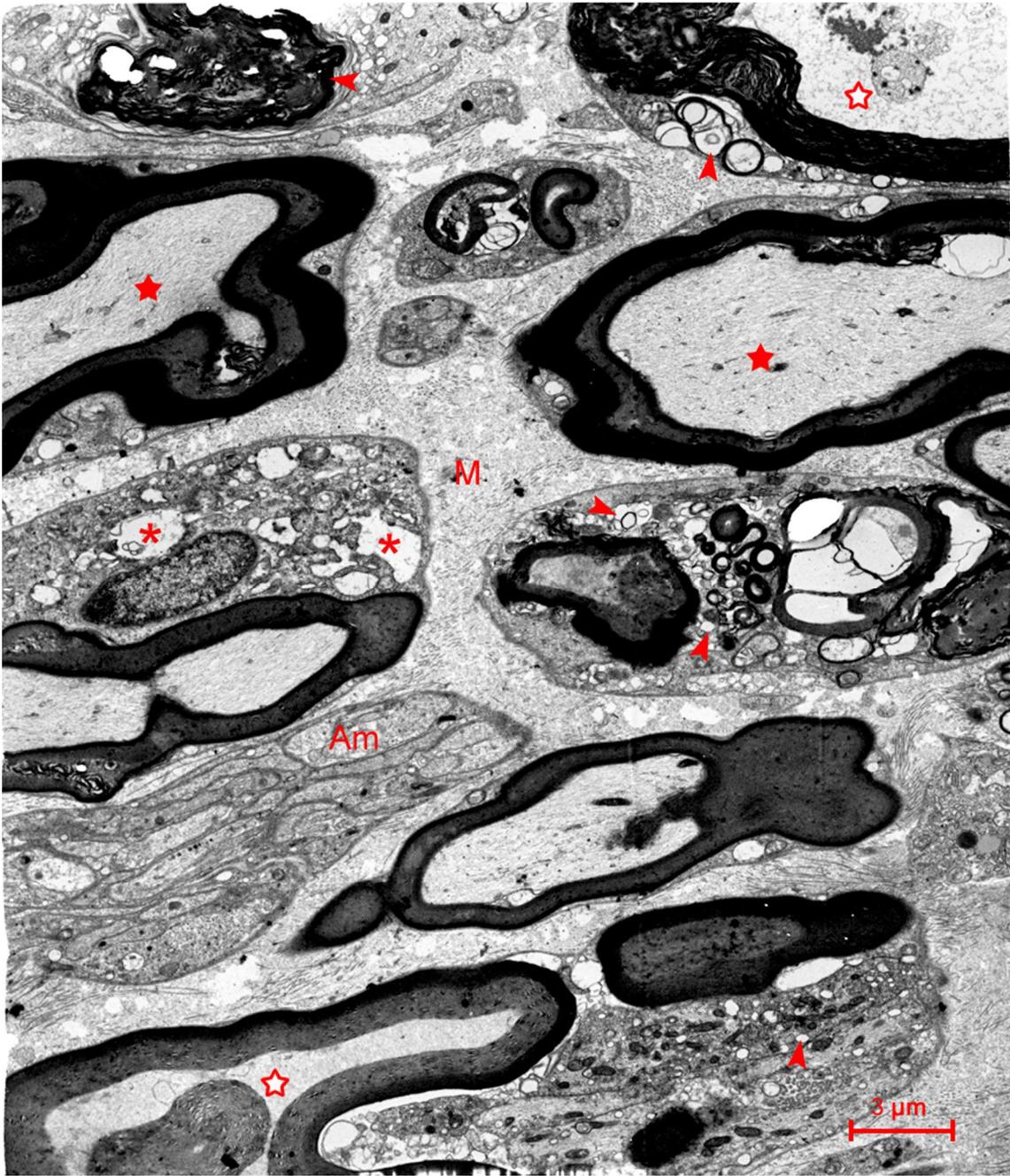


Figura 14

**Figura 15 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 96 horas pós-lesão, corte longitudinal. Fibras nervosas degeneradas se apresentam com seus axônios exibindo diferentes padrões de degeneração do citoesqueleto, que pode se apresentar com seus elementos mais dispersos ( ☆ ) ou em gradual condensação ( ★ ). Abundantes restos mielínicos (ovóides) ( → ) são observados por entre fibras nervosas em degeneração, em meio a fibrilas colágenas organizadas de forma paralela na matriz intersticial endoneural (M). Barra = 3 μm.

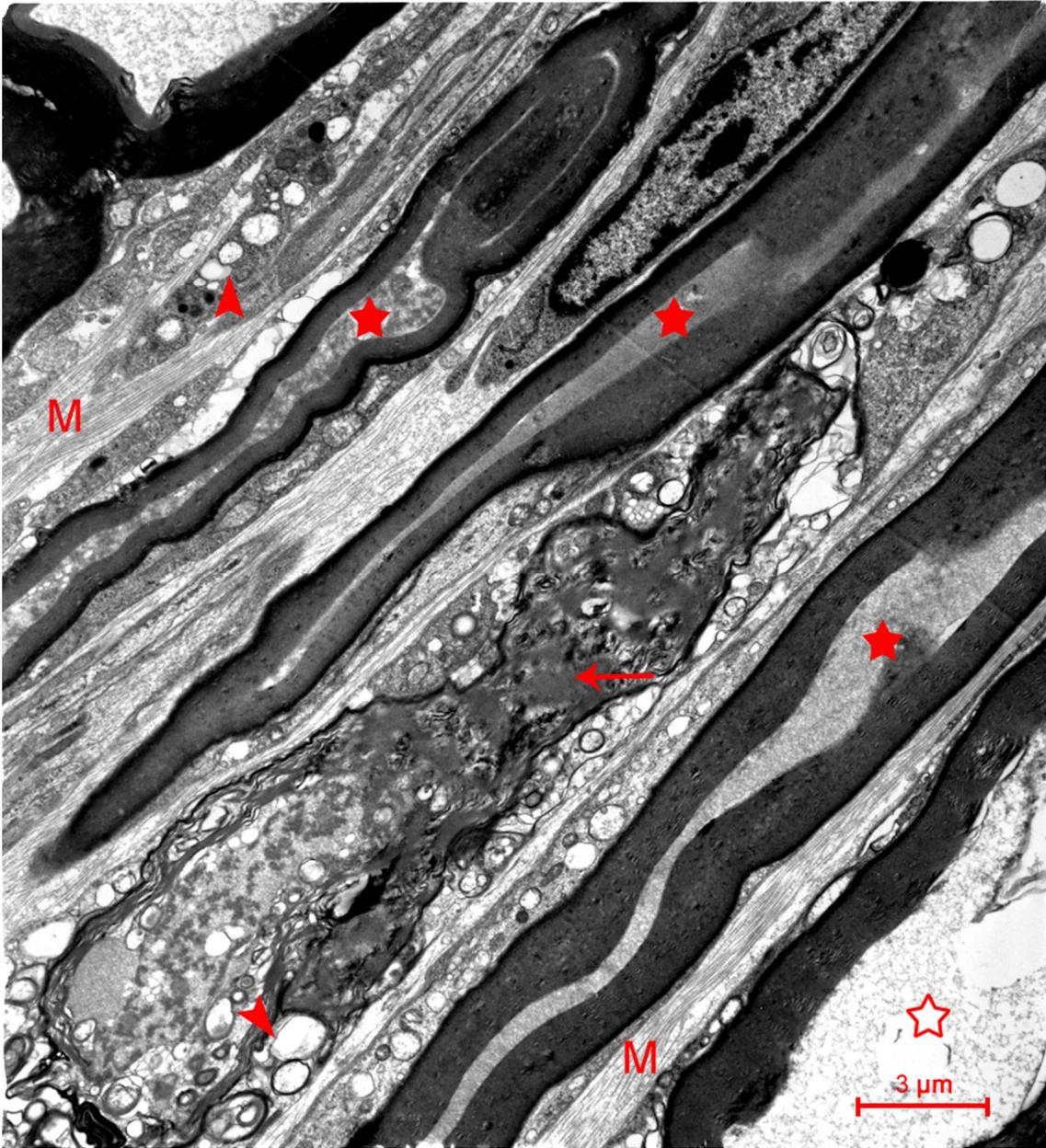


Figura 15

**Figura 16 - Célula de Schwann em divisão - microscopia eletrônica.** Eletromicrografia de uma célula de Schwann ao final da telófase da divisão celular. Observe o anel contrátil entre as duas células-filhas (→), onde se encontram inseridos os microtúbulos do fuso mitótico (▷). A célula de Schwann à esquerda apresenta dois axônios amielínicos em processo de englobamento (\*). As cabeças de seta (▲) indicam a lâmina basal que envolve conjuntamente as duas células em divisão. Nervo ciático, camundongo selvagem, 96 horas pós-lesão. Barra = 300 nm.

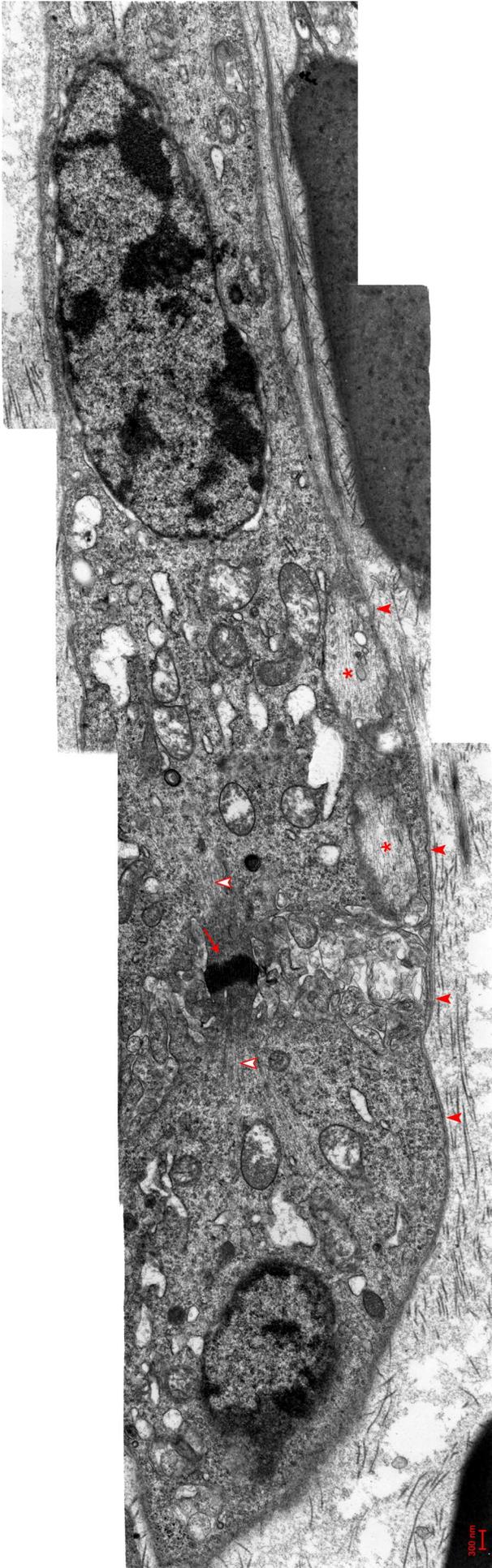


Figure 16

**Figura 17 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Praticamente não há fibras de aspecto íntegro; a grande maioria das fibras se apresenta extremamente alterada, com axônios mostrando degeneração escura devido à condensação dos componentes degradados do citoesqueleto (★) e células de Schwann com citoplasma extremamente vascularizado (▶) e repleto de resíduos mielínicos (→). Observe a abundante quantidade de fibrilas colágenas imersas em material floculento elétron-denso preenchendo todo o interstício endoneural (M). Células de Schwann exibem perfil não mielinizante (CS). V, Vaso sanguíneo. Barra = 1 µm.



Figura 17

**Figura 18 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para *glectina-3* - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para *glectina-3*, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Numerosos restos mielínicos são observados no interior de vacúolos em células de Schwann (→), as quais são distinguidas pela presença da lâmina basal (▶) ao seu redor. Nota-se ainda a abundante matriz fibrilar no interstício endoneural (M). E, Eosínófilo. Barra = 1 μm.

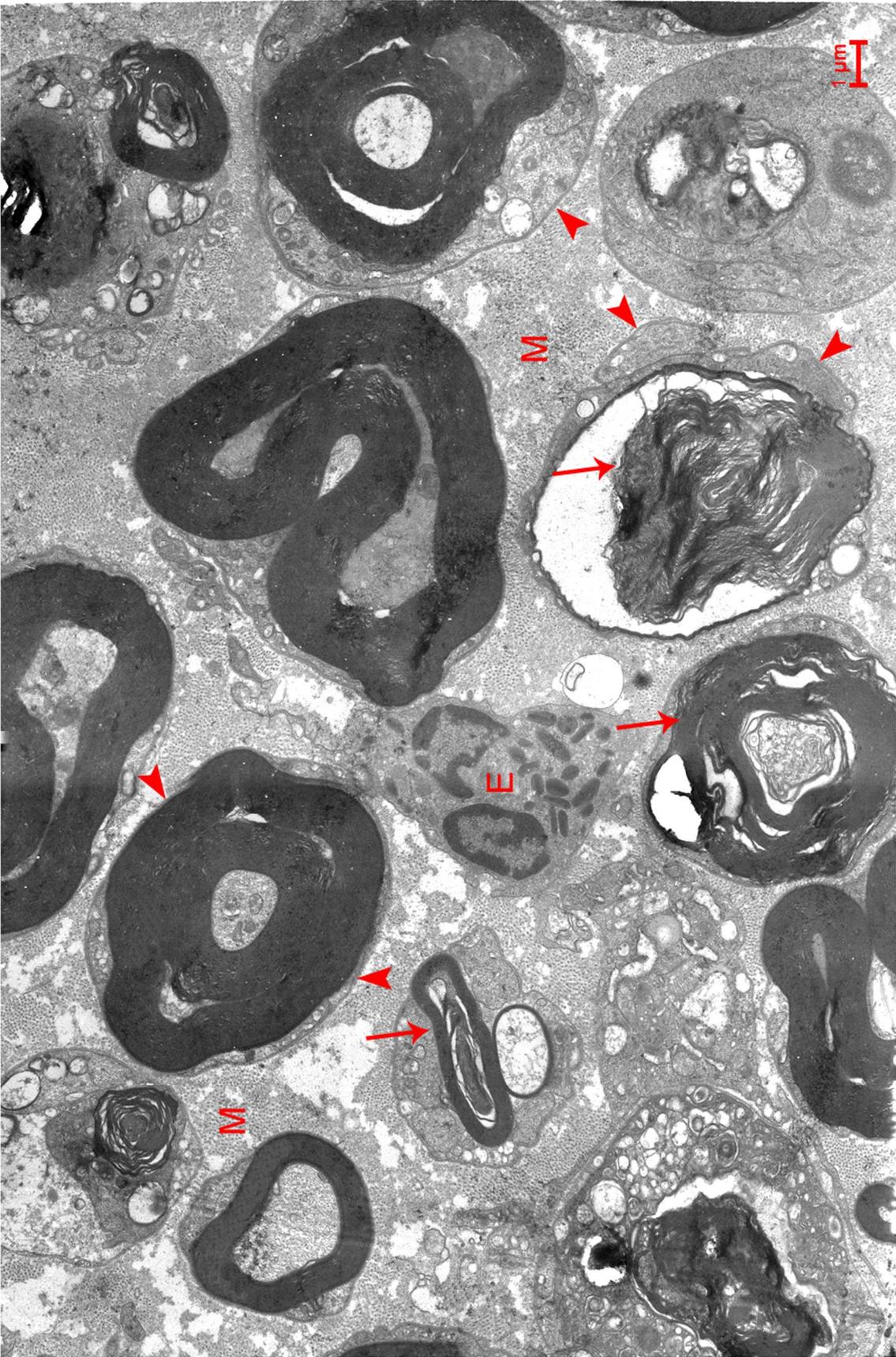


Figure 18

**Figura 19 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Várias fibras degeneradas com aspecto floculento no axoplasma (★) devido à degradação do citoesqueleto, são visualizadas. Células de Schwann com citoplasma repleto de vacúolos (→) ou com perfil não-mielinizante (CSNM) são visualizados no campo. Pequenos grupos de fibras em regeneração (R) ocorrem de forma relativamente esparsa em meio à abundante matriz fibrilar endoneural (M). Barra = 1 µm.

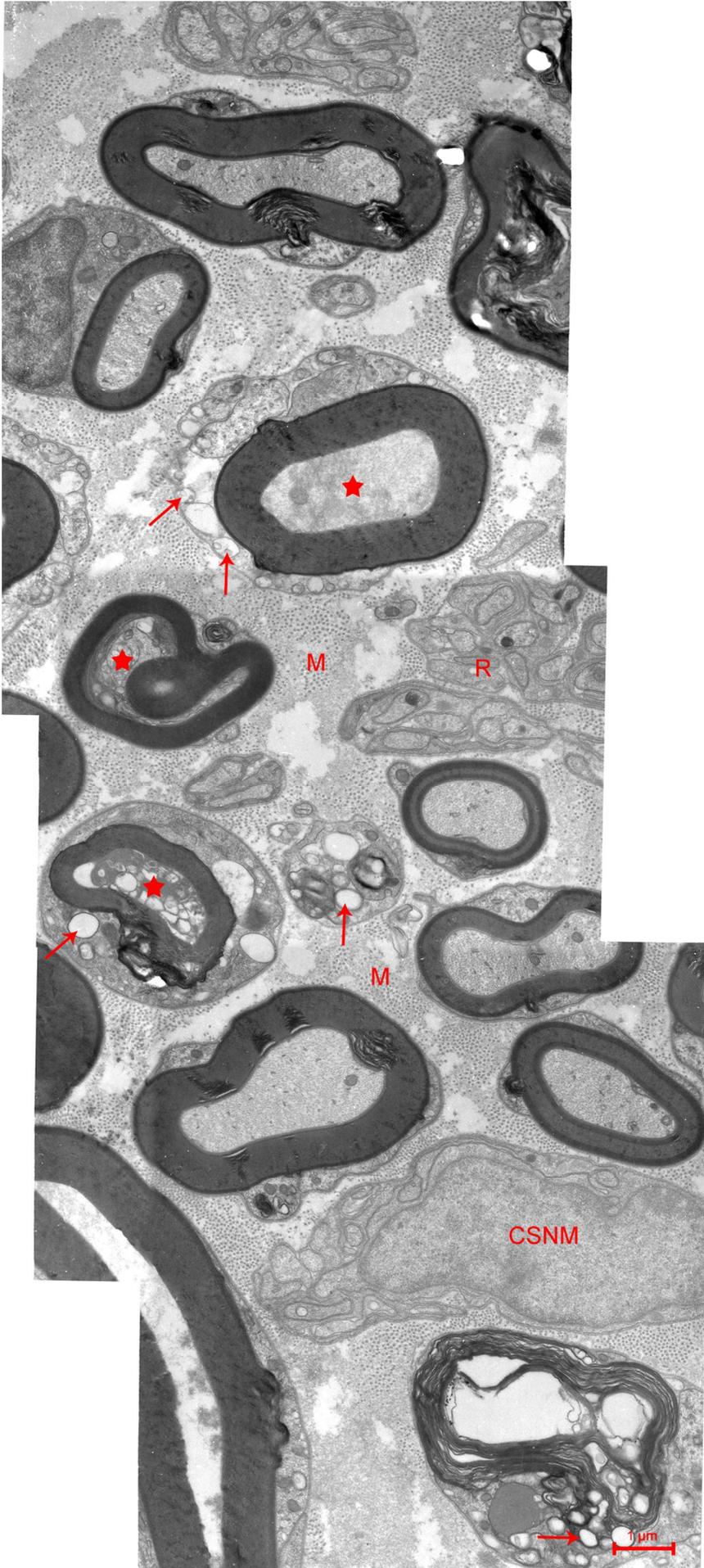


Figura 19

**Figura 20 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Neste campo, são visualizados agregados de delgadas fibras amielínicas regenerativas (Am) cercadas por extensões do citoplasma de células de Schwann, ao lado de fibras degeneradas (→), restos mielínicos (☆) e fibras mielínicas de aspecto íntegro (★). L, Linfócito. Barra = 1 μm.

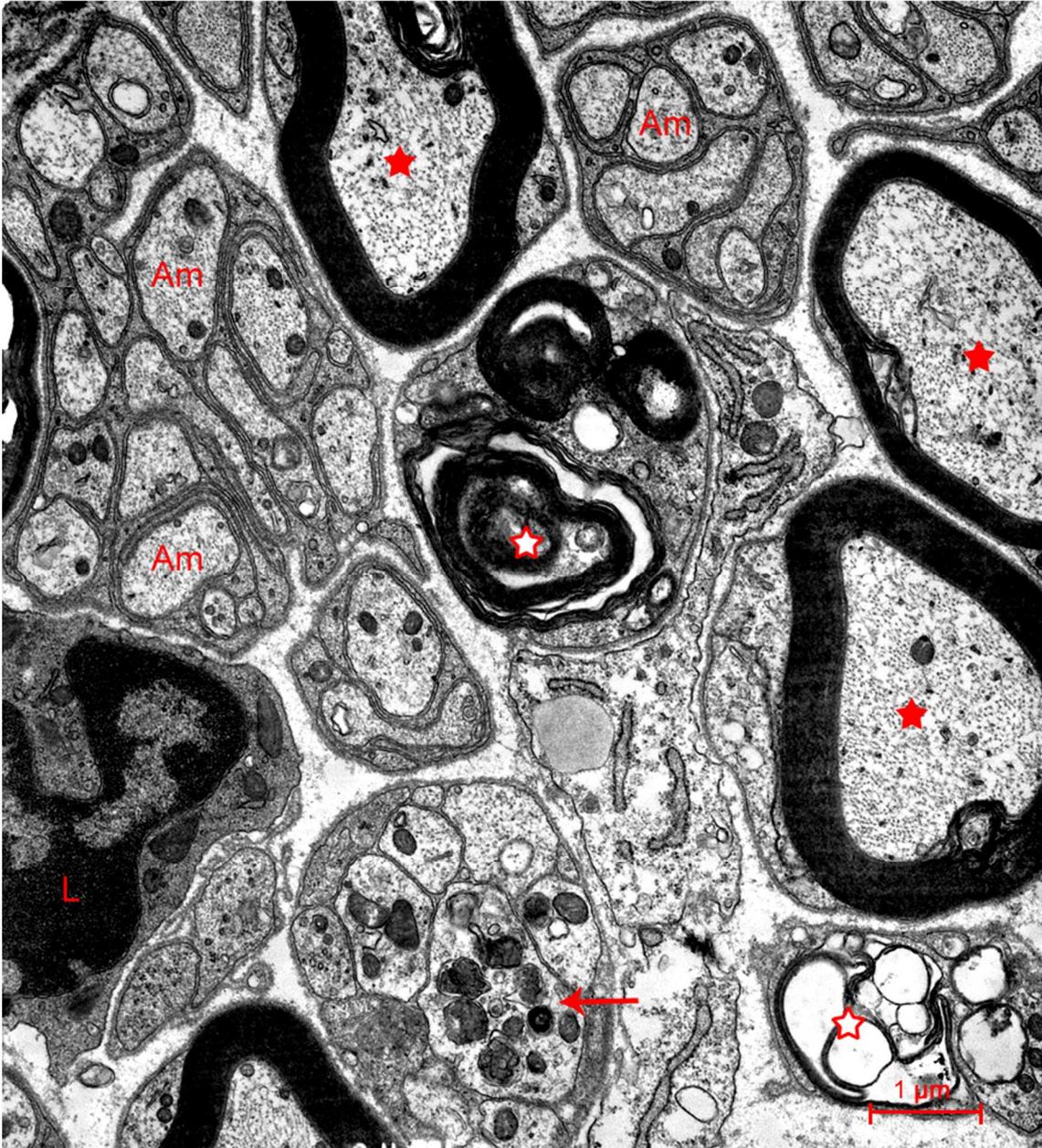


Figura 20

**Figura 21 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Células de Schwann de perfil não-mielinizante (**CSNM**), abrigando fibras degenerativas (**Am**) em sulcos em sua superfície. Cabeças de seta (▶), Lâmina basal. **CS**, Núcleo de célula de Schwann mielinizante. Barra = 300 nm.

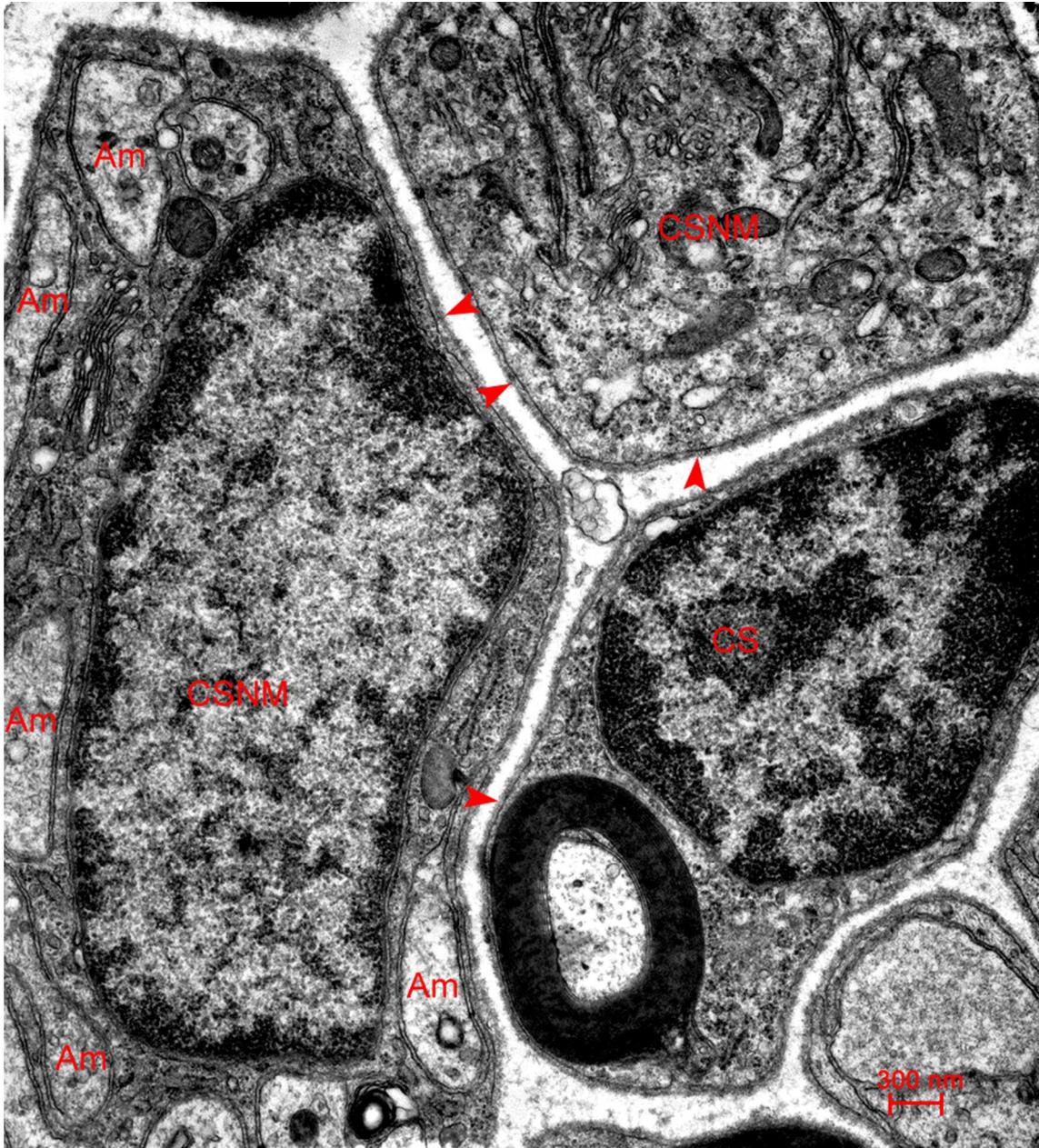


Figura 21

**Figura 22 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 96 horas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 96 horas pós-lesão, corte transversal. Células de Schwann de perfil não-mielinizante envolvida por sua lâmina basal (▶). Barra = 300 nm.

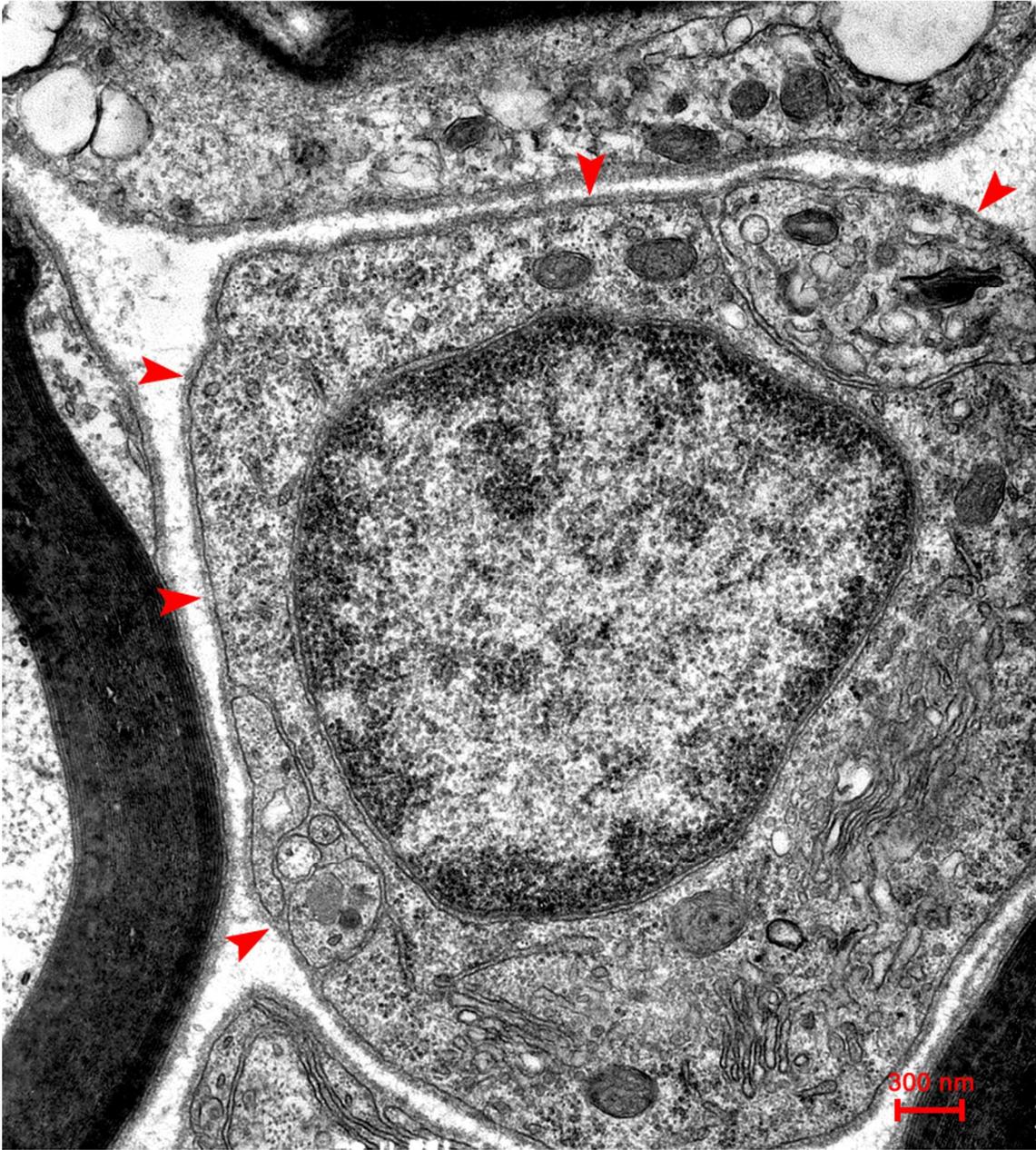
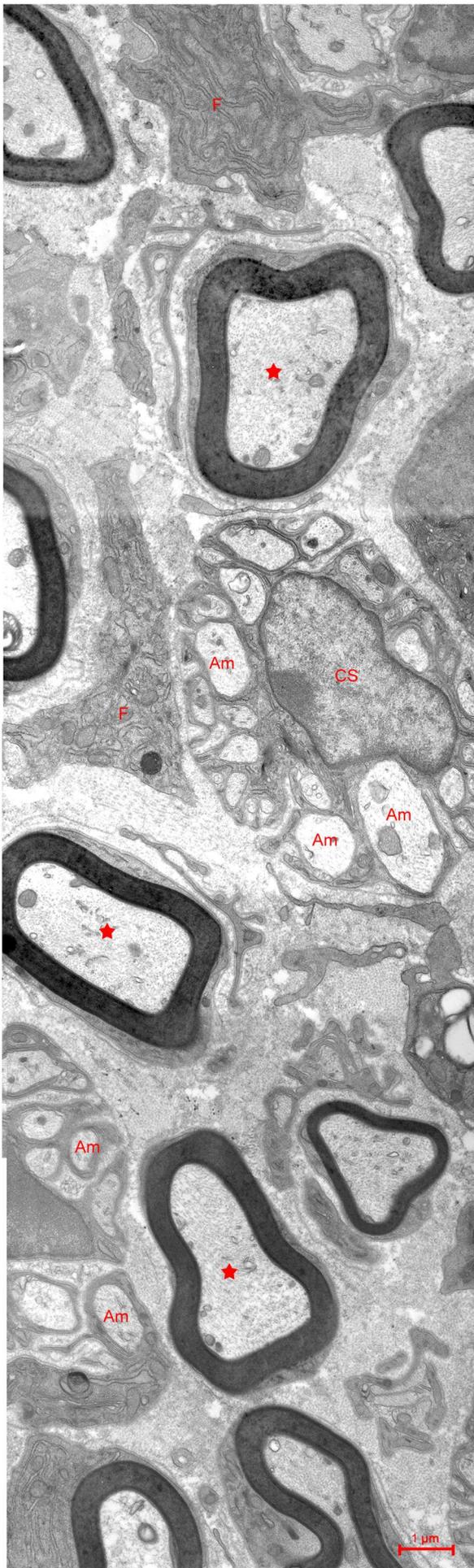


Figura 22

**Figura 23 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 3 semanas pós-lesão, corte transversal. Observa-se fibras mielínicas de aspecto íntegro, com base na organização do citoesqueleto (★), ao lado de fibras amielínicas acompanhadas de sua célula de Schwann não-mielinizante (CS). Algumas fibras apresentam bainha de mielina delgada (→), indicando uma mielinização recente. Observe a matriz extracelular (M) ainda com padrão extremamente fibrilar, com fibrilas colágenas imersas em material amorfo. F, Fibroblastos. Barra = 1 µm.



**Figura 23**

**Figura 24 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 3 semanas pós-lesão, corte transversal. Várias fibras mielínicas regeneradas apresentam bainha de mielina ainda delgada ( → ) ou de espessura intermediária; as células de Schwann mielinizantes apresentam citoplasma abundante e rico em organelas ( \* ). Abundantes fibras amielínicas regenerativas (Am) se encontram em sulcos nas superfícies das células de Schwann, cercadas por extensões citoplasmáticas irregulares destas células. Observe a abundante matriz extracelular rica em fibrilas colágenas (M). F, Fibroblastos. Barra = 1  $\mu$ m.



Figura 24

**Figura 25 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 3 semanas pós-lesão, corte longitudinal. As fibras mielínicas apresentam bainha de mielina ainda relativamente delgada (→) e ainda se encontram bem espaçadas entre si devido à abundante matriz extracelular (M) com feixes de fibrilas colágenas em arranjo paralelo por entre as fibras nervosas. Alguns restos mielínicos ( \* ) são vistos em vacúolos no citoplasma de células de Schwann. MØ, Macrófago. Barra = 3 µm.

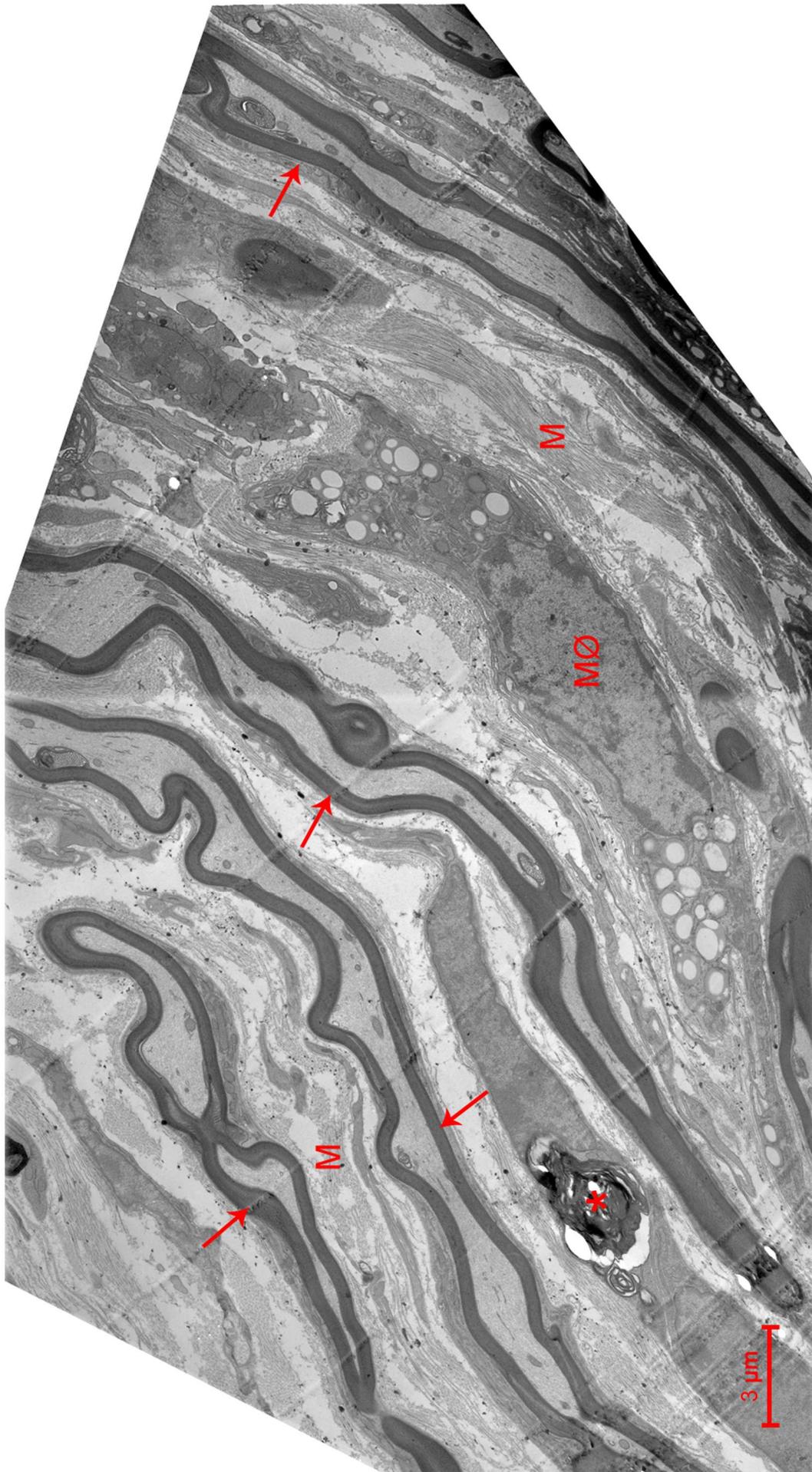


Figura 25

**Figura 26 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 3 semanas pós-lesão, corte longitudinal. Fibras mielícas com bainha de mielina ainda delgada (→) se encontram separadas por feixes de fibrilas colágenas da matriz extracelular endoneural (M). Fibroblastos (F) e macrófagos (MØ) fazem parte deste endoneuro. Fibras amielínicas regenerativas (Am) encontram-se separadas por extensões citoplasmáticas de células de Schwann não-mielinizantes. Barra = 3 µm.



Figura 26

**Figura 27 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal selvagem - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo selvagem, 3 semanas pós-lesão, corte longitudinal. Fibras mielínicas recém-regeneradas mostram abundante citoesqueleto axonal (\*), entremeadas por uma rica matriz fibrilar endoneural (M). A mielina das fibras ainda se apresenta delgada (→). Barra = 1 µm.

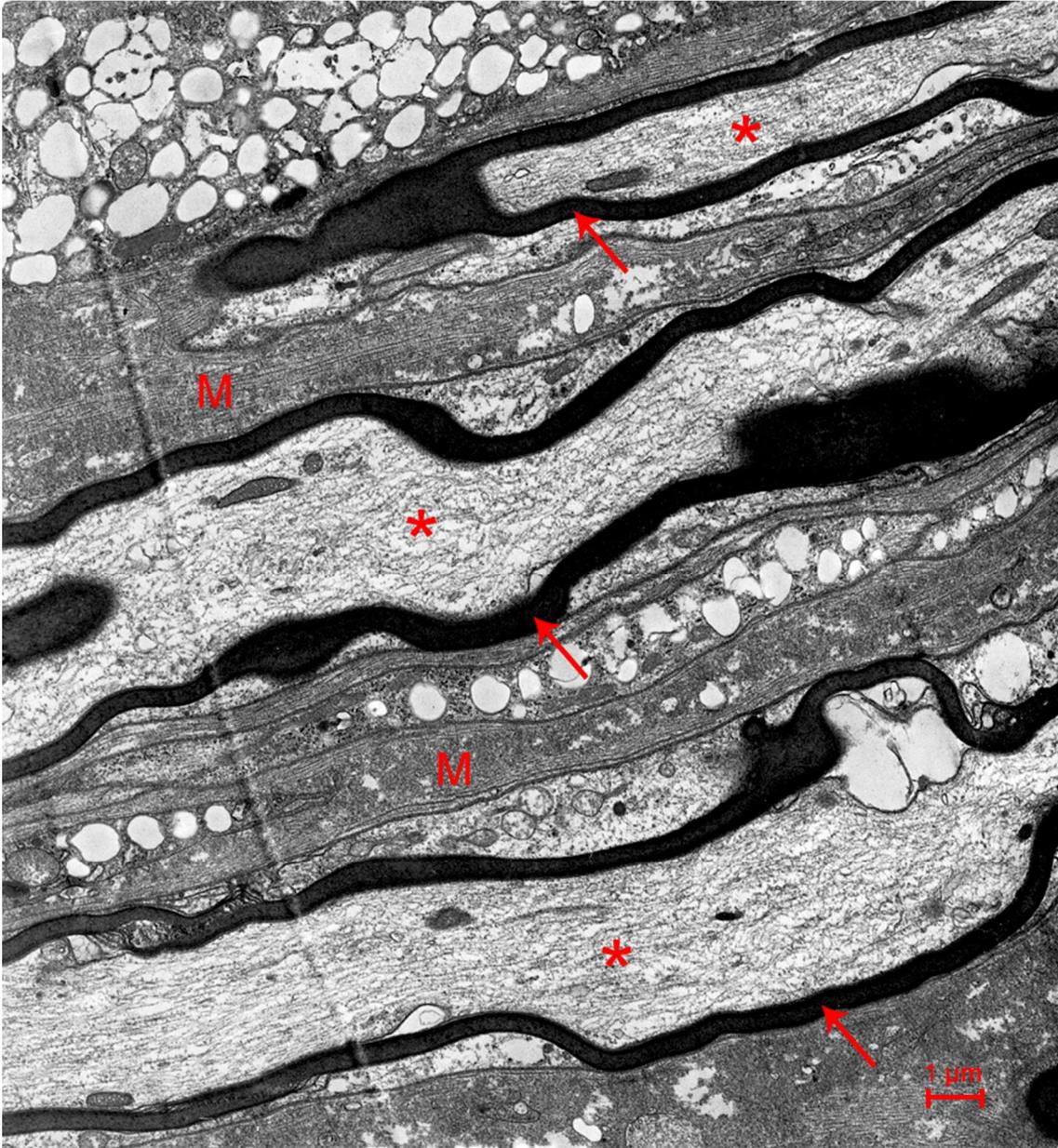


Figura 27

**Figura 28 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 3 semanas pós-lesão, corte transversal. A grande maioria das fibras mielínicas encontra-se íntegra, com os componentes do citoesqueleto axonal estruturados (★). Praticamente não se observa fibras degeneradas ou resíduos mielínicos. Abundantes fibras amielínicas (Am) encontram-se organizadas em sulcos na superfície de células de Schwann não-mielinizantes, que formam extensões citoplasmáticas de contorno mais regular. Observe os espaços endoneurais, onde a matriz fibrilar - inicialmente abundante em estágios precoces da regeneração do nervo - agora ocorre em quantidade muito menor, com poucos feixes de fibrilas colágenas (M). Barra = 1 μm.

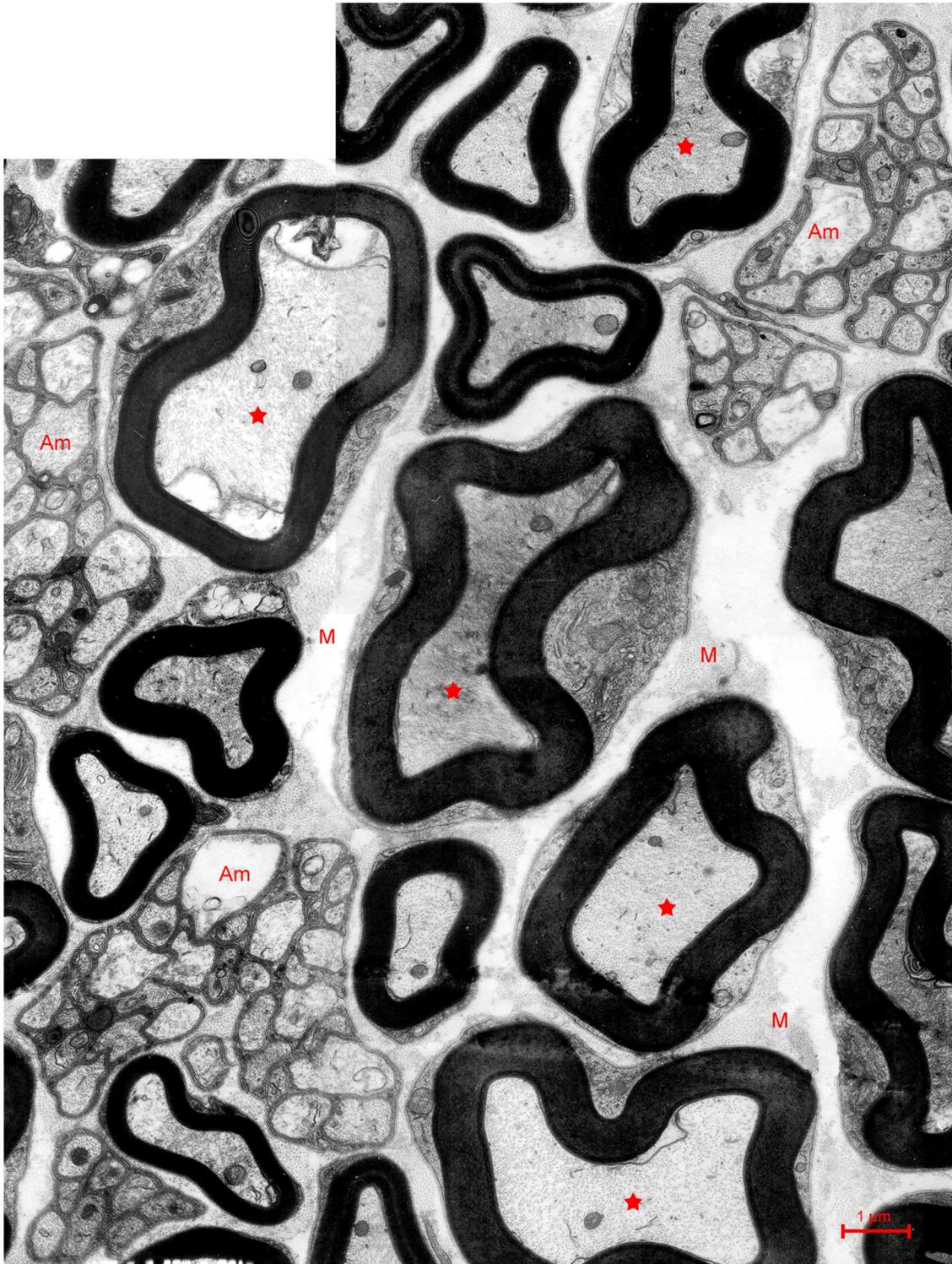


Figura 28

**Figura 29 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 3 semanas pós-lesão, corte transversal. Grandes fibras mielínicas, com axônios calibrosos (★) e mielina espessa (→) predominam no nervo regenerado. O endoneuro abriga agora uma matriz extracelular agora rarefeita, em comparação a estágios anteriores, com pequena quantidade de feixes de fibrilas colágenas (M). CS, Célula de Schwann; V, vaso sanguíneo com hemácia. Barra = 1 μm.

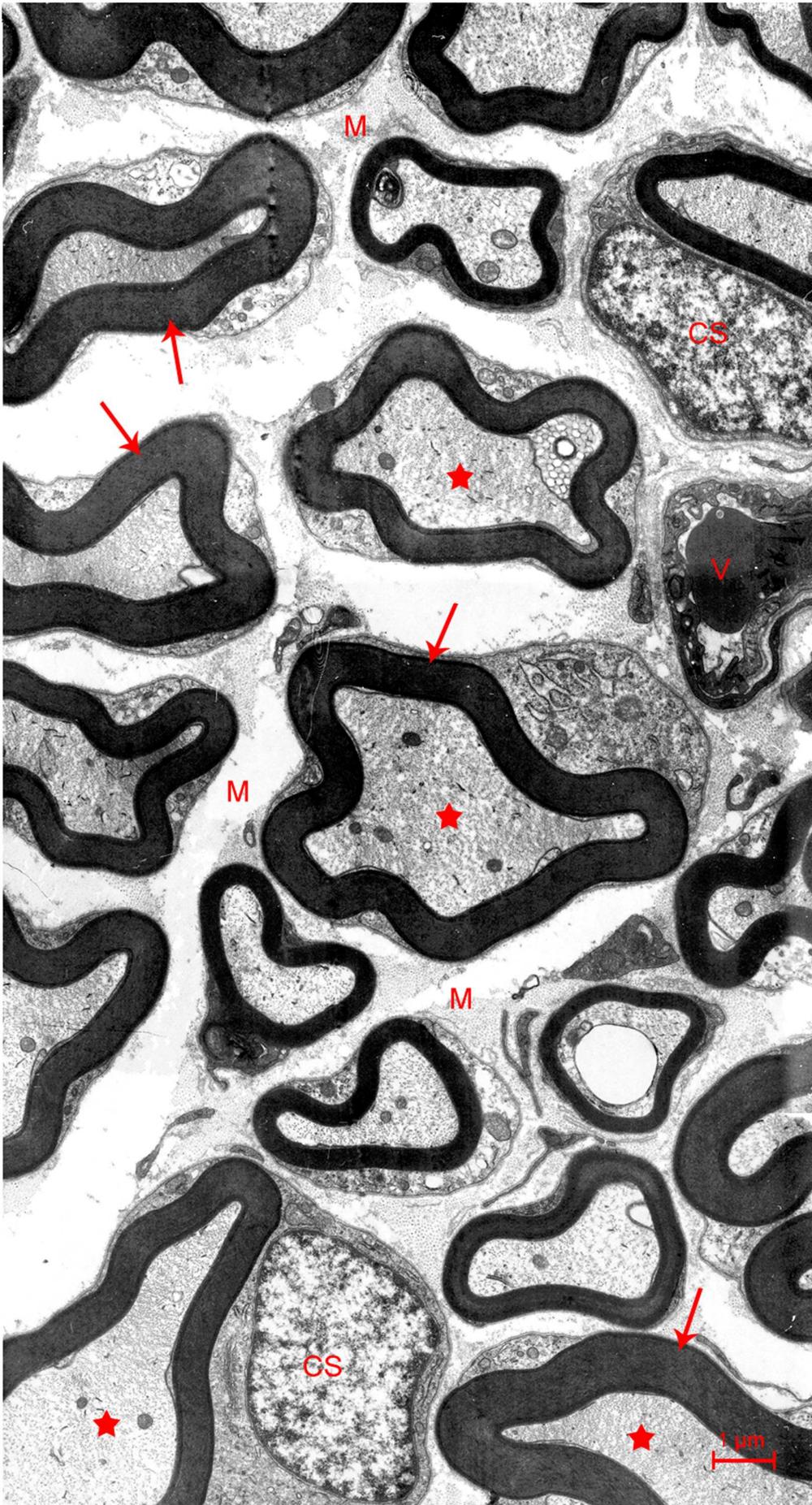
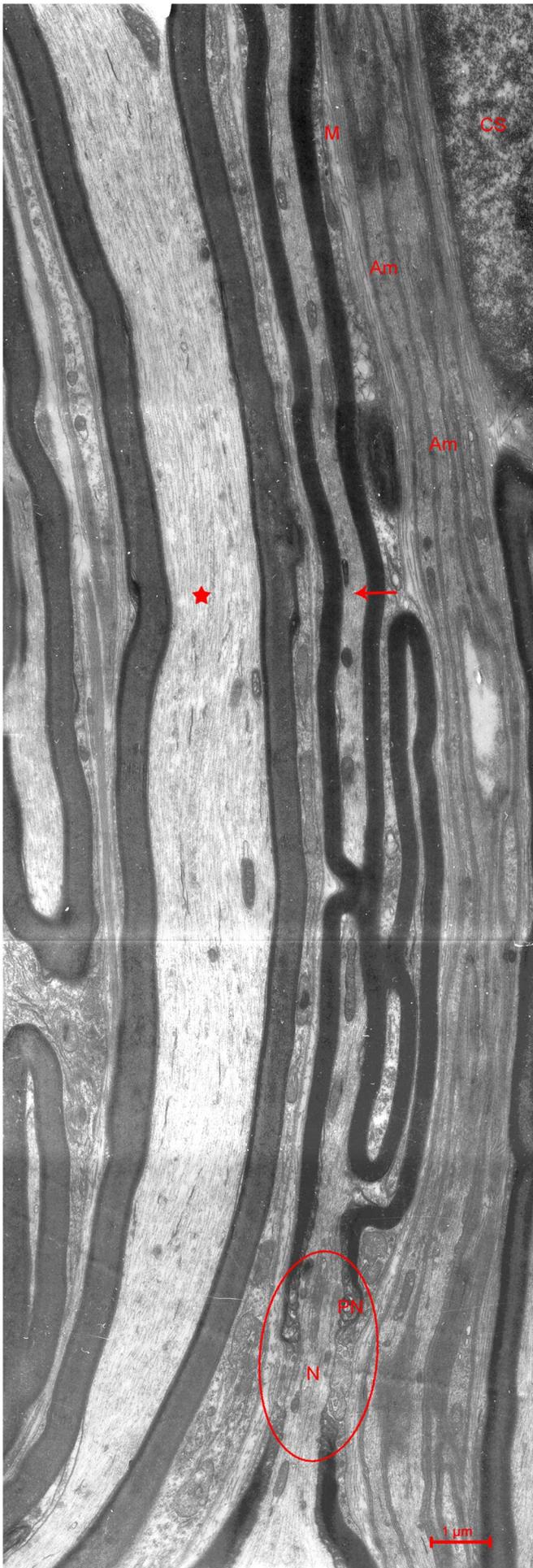


Figura 29

**Figura 30 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 3 semanas pós-lesão, corte longitudinal. Destaca-se na imagem uma espessa fibra mielínica, mostrando um citoesqueleto plenamente reestruturado (★), ao lado de fibras mielínicas menores (→) e fibras amielínicas regeneradas (Am), em meio a escassa matriz endoneural (M). A área circundada destaca um nodo de Ranvier (N), acompanhado de seus paranodos (PN). Barra = 1 μm.



**Figura 30**

**Figura 31 Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 3 semanas pós-lesão, corte longitudinal. Fibras miélicas regeneradas, com axônios calibrosos e espessa bainha de mielina, mostrando a exuberância de seu citoesqueleto reestruturado (★). CS, Núcleo de célula de Schwann. Barra = 1µm.



**Figura 31**

**Figura 32 - Nervo ciático - microscopia eletrônica - animal *knockout* para galectina-3 - 3 semanas pós-lesão.** Eletromicrografia de nervo ciático de camundongo *knockout* para galectina-3, 3 semanas pós-lesão. Grupos de fibras amielínicas (**Am**) envoltas por extensões citoplasmáticas delgadas e regulares de células de Schwann. **CS**, Núcleo de célula de Schwann; **M**, Fibrilas colágenas da matriz extracelular endoneural. Barra = 1  $\mu$ m.

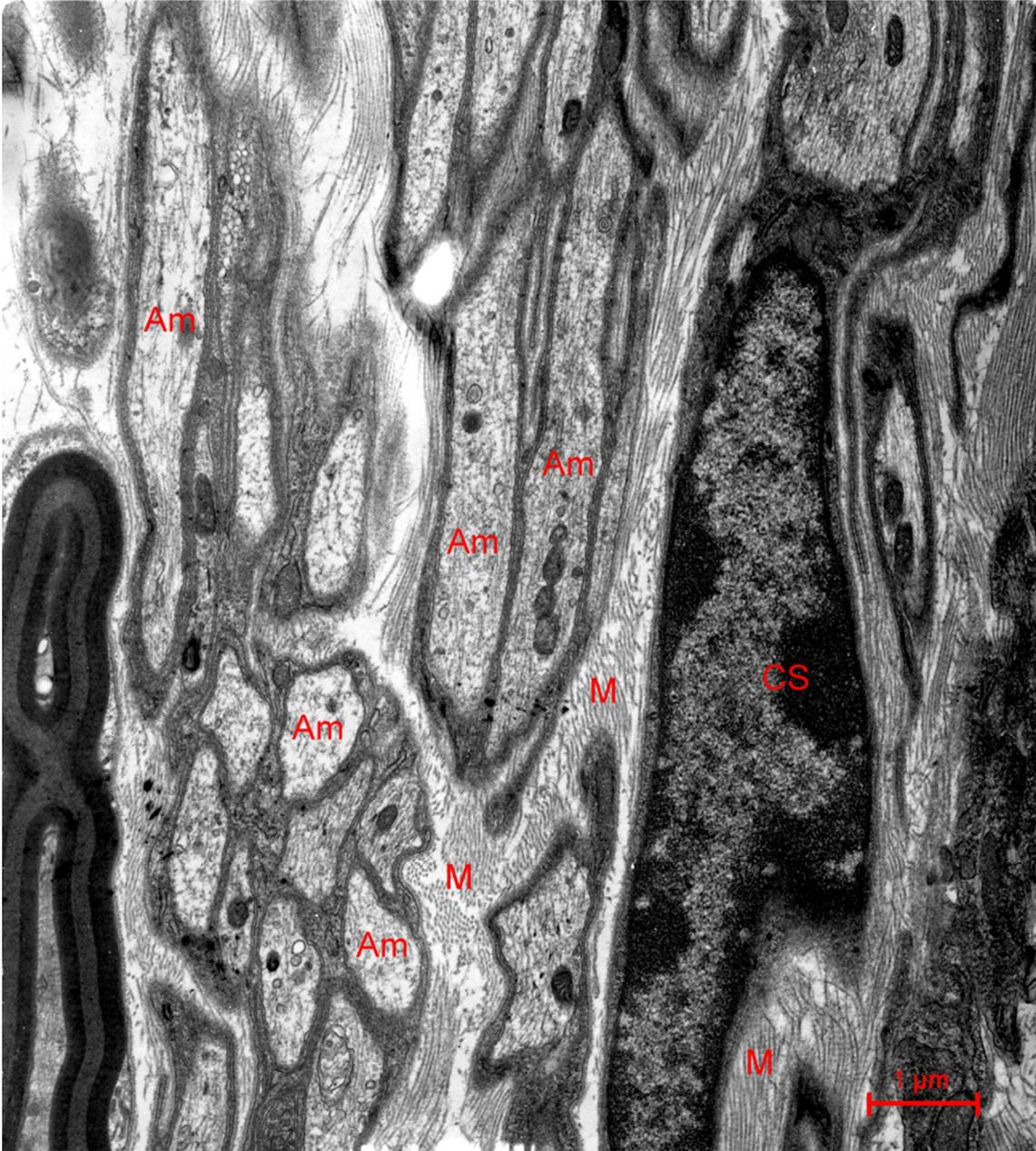


Figura 32

#### IV.4. Análise Morfométrica

Os estudos morfométricos foram realizados sobre o grupo com sobrevida de três semanas, uma vez que – sob o ponto de vista qualitativo – este foi o grupo que se mostrou com as diferenças mais marcantes entre camundongos selvagens e camundongos *knockout* para galectina-3. Todos os resultados estão expressos com média±DP dos grupos de animais. A análise quantitativa do número de fibras nervosas mielínicas mostrou que elas estavam significativamente mais numerosas ( $P < 0,05$ ) no grupo de animais *knockout* para galectina-3 do que no grupo de animais selvagens (**Figura 33A**). Com relação à área do axônio, à área da fibra, e à área da mielina, houve também uma diferença estatisticamente significativa entre animais *knockout* para galectina-3 e animais selvagens: os primeiros apresentaram sempre resultados mais altos (**Figuras 33B, C e D**). Com relação à razão G (*G ratio*), os animais *knockout* para galectina-3 também mostraram resultados melhores, uma vez que a maioria das fibras caiu na faixa normal (0,6-0,7 – **Figura 33E**).

#### IV.5. Análise Funcional – Índice de Função do Nervo Ciático

Durante as 3 semanas após injúria, os camundongos foram testados de modo a avaliar a recuperação da função motora em 1, 2, e 3 semanas, usando a análise da pista de caminhada. Um total de 240 pegadas foram medidas para ambos os grupos (selvagem e *knockout* para galectina-3). Na primeira semana, houve uma pronunciada perda de função em ambos os grupos; na segunda semana, os camundongos *knockout* para galectina-3 apresentaram uma melhor recuperação da função motora comparado a animais selvagens. Na terceira semana, o IFNC de ambos os grupos retornou a valores próximos ao normal (**Figura 33F**).

**Figura 33 - Análise quantitativa.** Análise quantitativa do número de fibras nervosas miélicas (A), área da fibra (B), área do axônio (C), área da mielina (D), relação G (G-ratio) estratificada por faixas (E), e índice de função do nervo ciático (F) em camundongos selvagens e *knockout* para galectina-3. Os valores representam a média  $\pm$  DP. \*P < 0,05.

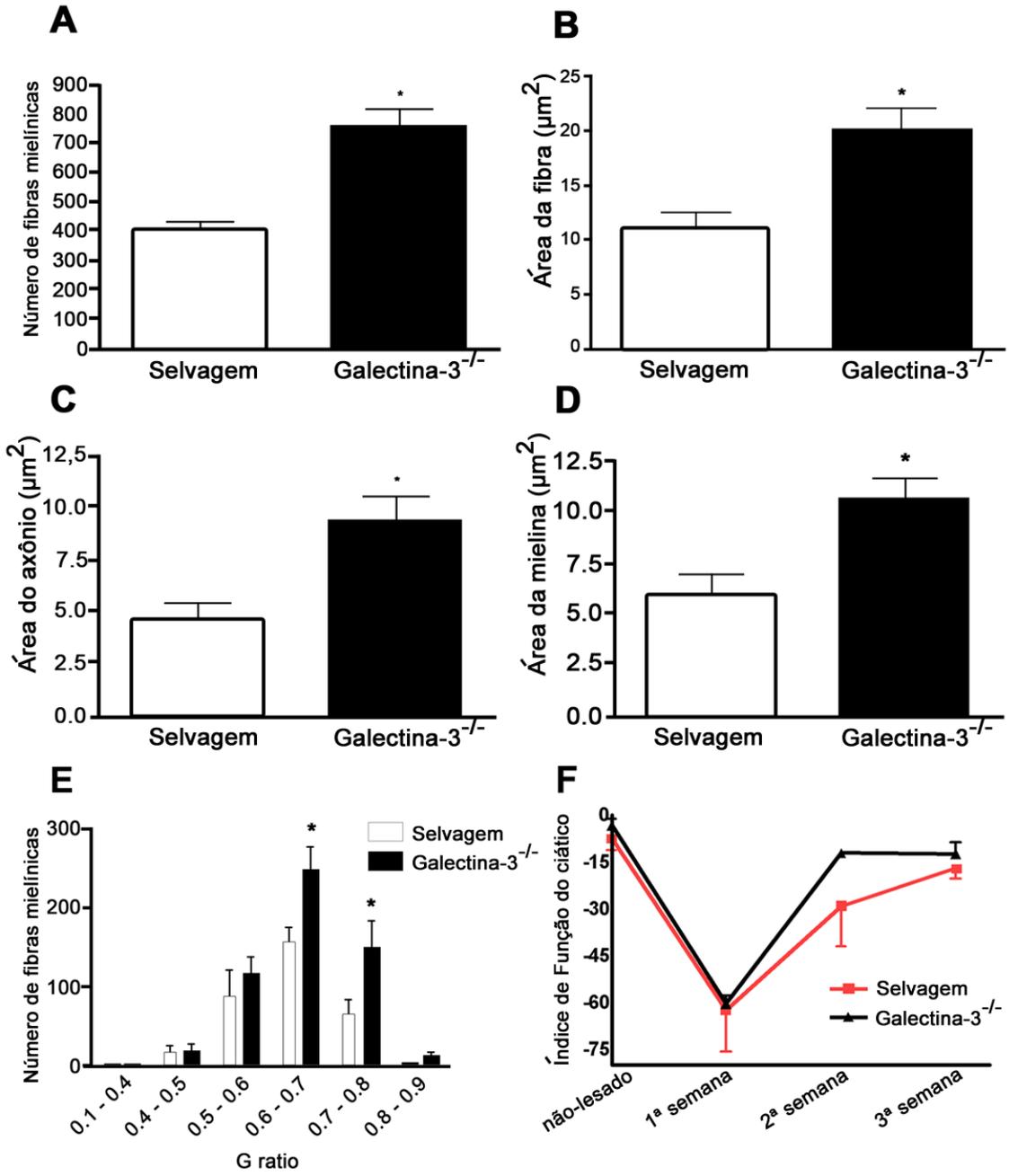


Figura 33

## IV.6. Análise Imuno-Histoquímica

### IV.6.1. Macrófagos e $\beta$ -Catenina

A **Figura 34** mostra os resultados da coloração com DAPI e da imunorreação para a evidenciação de macrófagos com anticorpo F4/80 nos animais controle (sem lesão), *knockout* para galectina-3 e selvagens em 96 horas após o esmagamento. As **Figuras 34 B-D, F-H e J-M** são aumentos maiores das **Figuras 34A, E e I**, respectivamente. A análise de cortes longitudinais de nervos ciáticos corados por DAPI mostraram que camundongos *knockout* para galectina-3 exibiram um nítido aumento na densidade de núcleos comparado a animais selvagens e animais controle (**Figuras 34A, E e I**). A imunorreação para o anticorpo F4/80 não apresentou qualquer reação aparente em animais controle não-lesados (**Figura 34B**). Em 4 dias pós-esmagamento, houve uma alta densidade de macrófagos nos animais selvagens (**Figura 34J**), embora a densidade tenha sido mais alta em camundongos *knockout* para galectina-3 (**Figura 34F**).

**Figura 34 - Nervos ciáticos - imuno-histoquímica para F4/80 e coloração com DAPI.** Cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos controle normais (sem lesão), selvagens e *knockout* para galectina-3 em 96 horas pós-lesão. As Figuras 34A, 34E e 34I mostram um aumento menor dos nervos contracorados com DAPI, de modo a exibir a densidade celular ao longo dos nervos. As Figuras 34B-34D, 34F-34H e 34J-34M são aumentos maiores das figuras anteriores, mostrando a imunorreação para F4/80 (Figuras 34B, 34F e 34J), a mesma área contracorada com DAPI (figuras 34C, 34G e 34L) e a sobreposição de F4/80 e DAPI (Figuras 34D, 34H e 34M). Observe as células coradas para F4/80 nos nervos de animais galectina-3 -/-. Uma destas células está em destaque na área demarcada da figura 34H. Barra: A, E e I = 100  $\mu$ m; B-D, F-H, J-M = 20  $\mu$ m; inserto = 10  $\mu$ m.

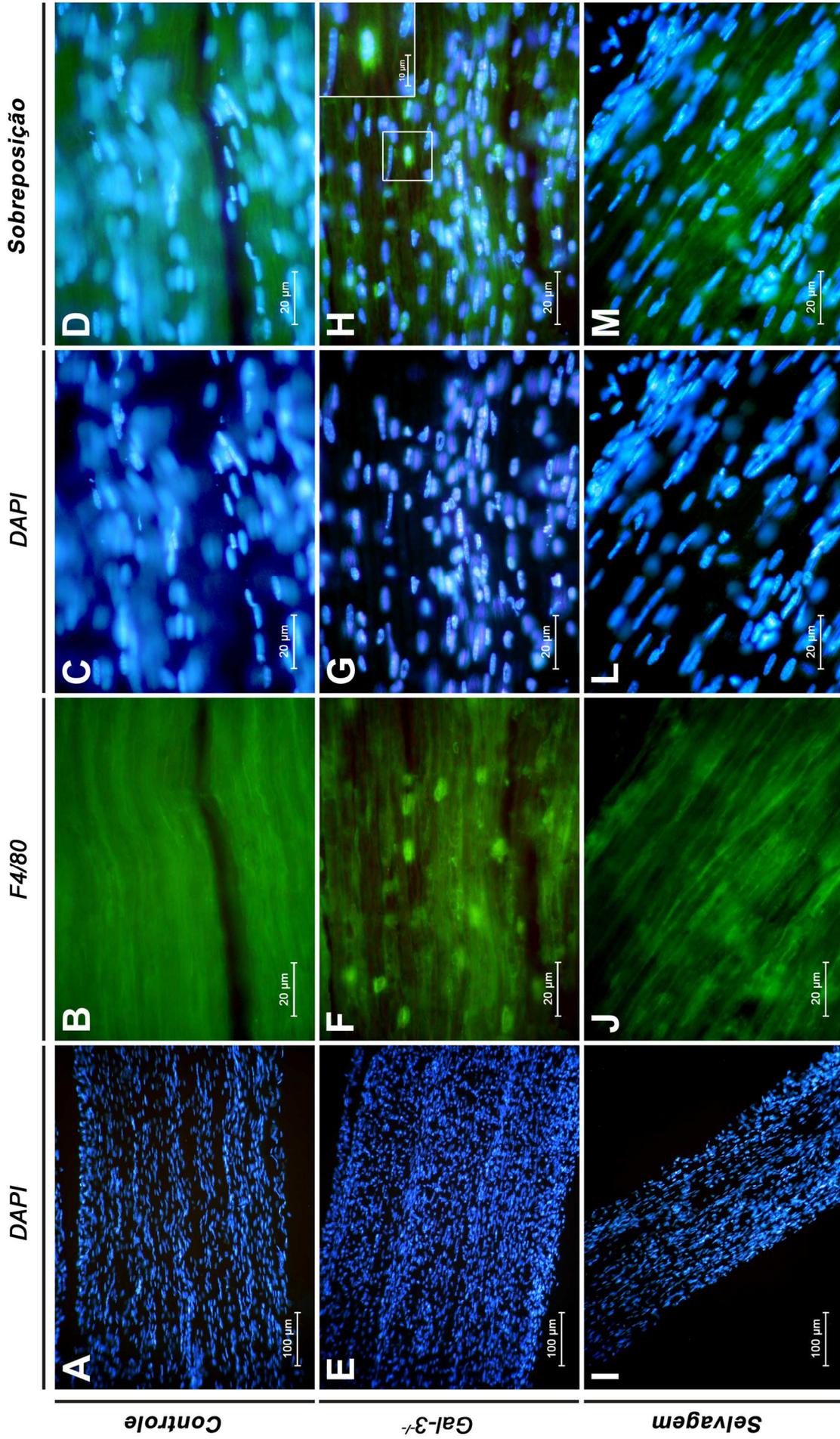


Figura 34

A **Figura 35** mostra os resultados da imunofluorescência para a proteína  $\beta$ -catenina, 96 horas após o esmagamento em cortes contracolorados com DAPI; é possível ver que a expressão de  $\beta$ -catenina foi muito aumentada em camundongos *knockout* para galectina-3 (**Figuras 35A-C**) comparado a animais selvagens (**Figuras 35D-F**). A marcação para  $\beta$ -catenina foi localizada em áreas correspondentes ao citoplasma e também a núcleos. A análise do Western blot confirmou os resultados de imunofluorescência para F4/80 e  $\beta$ -catenina (**Figura 36**). Houve um aumento na quantidade de células positivas para F4/80 em nervos esmagados de camundongos *knockout* para galectina-3 comparado a nervos esmagados de camundongos selvagens (**Figura 36A**). Houve um aumento de duas vezes na quantidade de  $\beta$ -catenina em nervos esmagados de animais *knockout* para galectina-3 comparado a nervos esmagados de animais selvagens (**Figura 36B**).

**Figura 35 - Nervos ciáticos - imuno-histoquímica para  $\beta$ -catenina.** Imuno-histoquímica para  $\beta$ -catenina e coloração com DAPI em cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos *knockout* para galectina-3 (Figuras 35A, 35B e 35C) e selvagens (Figuras 35D, 35E e 35F) em 96 horas pós-lesão. Observe a expressão de  $\beta$ -catenina no citoplasma (  $\rightarrow$  ) e em núcleos (  $\blacktriangleright$  ) nos animais *knockout*. Barra = 20  $\mu$ m.

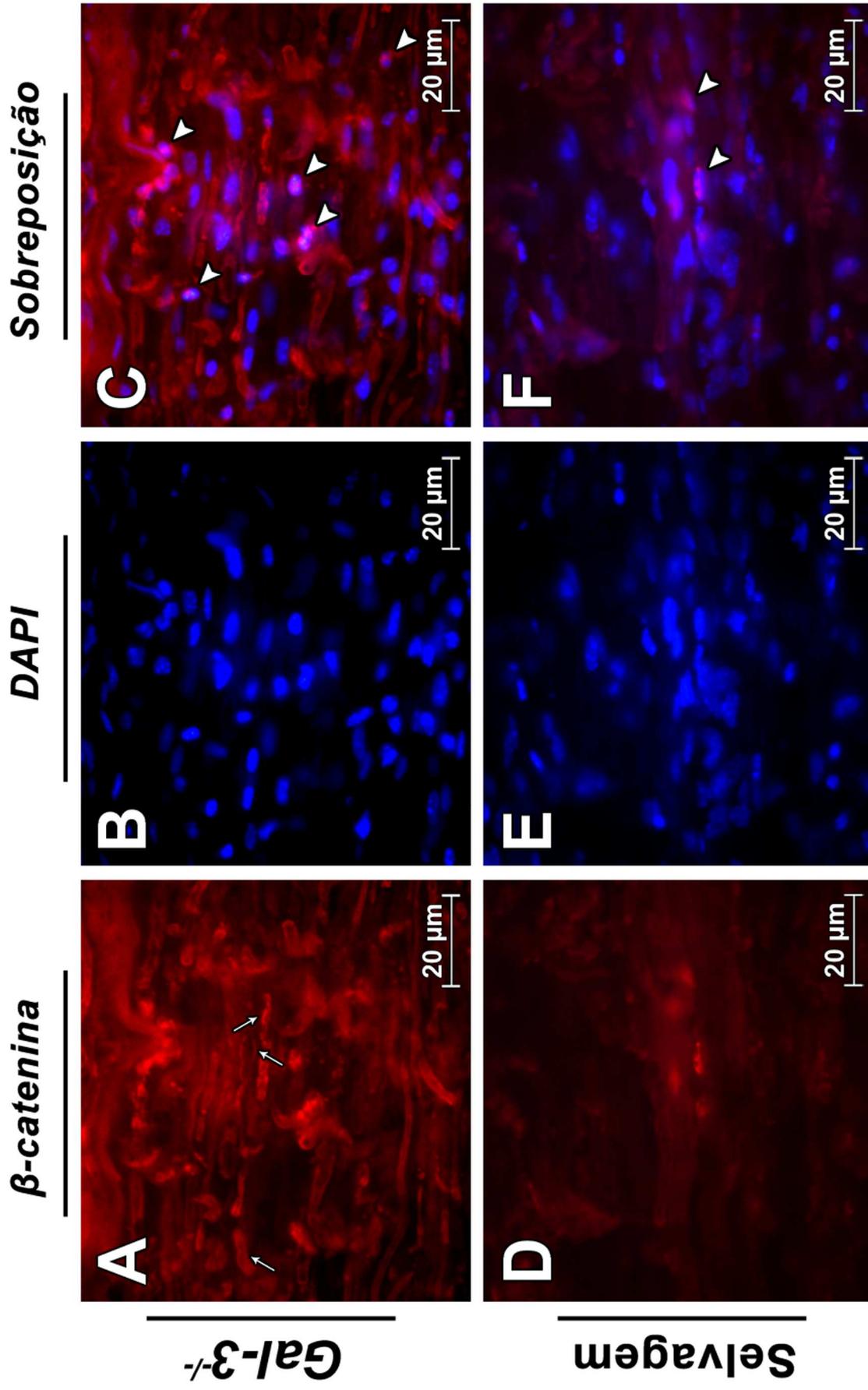
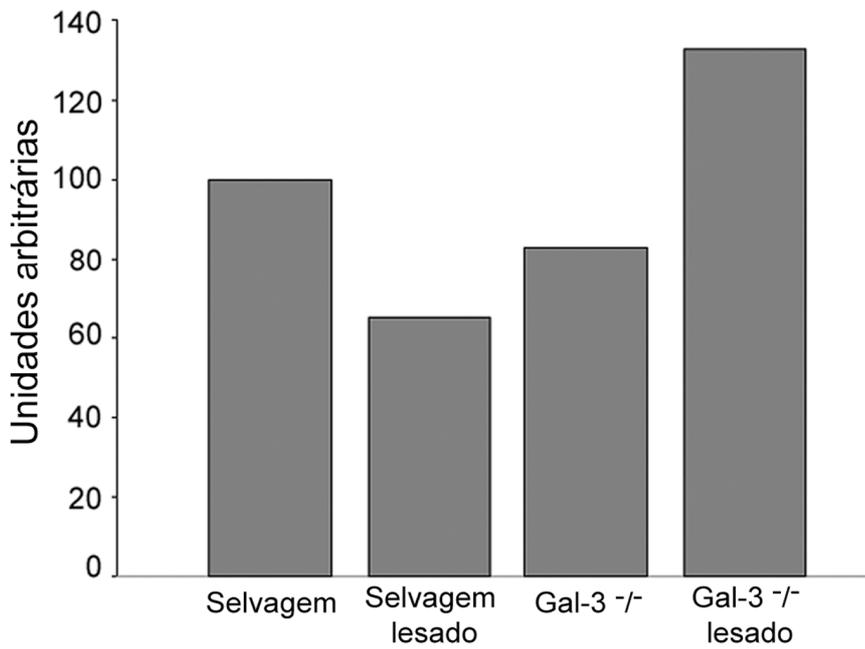
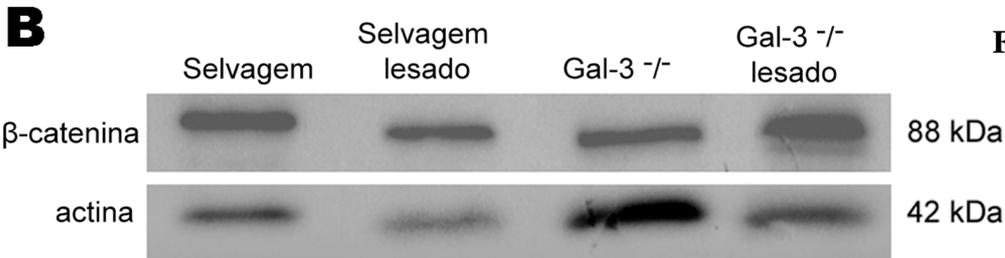
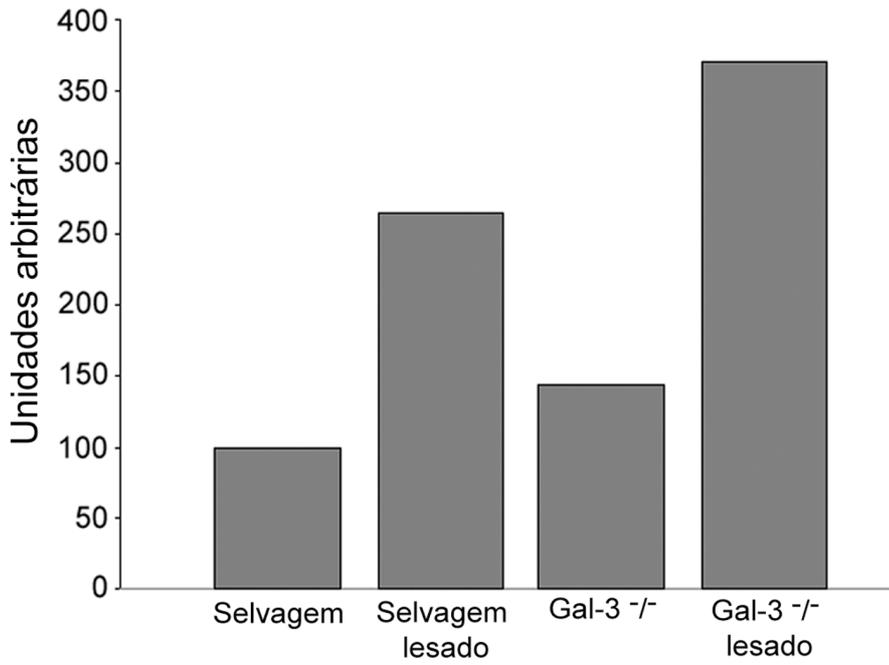
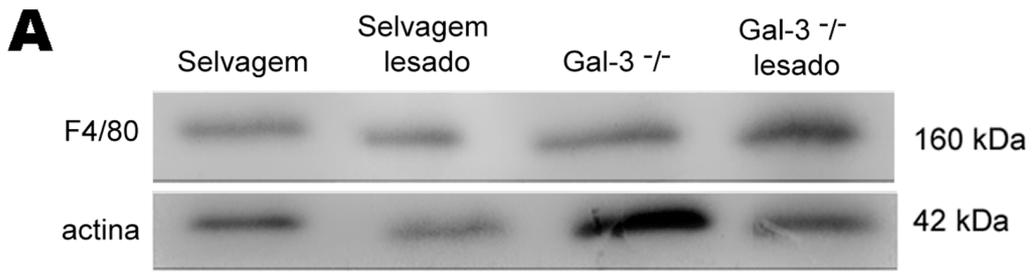


Figura 35

**Figura 36. - Imunoblotting para F4/80 e  $\beta$ -catenina.** A expressão de F4/80 e de  $\beta$ -catenina está aumentada em 96 horas pós-lesão de camundongos *knockout* para galectina-3. Extratos de nervos ciáticos submetidos a esmagamento foram analisados em Western blot usando anticorpos anti-F4/80 (A) e anti- $\beta$ -catenina (B). A quantificação dos extratos através de Western blot revelou uma expressão aumentada de F4/80 (160 kDa) em nervos de animais galectina-3<sup>-/-</sup> (A) e um aumento de mais de 2 vezes nos níveis de expressão de  $\beta$ -catenina (88 kDa) quando em comparação com animais selvagens (B). Um experimento representativo está mostrado em A e B. Três experimentos foram realizados.



**Figura 36**

#### IV.6.2. Células de Schwann

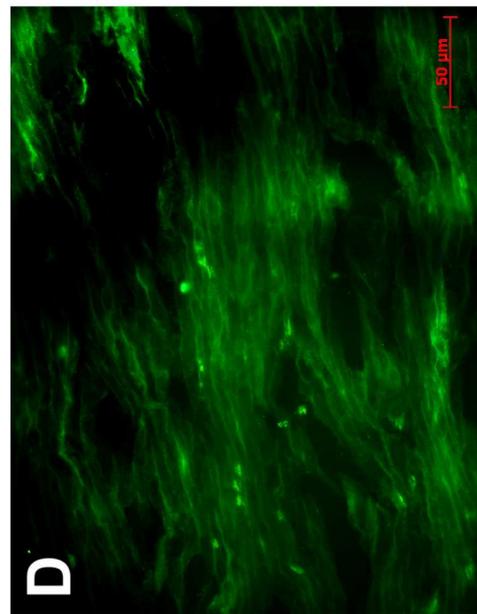
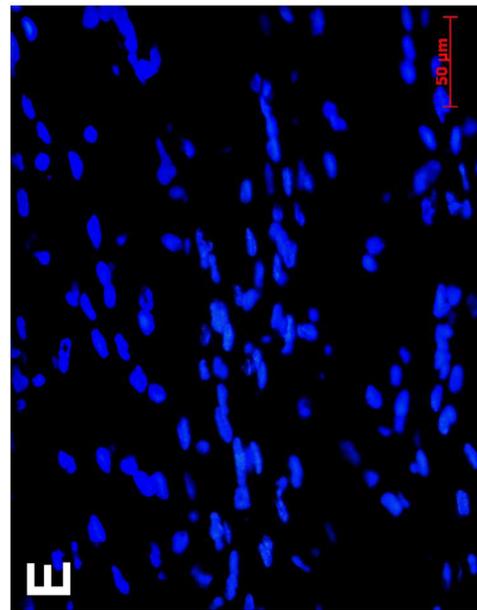
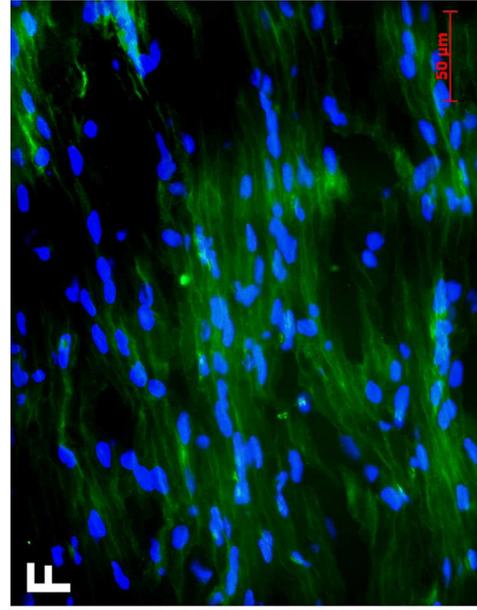
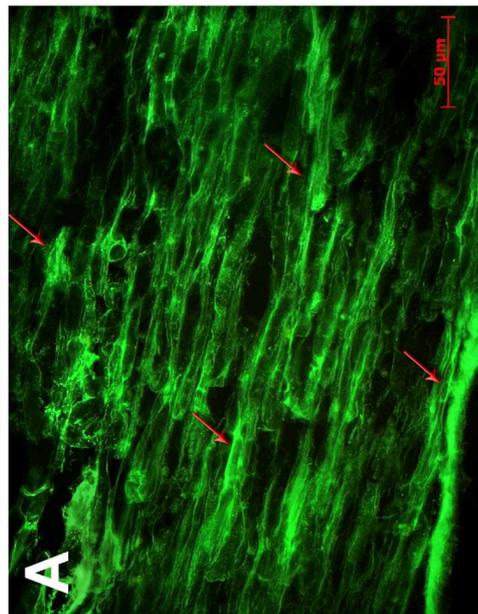
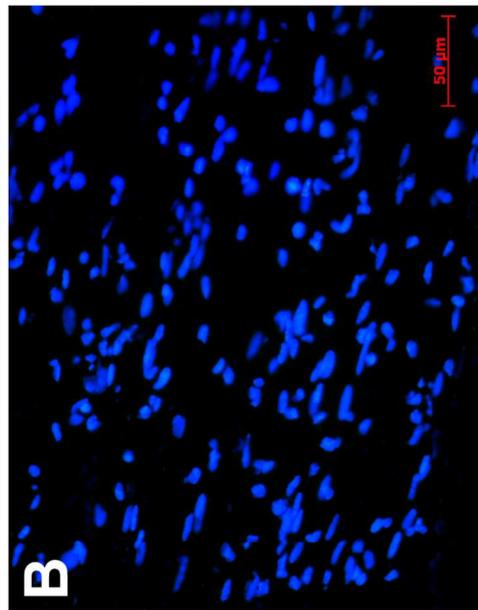
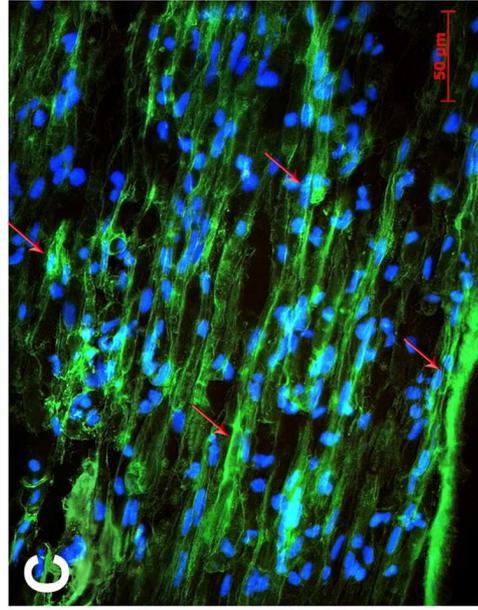
As fibras em regeneração dependem de um bom suprimento de células de Schwann, as quais provavelmente proliferam rapidamente em nervos em regeneração. A fim de avaliar qualitativamente o envolvimento de células de Schwann na melhor regeneração de animais *knockout* para galectina-3 e comparar os resultados com animais selvagens, foi realizada a imunocitoquímica usando o anticorpo S-100 para a marcação de células de Schwann, associado à coloração nuclear com DAPI. As **Figuras 37A e D** mostram que, em 96 horas pós-lesão, os nervos esmagados de animais *knockout* para galectina-3 exibiram uma marcação muito mais intensa para S-100 do que nervos esmagados de animais selvagens; nas **Figuras 37B e E**, pode-se observar através da coloração com DAPI a quantidade de núcleos nos nervos. As **Figuras 37C e F** mostram as imagens superpostas das colorações com S-100 e DAPI. Para avaliar quantitativamente o número de células de Schwann, foram usados cortes longitudinais de nervos de animais selvagens e *knockout* para galectina-3 corados com DAPI. A **Tabela 1** mostra os resultados desta quantificação e confirma um aumento significativo no número de núcleos celulares alongados em nervos esmagados de animais *knockout* para galectina-3 quando comparado a nervos de animais selvagens. Isto é compatível com um aumento no número de células de Schwann, uma vez que tais células têm núcleos tipicamente alongados e que são diferentes de outras células, tais como macrófagos.

**Figura 37 - Nervos ciático - imuno-histoquímica para S-100 e coloração com DAPI.** Imuno-histoquímica para células de Schwann e coloração com DAPI em cortes longitudinais de nervos ciáticos de camundongos *knockout* para galectina-3 (Figuras 37A, 37B e 37C) e selvagens (Figuras 37D, 37E e 37F) em 96 horas após esmagamento. Observe a expressão aumentada de S-100 em áreas correspondentes ao citoplasma de células de Schwann (→) nos animais *knockout*. Barra = 50 µm.

**Sobreposição**

**DAPI**

**S-100**



**Gal-3<sup>-/-</sup>**

**Selvagem**

**Figura 37**

**Tabela 1.** Existe um aumento significativo no número de núcleos celulares alongados corados por DAPI em 96 horas pós-lesão em nervos ciáticos de animais *knockout* para galectina-3, em comparação a nervos de animais selvagens submetidos ao mesmo trauma. Os valores representam a média  $\pm$ MEP. **\*\*P < 0,01.**

**Tabela 1.** Quantificação dos núcleos alongados/mm<sup>2</sup> em cortes longitudinais dos nervos ciáticos de animais selvagens e *knockout* para galectina-3.

	nº de núcleos alongados	
Selvagem normal	157.3 ±11.2	
Selvagem lesado	195.5 ±14.8	**
Galectina-3 <sup>-/-</sup> normal	170.0 ±14.8	
Galectina-3 <sup>-/-</sup> lesado	365.0 ±49.4	

## V. DISCUSSÃO

Em função do conhecimento estabelecido a respeito de que tanto a remoção de restos mielínicos como a proliferação de células de Schwann estarem claramente associados ao sucesso da regeneração do SNP, é conveniente especular sobre se a presença ou ausência de galectina-3 afetaria a regeneração de um nervo esmagado, uma vez que trabalhos clássicos enfatizam este papel realizado pela galectina-3. Para responder esta questão, foi realizado o esmagamento de nervos ciáticos de camundongos selvagens e *knockout* para galectina-3, de modo a avaliar, por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, o efeito da ausência da galectina-3 sobre o sucesso da regeneração no SNP. Os resultados mostraram um aumento na regeneração de nervos ciáticos em camundongo *knockout* para galectina-3 quando comparados a animais selvagens. Este trabalho também propõe a busca para o mecanismo que rege a proliferação das células de Schwann; associado a este mecanismo, foi encontrado um aumento na expressão de  $\beta$ -catenina em camundongos *knockout* para galectina-3, o que indicou um possível envolvimento da via de sinalização Wnt- $\beta$ -catenina.

O principal resultado deste estudo é que camundongos *knockout* para galectina-3 exibiram uma regeneração muito mais rápida de fibras do nervo ciático após compressão cirúrgica (esmagamento), comparado a animais selvagens submetidos ao mesmo trauma. Estes resultados foram observados e confirmados pela microscopia de luz, e pela quantificação de parâmetros intrínsecos à estrutura do nervo, tais como área do axônio, área da fibra, área da bainha de mielina, e número de fibras mielínicas. O cálculo da razão G (*G ratio*) indicou que a maioria das fibras nervosas de animais *knockout* para galectina-3 mostrou uma melhor relação axônio/mielina, o que indica um melhor resultado funcional.

Uma vez que a galectina-3 é expressa em macrófagos ativados e em células de

Schwann após lesão, relatos anteriores têm sugerido que esta proteína é uma importante molécula na remoção de resíduos axonais e mielínicos durante a degeneração Walleriana de nervos periféricos (Reichert et al., 1994). Estes autores descobriram que a galectina-3 é superexpressa no local de lesão em nervos ciáticos, e este aumento estava correlacionado com a fagocitose da mielina pelas células de Schwann (lectinofagocitose). Sabe-se que a remoção propriamente dita de resíduos axonais e mielínicos é um dos fatores associados ao sucesso da regeneração de nervos periféricos. Consequentemente seria plausível supor que a ausência de galectina-3 resultasse em uma falha na remoção de resíduos mielínicos, e, como resultado, o processo de degeneração Walleriana e de regeneração do nervo seria prejudicado. Os resultados mostrados por este trabalho, entretanto, indicaram que nervos de animais *knockout* para galectina-3 mostraram uma melhor e mais rápida regeneração. De forma interessante, um relato recente mostrou que a galectina-3 inibe a proliferação de células de Schwann em cultura de nervo ciático (Gustavsson et al., 2007). Estes autores injetaram galectina-3 humana recombinante no meio de cultura de segmentos de nervos periféricos de camundongos, e observaram uma diminuição na proliferação das células de Schwann, através da incorporação de BrdU (bromodeoxiuridina), sugerindo que esta proteína esteja envolvida na proliferação das células de Schwann *in vitro*. No presente trabalho, os dados *in vivo* proporcionam evidências de que a ausência de galectina-3 forma um ambiente favorável para o incremento à regeneração do nervo, e este resultado pode ser – pelo menos em parte – explicado pelo aumento na proliferação das células de Schwann. Como as células de Schwann atingem seu pico de proliferação em cerca de 4 dias após a lesão (96 horas; Liu et al., 1995a; Liu et al., 1995b), este tempo foi escolhido para analisar estas células. Os resultados do presente trabalho mostraram um aumento na marcação com S-100 e no número de núcleos alongados corados com DAPI em animais *knockout* para galectina-3 em 96 horas após a lesão do

esmagamento, corroborando a hipótese de que o número de células de Schwann esteja aumentado na ausência de galectina-3. O exato mecanismo pelo qual este incremento na proliferação das células de Schwann ocorre em animais *knockout* para galectina-3 ainda não é conhecido. Relatos a respeito da proliferação de células de Schwann e relacionados a eventos regenerativos do sistema nervoso periférico *in vitro* mencionam a participação de moléculas da matriz extracelular no incremento ao crescimento de neuritos, particularmente a laminina, com a ativação da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o qual estimula a expressão de várias citocinas e moléculas de adesão celular (Armstrong et al., 2008, 2007). No meio extracelular, devido às suas múltiplas propriedades, a galectina-3 é capaz de se unir à laminina e a várias outras moléculas da matriz extracelular (Kuwabara e Liu, 1996; Dunic et al., 2006), podendo promover ou inibir interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Rabinovich et al., 2002); tais mecanismos poderiam estar envolvidos na modulação da adesão das células de Schwann durante a regeneração.

Uma das moléculas que tem sido associada à proliferação celular aumentada é a família Wnt de glicoproteínas (Klaus e Birchmeier, 2008). A via canônica de sinalização Wnt envolve a  $\beta$ -catenina, uma molécula que, entre outras funções intracelulares, interage com moléculas de caderinas em eventos de adesão celular. Quando a  $\beta$ -catenina se transloca para o núcleo, ela se liga a LEF-1 (*Lymphoid enhancer factor-1*) e TCF (*T-cell factor*), convertendo LEF-1 em um ativador transcricional, e conseqüentemente mediando alterações na expressão gênica no núcleo (Klaus e Birchmeier, 2008). De acordo com relatos prévios, a galectina-3 é um parceiro de ligação da  $\beta$ -catenina e pode atuar como um regulador crucial na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (Shimura et al., 2005). Os resultados do presente trabalho mostram que a  $\beta$ -catenina é superexpressa em nervos ciáticos esmagados de camundongos *knockout* para galectina-3, sugerindo um possível papel da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina

na proliferação das células de Schwann. Importante também é que, após uma injúria, as células de Schwann produzem uma variedade de fatores neurotróficos que sustentam a sobrevivência de neurônios lesados (Scherer e Salzer, 2003), e possivelmente também aumentam a velocidade da regeneração e a quantidade de fibras nervosas regeneradas. Conseqüentemente, em animais *knockout* para a galectina-3, o aumento na proliferação de células de Schwann poderia melhorar a regeneração também através do aumento da produção de fatores neurotróficos. A quantidade aumentada de núcleos e de células marcadas positivamente para S-100 vistas em animais *knockout* para galectina-3 em 96 horas após esmagamento sustentaria esta ideia. Portanto, é tentador dizer que células de Schwann sejam realmente os mais importantes candidatos para o sucesso da regeneração de nervos periféricos.

Por que a  $\beta$ -catenina é superexpressa após esmagamento em animais *knockout* para galectina-3? Shimura e colaboradores (2005) sugeriram que a galectina-3 é um regulador fundamental na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, e destacou as similaridades funcionais entre a galectina-3 e a  $\beta$ -catenina. Ambas são substratos para fosforilação pela mesma enzima, a glicogênio-sintetase-quinase-3 (GSK-3 $\beta$ ); quando fosforilada, a  $\beta$ -catenina é direcionada para degradação em proteassomas. Embora a galectina-3 fosforilada seja encontrada no citoplasma ou no núcleo, e a forma não-fosforilada seja encontrada exclusivamente no citoplasma, ainda não existem conclusões sobre estes diferentes estados da galectina-3 e de suas propriedades funcionais (Dumic et al., 2006). Além disso, a  $\beta$ -catenina é translocada para o interior do núcleo associada à galectina-3 de modo a regular a transcrição gênica (Shimura et al., 2005). Os resultados do presente trabalho mostraram uma marcação aumentada para  $\beta$ -catenina em nervos esmagados de animais *knockout* para galectina-3, e isto foi confirmado pela análise de imunoblotting. Este resultado sugere que a  $\beta$ -catenina esteja acumulada, mas

não se pode ter a certeza se este acúmulo ocorre no citoplasma, associado à membrana, ou no núcleo. O acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma é um dos principais pré-requisitos para sua translocação para o núcleo, e neste evento a  $\beta$ -catenina é acompanhada pela galectina-3 (Shimura et al., 2005). Conseqüentemente, é possível que, na ausência de galectina-3, a  $\beta$ -catenina possa se acumular no citoplasma de, por exemplo, células de Schwann. O acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma poderia ser devido a uma redução ou impedimento de sua degradação em proteassomas, talvez pelo fato de a galectina-3 poder atuar como uma âncora entre a  $\beta$ -catenina e a GSK-3 $\beta$ . Conforme explicado anteriormente, este acúmulo poderia promover a translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo, onde ela ativaria genes que controlam a proliferação celular.

É importante saber por que a ausência de galectina-3 acelera o processo de degeneração e regeneração de nervos ciáticos esmagados. De modo interessante, as células de Schwann de camundongos Wld<sup>s</sup> (*Wallerian degeneration slow*), os quais apresentam uma progressão lenta na degeneração axonal, exibem baixos níveis de expressão de galectina-3 após transecção de nervo periférico, e estes níveis foram diretamente correlacionados com o grau de remoção de resíduos de mielina (Reichert et al., 1994). Além do mais, considera-se que a degeneração Walleriana lenta de camundongos Wld<sup>s</sup> seja devida ao recrutamento de macrófagos em escala lenta (Lunn et al., 1989; Perry et al., 1990). De acordo com os resultados do presente trabalho, houve mais macrófagos em nervos esmagados de animais *knockout* para galectina-3 do que em nervos esmagados de animais selvagens, conforme evidenciado pela imunomarcagem por anticorpo F4/80 (marcador específico de macrófagos de camundongo) e confirmado pelo imunoblotting, sugerindo um melhor recrutamento de macrófagos na ausência de galectina-3. Isto poderia estar correlacionado ao melhor desempenho na regeneração das fibras nervosas. As células de Schwann também podem

promover a infiltração de macrófagos no nervo lesado (Siebert et al., 2000; Toews et al., 1998). Embora a galectina-3 contribua para a fagocitose por macrófagos tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida (Liu et al., 1995a; Liu et al. 1995b; Sano et al., 2003), e possa agir como um quimioatrativo para monócitos e macrófagos (Sano et al., 2000), durante o curso normal da degeneração Walleriana, as células de Schwann e macrófagos expressam galectina-3. Isto permite que ambos os tipos celulares desempenhem um papel em um tipo específico de fagocitose de restos mielínicos (lectinofagocitose) (Reichert et al., 1994), e esta propriedade poderia estar aumentada com a expressão também aumentada da galectina-3 da superfície celular induzida por GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), o qual é produzido por fibroblastos endoneurais durante a transecção de um nervo (Saada et al., 1996).

De maneira diferente do estudo de Gustavsson e colaboradores (2007), cuja abordagem foi limitada à interação entre galectina-3 e células de Schwann *in vitro*, o modelo proposto no presente trabalho levanta a possibilidade da participação da galectina-3 no processo de degeneração e regeneração de nervos periféricos. No modelo *in vivo* do presente trabalho, a infiltração de macrófagos não foi impedida, e, portanto, alguma participação destas células no processo de degeneração e regeneração de nervos periféricos pode ser concebida. Neste contexto, Toews e colaboradores (1998), Stoll e Müller (1999), e Shamash e colaboradores (2002) enfatizaram a participação de macrófagos no processo de degeneração Walleriana, favorecendo a rápida remoção de resíduos axonais e mielínicos, e conseqüentemente preparando a rota para uma rápida e apropriada regeneração das fibras nervosas. Os resultados deste trabalho sugerem que tanto macrófagos como células de Schwann não dependem da galectina-3 para a fagocitose de restos celulares, ou que a proliferação aumentada das células de Schwann compensa a ausência de galectina-3. Deste

modo, a ausência de galectina-3 poderia acelerar o processo de regeneração através de um aumento no número de células de Schwann e/ou de macrófagos. Reichert e colaboradores (1994) afirmaram que a integridade da mielina em nervos normais está associada à falta de expressão de galectina-3 nas células de Schwann e na pequena quantidade de macrófagos normalmente presente no tecido. Em camundongos *Wld<sup>s</sup>*, esta integridade está associada à falha em recrutar macrófagos e em induzir a expressão de galectina-3 em células de Schwann. O modelo do presente trabalho não corrobora estes achados prévios, uma vez que nervos esmagados em camundongos *knockout* para galectina-3 apresentaram uma degeneração mais rápida do que a observada em nervos esmagados de animais selvagens, nos quais as células de Schwann e macrófagos recrutados certamente estavam expressando galectina-3. É possível, conseqüentemente, que em animais *knockout* para galectina-3, a ausência desta proteína possa promover uma rápida remoção de resíduos mielínicos e axonais, acelerando deste modo a degeneração Walleriana e, portanto, otimizando a regeneração do nervo periférico. De forma interessante, é possível confrontar a participação das células de Schwann no processo de regeneração axonal com os achados de Yang e colaboradores (2008), os quais utilizando camundongos mutantes para ciclina D1 (uma proteína da fase G1 do ciclo celular), verificaram nestes animais a ausência de proliferação de células de Schwann em cotos distais de nervos lesados por esmagamento e transecção e a simultânea regeneração normal das fibras nervosas lesadas, o que sugere que células de Schwann não sejam obrigatoriamente necessárias para a regeneração axonal.

Considerando-se o aspecto de que a degeneração Walleriana apresenta uma série de eventos que a remetem à condição de um típico processo inflamatório, torna-se plausível uma discussão sobre a participação específica de macrófagos como células ativas em tal processo no que diz respeito à produção de diferentes tipos de moléculas com especificidade

diversificada sobre o condicionamento do microambiente para o favorecimento dos eventos da degeneração Walleriana no SNP; ou seja, haja vista os macrófagos serem células rapidamente mobilizadas para o nervo lesado, seria interessante questionar que condições estas células proporcionariam de modo a promover a degradação das fibras em degeneração e sua subsequente regeneração. O trabalho pioneiro de Saada e colaboradores (1996) exalta a produção do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) por fibroblastos em nervos lesados; tal citocina, por sua vez, estimula a expressão de galectina-3 por células de Schwann e macrófagos. Os trabalhos de Shamash e colaboradores (2002) e de Perrin e colaboradores (2005) descreveram a contribuição dos macrófagos na produção de diversas interleucinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ), o que colaboraria para aumentar a fagocitose de resíduos mielínicos por macrófagos, além de regular o recrutamento destas células para o nervo lesado. Não obstante o fato de os macrófagos promoverem a remoção dos restos mielínicos, juntamente com as células de Schwann, macrófagos também são provavelmente responsáveis por um engajamento no advento da regeneração das fibras nervosas, através da produção de diversos fatores de crescimento; esta regeneração estaria certamente relacionada a um progressivo aumento no número de macrófagos durante o decorrer do processo de degeneração Walleriana e subsequente recuperação do nervo, seguida de uma diminuição do número destas células, ocasionado por apoptose e eliminação sistêmica através da circulação para os linfonodos e para o baço, embora em lesões por esmagamento a eliminação por via sanguínea não pareceria possível em função do restabelecimento da barreira hematonervosa (Omura et al., 2005). Logo, o declínio destas células no nervo em regeneração após uma lesão por esmagamento deve-se principalmente a eventos apoptóticos.

A correlação entre a participação de macrófagos e o envolvimento da galectina-3 em eventos fagocíticos aparenta ser uma consideração bem estabelecida. Segundo o trabalho de

Karlsson e colaboradores (2009), a galectina-3 tem um papel importante na remoção de neutrófilos apoptóticos por macrófagos em sítios inflamatórios, corroborando assim os achados prévios de Sano e colaboradores (2003), que mostram a deficiência da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos em animais *knockout* para galectina-3. No entanto, segundo Ferraz et al. (2008), animais *knockout* para galectina-3 apresentam maior resistência contra infecções, devido à alta produção de citocinas (por ex., IL-1 $\beta$ ) por macrófagos destes animais. Portanto, existem controvérsias sobre o papel funcional dos macrófagos associado à presença de galectina-3, uma vez que estas células são tão bem caracterizadas na literatura tanto como típicas células fagocíticas como células secretoras de citocinas. Nossos achados exaltam um aumento na quantidade de macrófagos observada em 96 horas pós-lesão em animais *knockout*, em comparação a animais selvagens, através da imunocitoquímica; à microscopia eletrônica, a quantidade de restos mielínicos observada em nervos lesados de animais *knockout* também se mostra em maior quantidade; é válido questionar se esta maior quantidade de restos mielínicos observada em animais *knockout* ocorre em função de uma provável aceleração dos eventos degenerativos nestes animais, em comparação aos animais selvagens – pois a ausência da galectina-3 favoreceria a participação das células de Schwann como células removedoras de restos mielínicos, pelo fato de os macrófagos não realizarem a fagocitose mediada através de galectina-3 – ou se a remoção dos restos mielínicos encontra-se retardada nos animais selvagens, em comparação a animais selvagens. Isto poderia colaborar para a hipótese de que a galectina-3 não fosse imprescindível para os eventos de fagocitose por macrófagos (e, por conseguinte, por células de Schwann) em nervos degenerados, e que certamente macrófagos seriam capazes de se utilizar de outros mecanismos para uma efetivação maior da remoção dos resíduos mielínicos; tal circunstância poderia estimular uma ativação de células de Schwann – as quais estão visivelmente aumentadas em quantidade,

conforme relatado nos experimentados acima mencionados neste trabalho – como células fagocitárias envolvidas na remoção de restos mielínicos. Diante de tais aspectos, permanecem as possibilidades de haver no animal *knockout* para galectina-3 uma degeneração Walleriana mais rápida, e conseqüentemente uma regeneração mais rápida, relacionada a eventos intrínsecos da degeneração axonal em um animal onde a galectina-3 está ausente ou a mecanismos de limpeza de resíduos mielínicos mais eficazes do que em animais selvagens.

Uma abordagem cada vez mais utilizada em trabalhos recentes é a caracterização de prováveis subpopulações de macrófagos envolvidas em diferentes eventos relativos à fagocitose e/ou à produção de citocinas. Resultados prévios evidenciaram a distinção entre macrófagos no coto distal de nervo ciático em degeneração de rato com base nos antígenos de superfície ED1 e ED2, onde células que expressavam ED1 estariam envolvidas com a fagocitose de resíduos mielínicos, enquanto que macrófagos que expressavam ED2 estariam envolvidos em outras funções, tais como a secreção de citocinas (Hirata et al., 1999). Uma atual simplificação conceitual que descreve a plasticidade de fagócitos é a polarização de macrófagos em células M1 ou células M2. Os macrófagos M1 são considerados como ativos na destruição de organismos estranhos e células tumorais, enquanto os macrófagos M2 estariam envolvidos na remoção de resíduos celulares, cicatrização de feridas e angiogênese (Ho e Sly, 2009). Macrófagos M1 seriam derivados de progenitores mielóides sob o estímulo do M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos), e produziriam níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias e níveis mais baixos de citocinas anti-inflamatórias e da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS); por sua vez, macrófagos M2 seriam derivados de macrófagos maduros, quando devidamente estimulados por interleucinas tais como IL-4 e IL-13, e sob estimulação com lipopolissacarídeo (LPS), tais células produziram baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de citocinas anti-inflamatórias (Ho e Sly, 2009). No

sistema nervoso central, esta caracterização de macrófagos é possível através da tipificação de células da microglia, de acordo com a específica exposição a LPS, ou a IL-4 ou IL-10; o primeiro estimula a expressão de um fenótipo M1, enquanto as duas interleucinas citadas promovem a expressão de um fenótipo M2 na microglia (Michelucci et al., 2009). Segundo dados recentes obtidos por Dumont e colaboradores (2008), células tumorais de câncer de colo, quando submetidas *in vitro* a um meio condicionado a partir de macrófagos ativados por LPS (com fenótipo M1), contendo alto nível de GM-CSF, e de interleucinas -1 $\beta$ , -6, -8 e TNF- $\alpha$ , sofrem marcante inibição de seu crescimento, além deste meio levar à modulação da expressão de galectina-3, com notável *downregulation* do RNAm da galectina-3 e da expressão desta proteína. Estes resultados estimulam uma busca para uma futura resposta sobre a provável tipificação de populações de macrófagos M1 e M2 em nervos lesados por esmagamento de animais selvagens e *knockout* para galectina-3, de modo a se estabelecer prováveis papéis para os eventuais tipos predominantes de macrófagos durante a degeneração Walleriana.

Durante a regeneração de nervos periféricos, o tempo necessário para reinervar o órgão-alvo é um dos fatores mais importantes que influenciam o nível de resultado funcional após diferentes tipos de lesões em nervos (Krarup et al. 2002). Portanto, o índice de crescimento de axônios pode ter implicações diretas para a recuperação funcional. A razão G (*G ratio*) é um índice que reflete a relação ideal entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra (axônio + bainha de mielina) em termos de uma apropriada condução de potenciais de ação. Nos camundongos *knockout* para galectina-3 usados no presente trabalho, a quantidade de fibras regeneradas que entrou na categoria de uma razão G ideal foi estatisticamente mais alta do que aquela de animais selvagens. Conseqüentemente, pode-se concluir que os resultados do presente trabalho são compatíveis com uma regeneração mais rápida,

acompanhada de um melhor resultado funcional.

Em vista do exposto, os resultados *in vivo* do presente trabalho podem contribuir para a elucidação dos mecanismos de degeneração Walleriana, com ênfase particular na participação da galectina-3 e na  $\beta$ -catenina, e no sucesso da regeneração de nervos periféricos. Estes resultados podem abrir novas áreas de pesquisa neste campo, e podem também proporcionar ferramentas adicionais para terapias que visam à melhora da regeneração do tecido nervoso tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico.

## VI. CONCLUSÕES

1. **Nervos periféricos submetidos a esmagamento apresentam diferenças qualitativas e quantitativas quando comparados em camundongos selvagens e *knockout* para galectina-3.** Nervos esmagados de animais *knockout* para galectina-3 apresentam uma regeneração mais rápida do que animais selvagens; isto pôde ser comprovado por microscopia de luz e eletrônica. À microscopia óptica, com 3 semanas pós-lesão, foi observado um número menor de restos mielínicos e de fibras degeneradas em nervos de animais *knockout* para galectina-3, em comparação a animais selvagens. À microscopia eletrônica de transmissão, os achados são representativos do mesmo padrão observado à microscopia óptica. Chama a atenção que, em animais com 3 semanas, a matriz extracelular endoneural, de aspecto predominantemente fibrilar, apresentou-se menos abundante em animais com 3 semanas pós-lesão, indicando um possível processo de reabsorção de matriz extracelular fibrosa, certamente necessária para o suporte físico da reconstrução do nervo em regeneração.
2. **De acordo com os dados morfométricos, o número de fibras nervosas mielínicas encontra-se aumentado em camundongos *knockout* para galectina-3 após o esmagamento do nervo, em comparação a animais selvagens.** Da mesma forma, os critérios para a área das fibras (em  $\mu\text{m}^2$ ), a área dos axônios (em  $\mu\text{m}^2$ ), e a área da bainha de mielina (em  $\mu\text{m}^2$ ) também se apresentaram aumentados em animais *knockout* para galectina-3 em relação a animais selvagens. Tais dados corroboram os valores obtidos através da medição do índice de função do nervo ciático, pelo qual os animais *knockout* para galectina-3 demonstraram uma maior recuperação funcional da

atividade do nervo, correspondente ao grau de regeneração das fibras nervosas observado às microscopias de luz e eletrônica de transmissão.

3. **A quantidade de macrófagos no nervo lesado em animais *knockout* para galectina-3 apresenta-se aumentada em comparação à quantidade de tais células observada em animais selvagens.** Apesar de os macrófagos expressarem galectina-3 após uma lesão, esta proteína não se mostrou imprescindível para o mecanismo de fagocitose de resíduos mielínicos realizado por tais células. Provavelmente, em animais *knockout* para galectina-3, macrófagos se utilizam de outras vias diferentes da mediação proporcionada pela galectina-3 para a realização da fagocitose de resíduos durante a degeneração Walleriana em nervos periféricos.
4. **Há um aumento da expressão da  $\beta$ -catenina em nervos submetidos a esmagamento em animais *knockout* para galectina-3 em comparação a animais selvagens.** Esta expressão pode estar relacionada aos eventos moleculares que envolvem a participação da  $\beta$ -catenina como parceiro da galectina-3 na via de sinalização Wnt, sugerindo um possível papel regulador na proliferação das células de Schwann, uma vez que, na ausência de galectina-3 nos animais *knockout*, a  $\beta$ -catenina poderia se acumular no citoplasma, e este acúmulo poderia promover sua translocação para o núcleo de células de Schwann, ativando os genes que controlariam a proliferação destas células.
5. **Em animais *knockout* para galectina-3, a quantidade de células de Schwann mostrou-se maior, em comparação a animais selvagens.** Esta quantidade maior corrobora os achados acima mencionados com relação à expressão da  $\beta$ -catenina e que, portanto, seria extremamente vantajosa para a regeneração mais rápida das fibras nervosas em animais *knockout* para galectina-3 e conseqüentemente para uma melhor

recuperação funcional do nervo destes animais.

## VII. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> ed., Garland Science.
- ALMKVIST, J., KARLSSON, A., 2004. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 19, 575-581.
- ARMSTRONG, S. J., WIBERG, M., TERENGI, G., KINGHAM, P. J. 2008. Laminin activates NF- $\kappa$ B in Schwann cells to enhance neurite outgrowth. *Neurosci Lett* 439:42-46.
- ARMSTRONG, S. J., WILBERG, M., TERENGI, G., KINGHAM, P. J. 2007. ECM molecules mediate both Schwann cell proliferation and activation to enhance neurite outgrowth. *Tissue Eng* 13:2863-2870.
- AVELLINO, A. M., DAILEY, A. T., HARLAN, J. M., SHARAR, S. R., WINN, R. K., MCNUTT, L. D. & KLIOT, M. Blocking of up-regulated ICAM-1 does not prevent macrophage infiltration during Wallerian degeneration of peripheral nerve. *Experimental Neurology* 187:430-444, 2004;
- BROWN, H.C., CASTAÑO, A., FEAM, S., TOWNSEND, M., EDWARDS, G., STREULL, C. & PERRY, V. H. Adhesion Molecules Involved in Macrophage Responses to Wallerian Degeneration in the Murine Peripheral Nervous System. *European Journal of Neuroscience*, vol. 9:2057-2063, 1997;
- COLNOT, C., RIPOCHE, M.A., MILON, G., MONTAGUTELLI, X., CROCKER, P.R. & POIRIER, F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 94:290-296, 1998;
- CHEN Z.-L., YU, W.-M., STRICKLAND, S. 2007. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosc* 30:209-233.
- DODD, J., JESSELL, T. M., 1986. Cell surface glycoconjugates and carbohydrate-binding proteins: possible recognition signals in sensory neurone development. *J. Exp. Biol.* 124, 225-238.
- DUMIC, J. DABELIC, S., FLÖGEL, M., 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 616-635.
- DUMONT, P., BERTON, A., NAGY, N., SANDRAS, F., TINTON, S., DEMETTER, P., MASCART, F., ALLAOUI, A., DECAESTECKER, C., SALMON, I., 2008. Expression of galectina-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab Invest*, 88(8): 896-906.
- FARNWORTH, S. L. HENDERSON, N. C., MACKINNON A. C., ATKINSON, K. M., WILKINSON, T., DHALIWAL, K., HAYASHI, K., SIMPSON, A. J., ROSSI, A. G.,

HASLETT, C, et al., 2008. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol* 172: 395-405.

FERRAZ, L. C., BERNARDES, E. S., OLIVEIRA, A. F., RUAS, L. P., FERMINO, M. L., SOARES, S. G., LOYOLA, A. M., OLIVER, C., JAMUR, M. C., HSU, D. K., LIU, F.-T., CHAMMAS, R., ROQUE-BARREIRA, M.-C., 2008. Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection. *Eur J Immunol* 38:1-14.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L., 2007. *Atlas Colorido de Histologia*, 4a. Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

GORDON, T., SULAIMAN, O., BOYD, J. G., 2003. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 8(4), 236-250.

GUSTAVSSON, P., LINSMEIER, C. E., LEFFLER, H., KANJE, M., 2007. Galectin-3 inhibits Schwann cell proliferation in cultures sciatic nerve. *NeuroReport* 18, 669-673.

HIRATA, K., MITOMA, H., UENO, N., HE, J.-W., KAWABUSHI, M., 1999. Differential response of macrophage subpopulations to myelin degradation in the injured rat sciatic nerve. *J Neurocytol* 28, 685-695.

HO, V. W., SLY, L. M., 2009. Derivation and characterization of murine alternatively activated (M2) macrophages. *Methods Mol Biol* 531, 173-185.

HSIEH, S.-T., KIDD, G. J., CRAWFORD, T. O., XU, Z., TRAPP, B. D., CLEVELAND, D. W., GRIFFIN, J. 1994. Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci* 14:6392-6401.

HSU, D. K., LIU, F. T., 2004. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj. J.* 19, 507-515.

HSU, D. K., YANG, R. Y., PAN, Z., YU, L., SALOMON, D. R., FUNG-LEUNG, W. P., LIU, F. T., 2000. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156, 1073-1083.

INSERRA, M. M., BLOCH, D., TERRIS, D. J., 1998. Functional indices for sciatic, perineal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* 18, 119-124.

KARLSSON, A., CHRISTENSON, K., MATLAK, M., BJÖRSTAD, Å., BROWN, K. L., TELEMO, E., SALOMONSSON, E., LEFFLER, H., BYLUND, J., 2009. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology*, 19(1), 16-20.

KIM, H. R., LIN H. M., BILIRIAN, H. RAZ, A., 1999. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 59, 4148-4154.

KLAUS, A. BIRCHMEIER, W., 2008. Wnt signaling and its impact on development and

cancer. *Nat. Rev., Cancer* 8, 387-398.

KRARUP, C., ARCHIBAL, S. J., MADISON, R. D. 2002. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann. Neurol.* 51, 69-81.

KRSTIĆ, R. V., 1988. *Atlas d'histologie générale*. Masson, Paris.

KRZEŚLAK, A., LIPIŃSKA, A. 2004. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9, 305-328.

KUWABARA I., LIU, F.-T., 1996. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J. Immunol.* 156, 3939-3944.

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

LIU, F.-T., RABINOVICH, G. 2005. Galectins as modulators of tumors progression. *Cancer* 5, 29-41.

LIU, F.-T., HSU, D. K., ZUBERI, R. I., KUWABARA, I., CHI, E. Y., HENDERSON JR., W. R. 1995a. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147, 1016-1028.

LIU, H. M., YANG, L. H., YANG, Y. J. 1995b. Schwann cell properties: 3. c-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 487-496.

LIU, F.-T., PATTERSON, R. J., WANG, J. L. 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 263-273.

LUNN, E. R., PERRY, V. H., BROWN, M. C., ROSEN, H., GORDON, S., 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.* 1, 27-33.

MAKWANA, M., RAIVICH, G. 2005. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J* 272:2628-2638.

MARKUS, A., PATEL, T. D., SNIDER, W. D. 2002. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12:523-531.

MARTIN, J. H., 1996. *Neuroanatomy – Text and Atlas*. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.

MICHELUCCI, A., HEURTAUX, T., GRANDBARBE, L., MORGA, E., HEUSCHLING, P., 2009. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol*, Mar 6 (Epub ahead of print).

- MIRSKI, R., REICHERT, F., KLAR, A. & ROTSHENKER, S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) activity is regulated by a GM-CSF binding molecule in Wallerian degeneration following injury to peripheral nerve axons. *Journal of Neuroimmunology* 140:88-96, 2003;
- NAKAHARA, S. RAZ, A. 2007. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 605-610.
- NAKAHARA, S., HOGAN, V., INOHARA, H., RAZ, A. 2006. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *J. Biol. Chem.* 281 (51), 39649-39659.
- OCHIENG, J. LEITE-BROWNING, M. L., WARFIELD, P. 1998. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 788-791.
- OCHIENG, J., FURTAK, V., LUKYANOV, P., 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glyconj. J.*, 19, 527-535.
- OLIVEIRA, F. L., FRAZÃO, P., CHAMMAS, R., HSU, D. K., LIU, F. T., BOROJEVIC, R., TAKYIA, C. M., EL-CHEIKH, M. C., 2007. Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine schistosomiasis in galectin-3<sup>-/-</sup> mice. *J Leukoc Biol* 82(2), 300-310.
- OMURA, T., OMURA, K., SANO, M., SAWADA, T., HASEGAWA, T., NAGANO, A., 2005. Spatiotemporal quantification of recruit and resident macrophages after crush nerve injury utilizing immunohistochemistry. *Brain Res* 1057, 29-36.
- PATTON B. L., MINER, J. H., CHIU, A. Y., SANES, J. R. 1997. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol* 139:1507-1521.
- PERRIN, F. E., LACROIX, S, AVILÉS-TRIGUEROS, M., DAVID, S., 2005. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in Wallerian degeneration. *Brain*, 128, 854-866.
- PERRY, V. H., BROWN, M. C., LUNN, E. R., TREE, P., GORDON, S., 1990. Evidence that very slow Wallerian degeneration in C57BL/Ola mice is an intrinsic property of the peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.* 2, 802-808.
- PESHEVA, P., KUKLINSKI, S., SCHMITZ, B., PROBSTMEIER, R., 1998. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. *J. Neurosci. Res.* 54, 639-654.
- PETERS, A., PALAY, S. L. WEBSTER. H. DeF., 1991. *The Fine Structure of the Nervous System*, 3<sup>rd</sup> Ed., New York, Oxford.

RABINOVICH, G. A., RUBINSTEIN, N., 2001. Galectinas, una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune – implicancias e procesos inmunopatológicos. *Medicina (B. Aires)* 61, 85-92.

RABINOVICH, G. A., RUBINSTEIN, N., TOSCANO, M. A., 2002. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572, 274-284.

REICHERT, F., SAADA, A., ROTSHENKER., 1994. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* 14 (5 pt 2), 3231-3245.

SAADA, A., REICHERT, F., ROTSHENKER, S. 1996. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J. Cell Biol.* 133, 159-167.

SANO, H. HSU, D. K., YU, L. APGAR, J. R. KUWABARA, I., YAMANAKA, T., HIRASHIMA, M., LIU, F.-T., 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165, 2156-2164.

SANO, H., HSU, D. K., APGAR, J. R., YU, L., SHARMA, B. B., KUWAGARA, I., IZUI, S., LIU, F.-T., 2003. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* 112, 389-397.

SATO, S. & HUGHES, R. C. Regulation of Secretion and Surface Expression of Mac-2, a Galactoside-binding Protein of Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 269(6):4424-4430, 1994;

SCHERER, S. S., SALZER, J., 2003. Axon-Schwann cell interaction during peripheral nerve degeneration and regeneration. In: Jessen, K. R., Richardson, W. D. (Eds.), *Glial Cell Development*. Oxford University Press, London, pp. 299-330.

SHAMASH, S., REICHERT, F., KLAR, A. ROTSHENKER, S., 2002. The cytokine network of Wallerian degeneration, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ . *J. Neurosci.* 22, 3052-3060.

SNIDER, W. D., ZHOU, F. Q., ZHONG, J., MARKUS, A., 2002. Signaling the pathway to regeneration. *Neuron* 35:13-16.

SHIMURA, T., TAKENAKA, Y., FUKUMORI, T., TSUTSUMI, S., OKADA, K., HOGAN, V., KIKUCHI, A., KUWANO, H., RAZ, A., 2005. Implications of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 65, 3535-3537.

SIEBERT, H., SACHSE, A., KUZIEL, W. A., MAEDA, N., BRÜCK, W. 2000. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J. Neuroimmunol.* 110, 177-185.

STOLL, G., MÜLLER, H. W. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration, basic insights. *Brain Pathol.* 9, 313-325.

SULAIMAN, O. A., GORDON, T., 2002. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia* 37:206-18.

TOEWS, A. D., BARRET, C., MORELL, P. 1998. Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for macrophage recruitment following injury to sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.*, 53, 260-267.

WADA, J., MAKINO, H. 2001. Galectins: galactoside-binding mammalian lectins, clinical application of multi-functional proteins. *Acta Med. Okayama* 55, 11-17.

WAXMAN, S. G., KOCSIS, J. D., STYS, P. K., 1995. *The Axon – Structure, Function and Pathophysiology*, New York, Oxford, 1995.

YANG, D. Y., ZHANG, D. P., MAK, K. S., BONDER, D. E., POMEROY, S. L., KIM, H. A., 2008. Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: Axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 80-88.

YANG, R.-Y., RABINOVICH, G. A., LIU, F.-T., 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10, e17, 1-24.

## **ANEXO – Artigo Científico**

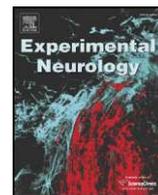


ISSN 0014-4886  
Volume 211, Number 1, May 2009

# Experimental Neurology

**Enhancement of nerve regeneration  
in galectin-3  $-/-$  mice**

www.elsevier.com/locate/ynb  
ScienceDirect



## Sciatic nerve regeneration is accelerated in galectin-3 knockout mice

Marcelo Sampaio Narciso, Bruno de Siqueira Mietto, Suelen Adriani Marques, Carolina Pontes Soares, Claudia dos Santos Mermelstein, Márcia Cury El-Cheikh, Ana Maria Blanco Martinez\*

Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 October 2008

Revised 18 December 2008

Accepted 3 January 2009

Available online 22 January 2009

#### Keywords:

Sciatic nerve

Degeneration

Regeneration

Galectin-3

Crush

Mice

### ABSTRACT

The success of peripheral nerve regeneration depends on intrinsic properties of neurons and a favorable environment, although the mechanisms underlying the molecular events during degeneration and regeneration are still not elucidated. Schwann cells are considered one of the best candidates to be closely involved in the success of peripheral nerve regeneration. These cells and invading macrophages are responsible for clearing myelin and axon debris, creating an appropriate route for a successful regeneration. After injury, Schwann cells express galectin-3, and this has been correlated with phagocytosis; also, in the presence of galectin-3, there is inhibition of Schwann-cell proliferation *in vitro*. In the present study we explored, *in vivo*, the effects of the absence of galectin-3 on Wallerian degeneration and nerve-fiber regeneration. We crushed the sciatic nerves of galectin-3 knockout and wild-type mice, and followed the pattern of degeneration and regeneration from 24 h up to 3 weeks. We analyzed the number of myelinated fibers, axon area, fiber area, myelin area, G-ratio and immunofluorescence for  $\beta$ -catenin, macrophages and Schwann cells in DAPI counterstained sections. Galectin-3 knockout mice showed earlier functional recovery and faster regeneration than the wild-type animals. We concluded that the absence of galectin-3 allowed faster regeneration, which may be associated with increased growth of Schwann cells and expression of  $\beta$ -catenin. This would favor neuron survival, followed by faster myelination, culminating in a better morphological and functional outcome.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

After lesion of a peripheral nerve, the distal stump degenerates in a typical inflammatory process known as Wallerian degeneration (WD). The ability of the peripheral nervous system (PNS) to regenerate after an injury is well known; this regeneration takes place in the proximal stump, which originates regenerating fibers that may or may not succeed in reinnervating the target organ. One of the factors associated with success of regeneration and reinnervation in PNS is the plasticity of Schwann cells. In the beginning of the WD process, these cells detach from the axons and begin to clear myelin and axon debris, a process that is afterwards continued by infiltrating macrophages. Schwann cells can survive after a trauma, and proliferate inside the original basal laminae, forming the bands of Büngner. After an injury, Schwann cells upregulate galectin-3, a galactose-specific lectin, and this has been associated with phagocytosis of myelin during WD (Saada et al., 1996).

Lectins are carbohydrate-binding proteins, with a strong affinity for oligosaccharides; they are a moderately conserved family of

proteins present in phylogenetically distant organisms (Hsu and Liu, 2004). Among the members of this family, galectins are the best-characterized; they have a specific affinity for  $\beta$ -galactosides, with at least one carbohydrate recognition domain (CRD) at the C-terminal, which is 135 amino acids long (Wada and Makino, 2001; Krześlak and Lipińska, 2004). Galectin function has been extensively studied with respect to its variable locations in cells (cytosol, nucleus, and other cell compartments). Because galectins can be secreted in the extracellular matrix, they have extracellular functions, mediating a variety of processes, such as kidney development, angiogenesis, neural function, tumor metastasis, and autoimmune diseases (Wada and Makino, 2001; Ochieng et al., 2004), including inflammatory processes, mainly related to cell recruitment and phagocyte activation (Rabinovich and Rubinstein, 2001; Almkvist and Karlsson, 2004). Many studies have demonstrated the presence and location of galectin-3 in different cell types, such as macrophages, eosinophils, neutrophils, mast cells, epithelia of respiratory and digestive tracts, some sensory neurons, and fibroblasts (Liu et al., 2002; Krześlak and Lipińska, 2004). Galectin-3 can also link to extracellular matrix components (Krześlak and Lipińska, 2004; Ochieng et al., 2004). Dodd and Jessell (1986) have reported the expression of carbohydrate molecules on the surface of functional subpopulations of dorsal root ganglion and dorsal horn neurons, many of these being recognized by monoclonal antibodies for  $\beta$ -galactoside epitopes, similar to galectin-3.

\* Corresponding author. Av. Brig. Trompowsky s/n, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, Bloco F, Departamento de Histologia e Embriologia, 21941-540 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Fax: +55 21 25626480.

E-mail address: [martinez@histo.ufrj.br](mailto:martinez@histo.ufrj.br) (A.M.B. Martinez).

The real biological properties of galectin-3 are controversial, whether in extra- or intracellular sites, or even inside the nucleus (Dumic et al., 2006). One of the most intriguing hypotheses about the intracellular functions of galectin-3 is related to apoptosis; in general, intracellular galectin-3 acts as an anti-apoptotic factor, whereas extracellular galectin-3 shows a pro-apoptotic action. Recent findings indicated that the enzyme glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) phosphorylates both galectin-3 and  $\beta$ -catenin in the cytosol; this phenomenon may be a prerequisite for galectin-3 translocation into the nucleus, which may suggest a functional role of galectin-3 in Wnt signaling (Shimura et al., 2005). Other mechanisms of the nuclear translocation of galectin-3 are involved with cancer-related gene expression, and are governed by passive diffusion and active transport (Nakahara et al., 2006; Nakahara and Raz, 2007). A link between intracellular and extracellular functions of galectin-3 can be assessed by the regulation of the cell cycle; an example was demonstrated by Kim et al. (1999), who induced overexpression of galectin-3 in human breast epithelial BT549 cells, and observed that these cells undergo loss of cell anchorage (anoikis) without detectable cell death. Furthermore, a high concentration of galectin-3 on the cell surface downregulates cellular adhesion to the extracellular matrix proteins, such as laminin-1, collagen IV, and fibronectin (Ochieng et al., 1998). It was also observed that galectin-3, in the extracellular milieu, would mediate the adhesion and/or neurite outgrowth of neural cells and tumor cells, similar to cell adhesion molecules (Pesheva et al., 1998). Because of the multiple roles of galectin-3 in tumorigenesis (Liu and Rabinovich, 2005) and other cell functions, including the above-mentioned processes, it is important to investigate the possible mechanisms underlying these processes.

A recent study showed that galectin-3 inhibits Schwann cell proliferation in segments of cultured sciatic nerves (Gustavsson et al., 2007). It is well known that both myelin clearance and Schwann cell proliferation are clearly associated with the success of PNS regeneration. Therefore, we have speculated whether the presence or absence of galectin-3 would affect the regeneration of a crushed nerve. To answer this question, we performed a sciatic-nerve crush in wild-type and galectin-3 $-/-$  knockout mice, and evaluated, by light microscopy, the effect of the absence of galectin-3 on the success of PNS regeneration. Our results showed an enhancement in sciatic nerve regeneration in galectin-3 knockout mice compared to wild-type animals. We have also searched for the mechanism underlying Schwann cell proliferation, and found an increase in  $\beta$ -catenin expression in galectin-3 knockout mice, indicating a possible involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

## Material and methods

### *Surgical procedure and tissue processing*

Wild-type and knockout for galectin-3 C57/Black6 mice were used ( $n=12$  for each). Inbred C57/Black6 and gal-3 null mice (backcrossed to c57/black6 for 10 generations) (Hsu et al., 2000) were obtained from the colony bred at the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, from stock originally provided by the Department of Dermatology, School of Medicine, University of California, Davis, Sacramento, California, USA. The procedures were approved by the Commission of Animal Care of the Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocol number DHEICB003). The animals were first anesthetized with intraperitoneal sodium pentobarbital (30 mg/kg), and then positioned on a cork platform. After a surgical incision in the skin of the right hind limb and dissection of the musculature, the right sciatic nerve was exposed and crushed for 30 s with the help of a fine forceps. Then, the musculature and skin were sutured, and the animals were returned to their cages. After periods of 48 h (2 days – 4 animals), 96 h (4 days – 4 animals), 168 h (1 week – 4 animals), or 3 weeks

(12 animals), the animals were perfused intracardially with a solution of 4% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). After the perfusion, the incision site was opened and three fragments of the nerve were obtained for electron microscopy: the first segment (about 2 mm long), nearest the point of the crush, for longitudinal sections; and two others (about 1 mm long), for transverse sections. Three segments of the left (uninjured) nerve, at the same level, were obtained as a control. The nerve segments were immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M calcium cacodylate buffer, and then processed for transmission electron microscopy as usual, and embedded in Polybed (Epon). Semithin (1  $\mu$ m thick) sections were obtained in a RMC MT-6000 ultramicrotome, stained with a 1% toluidine blue solution, and observed under a Zeiss Axioskop 2 Plus light microscope.

### *Quantitative analysis of semithin sections*

For the morphometric analysis, we sampled five areas from the semithin sections, at a magnification of  $\times 1000$ , using the program Axiovision Rel. 4.5. For each sample we calculated and compared the following parameters between the groups, using the Java Image Program: the number of myelinated fibers, nerve fiber area, axon area, and myelin area. Myelin area was calculated by subtracting the axon area from the fiber area. We also calculated the G ratio by dividing the axon diameter by the fiber diameter, and stratified the results in ranges of 0.0–0.4, 0.4–0.5, 0.5–0.6, 0.6–0.7, 0.7–0.8 and 0.8–0.9. When using these ranges, the lowest values were always included and the highest ones excluded (e.g., the 0.0–0.4 range includes 0.0 through 0.399, excluding 0.4). The results of these quantifications were analyzed statistically using the program BioEstat 4.0 (Mamirauá, Brazil) and Mann–Whitney tests. Results were considered significant at  $P<0.05$ .

### *Functional analysis – walking tracks*

Before the surgery and 1, 2 and 3 weeks after, all animals were submitted to a postoperative walking-track analysis, based on the protocol described by Inserra et al. (1998). Paw prints were recorded by painting the hindpaws of each animal with India ink. Next, the animals were allowed to walk along a 45  $\times$  6.5 cm track on white paper (Canson A4 140 g/m<sup>2</sup>). The paw prints were analyzed considering two different parameters: toe spread (TS), the distance between the first and fifth toes; and print length (PL), the distance between the third toe and the hind pad. All the parameters were measured for the left paw prints, for wild-type and galectin-3 $-/-$  knockout mice. These measures were calculated according to the sciatic functional index (SFI) formula by Inserra et al. (1998):

$$SFI = 118.9 \frac{ETS - NTS}{NTS} - 51.2 \frac{EPL - NPL}{NPL} - 7.5$$

where TS = toe spread in mm, PL = print length in mm; E and N indicate the experimental and normal hind foot, respectively. Differences between the groups were assessed using the Mann–Whitney test. A  $P$  value  $<0.05$  was considered to be statistically significant.

### *Immunohistochemistry and quantification of DAPI-stained nuclei*

After dissection and post-fixation for 4 h in fresh fixative solution, the sciatic nerves were cryoprotected in 30% sucrose, and ice-cold embedded in OCT (Tissue Tek). Ten-micrometer-thick sections were obtained with a cryostat (Leica CM 1850) and collected on gelatin-coated glass slides. The sections were then washed in 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.4) with Triton X-100 (0.5%, washing solution), three times. Soon after, the sections were

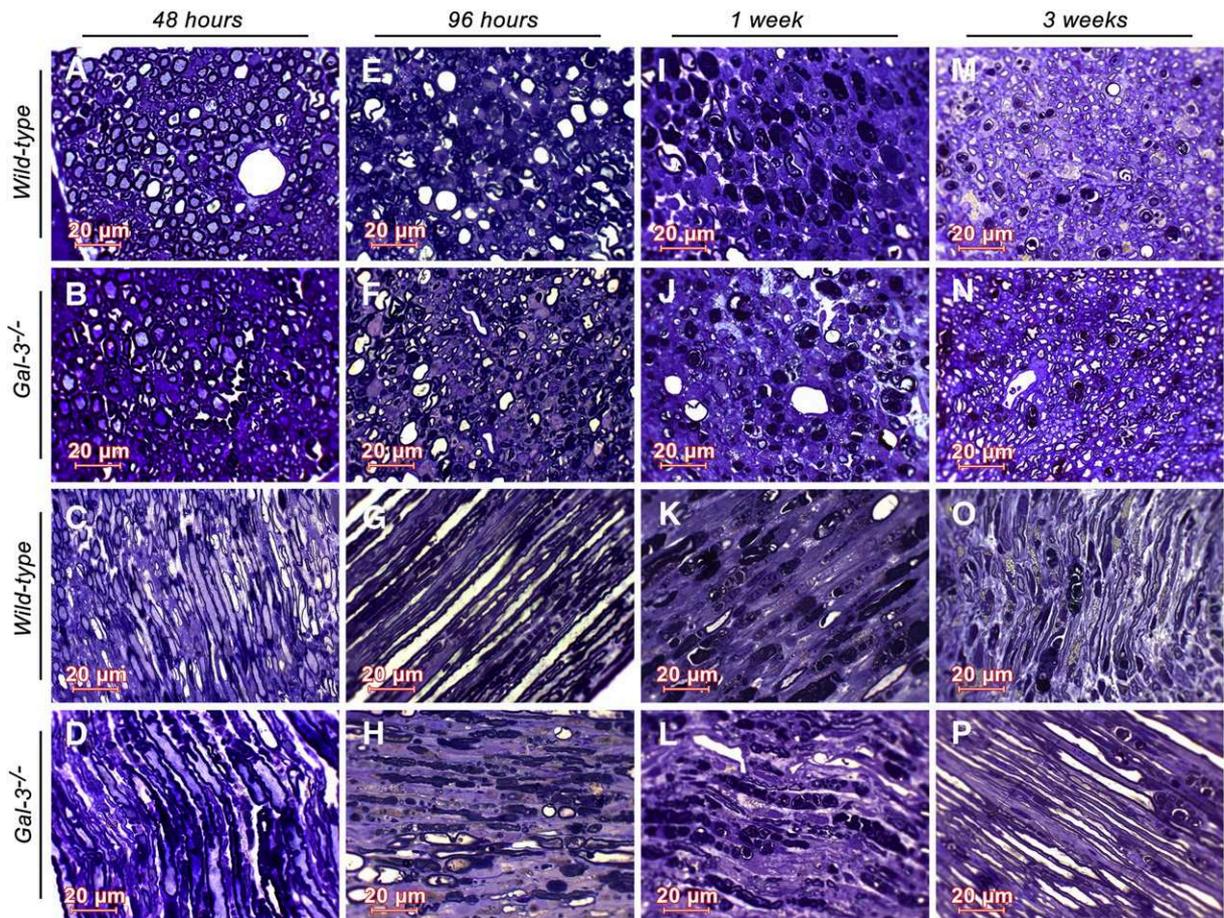
washed in the previous solution, to which had been added 10% normal goat serum, and incubated with primary antibodies (rat monoclonal anti-F4/80 antibody for macrophages, 1:100, Novocastria, United Kingdom; rabbit polyclonal anti- $\beta$ -catenin antibody, 1:100, Sigma, USA; rabbit anti S-100 antibody, 1:100, Sigma, USA) overnight. They were then rinsed in the washing solution, followed by incubation with secondary antibodies (Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa fluor 546-conjugated goat anti-rat IgG, 1:200, Molecular Probes, USA) for 2 h. After the reaction, the sections were washed once with 0.9% NaCl, and the DAPI nuclear label (0.1  $\mu$ g/mL in 0.9% NaCl, Molecular Probes, USA) was applied for 10 min. Finally, the sections were rinsed again and mounted with n-propyl gallate (250 mg/mL, Sigma, USA). Primary antibodies were omitted for negative controls. Sections were observed under a Zeiss Axioscop 2 Plus (Fluorescence Microscope) and photographed with a Zeiss Axiocam MRC camera, using the program Axiovision, version 4.5 (Zeiss) for image acquisition.

Quantification of elongated nuclei (typical of Schwann cells) in DAPI-stained longitudinal sections in normal and crushed (96 h) nerves was performed in wild-type and galectin-3<sup>-/-</sup> animals. Images were acquired using Axioscop 2 Plus with a Zeiss Axiocam MRC camera, using the program Axiovision, version 4.5 (Zeiss). The number of elongated nuclei per mm<sup>2</sup> was manually counted using the Image J software. Nuclei that were not elongated were not included in this quantification. One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey's test were used for comparisons among the groups; results were expressed as mean  $\pm$  SEM; *P* value was considered significant when  $\leq 0.05$ .

#### Immunoblotting for $\beta$ -catenin and F4/80

The nerves were quickly washed in ice-cold PBS, minced, and 50 mL of sample buffer (4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 0.2 M dithioethreitol, 125 mM Tris-HCl pH 6.8) was added to the extracts. Nerve extracts were then recovered in a tube, centrifuged, and boiled for 10 min. Samples were loaded in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore, São Paulo, Brazil). The proteins immobilized on the membranes were immediately blocked for 1 h at room temperature with a solution of 5% nonfat dry milk in Tris buffered saline-Tween 20 (0.001%) (TBS-T). Then the membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti- $\beta$ -catenin antibody (Sigma, USA, dilution 1:2000 in TBS-T) or a rat monoclonal anti-F4/80 antibody (Serotec, USA, dilution 1:1000 in TBS-T). After 5 washes in TBS-T (3 min each), the membranes were incubated with either an anti-rabbit peroxidase conjugated antibody (Promega, USA, dilution 1:1000 in TBS-T) or an anti-rat peroxidase conjugated antibody (Promega, USA, dilution 1:1000 in TBS-T), washed again as described above, and the bands were revealed using the West Pico Pierce kit (Pierce, USA).

To check sample loading, membranes were treated with stripping buffer (2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at 50 °C, washed 5 times in TBS-T, and blocked again as described above. Then the membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti-actin antibody (Sigma, USA, dilution 1:3000 in TBS-T). After 5 washes in TBS-T (3 min each), the membranes were incubated



**Fig. 1.** Semi-thin transverse and longitudinal sections (1  $\mu$ m thick) of crushed right sciatic nerve of wild-type (A, C, E, G, I, K, M and O) and galectin-3<sup>-/-</sup> (B, D, F, H, J, L, N and P) mice at different times post-lesion (48 h [A–D], 96 h [E–H], 1 week [I–L], and 3 weeks [M–P]). The differences between galectin-3<sup>-/-</sup> and wild-type mice after crush become pronounced at 3 weeks after lesion, when a much higher amount of myelinated nerve fibers is present in knockout animals. This observation is clear in transverse (M, N) and longitudinal sections (O, P). Toluidine blue staining. Bar = 20  $\mu$ m.

with an anti-rabbit peroxidase conjugated antibody (Promega, USA, dilution 1:1000 in TBS-T-milk) and developed as described above.

## Results

### *Axonal regeneration is enhanced in galectin-3 knockout mice following sciatic nerve crush*

Qualitative analysis was performed on transverse and longitudinal semi-thin sections of sciatic nerves from all the groups. The results of the analysis of the semi-thin sections are summarized in Fig. 1. At 48 h after crush, both galectin-3 positive and negative animals showed fibers in the process of degeneration, but this process was apparently more pronounced in galectin-3 negative animals (Figs. 1A–D). At 96 h after injury, both groups of mice showed larger amounts of degenerating fibers and myelin debris. However, at this time the differences between the knockout and wild-type mice became more pronounced (Figs. 1E–H). In transverse and longitudinal sections of sciatic nerves, the wild-type animals showed signs of a more advanced stage of Wallerian degeneration, represented by clearly visible figures of myelin ovoids. In knockout animals, areas suggestive of initial regeneration were observed (Figs. 1E–H).

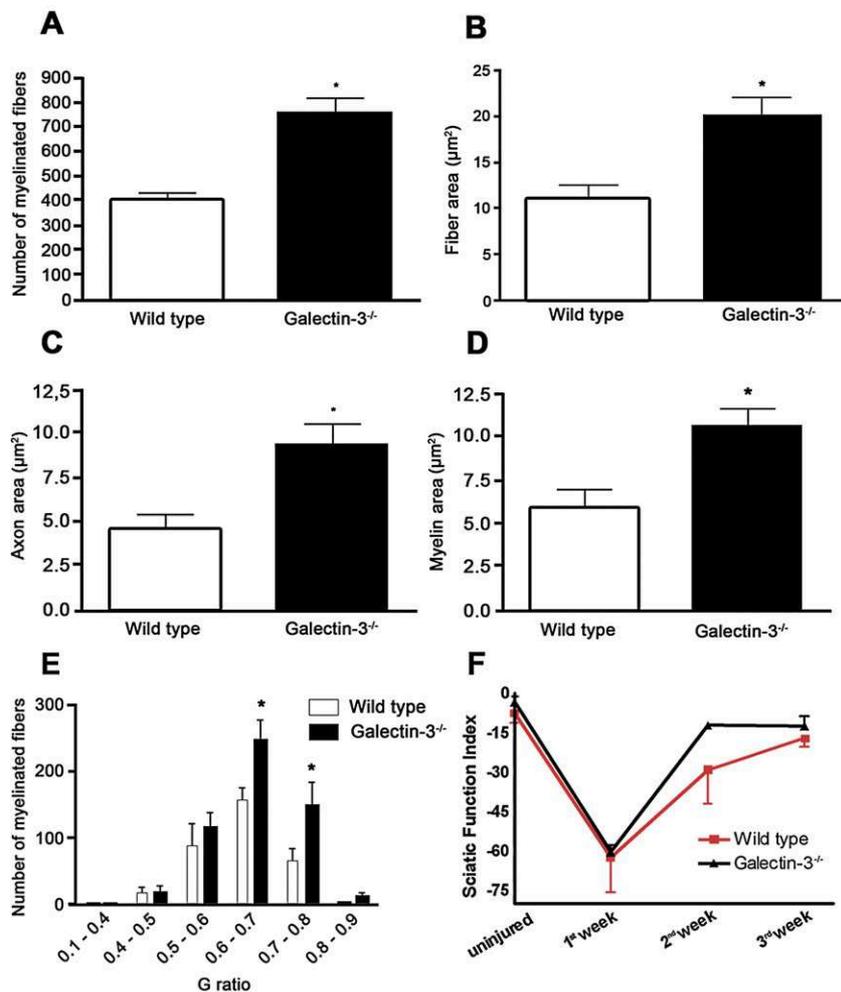
One week after crush, there was almost a complete absence of intact fibers in both positive and negative animals (Figs. 1I–L). Areas of myelin ovoid formation and axon degeneration were still clearly seen

in wild-type animals, whereas negative animals showed signs of advanced stages of degeneration and areas suggestive of axon regeneration. Vacuolated areas were observed near the degenerating fibers; these may be activated macrophages or Schwann cells with material engulfed in the cytoplasm.

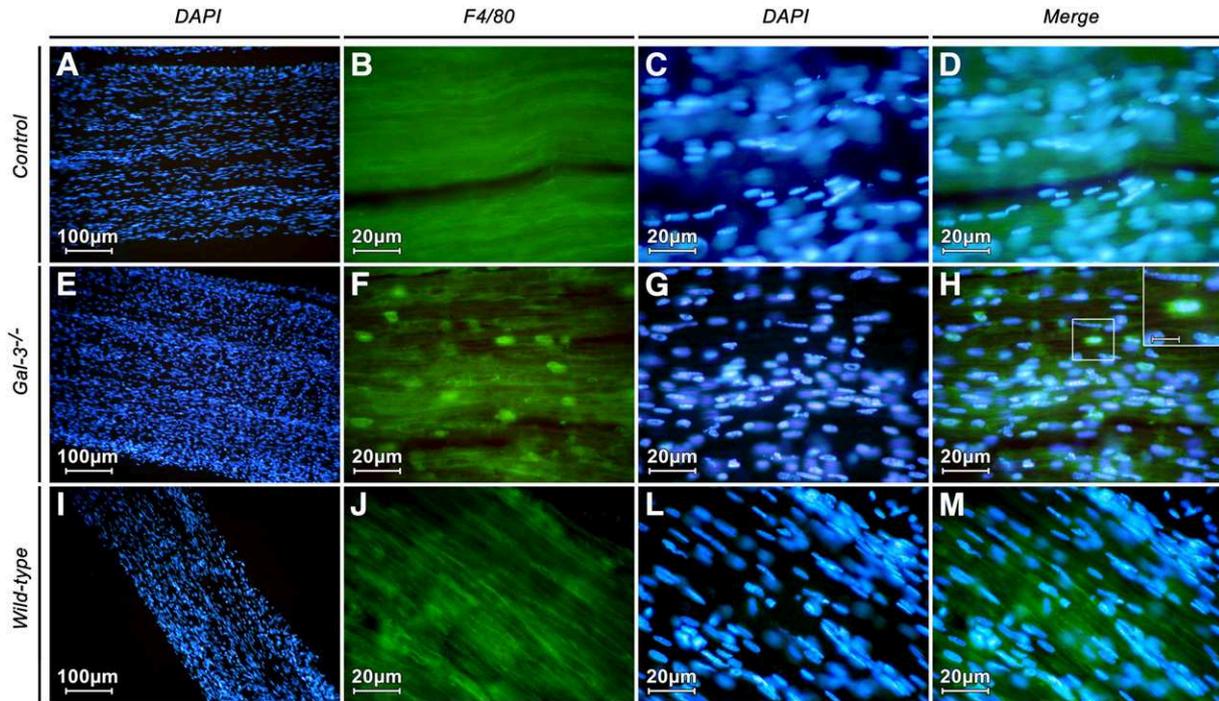
The most pronounced differences between the animals were observed 3 weeks after crush (Figs. 1M–P). Wild-type animals showed nerves with comparatively larger amounts of axonal and myelin debris – suggestive of nerve fiber degeneration – among relatively few regenerating fibers with thin myelin sheaths. Gal-3<sup>-/-</sup> showed almost complete regeneration, even though we could still observe a very few degenerating fibers.

### *The number of myelinated nerve fibers is increased in galectin-3 knockout mice following sciatic nerve crush*

Morphometric studies were carried out on the three-week survival group, since, qualitatively, this was the group that showed the most striking differences between the knockout and wild-type mice. All results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of the replicates. Quantitative analysis of the number of myelinated nerve fibers showed that they were significantly more numerous ( $P < 0.05$ ) in the galectin-3<sup>-/-</sup> group than in the wild-type group (Fig. 2A). Concerning the axon area, fiber area, and myelin area, there was also a statistically significant difference between galectin-3<sup>-/-</sup> and wild-type animals: the



**Fig. 2.** Quantitative analysis of the number of myelinated nerve fibers (A), fiber area (B), axon area (C), myelin area (D), G-ratio stratified by ranges (E) and sciatic functional index (F), in galectin-3<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Values represent mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ .



**Fig. 3.** Longitudinal sections of sciatic nerves from normal controls (no lesion), and galectin-3<sup>-/-</sup> and wild-type mice at 96 h after crush. Panels A, E and I show a small magnification of the nerves counterstained with DAPI, in order to show the cell density along the nerves. Panels B–D, F–H and J–M are higher magnifications of previous figures showing immunoreaction for F4/80 (panels B, F and J), the same area counterstained with DAPI (panels C, G and L) and F4/80 and DAPI merged (panels D, H and M). Observe cells stained for F4/80 in galectin-3<sup>-/-</sup> cases. One of these cells is enlarged in the boxed area of panel H. Bar: A, E, I = 100 µm; B–D, F–H, J–M = 20 µm; inset = 10 µm.

former always showed higher results (Figs. 2B, C and D). With regard to the G ratio, the galectin-3<sup>-/-</sup> animals also gave better results, since most fibers fell into the normal range (0.6–0.7 – Fig. 2E).

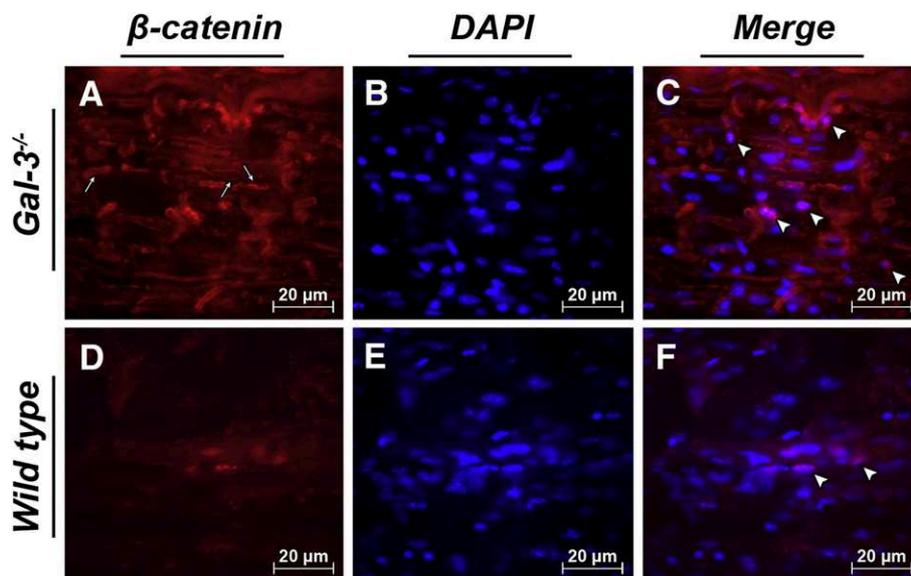
*Sciatic nerve function is recovered sooner in galectin-3 knockout mice following sciatic nerve crush*

During the 3 weeks after injury, the mice were tested to assess the recovery of motor function at 1, 2 and 3 weeks, using the walking track analysis. A total of 240 prints were measured for both groups (wild-type and galectin-3<sup>-/-</sup>). In the first week, there was a pronounced

loss of function in both groups; in the second week, the galectin-3<sup>-/-</sup> mice showed much better recovery of motor function compared to the wild-type animals. In the third week, the SFI of both groups returned to values close to normal (Fig. 2F).

*Macrophages and β-catenin expression is enhanced in galectin-3 knockout mice following sciatic nerve crush*

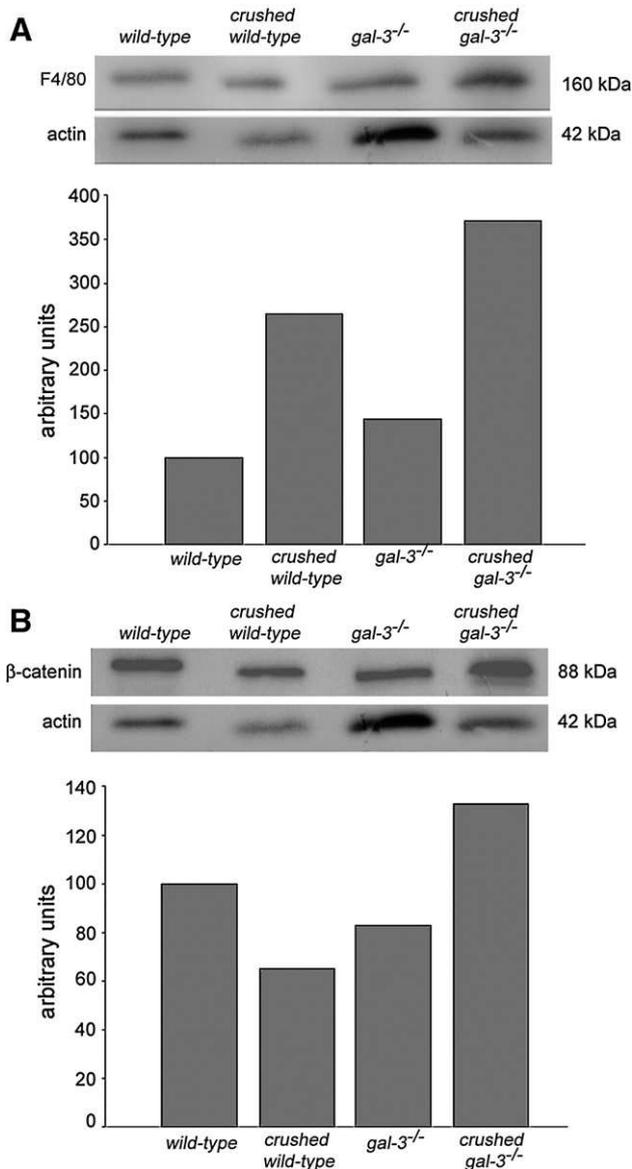
Fig. 3 shows the results for DAPI staining and macrophages (F4/80 antibody) immunoreaction in the control (no lesion), and galectin-3<sup>-/-</sup> and wild-type animals at 96 h after crush. Figs. 3B–D, F–H



**Fig. 4.** Immunohistochemistry for β-catenin and DAPI staining in longitudinal sections of sciatic nerves from galectin-3<sup>-/-</sup> (A, B and C) and wild-type (D, E, F) mice at 96 h after crush. Observe the increased expression of β-catenin in the cytoplasm (arrows) and nuclei (arrowheads) in the knockout animals. Bar = 20 µm.

and J–M are higher magnifications of Figs. 3A, E and I, respectively. Analysis of longitudinal sections of DAPI-stained sciatic nerves showed that galectin-3<sup>-/-</sup> mice exhibited a clear increase in the density of nuclei compared to wild-type and normal control animals (Figs. 3A, E and I). Immunoreaction for F4/80 antibody did not show any apparent reaction in uninjured control animals (Fig. 3B). At 4 days post-axotomy, there was a high density of macrophages in wild-type animals (Fig. 3J), although the density was higher in mice lacking galectin-3 (Fig. 3F).

Fig. 4 shows the results of the immunofluorescence for  $\beta$ -catenin protein, 96 h after crush in DAPI counterstained sections; it is possible to see that  $\beta$ -catenin expression was much enhanced in galectin-3<sup>-/-</sup> mice (Figs. 4A–C) compared to wild-type animals (Figs. 4D–F). The  $\beta$ -catenin signal was localized in areas corresponding to the cytoplasm, and also in the nuclei. Western blot analysis confirmed our immunofluorescence results for F4/80 and  $\beta$ -catenin (Fig. 5).



**Fig. 5.** Expression of F4/80 and  $\beta$ -catenin is enhanced 96 h after lesion in nerves of galectin-3 knockout mice. Crushed sciatic nerve extracts were analyzed in Western blot using anti-F4/80 (A) and anti- $\beta$ -catenin antibodies (B). Extract quantification of the blottings revealed an increase expression in F4/80 (160 kDa) in galectin-3<sup>-/-</sup> nerves (A) and a more than two-fold increase in the levels of  $\beta$ -catenin (88 kDa) expression when compared to wild-type animals (B). One representative experiment is shown in A and B. Three independent experiments were done.

There was an increase in the amount of F4/80 in crushed galectin-3 mice compared to crushed wild-type animals (Fig. 5A). There was a two-fold increase in the amount of  $\beta$ -catenin in crushed galectin-3<sup>-/-</sup> mice compared to crushed wild-type animals (Fig. 5B).

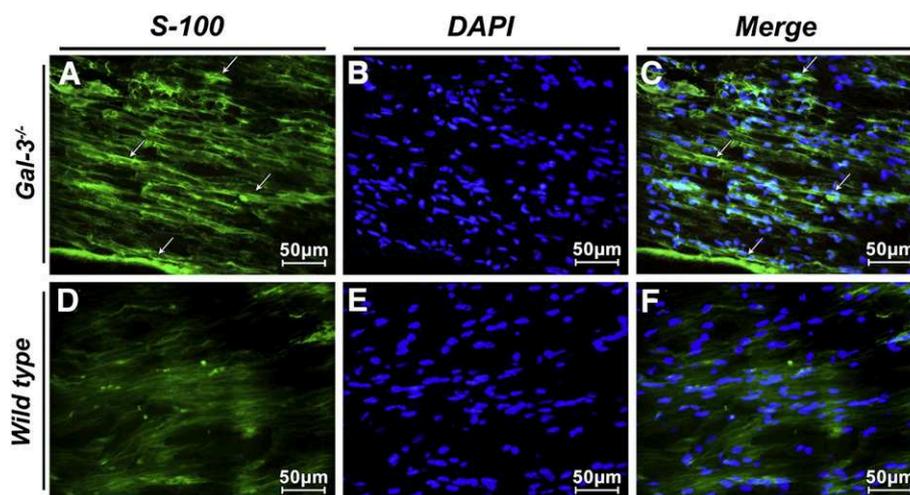
*S-100 labeling and quantification of DAPI-stained elongated nuclei confirm a greater amount of Schwann cells in regenerating nerves of galectin-3 knockout animals, as opposed to wild-type animals*

Regenerating fibers depend upon a good supply of Schwann cells, which probably proliferate rapidly in regenerating nerves. In order to assess qualitatively the involvement of Schwann cells in the better regeneration of galectin-3 knockout animals and to compare the results with wild animals, we performed immunocytochemistry using S-100 antibody for Schwann cell labeling, associated with DAPI nuclear staining. Figs. 6A and D show that the crushed nerves from knockout animals nerves exhibited much more intense labeling for S-100 than did those of wild-type animals at 96 h after lesion; in Figs. 6B and E we can see by DAPI staining the amount of nuclei in the nerves. Figs. 6C and F show superimposed images of S-100 and DAPI. To assess quantitatively Schwann cell number, we used DAPI-stained longitudinal sections of nerves from wild-type and galectin-3<sup>-/-</sup> animals. Table 1 shows the results of this quantification and confirms a significant increase in the number of elongated cell nuclei in crushed galectin-3<sup>-/-</sup> nerves when compared to wild-type nerves. This is compatible with an increase in the number of Schwann cells since these cells have typically elongated nuclei which are different from other cells, such as macrophages.

## Discussion

The main result of this study is that the galectin-3 knockout mice exhibited a much faster regeneration of sciatic nerve fibers after surgical compression, compared to wild-type animals subjected to the same trauma. These results were observed and confirmed by light microscopy, and quantification of axon area, fiber area, myelin sheath area, and number of myelinated fibers. Calculation of the G ratio indicated that the majority of nerve fibers from galectin-3<sup>-/-</sup> animals showed a better axon X myelin relationship, which indicates a better functional outcome.

Since galectin-3 is expressed in activated macrophages and Schwann cells after lesion, previous reports have suggested that this protein is an important molecule in the clearance of axon and myelin debris during Wallerian degeneration of peripheral nerves (Reichert et al., 1994). These authors found that galectin-3 is overexpressed at the site of injury in sciatic nerves, and this increase was correlated with myelin phagocytosis by Schwann cells. It is well known that proper myelin- and axon-debris clearance is one of the factors associated with the success of peripheral nerve regeneration. Therefore, it would be plausible to argue that the absence of galectin-3 would result in a failure of myelin-debris clearance, and as a result, the process of Wallerian degeneration and nerve regeneration would be disturbed. Our results, however, indicated that galectin-3<sup>-/-</sup> nerves showed faster and better regeneration. Interestingly, a recent report showed that galectin-3 inhibits Schwann cell proliferation *in vitro* (Gustavsson et al., 2007). These authors injected recombinant human galectin-3 into the culture medium of segments of mice peripheral nerves, and observed that galectin-3 is involved in the proliferation of Schwann cells. Our *in vivo* data provide evidence that the absence of galectin-3 forms a favorable environment for the enhancement of nerve regeneration, and this result can be, at least partially, explained by the increase in the proliferation of Schwann cells. Because Schwann cells reach their proliferation peak at about 4 days after lesion (96 h; Liu et al., 1995a,b), we chose this time to analyze these cells. Our results showed an increase of S-100 staining and in the number of elongated DAPI-stained nuclei in galectin-3<sup>-/-</sup> animals at 96 h after



**Fig. 6.** Immunohistochemistry for Schwann cell and DAPI staining in longitudinal sections of sciatic nerves from galectin-3<sup>-/-</sup> (A, B and C) and wild-type (D, E, F) mice at 96 h after crush. Observe the increased expression of S-100 in areas corresponding to Schwann cell cytoplasm (arrows) in the knockout animals. Bar = 50 µm.

lesion, corroborating the hypothesis that the number of Schwann cells is enhanced in the absence of galectin-3. The exact mechanism by which this enhancement of Schwann-cell proliferation occurs in galectin-3<sup>-/-</sup> animals is not yet known. One of the signalling molecules that have been associated with increased cell proliferation is the Wnt family of glycoproteins (Klaus and Birchmeier, 2008). The canonical Wnt signaling pathway involves  $\beta$ -catenin, a molecule that interacts with the cell adhesion molecule cadherin. When  $\beta$ -catenin translocates to the nucleus, it binds to LEF-1 (lymphoid enhancer factor-1) and TCF (T-cell factor), converting LEF into a transcriptional activator, and therefore mediating changes in gene expression in the nucleus (Klaus and Birchmeier, 2008). According to previous reports, galectin-3 is a binding partner of  $\beta$ -catenin and can act as a key regulator in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (Shimura et al., 2005). Our results show that  $\beta$ -catenin is overexpressed in crushed sciatic nerves of galectin-3<sup>-/-</sup> mice, suggesting a possible role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in Schwann cell proliferation. Also important is that following an injury, Schwann cells produce a variety of neurotrophic factors that support the survival of injured neurons (Scherer and Salzer, 2003), and possibly also enhance the speed and amount of nerve fiber regeneration. Therefore, in galectin-3 knockout animals, the increase in Schwann cell proliferation could improve regeneration by also increasing the production of neurotrophic factors. The increased amount of nuclei and the S-100-positively labeled cells seen in knockout animals at 96 h after crush would support this idea. Hence, it is tempting to say that Schwann cells are indeed the most important candidates for the success of peripheral nerve regeneration.

Why is  $\beta$ -catenin overexpressed after crush in galectin-3 knockout animals? Shimura et al. (2005) suggested that galectin-3 is a key regulator in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and highlighted the functional similarities between galectin-3 and  $\beta$ -catenin.

**Table 1**

Quantification of elongated cell nuclei/mm<sup>2</sup> in longitudinal sections of normal and injured sciatic nerves of wild-type and galectin-3<sup>-/-</sup> mice

	Number of elongated nuclei
Control wild-type	157.3 ± 11.2
Crushed wild-type	195.5 ± 14.8
Control galectin-3 <sup>-/-</sup>	170 ± 14.8
Crushed galectin-3 <sup>-/-</sup>	365 ± 49.4

There is a significant increase in the number of DAPI-stained elongated cell nuclei at 96 h after crush in galectin-3<sup>-/-</sup> sciatic nerves when compared to wild-type nerves subjected to the same trauma. Values represent mean ± SEM. \*\**P* < 0.01.

Both are substrates for phosphorylation by the same enzyme, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ); when phosphorylated,  $\beta$ -catenin is addressed for proteasomal degradation. Although phosphorylated galectin-3 is found in the cytoplasm or in the nucleus, and the unphosphorylated form is found exclusively in the cytoplasm, there are still no conclusions about these different states of galectin-3 and its functional properties (Dumic et al., 2006). In addition,  $\beta$ -catenin is translocated into the nucleus associated with galectin-3 in order to regulate gene transcription (Shimura et al., 2005). Our results showed enhanced labeling for  $\beta$ -catenin in crushed nerves of knockout animals, and this was confirmed by immunoblotting analysis. This result suggests that  $\beta$ -catenin is accumulated, but we cannot be sure if this accumulation occurs in the cytoplasm, associated with the membrane, or in the nucleus. The accumulation of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm is one of the main prerequisites for its translocation into the nucleus, and in this event  $\beta$ -catenin is accompanied by galectin-3 (Shimura et al., 2005). Therefore, it is possible that in the absence of galectin-3,  $\beta$ -catenin can accumulate in the cytoplasm of, for example, Schwann cells. The accumulation of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm might be due to a reduction or impairment of its proteasomal degradation, perhaps because galectin-3 can act as an anchor between  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$ . As explained previously, this accumulation can promote the translocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus, where it can activate genes that control cell proliferation.

It is important to know why the absence of galectin-3 speeds up the process of degeneration and regeneration of the crushed sciatic nerves. Interestingly, Schwann cells from Wld<sup>s</sup> mice that display a slow progression of axon degeneration, show low levels of galectin-3 expression after nerve transection, and these levels were directly correlated with the extent of myelin clearance (Reichert et al., 1994). Also, the slow Wallerian degeneration of Wld<sup>s</sup> mice is thought to be due to the slow-paced recruitment of macrophages (Lunn et al., 1989; Perry et al., 1990). According to our results, there were more macrophages in knockout animals than in wild-type animals, as evidenced by F480 antibody immunostaining and confirmed by immunoblotting, suggesting better macrophage recruitment in the absence of galectin-3. This may be related to the better performance in nerve fiber regeneration. Schwann cells can also promote macrophage infiltration into the injured nerve (Siebert et al., 2000; Toews et al., 1998). Although galectin-3 contributes to macrophage phagocytosis in both innate and adaptive immunity (Liu et al., 1995a,b; Sano et al., 2003) and can act as a chemoattractant for monocytes and macrophages (Sano et al.,

2000), during the normal course of Wallerian degeneration, Schwann cells and macrophages express galectin-3. This enables both cells to play a role in a specific kind of phagocytosis of myelin debris (Reichert et al., 1994), and this property could be increased with augmented expression of cell-surface galectin-3 induced by GM-CSF that is produced by endoneural fibroblasts during nerve transection (Saada et al., 1996).

Differently from the study of Gustavsson et al. (2007), whose approach was limited to the interaction between galectin-3 and Schwann cells *in vitro*, our model raises the possibility of galectin-3 participation in the process of nerve degeneration and regeneration. In our *in vivo* model, the infiltration of macrophages was not prevented, and therefore we can also conceive of some participation of these cells in the process of degeneration and regeneration of peripheral nerves. In this context, Toews et al. (1998), Stoll and Müller (1999) and Shamash et al. (2002) emphasized the participation of macrophages in the process of Wallerian degeneration, favoring the rapid clearance of axon and myelin debris, and therefore preparing the route for rapid and appropriate nerve-fiber regeneration. Our results strongly suggest that, either both macrophages and Schwann cells do not depend on galectin-3 for the phagocytosis of cell debris, or the increased proliferation of Schwann cells compensates for the absence of galectin-3. Thus, the absence of galectin-3 may accelerate the regeneration process through an increase in the number of Schwann cells and/or macrophages. Reichert et al. (1994) stated that the intactness of myelin in normal nerves is associated with the lack of galectin-3 in Schwann cells and the very few macrophages normally present in tissue. In *Wld<sup>s</sup>* mice, this intactness is associated with the failure to recruit macrophages and to induce galectin-3 production by Schwann cells. Our model confirmed these previous findings, because knockout mice for galectin-3 showed more-rapid degeneration than that observed in wild-type animals, in which Schwann cells and recruited macrophages were certainly expressing galectin-3. It is possible, therefore, that in knockout animals, the absence of galectin-3 may promote rapid withdrawal of myelin and axon debris, accelerating Wallerian degeneration and therefore optimizing nerve regeneration.

During nerve regeneration, the time required to reinnervate the target organ is one of the most important factors that influence the level of functional outcome after different types of nerve lesions (Krarup et al., 2002). Hence, the rate of growth of axons may have direct implications for functional recovery. The G-ratio is an index that reflects the optimum axon diameter/fiber diameter ratio in terms of appropriate conduction of action potentials. In our galectin-3<sup>-/-</sup> mice, the quantity of regenerated fibers that fell into the category of ideal G-ratio, was statistically higher than that of wild-type animals. Therefore, we can also conclude that our results are compatible with a faster regeneration accompanied by a better functional outcome.

We further observed, in this study, that in the galectin-3<sup>-/-</sup> mice, the recovery of motor function in the reinnervated hind limbs was accelerated, as demonstrated by the better SFI values achieved. Walking-track analysis has been used to reliably determine functional recovery following nerve repair, and the SFI formula is quite successful in describing the functional deficits produced after nerve lesions (Inserra et al., 1998). This result can be explained by the increased number of myelinated nerve fibers and the speed of axonal regeneration in the knockout animals.

In conclusion, our *in vivo* results may contribute to the elucidation of the mechanisms of Wallerian degeneration, with particular emphasis on galectin-3 and  $\beta$ -catenin participation, and the success of peripheral nerve regeneration. These results may open new areas of research in this field, and may also provide additional tools for therapies aiming to improve nerve regeneration in the peripheral and central nervous systems.

## Acknowledgments

This study was supported by CNPq, CAPES and FAPERJ.

## References

- Almkvist, J., Karlsson, A., 2004. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 19, 575–581.
- Dodd, J., Jessell, T.M., 1986. Cell surface glycoconjugates and carbohydrate-binding proteins: possible recognition signals in sensory neurone development. *J. Exp. Biol.* 124, 225–238.
- Dumic, J., Dabelic, S., Flögel, M., 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 616–635.
- Gustavsson, P., Linsmeier, C.E., Leffler, H., Kanje, M., 2007. Galectin-3 inhibits Schwann cell proliferation in cultured sciatic nerve. *NeuroReport* 18, 669–673.
- Hsu, D.K., Liu, F.T., 2004. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj. J.* 19, 507–515.
- Hsu, D.K., Yang, R.Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D.R., Fung-Leung, W.P., Liu, F.T., 2000. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156, 1073–1083.
- Inserra, M.M., Bloch, D., Terris, D.J., 1998. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* 18, 119–124.
- Kim, H.R., Lin, H.M., Biliran, H., Raz, A., 1999. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 59, 4148–4154.
- Klaus, A., Birchmeier, W., 2008. Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev., Cancer* 8, 387–398.
- Krarup, C., Archibald, S.J., Madison, R.D., 2002. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann. Neurol.* 51, 69–81.
- Krzyszak, A., Lipińska, A., 2004. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9, 305–328.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Liu, F.-T., Rabinovich, G., 2005. Galectins as modulators of tumors progression. *Cancer* 5, 29–41.
- Liu, F.T., Hsu, D.K., Zuberi, R.I., Kuwabara, I., Chi, E.Y., Henderson Jr., W.R., 1995a. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147, 1016–1028.
- Liu, H.M., Yang, L.H., Yang, Y.J., 1995b. Schwann cell properties: 3. *C-fos* expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 487–496.
- Liu, F.-T., Patterson, R.J., Wang, J.L., 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 263–273.
- Lunn, E.R., Perry, V.H., Brown, M.C., Rosen, H., Gordon, S., 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.* 1, 27–33.
- Nakahara, S., Raz, A., 2007. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 605–610.
- Nakahara, S., Hogan, V., Inohara, H., Raz, A., 2006. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *J. Biol. Chem.* 281 (51), 39649–39659.
- Ochieng, J., Leite-Browning, M.L., Warfield, P., 1998. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 788–791.
- Ochieng, J., Furtak, V., Lukyanov, P., 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J.* 19, 527–535.
- Pesheva, P., Kuklinski, S., Schmitz, B., Probstmeier, R., 1998. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. *J. Neurosci. Res.* 54, 639–654.
- Perry, V.H., Brown, M.C., Lunn, E.R., Tree, P., Gordon, S., 1990. Evidence that very slow Wallerian degeneration in C57BL/Ola mice is an intrinsic property of the peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.* 2, 802–808.
- Rabinovich, G.A., Rubinstein, N., 2001. Galectinas, una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune – implicancias e procesos inmunopatológicos. *Medicina (B. Aires)* 61, 85–92.
- Reichert, F., Saada, A., Rotshenker, S., 1994. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes, phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J. Neurosci.* 14, 3231–3245.
- Saada, A., Reichert, F., Rotshenker, S., 1996. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J. Cell Biol.* 133, 159–167.
- Sano, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., Liu, F.T., 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165, 2156–2164.
- Sano, H., Hsu, D.K., Apgar, J.R., Yu, L., Sharma, B.B., Kuwabara, I., Izui, S., Liu, F.T., 2003. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* 112, 389–397.
- Scherer, S.S., Salzer, J., 2003. Axon-Schwann cell interaction during peripheral nerve degeneration and regeneration. In: Jessen, K.R., Richardson, W.D. (Eds.), *Glial Cell Development*. Oxford University Press, London, pp. 299–330.
- Shamash, S., Reichert, F., Klar, A., Rotshenker, S., 2002. The cytokine network of Wallerian degeneration, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ . *J. Neurosci.* 22, 3052–3060.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H., Raz, A., 2005. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 65, 3535–3537.

- Siebert, H., Sachse, A., Kuziel, W.A., Maeda, N., Brück, W., 2000. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J. Neuroimmunol.* 110, 177–185.
- Stoll, G., Müller, H.W., 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration, basic insights. *Brain Pathol.* 9, 313–325.
- Toews, A.D., Barret, C., Morell, P., 1998. Monocyte chemoattractant protein 1 is responsible for macrophage recruitment following injury to sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.* 53, 260–267.
- Wada, J., Makino, H., 2001. Galectins, galactoside-binding mammalian lectins, clinical application of multi-functional proteins. *Acta Med. Okayama* 55, 11–17.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)