
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ANTONIO LUIZ CARONE

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE ENXERTOS DE
NERVOS MANTIDOS EM SOLUÇÕES
CONSERVADORAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em **NEUROLOGIA**

Orientador

Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE

Co-orientador

Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO FIGUEIREDO

Campinas, 1998

UNIDADE	BC
N. DE REG. ADA:	
V. Ex.	
TEMBR. PC	35673
PLAC.	395198
PRC	2411 00
DATA	31/10/98
N.º CPD	

CM-00118013-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C222e Carone, Antonio Luiz
Estudo da viabilidade de enxertos de nervos mantidos em soluções conservadoras / Antonio Luiz Carone. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientadores : Francesco Langone, José Francisco Figueiredo
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nervo - cirurgia. 2. Transplante. 3. Transplante homólogo. 4. Sistema nervoso - Regeneração. I. Francesco Langone. II. José Francisco Figueiredo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ANTONIO LUIZ CARONE

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE ENXERTOS DE
NERVOS MANTIDOS EM SOLUÇÕES
CONSERVADORAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em **NEUROLOGIA**

Orientador

Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE

Co-orientador

Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO FIGUEIREDO

Campinas, 1998

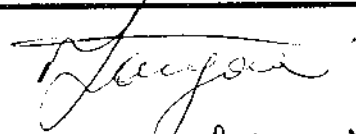
BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE

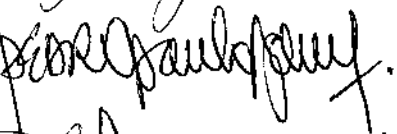
Co-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ FIGUEIREDO

MEMBROS:

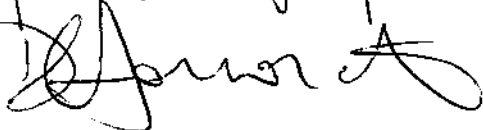
1.



2.



3.

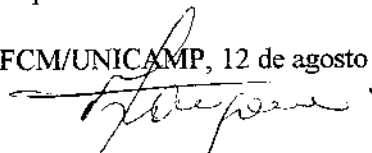


Curso de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas

DATA: 12/08/98

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Neurociências pelo Aluno ANTONIO LUIZ CARONE.

CPGN/FCM/UNICAMP, 12 de agosto de 1998



FRANCESCO LANGONE
Orientador (mat. 11371-9)

À minha esposa
Cristina,
pelo apoio e estímulo constantes,
e a meus filhos
Ana, Samuel e David,
que alegam nossas vidas

Dedico

Agradecimentos

Ao professor **Dr. Francesco Langone**, pela acolhida, pela amizade cultivada ao longos dos anos e pela sua segura e honesta orientação.

Ao professor **Dr. José Francisco Figueiredo**, pela sua disponibilidade e criteriosa co-orientação do nosso trabalho.

Ao professor **José Carlos Corrêa**, que gentilmente cedeu o seu laboratório e auxiliou nos trabalhos de microfotografia.

À professora **Dra. Vanda M. Gimenes Gonçalves**, que sempre esteve atenta as nossas aspirações dentro da carreira universitária.

Ao professor **Dr. Benito Damasceno**, pelo estímulo que sempre nos deu para levar adiante este trabalho.

À professora **Dra. Maria Valeriana Moura Ribeiro**, pela acolhida e constante atenção no desenvolvimento do curso de pós-graduação.

Ao Professor **Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira**, pelas valiosas sugestões dadas a este trabalho e pela amizade.

Ao acadêmico de medicina **Bruno Raposo Barros** pela inestimável colaboração na obtenção dos dados quantitativos deste trabalho e pela amizade.

Ao bioquímico e farmacêutico **Sr. Sebastião Domingues Arouca**, pela sua atenção e dedicação na manipulação das soluções durante o trabalho.

Aos técnicos **Sr. Marco Aurélio Ribeiro de Paula** e **Sr. Norivaldo Celestino**, pela competência e extrema boa vontade no processamento do material histológico utilizado para documentação deste estudo.

À **Sra. Ana Adélia Monteiro Fagundes**, secretária da pós-graduação em Neurologia/Neurociências pela dedicação, paciência e atenção que sempre nos dispensou.

Ao digitador **Sr. Cícero Padilha Rosa**, pela generosa disponibilidade durante as horas intermináveis deste trabalho.

A **todos**, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Minha gratidão

SUMÁRIO

RESUMO

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1.	Considerações preliminares	02
1.2.	Alguns dados históricos do reparo cirúrgico de nervos periféricos	03
1.3.	Morfologia do nervo periférico	04
1.3.1.	Aspectos anatômicos e histológicos do nervo periférico	04
1.3.2.	Características morfológicas das fibras nervosas	06
1.3.3.	Características morfológicas do axônio	08
1.4.	Lesões do nervo periférico	09
1.4.1.	Classificação das lesões	09
1.4.2.	Alterações proximais à lesão	10
1.4.3.	Alterações distais à lesão	11
1.5.	Regeneração do nervo periférico	12
1.5.1.	Conceitos básicos	12
1.5.2.	Importância dos elementos celulares do nervo e dos fatores neurotróficos	13
1.6.	Estratégias de tratamento cirúrgico das lesões nervosas periféricas	15
1.6.1	Neurorrafias, tubulizações e enxertos	15
1.7.	O emprego dos enxertos de nervos: suas vantagens e limitações	18
2.	OBJETIVOS	25

3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.2. Soluções conservadoras	29
3.2.1. Solução de Wisconsin/Belzer	29
3.2.2. Solução de Collins	29
3.2.3. Preparo do meios de conservação	30
3.3. Procedimentos cirúrgicos	30
3.3.1. Retirada e conservação do enxerto	30
3.3.2. Transplante dos enxertos mantidos nas soluções conservadoras	31
3.3.3. Transplante dos enxertos frescos	32
3.4. Processamento histológico dos nervos	33
3.5. Análise quantitativa	34
3.6. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Aspectos macroscópicos dos enxertos	37
4.1.1. Antes do transplante	37
4.1.2. Após 50 dias do transplante	37
4.2. Análise histológica dos enxertos após sua conservação na solução de Wisconsin/Belzer ou na solução de Collins	42
4.3. Análise histológica dos enxertos após sua conservação na solução de Wisconsin/Belzer ou na solução de Collins e de enxertos frescos após 50 dias de transplante	49
4.3.1. Enxertos mantidos na solução de Wisconsin/Belzer por 24 ou 72 horas	49
4.3.2. Enxertos mantidos na solução de Collins por 24 ou 72 horas	50
4.3.3. Enxerto fresco	51
4.4. Análise quantitativa	62

5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ABSTRACT		

RESUMO

As lesões traumáticas incidem com grande frequência sobre o sistema nervoso periférico, apresentando prognóstico reservado principalmente quando ocorre transecção completa do nervo. Todavia, com o melhor conhecimento dos fenômenos celulares e moleculares envolvidos na regeneração axonal e das técnicas microcirúrgicas, tem-se buscado melhorar esse quadro. Neste sentido, tem sido objeto de investigação nos últimos anos a criação de um banco de nervos que viria facilitar o reparo de lesões nervosas com extensa perda de substância. Assim, diversos métodos vem sendo testados para a conservação dos segmentos de nervos para posterior transplante. Neste estudo foram analisados os aspectos morfológicos e quantitativos de enxertos autólogos previamente mantidos em dois tipos de solução conservadora. Foram utilizados quarenta ratos machos da linhagem Wistar, sendo que 16 deles foram subdivididos em grupos de 4 animais, que tiveram os nervos tibial esquerdo e direito removidos e mantidos em solução conservadora de Wisconsin/Belzer (4°C), por 24 ou 72 horas, ou em solução conservadora de Collins (4°C), por 24 ou 72 horas, respectivamente. Após os períodos de conservação previstos, estes nervos foram processados para análise histológica, conforme descrito a seguir. Outros 4 animais, controles, tiveram os nervos tibial direito e esquerdo removidos e imediatamente processados para histologia. Por sua vez, um grupo de 15 animais teve o nervo tibial esquerdo removido e conservado por 24 horas ou 72 horas em solução de Wisconsin/Belzer (4°C) ou solução de Collins (4°C), e posteriormente transplantado no mesmo animal para o lado direito. Outros 5 animais, tiveram o nervo tibial esquerdo retirado e imediatamente transplantado para o lado direito. A conduta cirúrgica foi precedida sempre de anestesia profunda com pentobarbital sódico (50mg/Kg/peso) para todos os animais. Após 50 dias do transplante, os animais que receberam os enxertos nervosos foram anestesiados para exposição do respectivo enxerto e para sua fixação "in situ" com uma solução de glutaraldeído 2% e formaldeído 1%, em tampão fosfato de sódio 0,1M. Após serem mantidos por 24 horas nesta solução, os segmentos do enxerto foram pós-fixados em OsO₄ e incluídos em resina. A seguir, de cada espécime foram obtidos cortes semi-finos da porção média do enxerto, os quais foram corados com azul de Toluidina e analisados em microscópio de luz convencional. Para a análise quantitativa dos axônios regenerados no enxerto, foram amostrados cinco campos diferentes e fotografados sob objetiva de imersão (100x). Os negativos foram copiados em papel fotográfico com o aumento final de 1625 vezes e procedeu-se a contagem dos axônios mielínicos com o auxílio de contador eletrônico. A análise histológica mostrou que a regeneração axonal, após 50 dias do transplante, estava mais avançada nos enxertos previamente mantidos nas soluções de Wisconsin/Belzer, em relação aos enxertos mantidos na solução de Collins, e era semelhante à observada nos enxertos frescos. A análise da densidade de axônios mielínicos regenerados nas diferentes condições experimentais confirmou os resultados histológicos. Assim, o número de axônios mielínicos regenerados em 10⁴µm² de área nos enxertos previamente mantidos em solução Wisconsin/Belzer, por 24 ou 72 horas, foram, respectivamente, 433±12 e 430±32. Sendo estes resultados significativamente superiores aos observados nos enxertos mantidos em solução de Collins por 24 horas (344±20^b) e 72 horas (327±29^b) e semelhante aos computados nos enxertos frescos (407±13^a). Estes resultados mostraram que a composição da solução conservadora de Wisconsin/Belzer é capaz de manter a viabilidade dos enxertos de nervos, nos períodos de tempo estudados, de maneira superior à da solução de Collins, podendo ser proposta como um meio adequado para a preservação dos nervos até o seu transplante.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

O mundo vem passando por uma grande transformação técnico-industrial que traz consigo novas doenças ocupacionais, traumáticas e de lazer. Entre as lesões traumáticas, estão as do sistema nervoso periférico, que se apresentam com grande frequência na faixa etária produtiva da população masculina, limitando ou incapacitando para as atividades profissionais e sociais.

O tratamento dessas lesões, e especialmente aquelas que acarretam a secção do nervo, são as que apresentam pior prognóstico. Contudo, o progresso das técnicas cirúrgicas, especialmente da microcirurgia, e o melhor conhecimento dos fenômenos celulares e moleculares envolvidos no processo de regeneração axonal, têm propiciado perspectivas significativamente melhores para o tratamento das lesões nervosas periféricas (Benzel, 1996).

Nesse contexto, destacam-se os esforços de alguns grupos de pesquisa no sentido de viabilizar a criação de um banco de nervos, como uma alternativa atraente no tratamento adequado das lesões de nervos com extensa perda de substância (Evans e cols., 1994; Mackinnon, 1996). Contudo, para se alcançar esse objetivo antes será necessário responder perguntas importantes, tais como: Qual é o melhor meio para manutenção e conservação dos enxertos de nervos? Por quanto tempo esses enxertos podem ser mantidos no meio de conservação? Quais os efeitos esses meios sobre os elementos celulares do nervo importantes para o processo regenerativo? Além disso, a compreensão adequada dos processos de histocompatibilidade é outro significativo obstáculo a ser ultrapassado para a validação de um banco de nervo.

1.2. ALGUNS DADOS HISTÓRICOS DO REPARO CIRÚRGICO DE NERVOS PERIFÉRICOS

Os primeiros experimentos empregando suturas para o reparo cirúrgico de nervos foi relatado por Ferrar no século 17 (apud Flynn, 1975). Porém, somente no século 19, Baudens (apud Flynn, 1975) fez os primeiros relatos de justaposição de cotos nervosos suturando suas extremidades. A investigação sistemática do reparo cirúrgico de lesões nervosas periféricas teve um avanço importante durante a guerra civil americana com os trabalhos realizados por Hammond (apud Flynn, 1975). Ainda, no final do século 19 e no início deste século, Huber (1895, 1919, 1920, apud Flynn, 1975) fez um amplo estudo da reparação cirúrgica de nervos e relatou a recuperação parcial, e mesmo completa, das funções motoras e sensitivas dos pacientes.

Bristow e Platt (1920, apud Flynn, 1975) atuando como cirurgiões durante a primeira guerra mundial, relataram que era possível fazer sutura primária nas lesões incompletas e opinaram que isso poderia melhorar o quadro lesional. Herbig, em 1937, (apud Flynn 1975) relatou 4 suturas primárias e 13 secundárias. Após um período de 2 a 12 meses do reparo, concluiu que o reparo primário tinha resultados superiores. Pollock e Davis (1923), através de trabalhos experimentais, verificaram que a sutura primária em uma ferida limpa tinha melhores resultados quando esta era término-terminal.

Durante a Segunda Grande Guerra, inicia-se a moderna cirurgia de nervos periféricos (Woodhall, em 1954). Contudo, durante esse período, as lesões geralmente abordadas eram extensas e severas e o tratamento cirúrgico pouco refinado. Assim, os resultados relatados não eram alentadores. Seddon (1954),

por sua vez, relatou também a sua experiência de guerra apresentando resultados similares.

Diversos outros autores têm contribuído na busca de aprimoramento para o tratamento de lesões nervosas periféricas. Dentre os quais citamos os estudos anatômicos de Sunderland (1978), a exploração intra-operatória por Kline e cols. (1969) e o reparo cirúrgico livre de tensão proposto por Millesi (1986). Também, Dellon (1981) e Moberg (1991) apresentaram importantes dados clínicos sobre a recuperação da função sensitiva.

Finalmente, o advento das técnicas microcirúrgicas, popularizadas por Millesi e cols. (1972, 1973), associadas ao uso de enxertos e de outras estratégias empregando-se materiais sintéticos e orgânicos, têm dado novas perspectivas para a união cirúrgica dos cotos nervosos (Mackinnon, 1996).

1.3. MORFOLOGIA DO NERVO PERIFÉRICO

1.3.1. Aspectos anatômicos e histológicos do nervo periférico

Durante o desenvolvimento embrionário, por volta do 18º dia, a placa neural invagina-se ao longo do seu eixo central constituindo a goteira neural e formando ao longo desta as pregas neurais. Ao final da terceira semana estas se fundem dando lugar ao tubo neural. Neste processo, algumas células neuroectodérmicas não são incorporadas ao tubo neural e passam a formar as chamadas cristas neurais. A partir destas estruturas se originam os neurônios sensoriais e as células de Schwann que, com o desenvolvimento dos nervos periféricos, formam a bainha mielina ao redor dos axônios motores somáticos, de

certos axônios sensitivos, ou envolvem completamente os feixes de axônios amielínicos (Moore, 1975).

Os nervos periféricos têm aspecto de cordões esbranquiçados e resistentes devido ao tecido conjuntivo das bainhas que o envolvem. A bainha mais externa é denominada de epineuro; a segunda é o perineuro e a camada conjuntiva mais interna, que se relaciona intimamente com as fibras nervosas, chama-se endoneuro.

O epineuro é constituído de fibroblastos distribuídos em camadas concêntricas e separadas por fibras de colágeno tipo I, dispostas longitudinalmente, que reforçam a arquitetura do epineuro. Pode-se considerar este envoltório conjuntivo como uma continuação diferenciada da duramater. Apresenta vasos sanguíneos com maior calibre que os encontrados nas demais regiões conjuntivas do nervo (Peters, 1976, Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997).

O perineuro é a segunda camada que reveste os fascículos nervosos. A partir de sua descrição inicial teve várias denominações, tais como, perilema, mesotélio, neuroendotélio, perineurotélíio e, finalmente, perineuro. É formado de células achatadas, dispostas 3 a 4 camadas concêntricas, separadas por feixes de colágeno tipo I e III. Caracteristicamente, essas células apresentam-se envolvidas por uma lâmina basal. As células perineurais são constituídas de citoplasma contendo pouco retículo endoplasmático, mas apresentam abundantes filamentos e vesículas. Estabelecem entre si zonas ocluentes ("tight junctions"), cuja função é controlar a passagem de substâncias através das camadas do perineuro. Parece ser que uma função importante do perineuro é atuar na homeostase do nervo, controlando a entrada e a saída de substâncias por

pinocitose e exocitose, participando, assim, na formação da barreira hemato-nervosa (Peters, 1976, Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997).

O endoneuro corresponde aos elementos conjuntivos que se encontram em íntimo contato com as fibras nervosas no interior do nervo periférico. Encontram-se aí, distribuídos ao redor das fibras mielínicas e feixes de fibras amielínicas, fibras de colágeno tipo III, fibroblastos, capilares e alguns mastócitos. Os fibroblastos são idênticos ao resto do corpo e o colágeno encontra-se altamente organizado, formando dois folhetos distintos ao redor das fibras nervosas e respectivas células de Schwann. O mais externo é formado por grandes fibras colágenas longitudinais, e o mais interno é composto por fibras de colágeno finas e orientadas de forma oblíqua e circunferencial ao nervo (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997)

Os vasos que suprem os nervos periféricos advêm de ramos vasculares de artérias regionais. Esses ramos se distribuem inicialmente no epineuro e penetram no perineuro, formando intercomunicações ou anastomoses de plexos. A partir do perineuro estes se subdividem e penetram no endoneuro, geralmente na forma de capilares (Wadhwani e Rapoport, 1994)

1.3.2. Características morfológicas das fibras nervosas

Todas as fibras nervosas estão acompanhadas por células de Schwann, que se originam das células neuroectodérmicas das cristas neurais (Ham, 1983). Essas células podem ou não organizar uma bainha de mielina ao redor do axônio. Desta forma, dão origem às chamadas fibras nervosas mielínicas e amielínicas, respectivamente. Além disso, as células de Schwann organizam, ao redor dos axônios por elas envolvidos, um verdadeiro tubo de membrana basal que se

estende da região de emergência dos filamentos radiculares até as terminações axonais, distalmente. Este tubo de membrana basal é considerado matriz extracelular e é composta por colágeno (tipos IV e V), glicoproteínas e proteoglicanos. Ao microscópio eletrônico distinguem-se 3 camadas na membrana basal. A primeira é uma lâmina tênue que constitui uma região mais clara e varia sua espessura de 20 a 40 nanômetros. A segunda lâmina, denominada lâmina densa ou basal, situa-se entre a lâmina rara e a lâmina reticular e sua espessura é de 20 a 100 nanômetros, é eletrodensa e é constituída por uma malha de filamentos. A terceira camada, ou lâmina reticular ou rara interna, é brilhante ao microscópio eletrônico e de espessura variada, localizando-se entre a lâmina densa e o endoneuro (Martin e Webster, 1973).

A membrana basal é também importante barreira seletiva na troca de substâncias entre o meio externo e as fibras nervosas (Oldfors e Johanson, 1979). Serve também para a orientação dos axônios em crescimento durante a regeneração axonal (Gorio, 1984).

As fibras nervosas, definidas como o axônio associado às células de Schwann, são classificadas em A, B, e C e de acordo com seu tamanho, função e velocidade de condução de impulso. As do tipo A são mielinizadas e se subdividem em 3 grupos: A α , A β e A δ . Sendo que as maiores (A α) variam de 10 a 20 μ m de diâmetro e conduzem o impulso nervoso de 50 a 100 metros por segundo. As A β , possuem dimensões de 5 a 15 μ m de diâmetro e apresentam uma velocidade de condução de 20 a 90 metros por segundo, e as fibras A δ , por sua vez, possuem de 1 a 7 μ m de diâmetro e uma velocidade de condução de 12 a 30 metros por segundo. As fibras do tipo B são também fibras mielinizadas com diâmetro de 3 μ m e uma velocidade de condução de 3 a 15 metros por segundo.

As fibras amielínicas são pequenas, com 0,2 a 1,2 μm de diâmetro, e conduzem impulsos de 0,3 até 1,6 metros por segundo (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997).

1.3.3. Características morfológicas do axônio

O axônio é um prolongamento diferenciado do corpo celular do neurônio, sendo sua função transportar sinais elétricos e químicos a longas distâncias. Fazendo parte do seu citoesqueleto, encontramos os neurofilamentos e microtúbulos que constituem percentual importante da proteína axonal total. Os neurofilamentos, descritos originalmente por Ramon y Cajal e Bielschowsky como neurofibrilas argentófilos (apud Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997), apresentam um diâmetro de 8 a 10 nm, com comprimento variável. Os microtúbulos têm o aspecto cilíndrico oco e são compostos por subunidades globulares de tubulina com 4 a 5 nm de diâmetro. Exercem função importante no transporte axonal, ancorando e permitindo o avanço de vesículas transportadoras de neurotransmissores e outros produtos do metabolismo neuronal (Day-Allen, 1987; Black, 1994).

As células de Schwann envolvem axônio e formam uma bainha de mielina ao seu redor. Observadas ao microscópio eletrônico, verifica-se que durante o processo de mielinização as camadas internas da sua membrana celular se fundem, formando linhas densas principais, e as camadas externas formam as chamadas linhas intraperiódicas (Ross, 1993). Também, na formação da mielina, permanecem porções de citoplasma entre as membranas das células de Schwann, que são denominadas de incisuras ou fendas de Schmidt-Lanterman. Parece que a função destas estruturas seria prevenir o fluxo ou deslocamento de mielina semi-líquida ao longo das fibras nervosas e fornecer, por difusão,

nutrientes ao axônio. A bainha de mielina, por sua vez, é constituída por 75% de lipídios (colesterol, esfingomielina e galactolipídeo) e 25% de proteínas (Ham,1983).

A região entre duas células de Schwann adjacentes, onde não há mielina, chama-se nódulo de Ranvier. Nesta região a membrana axonal está em direta comunicação com o meio extracelular, sendo rica em canais iônicos, cujo funcionamento determina a geração e propagação do impulso nervoso (Waxman e Ritchie, 1985; Scholz, 1993). É importante destacar que no funcionamento do sistema nervoso, a bainha de mielina atua como isolante elétrico e aumenta a velocidade de condução do impulso nervoso, sem necessidade de aumento do diâmetro da fibra nervosa (Waxman e Ritchie, 1985; Scholz, 1993).

1.4. LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO

1.4.1. Classificação das lesões

Os nervos periféricos estão sujeitos a vários tipos de trauma, podendo ser único ou associado. Os agentes lesivos podem ser mecânicos (compressão, tração), isquêmicos, químicos, térmicos ou elétricos. A lesão pode localizar-se em um pequeno segmento, por exemplo, quando causado por um instrumento cortante, ou abranger uma extensão relativamente grande, quando ocorre um esmagamento ou tração (Leffert,1988).

Seddon (1943) classificou a lesão nervosa periférica segundo três graus: o primeiro tipo é aquela onde há um bloqueio parcial da condução do impulso nervoso causado pela compressão do nervo, sendo denominada **neuropaxia**; o segundo tipo de lesão é aquele onde ocorre um importante bloqueio da condução

do impulso nervoso provocado pelo esmagamento do nervo, com a secção de muitos axônios, sendo denominada de **axotomia**; o terceiro tipo de lesão, denominada **neurotomia**, se estabelece quando há transecção do nervo com a interrupção das bainhas conjuntivas e dos axônios, tendo como consequência o bloqueio total da condução do impulso nervoso.

A probabilidade de regeneração do nervo, com retomada total da sua funcionalidade, diminui em proporção à gravidade da lesão. Assim, após uma neurotomia, a probabilidade de recuperação funcional, sem a utilização de algum tratamento cirúrgico é muito pequena.

1.4.2. Alterações proximais à lesão

Após uma lesão do nervo, o corpo celular dos neurônios exibe o fenômeno da cromatólise, que corresponde à desintegração da substância de Nissl, ocasionada pela dispersão dos ribossomos no citoplasma e retículo endoplasmático rugoso, e aumento de basofilia (Torvik, 1976). Ao mesmo tempo o volume do núcleo e nucléolo aumenta, e estes migram para a periferia celular. Do ponto de vista funcional estes fenômenos não estão ainda bem esclarecidos. Porém, estão relacionados com as alterações celulares referentes à síntese protéica e ao transporte axoplasmático, envolvidos com o início da regeneração axonal, ou com a morte dos neurônios (Fawcett e Keynes, 1990).

Quando ocorre neurotomia, a região adjacente à lesão fica inicialmente entumecida. Na extremidade do coto proximal, os axônios transeccionados apresentam uma perda de material axoplasmático imediatamente após lesão, que cessa após alguns minutos com a reorganização da membrana plasmática axonal. A degeneração retrógrada pode atingir os axônios e esse fenômeno fica

restrito apenas ao local mais próximo a lesão (Waller, 1850). Numa etapa seguinte, se houver condições adequadas, os axônios podem iniciar a sua regeneração ramificando-se e orientando-se na direção do coto distal (Cajal, 1959).

1.4.3. Alterações distais à lesão

Após uma lesão no nervo, tem lugar no coto distal um processo degenerativo denominado "degeneração Walleriana" onde, primeiramente, os axônios desconectados do coto proximal entram num processo autolítico. Estudos ultra-estruturais mostraram que a primeira alteração a ocorrer nos segmentos axonais distais é o acúmulo de mitocôndrias no axoplasma da região dos nodos de Ranvier (Donat e Wisniewski, 1973). A seguir há uma retração da bainha de mielina, fragmentação do axoplasma e um rompimento das mitocôndrias. Após 12 horas da lesão a fibra nervosa fica entumecida e deformada com o aumento das incisuras de Schmidt-Lantermann. Apresentam também um afrouxamento das lamelas de mielina e retração da bainha em direção aos nodos de Ranvier. Num período de 3 a 7 dias os axônios e a bainha de mielina estarão completamente fragmentados em segmentos elipsóides (Carpenter, 1988).

Ainda há certa controvérsia sobre o padrão de degeneração Walleriana, ou seja, se ela avança de maneira centrífuga ou centrípeta à lesão (Cajal, 1959; Donat e Wisniewski, 1973; Sunderland, 1978; Lunn e cols., 1990). Contudo, Donat e Wisniewski (1973) obtiveram evidências de que esse processo de degeneração não seria uniforme e não teria, portanto, uma padronização quanto à sua propagação a partir da lesão.

Um fato importante na degeneração Walleriana é a alteração no comportamento da célula de Schwann. Seu citoplasma se hipertrofia, organelas são produzidas e aumentam os movimentos citoplasmáticos (Lubinska, 1982). Durante essa fase, são recrutados para o coto distal monócitos e macrófagos que, atuando junto com células de Schwann, aceleram a autólise dos axônios e fagocitam os fragmentos decorrentes da sua degradação, bem como os resíduos das bainhas de mielina (Stoll e cols., 1989).

A importância dos macrófagos no desenvolvimento da degeneração Walleriana é de vital importância. Nesse sentido, Beuche e Friede (1984) mostraram que fragmentos de nervos mantidos no interior de recipientes de "milipore", implantados intraperitonealmente, não apresentaram degeneração Walleriana. Esses recipientes não permitiam o ingresso de macrófagos e os axônios e a bainha de mielina permaneciam íntegros vários dias após o implante. Isso foi confirmado por White e cols. (1989), e mais recente Dahlin (1995), em experimentos onde a entrada de células no micro-ambiente do nervo lesado foi impedido.

1.5. REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

1.5.1. Conceitos básicos

O processo da regeneração do nervo depende de vários fatores, tais como, o grau de comprometimento das bainhas conjuntivas, a distância da lesão com relação ao corpo celular do neurônio, a disponibilidade de fatores tróficos no sítio da lesão e a capacidade de regeneração intrínseca da própria célula nervosa.

No início do processo regenerativo os axônios começam a formar, a partir do coto proximal, os chamados cones de crescimento. Estes correspondem a uma intumescência na extremidade do axônio, com 50µm de diâmetro e 100 µm de comprimento, sendo constituído de organelas e fibrilas (Cajal, 1959; Fawcett e Keynes, 1990).

Vários fatores atuam no crescimento axonal, em particular a lâmina basal das células de Schwann, que contém laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV. No decorrer do processo degenerativo no coto distal, as células de Schwann se multiplicam e se organizam formando cordões (bandas de Büngner) envolvidos pela membrana basal produzida por elas (Nathaniel e Paese, 1963; Haftek e Thomas, 1968). Os cones de crescimento, por sua vez, penetram as bandas de Büngner e os axônios se alongam entre a membrana da célula de Schwann e sua respectiva membrana basal, a uma velocidade de 1 a 2,5 mm /dia (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997).

No decorrer do processo descrito acima, os axônios em regeneração podem ou não ser mielinizados pelas células de Schwann. Embora se saiba que o início deste processo dependa de uma sinalização axonal, ele ainda não é bem compreendido (Griffin e cols, 1993).

1.5.2. Importância dos elementos celulares do nervo e dos fatores neurotróficos

Conforme já dito acima, no início do processo regenerativo os brotamentos axonais dão lugar à formação do cone de crescimento. Essa estrutura tem a função de detectar sinais físicos e bioquímicos no micro-ambiente de regeneração, dando condição de orientação e crescimento do axônio em direção

ao alvo periférico (Lockerbie, 1987; Dodd e Jessel, 1988). Devemos enfatizar que os axônios em regeneração crescem dentro dos tubos endoneurais, formados pelas células de Schwann e suas membranas basais. Além disso, as células de Schwann, e demais componentes celulares do nervo, são responsáveis por fornecer um meio propício para a indução e manutenção da regeneração axonal.

Particularmente, os elementos celulares de origem não-neural, sobretudo as células de Schwann, respondem pela produção de fatores neurotróficos, tais como, o NGF, BDNF e o GDNF, entre outros, bem como de moléculas promotoras de neuritos como a laminina (Levi-Montalcini, 1987; Heumann e cols., 1987; Raivich e Kreutzberg, 1987; Funakoshi e cols., 1993; Watabe e cols, 1995; Hammarberg e cols, 1996; Arce e cols, 1998).

Particularmente, Taniuchi e cols. (1988) demonstraram que as células de Schwann também expressam receptores para a NGF e que esta expressão parece ser controlada pelo contato axonal. Assim, após uma lesão do nervo, o número desses receptores nas células de Schwann, distais à lesão, aumenta com a degeneração das axonais, diminuindo, porém, à medida que se reestrutura o contato axonal durante a regeneração.

Por sua vez, Funakoshi e cols. (1993) mostraram alterações substanciais da quantidade de outros fatores neurotróficos no nervo (BDNF; NT-3), bem como dos seus receptores de alta afinidade, durante o processo degenerativo e regenerativo axonal.

Concomitante a essas respostas celulares ocasionadas por alguma lesão, desenvolve-se, distalmente à mesma, alterações na síntese de diversos fatores da matriz extracelular, entre eles colágeno, laminina, ácido hialurônico e proteoglicanos. Um desses componentes, a laminina, é uma molécula de

particular importância, pois entra na composição das membranas basais das bandas de Büngner (Salonen e cols., 1987; Tona e cols., 1993).

1.6. ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

Os reparos cirúrgicos necessitam de tempo certo para intervenção e o uso de técnicas operatórias apropriadas. Deve-se considerar também o aspecto anatômico e fisiológico da região traumatizada (Benzel, 1996). Relataremos a seguir algumas das técnicas mais empregadas, bem como sua adequação para as diversas situações

1.6.1. Neurorrafias, tubolizações e enxertos

Um dos métodos mais comuns são as suturas ou neurorrafias, que podem ser: **epineural** (Bora Jr. e cols., 1976; Rouleau, 1981), **perineural** ou **interfunicular** (Sunderland, 1953; Millesi e cols., 1972; Orgel e Terzis, 1977; Millesi, 1981) e **epiperineural** (Elsberg, 1919; Brunnelli, 1969). Vale destacar que alguns autores não vêem diferença entre a sutura epineural e interfunicular (Cabaud e cols., 1976; Hudson e cols., 1979; Buehler e cols., 1990).

Além das neurorrafias, têm sido empregados outros métodos para unir os cotos nervosos, como "cuffs" de tântalo (Weiss, 1944a), envelope arterial (Weiss, 1941, 1943, 1944b), ou venoso (Fullerton, 1915; Ely e Calteux, 1983), cola de fibrina (Epstein, 1949; Bento e Minit, 1989; Maragh e cols., 1990) e cola acrílica (Kline e Hayes, 1963; Freeman, 1965).

Outra solução aventada para lesões onde a união dos cotos não é possível, devido a uma perda de substância, foi o uso de tubos de diversos materiais para a regeneração do nervo no seu interior. Têm sido utilizados tubos de silicone ou de outros materiais aloplásticos (Ducker e Hayes, 1968; Ashur e cols., 1987; Gibson e cols., 1991; Langone, 1991, Francel e cols., 1997), materiais bioabsorvíveis (Dellon e Mackinnon, 1988; Pham e cols., 1991, Favaro e cols., 1992; Langone e cols., 1995), tubos pseudo-sinoviais (Lundborg e cols., 1981) e tubos de colágeno (Braun, 1966; Archibald e cols., 1991; Langone e cols., 1997; Lora e cols., 1997).

Quando a lesão produz uma acentuada perda de substância, várias propostas de tratamento foram feitas, sendo o enxerto de nervo autólogo o mais utilizado (Elsberg, 1919; Naffziger, 1921; Bentley e Hill, 1936; Holmes, 1947; Seddon, 1947, 1963; Sunderland e Ray, 1947; Spiegel, 1949; Millesi e cols., 1972, 1986; Narakas, 1989; Wong e Scott, 1991). Na década de quarenta os enxertos de nervos heterólogos e homólogos (Lerich, 1940; Bentley e Hill, 1940) também foram realizados, mas, devido ao fenômeno da rejeição foram abandonados (Seddon, 1963; Marmor, 1963, 1972). Porém, com a descoberta das drogas imunossupressoras, esses enxertos voltaram a ganhar espaço (Pollard e cols., 1971; Zalewski e cols., 1981; White e cols., 1982; Mackinnon e cols., 1985; Bain e cols., 1988a,b; Yu e cols., 1989; Midha e cols., 1992).

Tem sido também proposta a utilização de enxertos heterólogos de nervos previamente congelados e descongelados (Gulatti, 1988, Tajima e cols., 1991) e, principalmente, enxertos de fragmentos musculares previamente congelados e descongelados, que forneceriam o substrato para o crescimento axonal e

aumentariam a fonte de enxerto para a restauração nervosa (Fawcett e Keynes; 1986, Norris e cols.; 1988, Feneley e cols.;1991).

O uso de enxertos vascularizados é uma outra opção para reparação nervosa periférica (Breindenbach e Terzys; 1984, Kuenzel e cols.;1986, Breindenbach ; 1988), porém há sérias limitações na utilização desta técnica.

Encontram-se também outras manobras radicais para tentar resolver as falhas dos nervos como a relatada por Dandy (1943). Este autor promoveu o encurtamento ósseo do úmero ou do fêmur para assim realizar sutura término-terminal dos cotos nervosos.

Na literatura atual, encontram-se várias opções de neurorrafias, mas o uso clássico é o modo término-terminal (Coleman, 1944; Terzys, 1979; Mackinnon, 1989; Millesi, 1990; Brunnelli e Brunnelli, 1990; Harris e Tindall, 1991). De fato, os conhecimentos atuais sobre o processo regenerativo axonal, que se faz através dos tubos endoneurais, parecem indicar a técnica da neurorafia término-terminal como superior às neurorrafias látero-terminal ou término-lateral.

Finalmente, é importante ressaltar que em todas as técnicas cirúrgicas hoje empregadas para o tratamento dos nervos periféricos, o uso do microscópio está sempre bem indicado para se obter os melhores resultados (Millesi, 1973; Van Beek e Kleinert, 1977).

1.7. O EMPREGO DOS ENXERTOS DE NERVOS: SUAS VANTAGENS E LIMITAÇÕES

O enxerto autólogo de nervos (EAN) ainda é o método mais empregado na reconstrução cirúrgica de lesões nervosas periféricas com perda de substância. A ausência de fenômenos de rejeição e a relativa facilidade para a obtenção dos mesmos são as principais razões que têm motivado o seu uso. Contudo, quando as lesões apresentam uma grande extensão ou, quando o nervo a ser reconstruído possui grande calibre, a utilidade dos EAN diminui significativamente. Além disso, mesmo nos casos nos quais é indicado, sempre haverá a denervação da região doadora, que apenas teoricamente é menos importante que a região receptora.

Uma atraente alternativa aos EAN são os enxertos homólogos de nervos (EHN). Estes porém, estão sujeitos aos fenômenos de rejeição dependentes do grau de histocompatibilidade existente entre o doador e o receptor.

A rejeição dos EHN como resultado de uma resposta imune do receptor foi considerada pela primeira vez por Sanders e Young (1943) e por Gutmann e Sanders (1943). Posteriormente, Pollard e Fitzpatrick (1973), pelo estudo da ultra-estrutura dos EHN, puderam associar de maneira irrefutável a rejeição dos EHN com a sua invasão por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos ativados. Anselin e Pollard (1990), empregando anticorpos monoclonais e técnicas de imunohistoquímica, quantificaram e acompanharam a cronologia da invasão dos diferentes tipos de linfócitos nos EHN realizados entre ratos Dark Agouti (doadores) e Wistar (receptores), do 1º ao 14º dia após o transplante. Observaram também que as células de Schwann passaram a expressar

moléculas classe I e classe II do Sistema de Histocompatibilidade Principal (MHC) a partir do 2º dia após o transplante. Ansellin e Pollard (1990) propuseram, então, que as células de Schwann poderiam estar atuando como células apresentadoras do antígeno (APC), disparando assim a resposta imune e se tornando, elas mesmas, alvo do processo de rejeição.

Nos últimos anos foi evidenciada a existência de uma população de células no nervo com morfologia e propriedades análogas às dos macrófagos de outros tecidos e das células microgliais no sistema nervoso central (CM/SNC). Estas células têm sido consideradas por alguns autores como macrófagos residentes do sistema nervoso periférico (MR/SNP) (Hughes e cols., 1987; Perry e Gordon, 1987; Steves e cols., 1989; Vass e Lassman, 1990; Gehrmann e cols., 1991 a,b). Recentemente, Griffin e cols. (1991) e Monaco e cols (1992), estudando as características imunofenotípicas dos MR/SNP, observaram nessas células uma forte expressão de moléculas classe II do MHC. Esse achado, associado ao fato de que essas células apresentam uma morfologia ramificada semelhante à das células dendríticas do sistema imune, sugere que os MR/SNP possam atuar primariamente como APC. Sendo assim, parece razoável supor que também os MR/SNP desempenhem um papel importante no processo de rejeição dos EHN.

O desenvolvimento e o uso relativamente bem sucedido de drogas imunossupressoras no transplante de órgãos, levou vários grupos investigarem a possibilidade de seu emprego também nos EHN (Pollard e cols. 1971; Pollard e Fitzpatrick, 1973; Pollard e cols., 1973; Chung e Chung, 1974; Zalewsky e Gulati, 1981, 1984; Mackinnon e cols., 1984 a,b, 1987; Bain e cols., 1988a; 1988b; Gulati, 1989; Grochowicz e cols., 1989; Yu e cols, 1989; Ansellin e cols., 1990; Mackinnon e cols., 1992; Ansellin e cols., 1992; Zalewsky e cols., 1993). Diversos

autores obtiveram imunoproteção dos EHN e aumento da regeneração axonal em camundongos, ratos e primatas submetidos à ação de drogas como Azatioprina e Ciclosporina A (Pollard e cols., 1971; Pollard e cols., 1973; Zalewsky e Gulati, 1981, 1984; Mackinnon e cols., 1984 a,b, 1987; Bain e cols., 1988a; 1988b; Mackinnon e cols., 1992). Contudo, a administração dessas drogas imunossupressoras em seres humanos que tenham recebido EHN ainda é controversa. Os efeitos colaterais dessas substâncias, toleráveis nos transplantes de órgãos vitais como rim, coração ou fígado, não são aceitáveis na imunoproteção dos EHN, considerando que esses efeitos podem vir a ser mais adversos que a própria lesão do nervo. Além disso, diversos autores observaram que EHN transplantados em ratos submetidos à imunossupressão com Ciclosporina A por longo período (9-20 semanas) sofreram uma rápida e total rejeição uma vez cessada a administração da droga (Zalewski e Gulati 1981; Yu e cols., 1989; Ansselin e cols., 1990; Ansselin e cols., 1992). Em particular, Ansselin e cols., (1992) observaram uma significativa diminuição da amplitude do eletromiograma em ratos controle (não operados) que receberam doses diárias de Ciclosporina A (5mg/kg e 10mg/kg) durante 20 semanas.

Com o objetivo de diminuir a antigenicidade dos EHN, diversos autores submeteram os nervos a diferentes tipos de tratamentos prévios, tais como: predenervação, congelamento, resfriamento, irradiação ou liofilização (Campbell e cols., 1963; Marmor, 1963; Das Gupta, 1967; Pollard e Fitzpatrick, 1973; Singh, 1976; Singh e cols., 1977; Pollard e McLeod, 1981; Zalewski e Gulati, 1982; Ide, 1983; Ide e cols., 1983; Mackinnon e cols., 1984a,b; Gulati, 1988; Osawa e cols., 1986, 1987; Hare e cols., 1993; Zalewski e cols., 1993).

Empregando as técnicas de congelamento, associadas ou não à predenervação dos EHN, Ide (1983), Ide e cols. (1983), Gulati e Zalewski (1985), Osawa e cols. (1986, 1987) e Tohyama e cols. (1990) mostraram que o processo de rejeição dos EHN promove a eliminação da mielina, dos axônios e das células de Schwann, porém, preserva os tubos de membrana basal destas últimas. Contudo, à medida que os axônios, acompanhados pelas células de Schwann do receptor, crescem no interior do nervo transplantado, os tubos antigos de membrana basal vão se fragmentando. Observações sistemáticas de enxertos de nervo ciático em camundongos, ratos e coelhos, e de nervo ulnar em macaco, realizadas ao microscópio eletrônico, confirmaram a importância dos tubos de membrana basal para a orientação e crescimento dos axônios em regeneração, tanto no interior dos EAN, quanto no interior dos EHN (Ide e cols., 1990).

Contudo, diversos autores têm mostrado que a regeneração axonal através dos EAN onde os elementos celulares foram eliminados é inferior à observada nos enxertos frescos. De fato, uma grande quantidade de dados demonstram que os componentes celulares do nervo, especialmente as células de Schwann, produzem várias moléculas neurotróficas responsáveis pela sobrevivência dos neurônios e pelo crescimento axonal (Fawcett e Keynes, 1990; Hurst e Badalamente, 1991; Perry e Brown, 1992; Hammarberg e cols, 1996; Arce e cols, 1998). Por outro lado, conforme mencionamos, no caso dos EHN, os elementos celulares têm um importante papel no desencadeamento da rejeição do enxerto pelo sistema imunológico do receptor.

Dessa forma, um passo importante seria o desenvolvimento de um método que possibilitasse o emprego dos EHN, onde as células de Schwann fossem preservadas, ao mesmo tempo que sua antigenicidade, bem como dos outros

elementos celulares, fosse eliminada ou restringida ao máximo. Neste último caso, embora a imunossupressão sistêmica ainda fosse necessária, ela poderia, então, ser reduzida a níveis aceitáveis.

São realmente escassos na literatura trabalhos experimentais voltados ao estudo da viabilidade dos EAN e EHN conservados em meios que preservam os elementos celulares e que, de alguma maneira, reduzam seu potencial antigênico (Mackinnon e cols., 1984 a,b; Ruwe e Trumble, 1990; Jensen e cols., 1990; Hare e cols., 1993; Zalewski e cols., 1993). Consequentemente, pouco se sabe a respeito da ação preservadora exercida sobre os nervos pelos diferentes agentes até agora empregados.

Zalewski e cols. (1993) avaliaram a viabilidade do emprego de EAN e EHN congelados sob a ação crioprotetora de uma mistura de dimetil sulfoxida/formamida por 5 semanas. A seguir, os enxertos foram transplantados em ratos normais ou imunossuprimidos com doses diárias de Ciclosporina A (5mg/kg) durante 5 semanas após o transplante. Os resultados de Zalewski e cols. (1993) mostraram que os elementos celulares do nervo podem ser criopreservados e que, assim como os EAN, os EHN sobrevivem após o transplante nos animais imunossuprimidos. Entretanto, nos animais normais (não imunossuprimidos) e em todos os animais nos quais foi suspenso o tratamento com Ciclosporina A, os EHN sofreram acentuado grau de rejeição. O exame ultra-estrutural dos EHN rejeitados revelou a eliminação da camada de células perineurais e das células de Schwann. Inúmeras células mononucleadas, que ocupavam o espaço endoneural, haviam penetrado também no interior dos tubos de membrana basal. É interessante notar a permanência dos tubos de membrana basal também neste caso, o que parece confirmar os achados de outros vários

autores já mencionados (Ide, 1983; Ide e cols., 1983; Gulati e Zalewski, 1985; Osawa e cols., 1986, 1987; Tohyama e cols., 1990; Ide e cols., 1990).

Por sua vez, Hare e cols. (1993) analisaram a migração de linfócitos para o interior de EHN frescos ou pré-tratados transplantados subcutaneamente em ovelhas. O pré-tratamento dos EHN foi realizado por congelamento ou por resfriamento a 5°C. Estes últimos foram mantidos em solução conservadora Wisconsin/Belzer por períodos de 6 horas a 3 semanas. A análise da migração de linfócitos do hospedeiro, previamente marcados com índio¹¹¹, realizada 7 dias após o implante, mostrou que ambos os tratamentos inibiram significativamente a migração de linfócitos para o interior dos EHN, quando comparados com os nervos frescos. Foram particularmente interessantes os resultados obtidos por esses autores com o resfriamento e conservação nos nervos na solução Wisconsin/Belzer. De fato, a inibição da migração de linfócitos para o interior dos EHN foi realmente muito acentuada quando os mesmos foram mantidos na solução conservadora de Wisconsin/Belzer pelo período de 1 a 3 semanas. Entretanto, a conservação dos EHN por períodos curtos, de 6 a 24 horas, produziu, paradoxalmente, um aumento da migração de linfócitos. Considerando o observado em transplantes renais, nos quais curtos períodos de isquemia do órgão podem levar a um aumento da expressão dos MHC classe II no endotélio vascular, os autores atribuíram a maior migração de linfócitos à ocorrência de um fenômeno análogo nos EHN. Por outro lado, tempos longos de conservação a frio poderiam estar provocando uma depleção e/ou inibição de células endoteliais, bem como de outras células apresentadoras de antígeno, determinando, assim, a redução da migração dos linfócitos.

Evans e cols. (1995) avaliaram o potencial da técnica de conservação de enxertos de nervos em solução Wisconsin/Belzer, empregando o modelo de transplante de nervo ciático entre ratos de linhagem isogênica. Esses autores estudaram o efeito de diferentes temperaturas de conservação (5, 22 e 37°C) sobre a potencialidade dos mesmos em sustentar a regeneração do nervo. Após 14 meses do transplante verificaram que os parâmetros histológicos, eletrofisiológicos e funcionais computados nos animais que receberam enxertos conservados a 5°C por até três semanas foram equivalentes aos observados nos animais que receberam transplantes de nervos frescos.

Realmente, a técnica de conservação de nervos para transplante parece ser promissora. Neste sentido, consideramos importante aprofundar nosso conhecimento sobre a eficácia de diferentes tipos de soluções conservadoras, bem como, sobre o tempo máximo de conservação dos enxertos sem que haja comprometimento da sua viabilidade. Tais dados, associados ao estudo do(s) mecanismo(s) que inibem a resposta imunológica do receptor aos enxertos homólogos de nervos mantidos em tais soluções, poderão viabilizar o desenvolvimento e implantação de um banco de nervos.

2. OBJETIVOS

No sentido de fornecer dados sobre a viabilidade de enxertos de nervos mantidos em soluções conservadoras, propõe-se estudar as características morfológicas e quantitativas da regeneração axonal em enxertos autólogos de nervos mantidos em dois tipos diferentes de soluções conservadoras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 350 e 450 gramas, com idade entre 14 e 18 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os animais foram divididos em dez subgrupos de acordo com a tabela abaixo. Em 15 desses animais o nervo tibial esquerdo foi removido e conservado por 24 ou 72 horas em uma das seguintes soluções: solução da Universidade de Wisconsin/Belzer ou solução de Collins. Após o período de conservação, os nervos foram transplantados para o mesmo animal no lado direito, segundo os procedimentos cirúrgicos descritos a seguir. Em outro grupo de 5 animais o nervo tibial esquerdo foi retirado e imediatamente transplantado para o lado direito. Ainda, em outro grupo de 16 animais, os nervos tibial direito e esquerdo foram removidos e conservados em solução da Universidade de Wisconsin/Belzer e solução de Collins por 24 ou 72 horas. Após este período esses nervos foram processados histologicamente. Finalmente, em um grupo de 4 animais o nervo tibial esquerdo foi retirado e a seguir processado histologicamente.

NERVOS TRANSPLANTADOS

Grupo	número de animais	solução conservadora	tempo de conservação
SW1-T	4	UW / BELZER	24 Horas
SW3-T	4	UW / BELZER	72 Horas
SC1-T	4	COLLINS	24 Horas
SC3-T	3	COLLINS	72 Horas
NF-T	5	-	-

NERVOS NÃO TRANSPLANTADOS

Grupo	número de animais	solução conservadora	tempo de conservação
SW1-S	4	UW / BELZER	24 Horas
SW3-S	4	UW / BELZER	72 Horas
SC1-S	4	COLLINS	24 Horas
SC3-S	4	COLLINS	72 Horas
NN-S	4	-	-

3.2. SOLUÇÕES CONSERVADORAS

3.2.1. Solução de Wisconsin/Belzer

A solução de Wisconsin/Belzer (Du Pont Pharma, Netherlands) foi fornecida pelo Laboratório do Prof. Dr. José Francisco Figueiredo, do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e apresentava a seguinte composição:

KH ₂ PO ₄	25 mM
MgSO ₄	5 mM
Lactobionato de K ⁺	100 mM
Adenosina	5 mM
Glutathione Total	3 mM
Rafinose	30 mM
Alopurinol	1 mM
Hidroxi-etil-amato	50 g/L
pH	7,4
Osmolaridade	320 mOsmol/L

3.2.2. Solução de Collins

A solução de Collins foi adquirida dos Laboratórios B.Braun S/A (São Gonçalo, RJ, Brasil) e tinha a seguinte composição:

KCl	15 mM
NaHCO ₃	10 mM
MgSO ₄	28 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
K ₂ HPO ₄	42 mM
Glicose	139 mM
pH	7,0
Osmolaridade	317 mOsmol/L

3.2.3. Preparo dos meios de conservação

A partir de frascos inviolados, contendo um litro das soluções conservadoras, foram retiradas alíquotas de 10 ml as quais, a seguir, foram armazenadas a -20°C em frascos estéreis até o momento do uso. Previamente à retirada do enxerto de nervo, as alíquotas foram descongeladas e adicionados às mesmas os antibióticos Benzilpenicilina Potássica (10.000.000 U, Laboratórios Wyeth Ltda., SP, Brasil) e Sulfato de Estreptomicina (1,0 grama, Laboratórios Wyeth Ltda., SP, Brasil).

3.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia profunda através da administração de uma dose de Pentobarbital Sódico (50mg/kg de peso corporal; Hypnol, Laboratórios Cristália) intraperitonealmente.

3.3.1. Retirada e conservação do enxerto

Após anestesia, foi feita a tricotomia da face posterior da coxa esquerda na região correspondente ao nervo ciático e a seguir depositados em decúbito ventral sobre uma mesa cirúrgica especialmente construída para cirurgia em pequenos animais. Após uma incisão de 5cm na pele, em direção ao maior eixo da coxa, foram afastados os músculos da região, exposto o nervo ciático e suas respectivas divisões, desde o tendão do músculo obturador até a fossa poplíteia. A seguir, sob microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos, mod. MC-M9), com aumento de 10 e 16 vezes, foi feita a neurolise e ressecados 2,0 cm do nervo tibial.

Durante o ato cirúrgico o campo operatório foi umedecido com solução fisiológica estéril. O segmento de nervo tibial ressecado foi imediatamente depositado no frasco contendo a solução conservadora respectiva, que foi, a seguir, armazenada a 4°C por um período de 24 ou 72 horas.

Ao final desse procedimento, a ferida cirúrgica foi fechada, restabelecendo-se o plano muscular e aproximando-se a pele com pontos simples de Mononylon 4-0 (Ethicon). A seguir, os animais foram identificados e transferidos para o biotério e mantidos sob temperatura e umidade controladas, num ciclo de 12 horas de claro-escuro, recebendo ração e água ad libitum.

Nos animais, dos quais foi retirado o nervo tibial para avaliação morfológica, após os períodos de conservação de 24 e 72 horas ou não, sem posterior transplante, os procedimentos cirúrgicos foram semelhantes. Sendo que, de cada animal foram retirados o nervos tibial direito e esquerdo. Estes foram armazenados nas soluções conservadoras correspondentes ou imediatamente processados para o estudo morfológico. Após esse procedimento os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico.

3.3.2. Transplante dos enxertos mantidos nas soluções conservadoras

Após o período de conservação dos enxertos por 24 ou 72 horas, os animais foram novamente anestesiados e submetidos aos procedimentos de tricotomia e exposição do nervo ciático e seus ramos na coxa direita, conforme já descrito. A seguir, sob microscópio cirúrgico, foi retirado um segmento de 1,0 cm do nervo tibial e iniciado o transplante do enxerto respectivo.

O enxerto foi retirado da solução conservadora e regularizadas as suas extremidades, reduzindo-se seu comprimento para 1,3 cm. A seguir os cotos

proximal e distal do nervo receptor foram também regularizados e, depois procedida a neurorrafia com 3 pontos de Mononylon 10-0. Ao final, a ferida cirúrgica foi fechada restabelecendo-se o plano muscular e aproximando-se a pele com pontos simples de Mononylon 4-0 (Ethicon). Os animais foram transferidos para o biotério e mantidos sob temperatura e umidade controladas, num ciclo de 12 horas de claro-escuro, recebendo ração e água ad libitum, por um período de 50 dias.

3.3.3. Transplante dos enxertos frescos

Após a anestesia, foi feita a tricotomia da face posterior da coxa esquerda na região correspondente ao nervo ciático e, a seguir, o animal foi posicionado em decúbito ventral. Após uma incisão de 5 cm na pele, na direção do maior eixo da coxa foram afastados os músculos da região, exposto o nervo ciático e suas respectivas divisões, desde o tendão do músculo obturador até a fossa poplítea. A seguir, sob microscópio cirúrgico com aumento de 10 e 16 vezes, foi feita a neurolise e ressecados 2 cm de segmento do nervo tibial. A seguir feita nova incisão na coxa direita e, sob microscópio cirúrgico, foi isolado o nervo tibial e retirado 1 cm do mesmo e iniciado o transplante do enxerto respectivo. O enxerto foi regularizado em suas extremidades para 1,3 cm de comprimento, o mesmo foi feito nos cotos distal e proximal do nervo receptor e procedida a neurorrafia com 3 pontos de Mononylon 10-0.

Foi fechada a ferida cirúrgica reestabelecendo-se o plano muscular e aproximando a pele com pontos simples de Mononylon 4-0.

Os animais foram transferidos para o biotério e mantidos sob temperatura e umidade controladas, num ciclo de 12 horas de claro-escuro, recebendo ração e água ad libitum, por um período de 50 dias.

3.4. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NERVOS

Após 50 dias, os animais foram anestesiados com Pentobarbital e submetidos à fixação e retirada do nervo tibial contendo o segmento transplantado. A fixação foi realizada "in situ", por um período de 20 minutos, com uma solução composta por glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato (pH 7,38). Após a fixação do nervo tibial e do respectivo enxerto, estes foram imersos na mesma solução fixadora por 24 horas e mantidos à temperatura de 4 graus centígrados. A seguir, foram pós-fixados por um período de 2 horas em uma solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,38).

Ao final da pós-fixação, os nervos foram lavados em água destilada e corados com acetato de uranila a 0,5%, em solução aquosa de sacarose, por um período de 12 horas. A seguir, foram desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Araldite F, CY-205, Uegama).

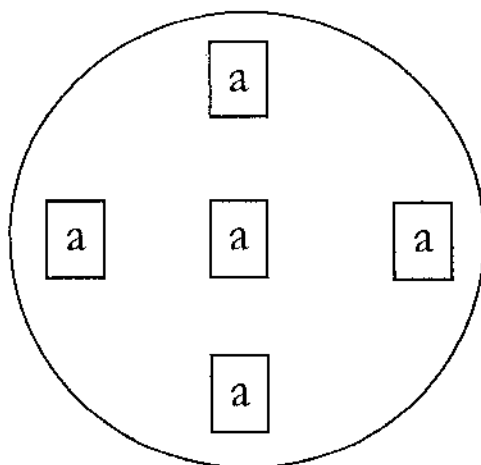
Após a polimerização da resina, os blocos correspondentes ao nervo tibial foram levados ao ultramicrotomo (LKB, Bromma 8800), equipado com navalha de vidro, para confecção dos cortes transversais semifinos com 0,5µm de espessura e corados em uma solução aquosa de azul de toluidina (0,5 %) para análise ao microscópio óptico. Todos os cortes foram obtidos a partir da porção média do enxerto.

3.5. ANÁLISE QUANTITATIVA

Para a avaliação quantitativa dos axônios regenerados, em cada corte transversal, de cada um dos enxertos, foram amostrados 5 campos distintos de $9675 \mu\text{m}^2$, conforme esquema abaixo. Cada campo foi fotografado ao microscópio óptico com objetiva de imersão e os negativos copiados em papel (Kodak, F4), obtendo-se um aumento final de 1625 vezes. O mesmo procedimento foi empregado para a avaliação do número de axônios no nervo normal.

Em cada campo foi contado o número total de axônios mielínicos, com auxílio de um contador eletrônico construído para essa finalidade. Para o cálculo da densidade axonal foi considerado o número de axônios mielínicos distribuídos em $10000 \mu\text{m}^2$ do corte.

Esquema mostrando a localização dos campos amostrados



3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados quantitativos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) dos valores registrados de cada parâmetro seguida do teste "t" de Student-Newman-Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. ASPECTOS MACROSCÓPICOS DOS ENXERTOS

4.1.1. ANTES DO TRANSPLANTE

Ao serem retirados dos meios de conservação, solução de Wisconsin/Belzer ou solução de Collins, os enxertos apresentavam um aspecto edemaciado, sem contudo perder seu perfil anatômico. Apresentavam uma coloração esbranquiçada e ligeiramente mais rígidos que os enxertos frescos. Em todas as condições experimentais, os enxertos foram mais difíceis de serem manipulados durante a rafia. O epineuro era menos consistente que nos nervos frescos e, mesmo após a trimagem das suas extremidades, era mais difícil sua perfeita coaptação os cotos proximal e distal, respectivamente. Estas características dos enxertos foram semelhantes após 24 ou 72 horas de conservação (Figs. 1A, 1B).

4.1.2. APÓS 50 DIAS DO TRANSPLANTE

Após período de 50 dias, os enxertos apresentavam aspecto semelhante em todas as situações experimentais, não havendo evidência de necrose em nenhum dos casos estudados. A coloração dos mesmos era normal e a ocorrência de fibrose nas regiões da rafia foi observada igualmente em todas as situações experimentais. Em todos os casos ocorreu a formação de uma nova e abundante rede vascular, passível de ser observada na superfície dos enxertos. Assim, não foram constatadas diferenças significativas do aspecto macroscópico entre os enxertos pré-tratados por 24 ou 72 horas com as soluções empregadas, bem como entre estes e os enxertos de nervos frescos (Figs. 2A, 2B).

Figura 1.

As figura 1A e 1B mostram segmentos de nervo tibial mantidos por 72 horas em solução conservadora de Wisconsin/Belzer e solução de Collins, respectivamente. Note o perfil anatômico normal dos mesmos.

A



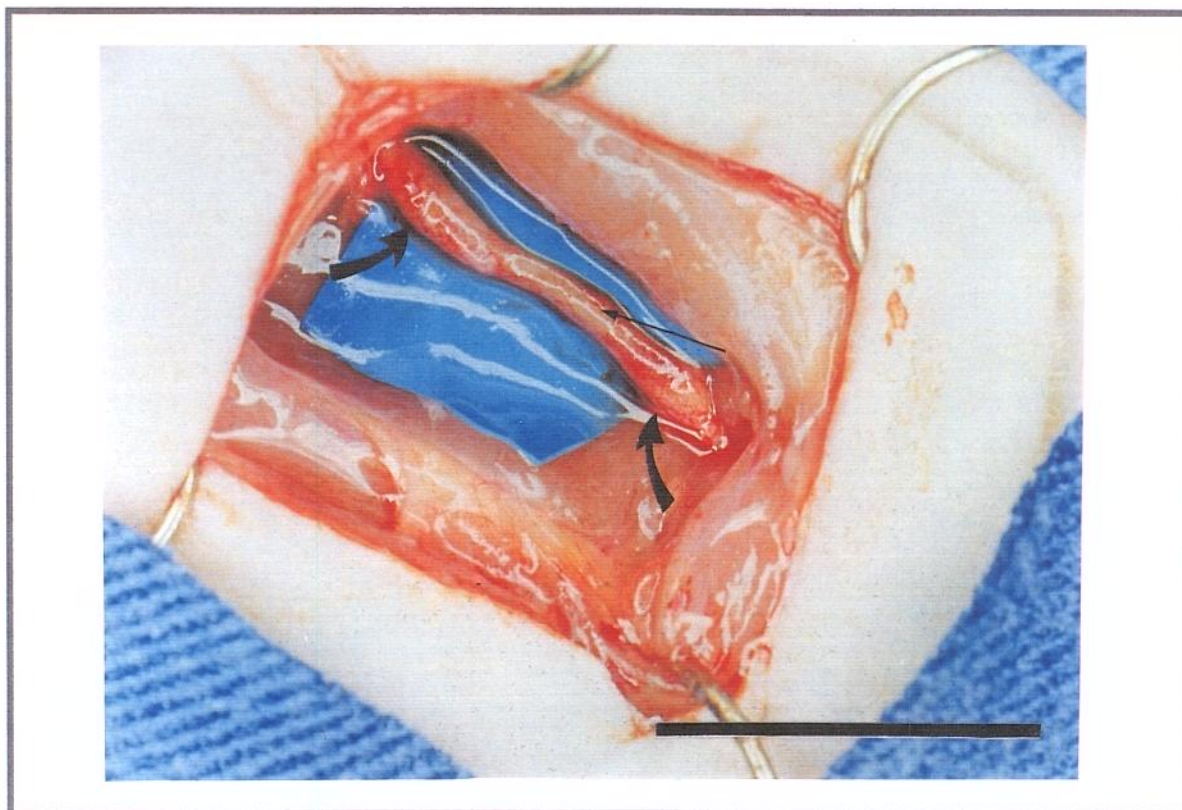
B



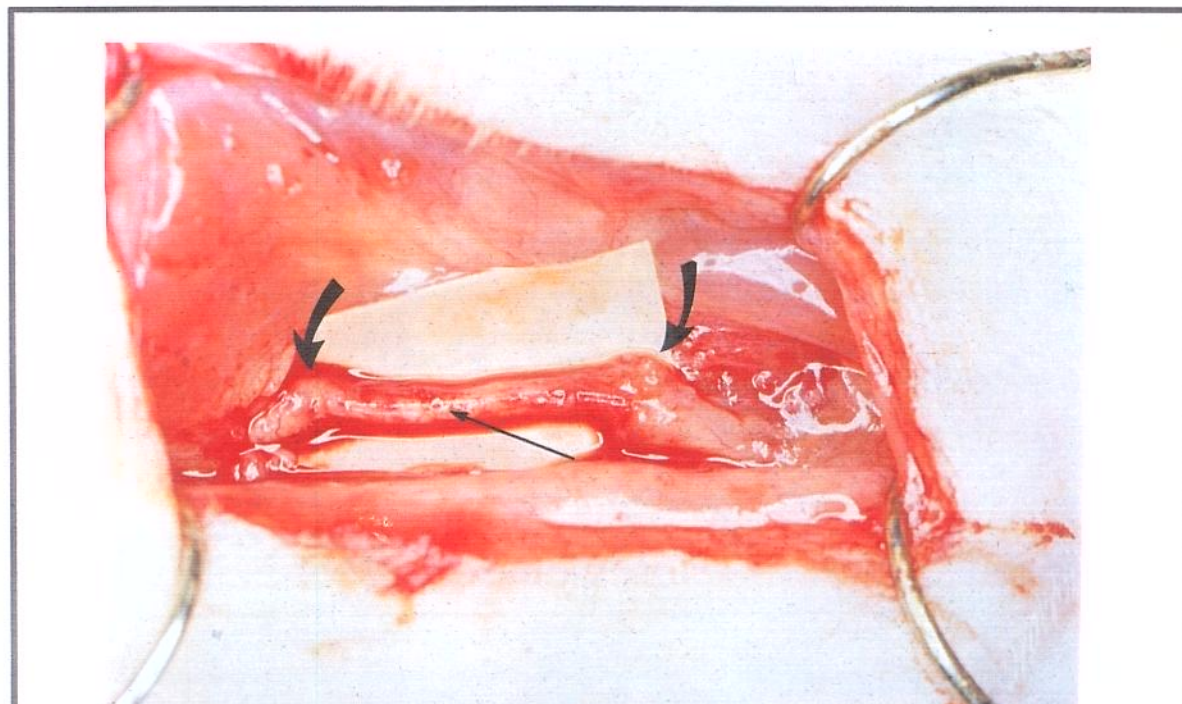
Figura 2.

A figura 2A mostra a região de um enxerto de nervo tibial após 50 dias de cirurgia. O enxerto foi previamente mantido em solução de Wisconsin / Belzer por 72 horas. A figura 2B mostra a região de um enxerto fresco de nervo tibial após 50 dias de cirurgia. Note em ambos os casos a presença de uma rede vascular bem desenvolvida na superfície do enxerto (setas retas) e de fibrose nas regiões de sutura (setas curvas). Barras=1,0 cm

A



B



4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ENXERTOS APÓS SUA CONSERVAÇÃO NA SOLUÇÃO DE WISCONSIN/BELZER OU NA SOLUÇÃO DE COLLINS POR 24 OU 72 HORAS

Os cortes transversais dos segmentos de nervos mantidos em solução de Wisconsin\Belzer ou em solução de Collins apresentaram aspecto semelhante após 24 ou 72 horas. Em pequeno aumento (objetiva 10X), apresentavam aspecto semelhante a um nervo normal, com tecido perineural bem definido e axônios mielínicos com morfologia regular, sem evidência de processo degenerativo (Figs. 3A, 4A, 5A). Contudo, sob maior aumento (objetiva 100X) foi possível evidenciar um edemaciamento das fibras mielínicas, especialmente da bainha de mielina (Figs. 3B, 4B).

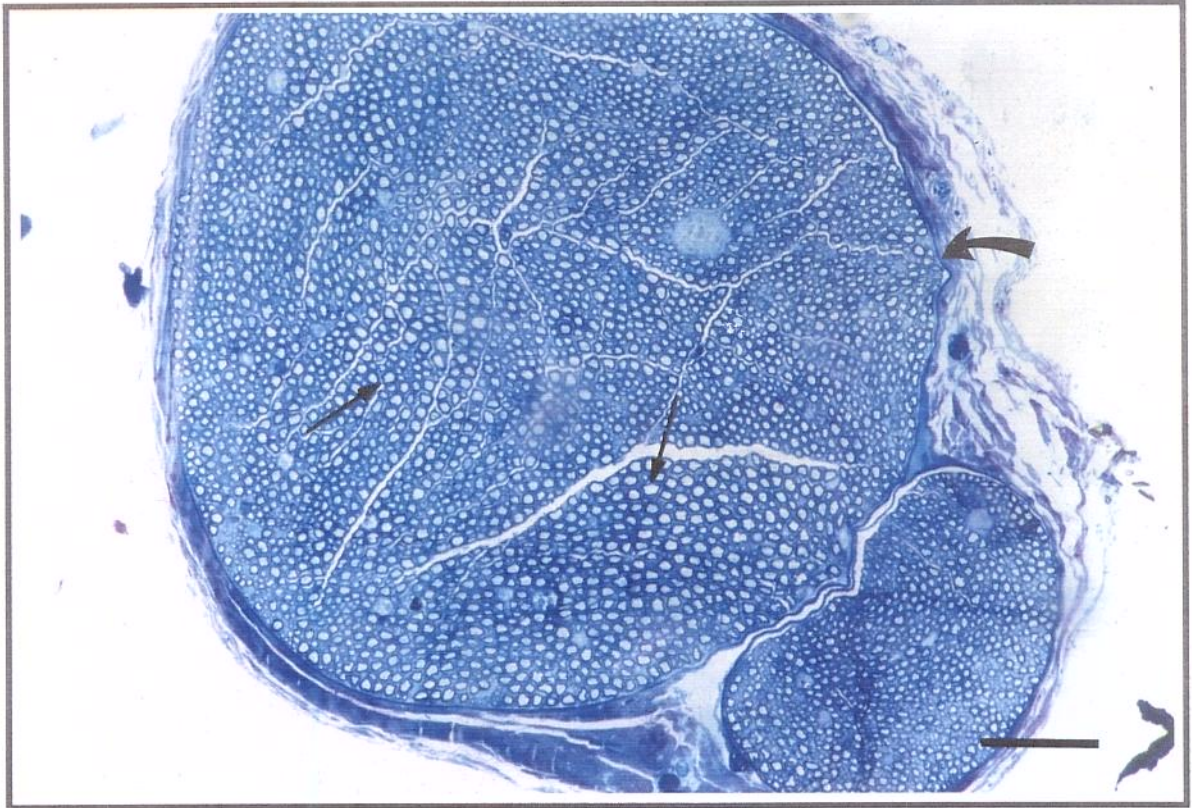
O espaço endoneural nos enxertos mantidos nas soluções conservadoras se encontrava reduzido e era mais difícil visualizar os grupamentos de axônios amielínicos, os quais são bem evidentes no nervo normal (FigS. 3B,4B,5B). Por outro lado, dentro os grupamentos de axônios amielínicos visíveis nos nervos tratados, podia-se observar o edemaciamento daqueles de maior calibre (Fig. 4B).

Figura 3 - A figura 3A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto de nervo tibial após 72 horas de conservação em solução de Wisconsin/Belzer. Note a presença do perineuro bem definido (seta curva) e os axônios mielínicos (setas retas) com aspecto semelhante ao do nervo normal (vide figura 5). Barra=100 μ m.

A figura 3B mostra um detalhe do corte transversal da figura 3A . Observe o aspecto edemaciado das fibras mielínicas e o reduzido espaço endoneural. Barra=10 μ m.

Coloração: Azul de toluidina

A



B

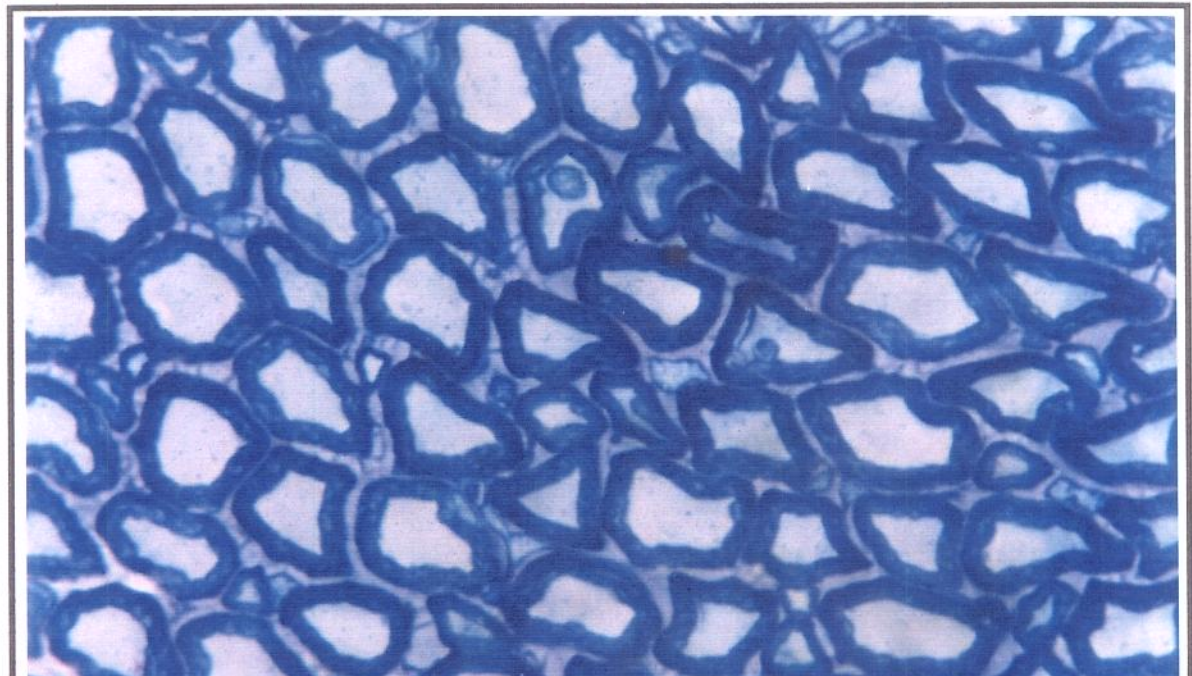
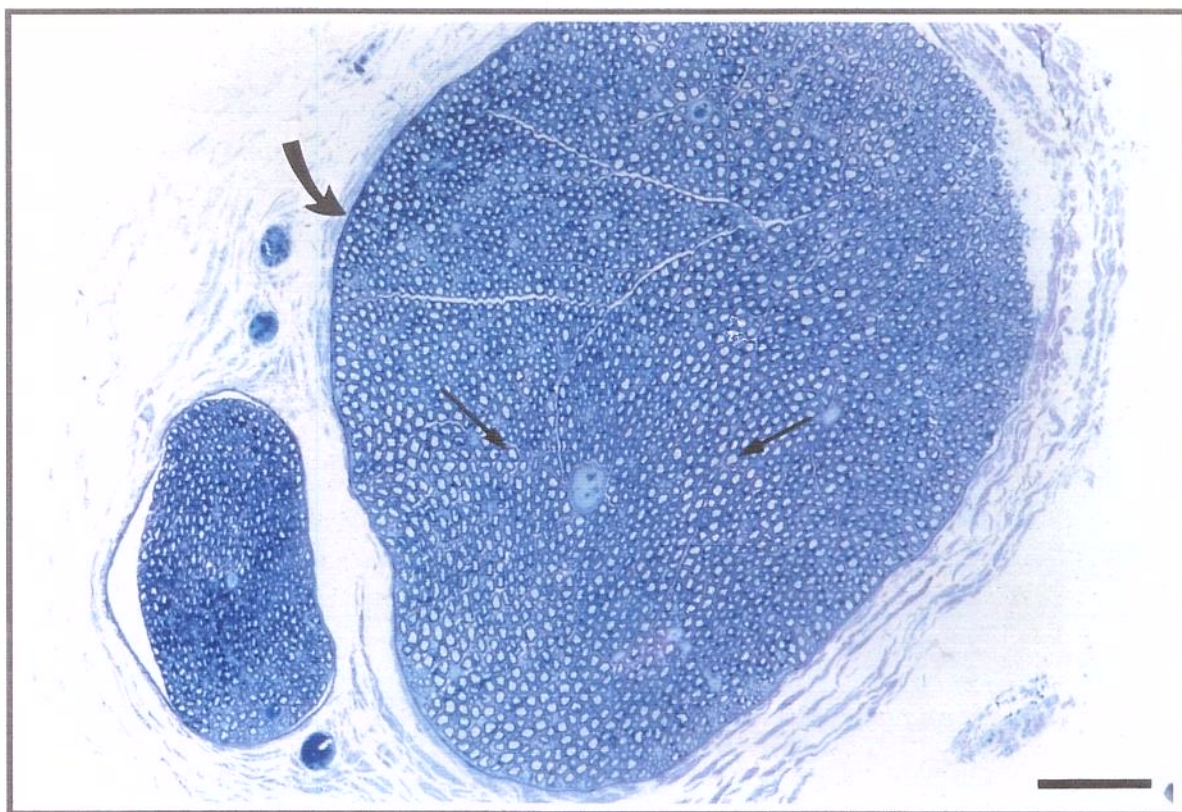


Figura 4 - A figura 4A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto de nervo tibial após 72 horas de conservação em solução de Collins. Note a presença do perineuro bem definido (seta curva) e os axônios mielínicos (setas retas) com aspecto semelhante ao do nervo normal (vide figura 5). Barra=100 μ m.

A figura 4B mostra um detalhe do corte transversal da figura 3A . Observe o aspecto edemaciado das fibras mielínicas (setas retas) de axônios amielínicos de grande calibre (seta curva). Barra=10 μ m.

Coloração: Azul de toluidina

A



B

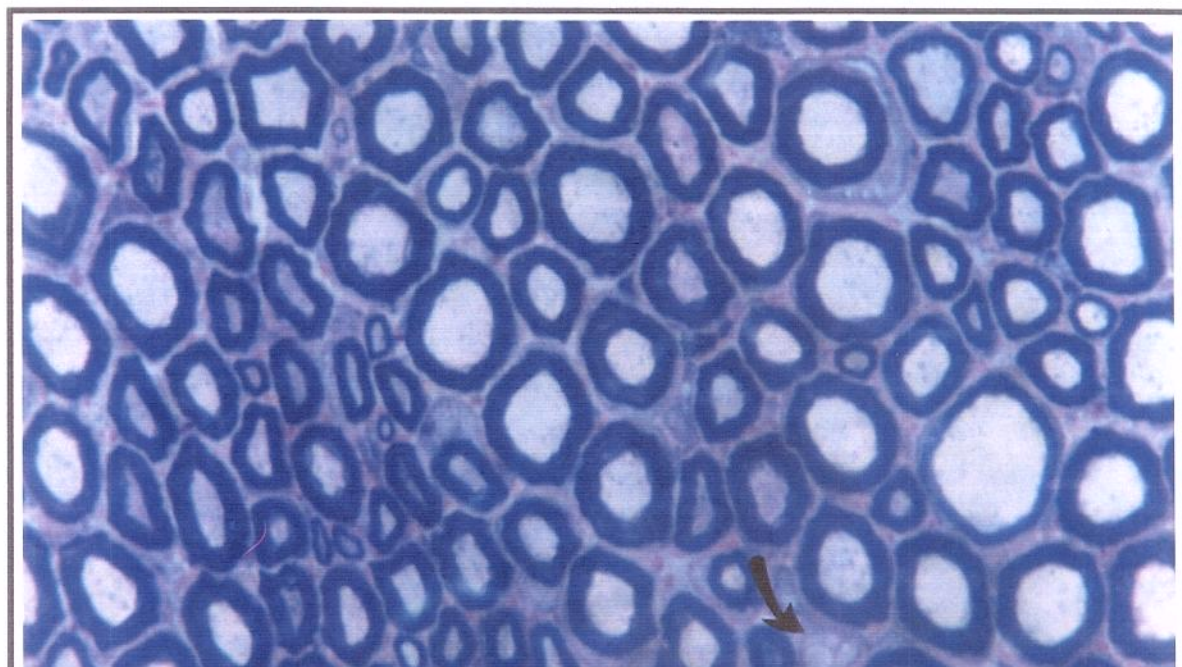
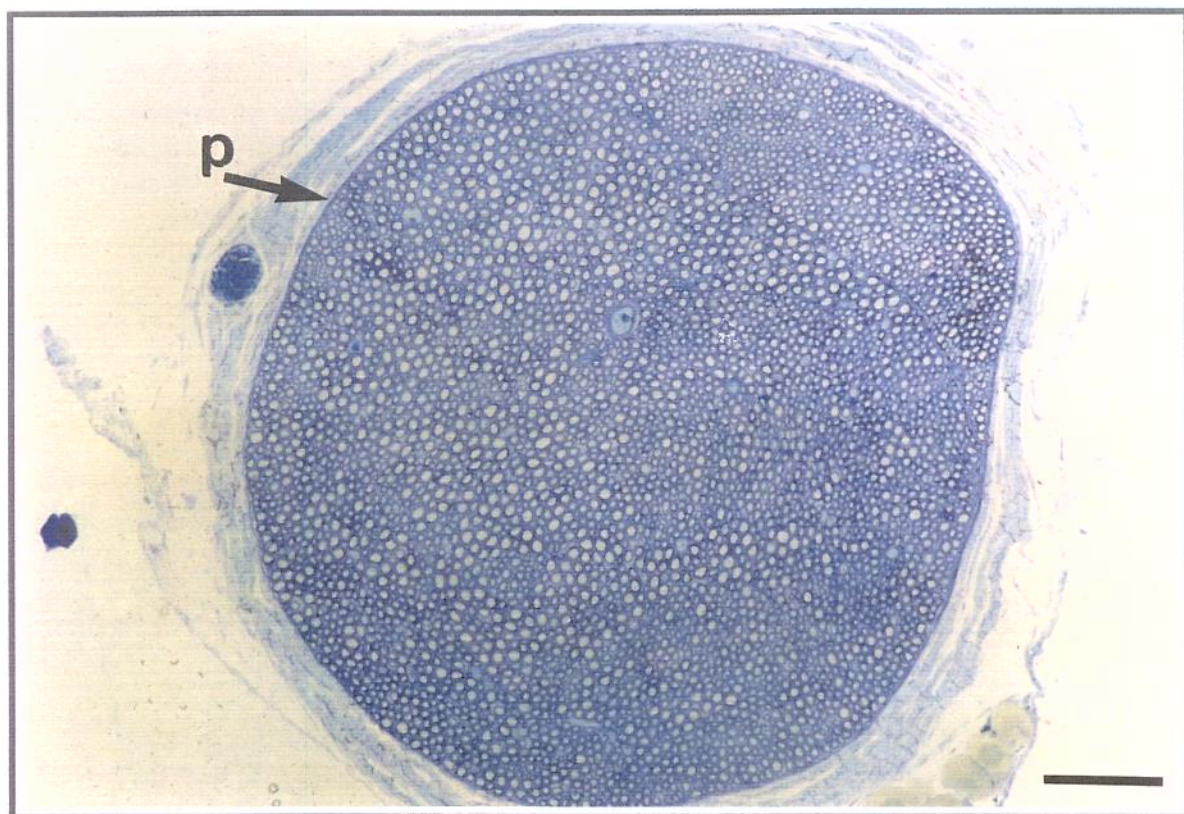
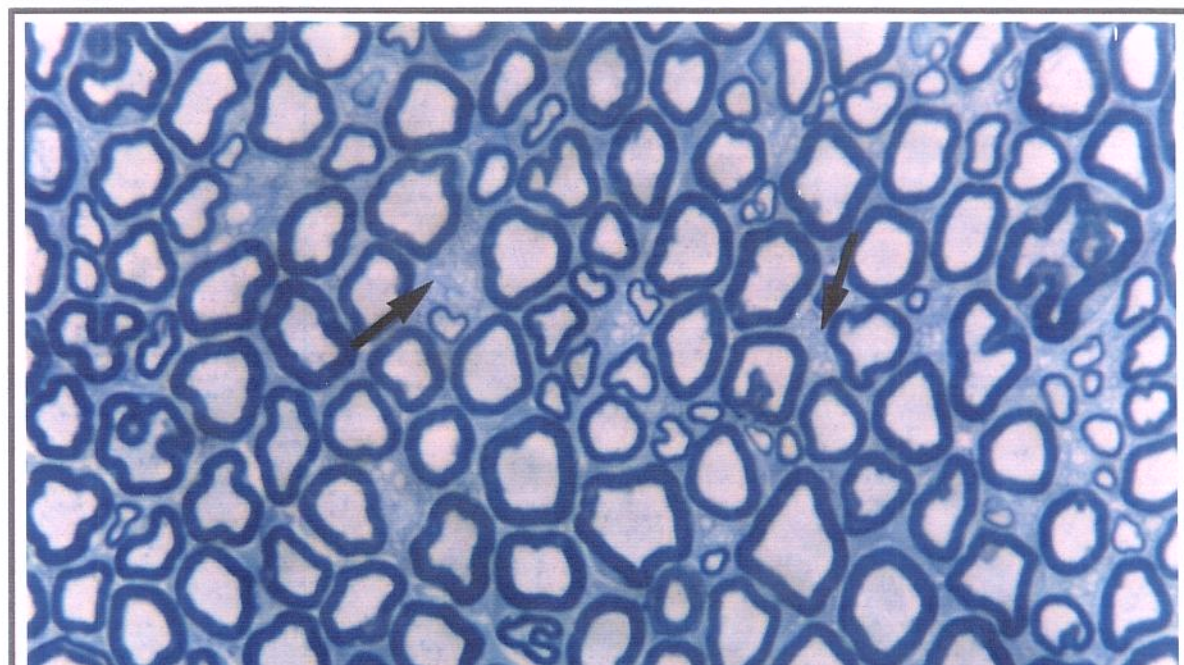


Figura 5 - A figura 5A mostra um corte transversal de um nervo tibial normal obtido em região similar à dos enxertos estudados (p=perimeuro). Barra=100 μ m. A figura 5B mostra detalhe do corte transversal da figura 5A. Note a presença de grupamentos de fibras amielínicas (setas). Barra=10 μ m. Coloração: Azul de toluidina

A



B



4.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ENXERTOS MANTIDOS NA SOLUÇÃO DE WISCONSIN/BELZER OU NA SOLUÇÃO DE COLLINS E DE ENXERTOS FRESCOS APÓS 50 DIAS DE TRANSPLANTE

4.3.1. ENXERTOS MANTIDOS NA SOLUÇÃO DE WISCONSIN/BELZER POR 24 OU 72 HORAS

Após 50 dias de transplante, os cortes transversais dos enxertos previamente mantidos em solução de Wisconsin/Belzer por 24 ou 72 horas apresentavam aspecto típico de nervo em regeneração. O epineuro mostrava-se espessado com várias camadas de células pouco compactadas ao redor de fascículo nervoso. Entremeados no tecido epineural apareciam também pequenos vasos sangüíneos (Fig. 7A). O perineuro, por sua vez apresentava-se como um revestimento fino e homogêneo (Fig. 6A,7A).

A população de axônios mielínicos regenerados no interior do enxerto era heterogênea quanto às suas dimensões, mas apresentavam aspecto normal, com a bainha de mielina bem definida (Figs. 6B, 7B). Estes axônios se encontravam, na sua maioria, agrupados formando minifascículos, onde predominavam aqueles de pequeno calibre acompanhados por axônios de médio e grande calibre localizados mais periféricamente (Figs. 6B, 7B). Tais minifascículos apresentavam-se delimitados por processos de células com aspecto de fibroblastos (Figs. 6B, 7B). Com frequência, axônios de maior calibre encontravam-se distribuídos isoladamente pelo enxerto, sendo possível observar no seu interior mitocôndrias (Figs. 6B, 7B). Distribuídos no espaço endoneural podiam-se observar também fibroblastos. De fato, foi possível visualizar também restos de mielina e axônios em diferentes fases de

degeneração (Figs. 6B, 7B). Notavam-se também alguns vasos sanguíneos de diferentes calibres distribuídos no endoneuro (Figs. 6B, 7B).

4.3.2. ENXERTOS MANTIDOS NA SOLUÇÃO DE COLLINS POR 24 OU 72 HORAS

Após 50 dias de transplante, os enxertos previamente mantidos em solução de Collins por 24 ou 72 horas apresentavam nos cortes da sua porção média aspecto típico de nervo em regeneração, à semelhança daqueles mantidos em solução de Wisconsin/Belzer (Fig. 8A). Contudo, pôde-se observar que os minifascículos eram menores e continham importante número de axônios amielínicos associados a eles (Fig. 8B). Ao nível de microscopia de luz, como foram examinados, não foi possível observar uma definição muito clara do contorno dos axônios amielínicos, contudo os de maior calibre eram evidentes (Fig. 8B). Além disso, foi possível verificar um grande número de axônios mielínicos de menor calibre relacionados à célula de Schwann que organizava a bainha de mielina a seu redor (Fig. 8B). Outro aspecto característico dos enxertos mantidos em solução de Collins foi a presença de um significativo número de resíduos de mielina e de axônios em degeneração (Fig. 8B). Esse aspecto contrastava com o observado nos enxertos mantidos em solução de Wisconsin/Belzer. Além disso, eram mais frequentes as células com aspecto semelhante a macrófagos e de fibroblastos distribuídos no endoneuro (Figs. 8B, 9B).

O epineuro mostrava-se espessado em várias camadas e estavam presentes pequenos vasos sangüíneos (Figs. 8A, 9A). O perineuro apresentava-se de aspecto fino em todo o fascículo delimitando bem o endoneuro (Figs. 8A, 9A).

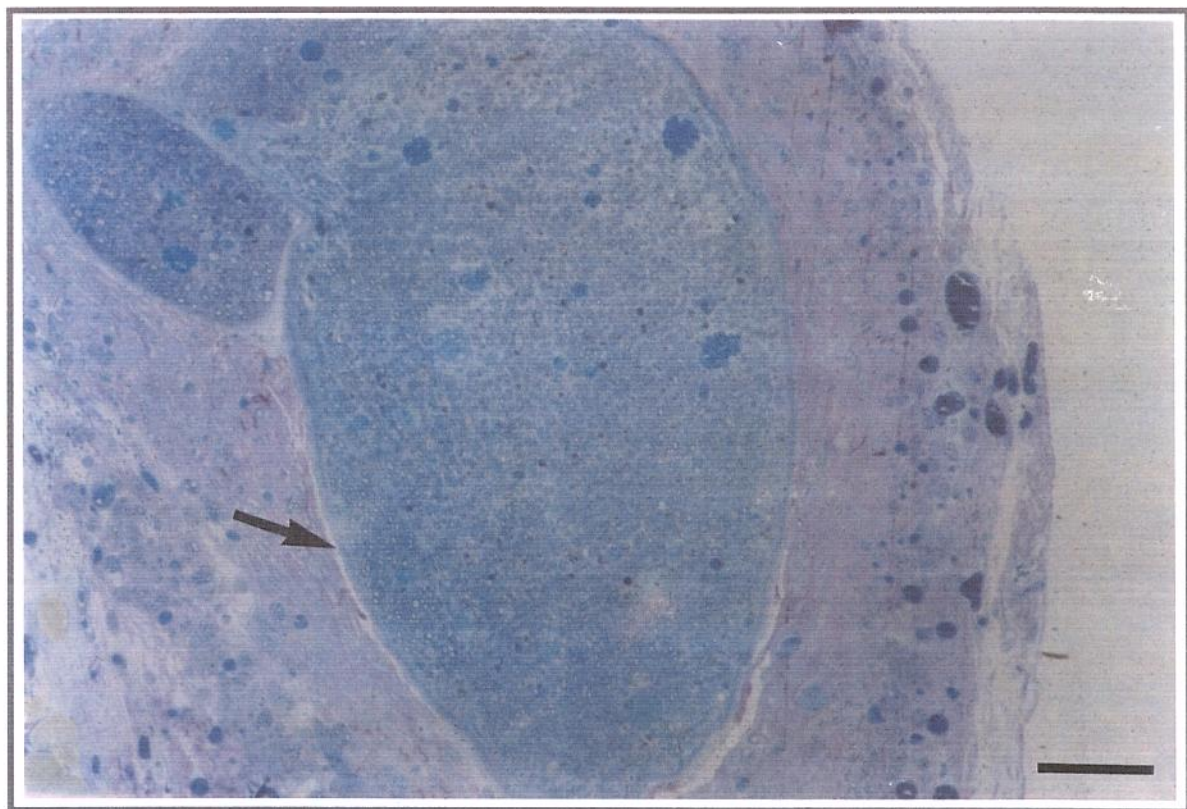
4.3.3. ENXERTO FRESCO

Após 50 dias de transplante, os enxertos de nervos frescos mostravam na sua porção média também o aspecto próprio de um nervo em regeneração. Nos cortes transversais desta região observou-se a presença do epineuro como um revestimento conjuntivo bem espessado ao redor de todo o fascículo nervoso. Estavam presentes no seu interior vasos sangüíneos pequenos (Fig. 10A).

Os axônios mielínicos apresentavam-se distribuídos de maneira uniforme pelo endoneuro (Fig. 10A, 10B). A sua organização em minifascículos era menos evidente que nas demais situações experimentais, parecendo haver uma predominância dos axônios de calibre médio (Fig. 10B). Podiam-se visualizar também pequenos grupamentos de axônios amielínicos e axônios de pequeno calibre em início de mielinização (Fig. 10B). Também estavam presentes resíduos de mielina e axônios em degeneração (Fig. 10B). Eram muito evidentes, ainda, os capilares sangüíneos distribuídos em grande número no espaço endoneural (Fig. 10A, 10B).

Figura 6 - A figura 6A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto de nervo tibial após 50 dias de transplante. Previamente ao transplante, este enxerto foi mantido em solução Wisconsin/Belzer por 24 horas. Observe a presença de perineuro fino e homogêneo (seta). Barra=100 μ m. A figura 6B mostra detalhe do corte transversal da figura 6A. Observe a presença de axônios mielínicos agrupados em minifascículos delimitados por células semelhantes a fibroblastos (setas curvas) e vaso sanguíneos (seta reta). Barra=10 μ m. Coloração: Azul de toluidina

A



B

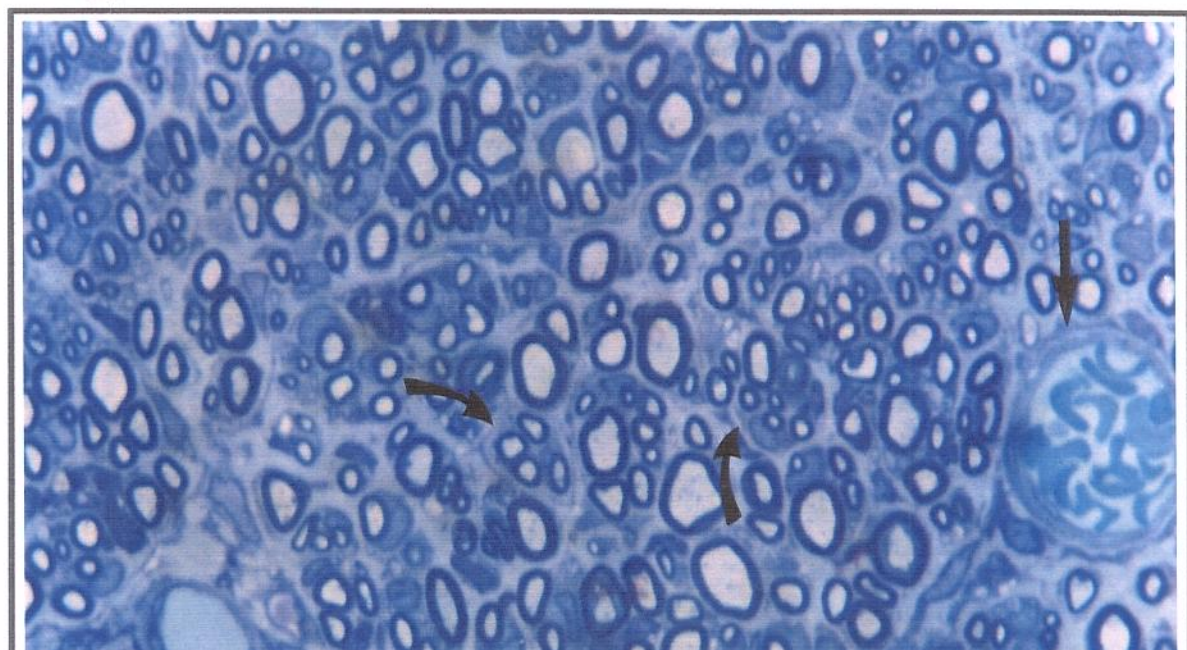
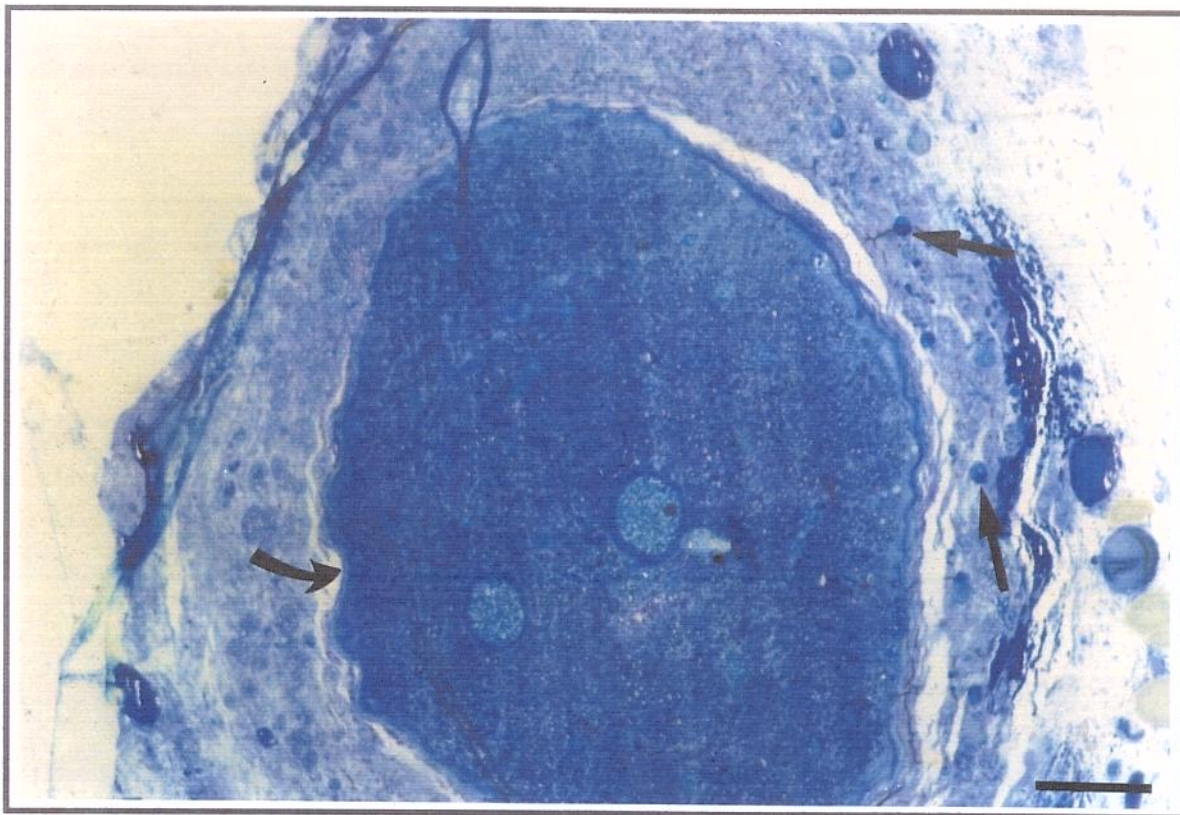


Figura 7 - A figura 7A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto de nervo tibial após 50 dias de transplante. Previamente ao transplante, este enxerto foi mantido em solução Wisconsin/Belzer por 72 horas. Note a presença de pequenos vasos sanguíneos no epineuro (setas retas) e do perineuro bem definido (seta curva). Barra=100 μ m. A figura 7B mostra detalhe do corte transversal da figura 7A. Note os axônios mielínicos de diferentes dimensões organizados em minifascículos (setas curvas) e a presença de mitocôndrias no axoplasma daqueles de maior calibre (setas retas). Barra=10 μ m. Coloração: Azul de toluidina

A



B

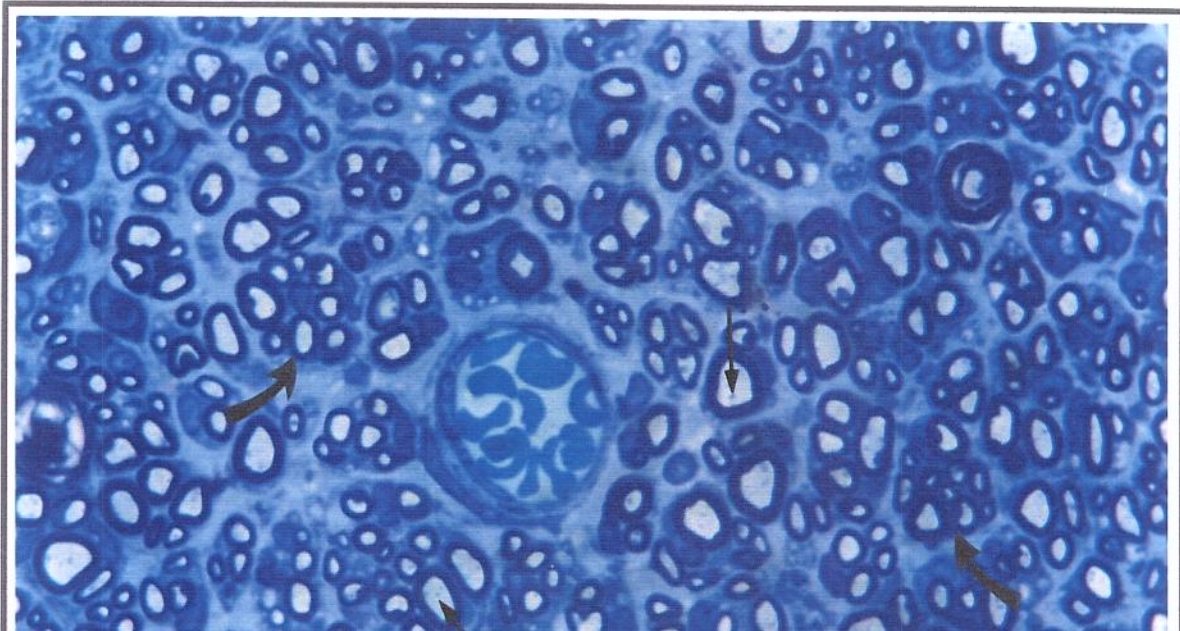
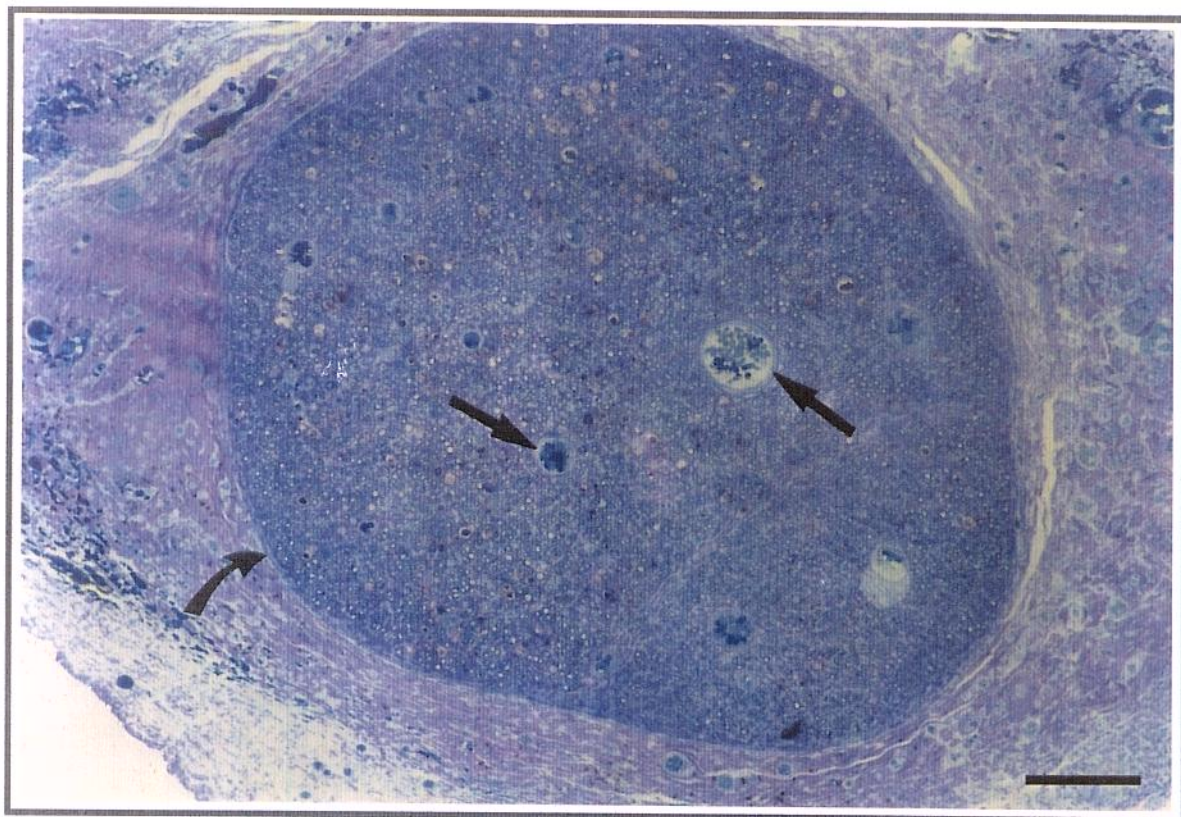


Figura 8 - A figura 8A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto de nervo tibial após 50 dias de transplante. Previamente ao transplante, este enxerto foi mantido em solução de Collins por 24 horas. Note o perineuro bem delineado (seta curva) e a presença de vasos sanguíneos no endoneuro (setas retas). Barra = 100 μ m.

A figura 8B mostra detalhe do corte transversal da figura 8A. Note a presença de minifascículos pequenos contendo grupamentos de axônios amielínicos, sendo particularmente evidentes os de maior calibre (cabeça de seta). Note também a presença de axônios mielínicos pequenos associados a células de Schwann (setas retas pequenas) e resíduos de mielina (setas retas grandes). Barra = 10 μ m. Coloração: Azul de toluidina

A



B

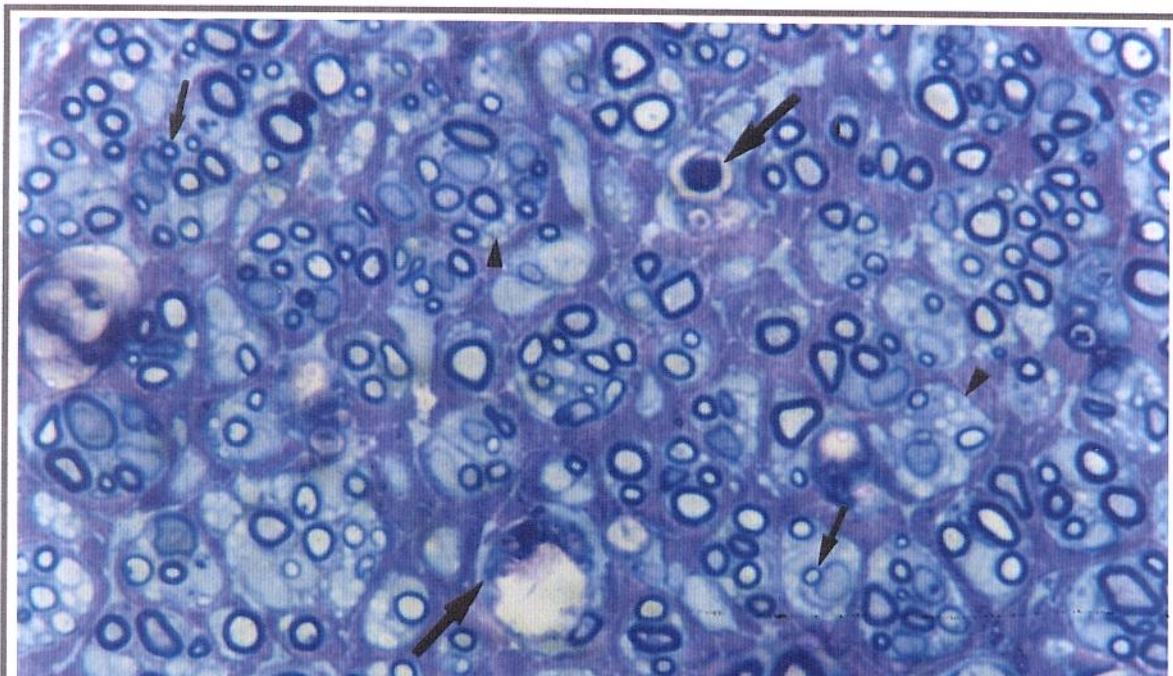
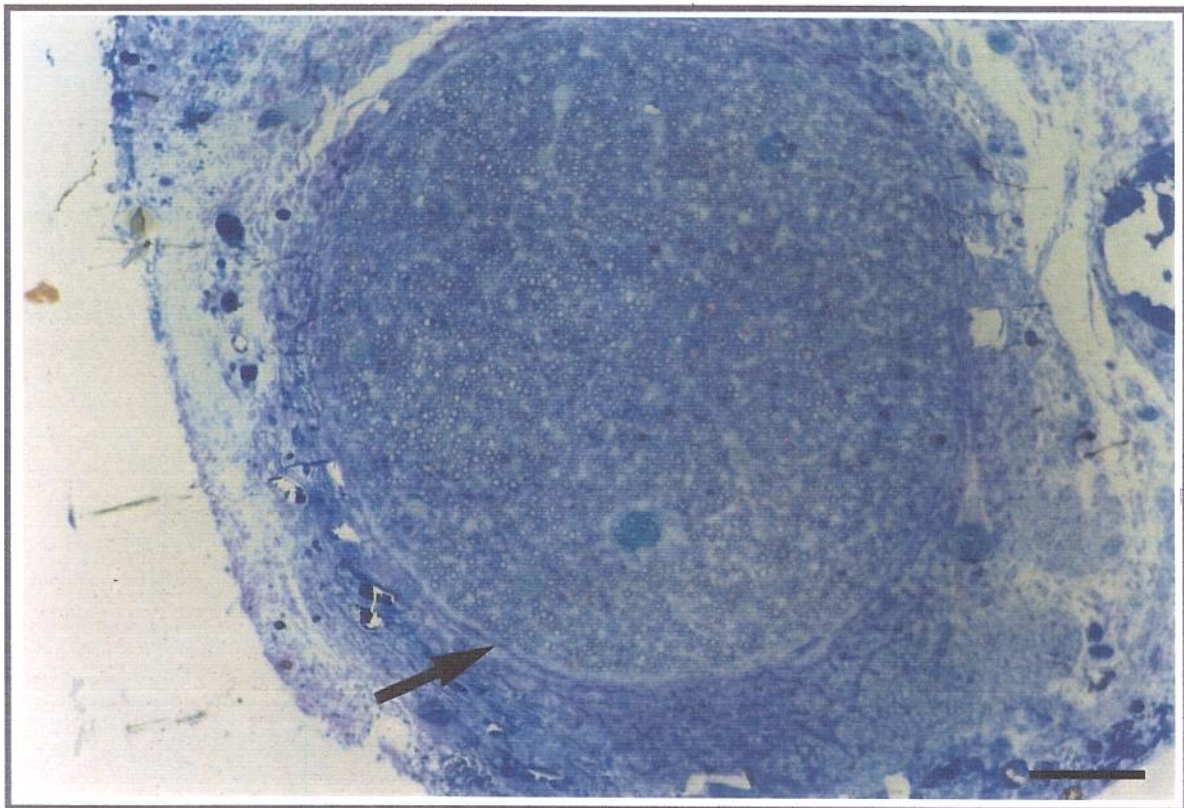


Figura 9 - A figura 9A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto de nervo tibial após 50 dias de transplante. Previamente ao transplante, este enxerto foi mantido em solução de Collins por 72 horas. Note a presença de um perineuro bem definido (seta reta). Barra=100 μ m

A figura 9B mostra detalhe do corte transversal da figura 9A. Note a presença de minifascículos (setas curvas). Note também a presença de axônios mielínicos pequenos associados a células de Schwann (setas retas pequenas) e de resíduos de mielina (setas retas grandes). Barra=10 μ m.

Coloração: Azul de toluidina

A



B

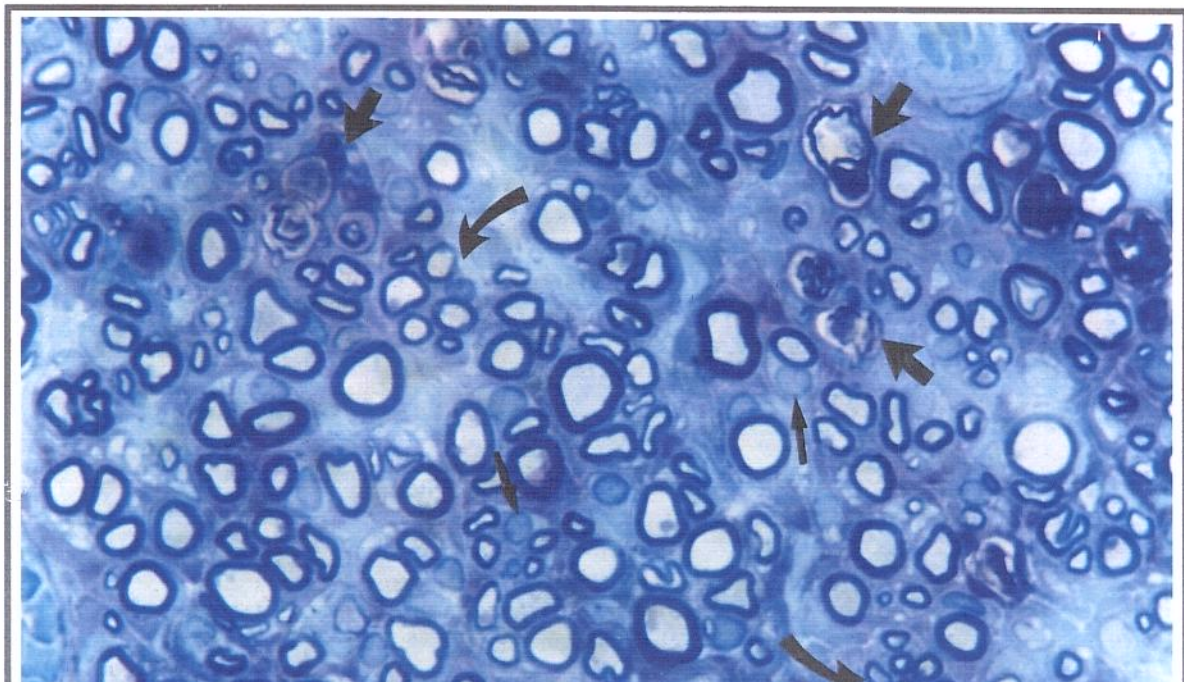
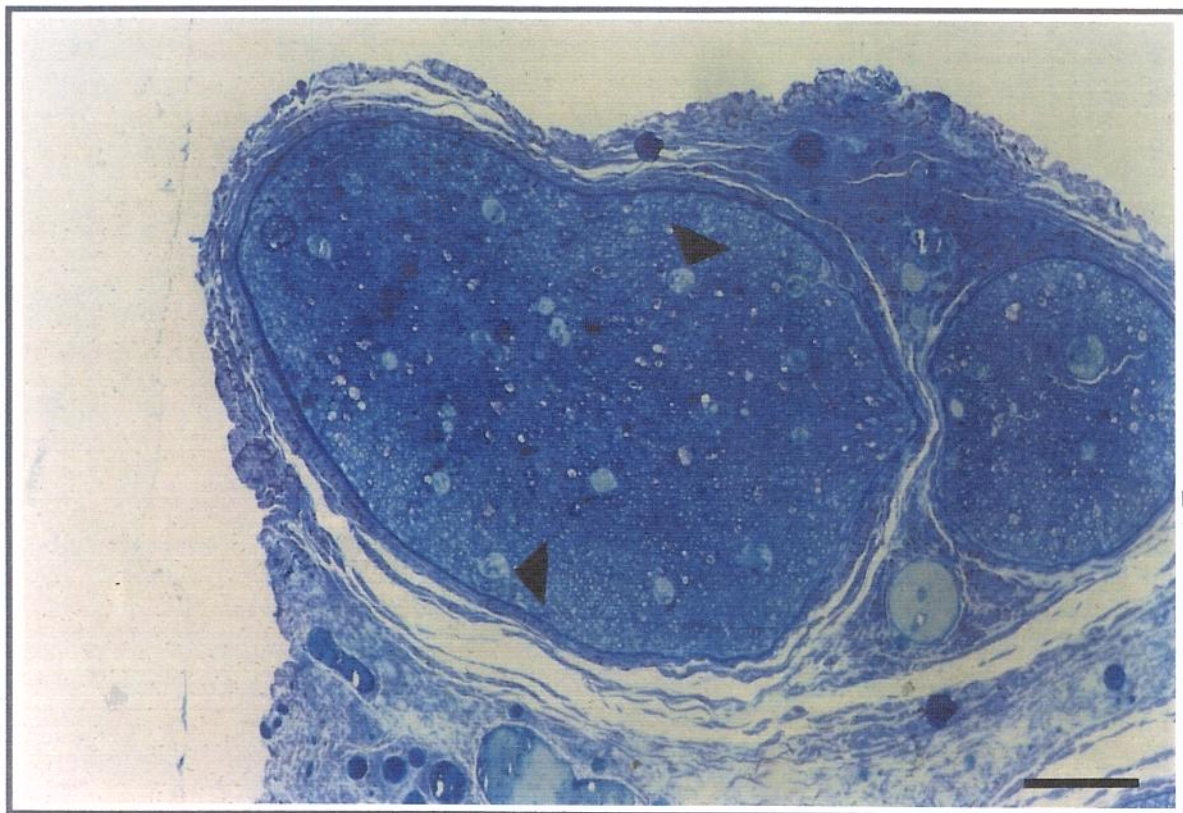


Figura 10 - A figura 10A mostra um corte transversal obtido na porção média de um enxerto fresco de nervo tibial após 50 dias de transplante. Observe a distribuição uniforme dos axônios mielínicos e a presença de um importante número de vasos sanguíneos (cabeças de seta). Barra=100 μ m.

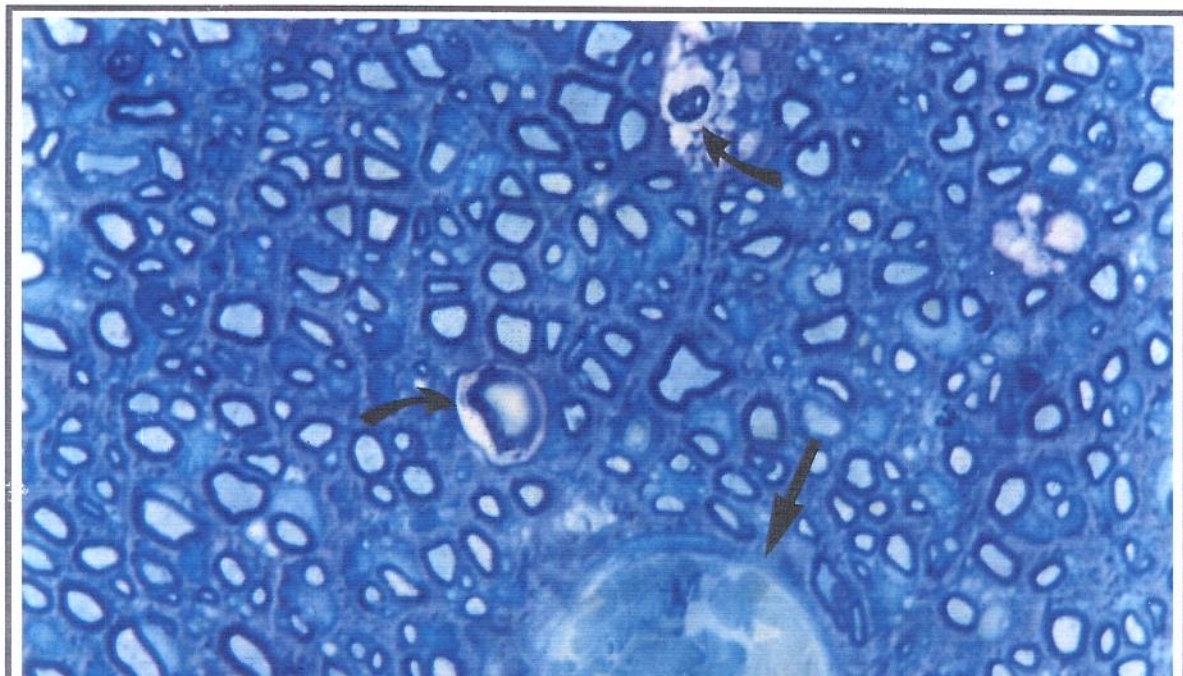
A figura 10B mostra detalhe do corte transversal da figura 10A. Observe a predominância de axônios de médio calibre e axônios pequenos em início de mielinização. Observe também a presença de resíduos de mielina (setas curvas) e capilar (seta reta). Barra=10 μ m.

Coloração: Azul de toluidina

A



B



4.4. ANÁLISE QUANTITATIVA

A tabela e o gráfico abaixo mostram os valores obtidos na contagem dos axônios mielínicos regenerados através dos enxertos mantidos em soluções conservadoras e de enxertos frescos. Os axônios foram contados na porção média dos enxertos, de acordo com o referido em "Material e Métodos", e calculada a densidade dos mesmos (número de axônios / $10^4 \mu\text{m}^2$).

Os resultados mostram que a densidade de axônios mielínicos regenerados através de enxertos mantidos em solução Wisconsin/Belzer, quer durante 24 ou 72 horas, foi significativamente superior àquela observada nos enxertos mantidos em solução de Collins pelos mesmos períodos. Além disso, nossos resultados mostraram que a densidade axonal nos enxertos mantidos em conservação nas solução Wisconsin/Belzer foi semelhante àquela observada nos enxertos frescos.

A comparação das densidades dos axônios mielínicos observadas nos enxertos mantidos por 24 ou 72 horas em solução Wisconsin/Belzer mostrou não haver diferença significativa entre estes dois períodos de conservação. O mesmo foi observado quando comparadas as densidades axonais nos enxertos mantidos por 24 ou 72 horas em solução de Collins.

A densidade dos axônios mielínicos observada nos nervos normais mostrou-se menor que nos enxertos regenerados, conforme esperado.

**DENSIDADE DE AXÔNIOS MIELÍNICOS OBSERVADA NOS CORTES
TRANSVERSAIS DA REGIÃO MÉDIA DOS ENXERTOS MANTIDOS POR 24 OU 72
HORAS EM SOLUÇÕES CONSERVADORAS DE WISCONSIN / BELZER OU
COLLINS E NOS EXERTOS FRESCOS E NERVOS NORMAIS**

Tratamento	Wisconsin		Collins		Fresco	Normal
Período	24 h	72h	24 h	72h		
Animal						
#1	439	480	333	361	409	178
#2	413	365	347	270	437	176
#3	416	386	299	350	369	158
#4	462	489	396	-----	430	203
#5	-----	-----	-----	-----	389	
Média ± ep	433±12 ^a	430±32 ^a	344±20 ^b	327±29 ^b	407±13 ^a	179±10 ^c

A tabela mostra as médias ($\pm$ erro padrão) da densidade axonal (número de axônios mielínicos/ $10^4\mu\text{m}^2$) encontradas nos cortes da porção média do enxertos previamente mantidos em solução de Wisconsin ou solução de Collins e nos enxertos frescos 50 dias após o transplante. A última coluna da esquerda corresponde à densidade de axônios mielínicos encontrada nos nervos tibiais normais obtida na região correspondente à dos enxertos conservados e enxertos frescos. As médias assinaladas com letras iguais não diferem dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste "t" de Student-Newman Keuls.

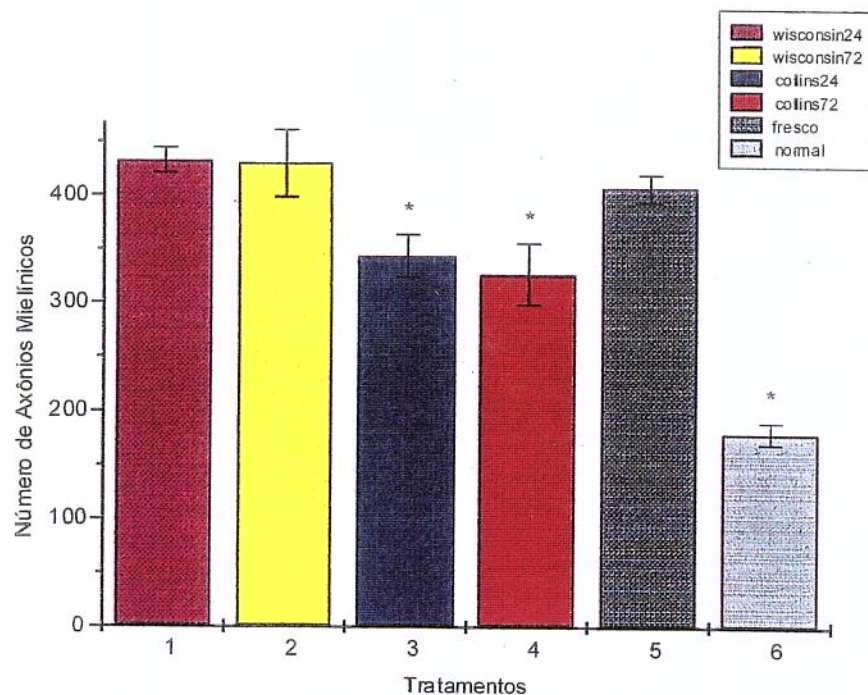


Figura 11

O gráfico representa a densidade de axônios mielínicos ($\pm$ erro padrão) computada em uma área de $10^4 \mu\text{m}^2$ de cada corte transversal de enxertos de nervos tibiais mantidos em soluções conservadoras, de enxertos frescos e de nervos normais. Conforme mostrado na tabela anterior a densidade de axônios mielínicos foi menor nos enxertos mantidos em solução conservadora de Collins, quando comparada à dos enxertos mantidos em solução de Wisconsin/Belzer e à dos enxertos frescos. A densidade de axônios mielínicos foi menor nos nervos normais quando comparada com as situações experimentais estudadas. (* $p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

No reparo cirúrgico de lesões de nervos periféricos com perda de substância, o emprego de enxertos autólogos ainda é o método de escolha. Contudo, suas limitações no que se refere, por exemplo, à obtenção de enxertos com dimensões adequadas ao nervo a ser reparado e a necessária denervação de outra região do corpo do paciente, tem levado muitos autores a buscar diferentes soluções para o problema (Mackinnon, 1996).

Neste sentido, a implementação de um banco de nervos parece ser uma atraente alternativa aos enxertos autólogos. Uma das tarefas importantes para o estabelecimento deste tipo de técnica consiste na determinação dos meios e tempos adequados para a conservação do enxertos, além dos necessários estudos sobre a histocompatibilidade que deve se estabelecer entre o doador e o receptor (Ansselin e cols., 1992; Evans e cols., 1994; Evans e cols., 1995; Strasberg e cols., 1996).

Dentro do presente estudo, nossos resultados mostraram que a conservação de segmentos de nervos tibiais de ratos em solução de Wisconsin/Belzer e em solução de Collins a 4°C, por 24 ou 72 horas, mantém a viabilidade dos mesmos. Essa viabilidade pôde ser comprovada pela observação do desenvolvimento de um processo regenerativo axonal 50 dias após o transplante autólogo desses segmentos.

Nossos resultados mostraram também que o tempo de conservação, em ambos os tipos de solução, não afetou a capacidade dos enxertos de darem suporte à regeneração das fibras nervosas. A densidade axonal (número de axônios mielínicos/ $10^4 \mu\text{m}^2$), encontrada nos enxertos após 24 ou 72 de conservação, não mostrou diferenças significativas em cada uma das condições experimentais.

Levi e cols. (1994), empregando técnicas de "in vitro", mostraram que a viabilidade celular em explantes de nervos ciáticos de ratos mantidos em soluções conservadores de Wisconsin/Belzer por 12 horas, 3 dias, 1, 2 ou 3 semanas, diminuía com o aumento do tempo de conservação. Por outro lado, mostram que as células de Schwann presentes nos explantes eram capazes de mielinizar axônios "in vitro", mesmo após 3 semanas de conservação na referida solução.

Nossos experimentos confirmam tais observações "in vivo", pois o processo de mielinização ocorreu da mesma forma, quer nos enxertos mantidos nas soluções conservadoras por 24 ou 72 horas, quer nos nervos frescos.

Nossos resultados também estão de acordo com os achados de Evans e cols. (1995), os quais analisaram a regeneração axonal através de enxertos preservados em solução de Wisconsin/Belzer por 6 horas, 24 horas ou 3 semanas, mantidos à temperatura de 5°C.

Estes autores verificaram, 14 meses após o isotransplante (transplante entre animais isogênicos), que não havia diferença qualitativa e quantitativa da regeneração axonal entre os grupos, cujo o enxerto foi previamente mantido por 6 horas, 24 horas ou 3 semanas na solução de Wisconsin/Belzer. Evans e cols. (1995) também não observaram diferenças entre os grupos que receberam os enxertos tratados e o grupo que recebeu enxerto fresco.

Também nossos experimentos mostraram que a regeneração axonal através dos enxertos mantidos em solução de Wisconsin/Belzer por 24 ou 72 horas foi semelhante à observada nos enxertos frescos após 50 dias do transplante.

Por outro lado, observamos que a regeneração axonal através dos enxertos mantidos em solução de Collins, por 24 ou 72 horas, estava significativamente

retardada em comparação à verificada nos enxertos preservados em solução de Wisconsin/Belzer ou aos enxertos frescos, após 50 dias da cirurgia.

As fibras nervosas regeneradas a longo dos enxertos mantidos em solução de Collins organizavam-se em minifascículos formados por axônios mielínicos de pequeno calibre e por um importante número de axônios amielínicos. Dentre estes últimos podiam-se observar alguns de maior calibre, cujo perfil era distinguível ao microscópio de luz convencional.

Por sua vez, nos enxertos preservados na solução de Wisconsin/Belzer podiam-se observar axônios mielínicos de grande calibre já isolados no endoneuro dos minifascículos. Também, não observamos axônios amielínicos de grande calibre no interior dos minifascículos.

Além disso, após 50 dias de transplante, eram mais abundantes os resíduos de mielina e axônios em degeneração no interior dos enxertos previamente mantidos em solução de Collins do que os observados nos enxertos mantidos na solução de Wisconsin/Belzer e nos enxertos frescos.

Com relação a estes resultados, devemos considerar que imediatamente após o transplante desenvolve-se nos enxertos o processo de degeneração Walleriana. É sabido que nesse processo tomam parte ativa os macrófagos e as células de Schwann (Fawcett e Keynes, 1990; Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997). Os macrófagos invadem o enxerto e, através da produção de interleucinas, induzem a multiplicação das células de Schwann (Fawcett e Keynes, 1990; Khan e Wigley, 1994; Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997). Estas últimas aumentam a produção de fatores indutores de neuritos e de fatores neurotróficos, que darão suporte ao processo regenerativo axonal (Longo e cols., 1983a,b, 1984; Heumann e cols., 1987; Fawcett e Keynes, 1990).

O retardo da regeneração nervosa observado nos enxertos mantidos em solução de Collins, em comparação com o observado nos enxertos preservados em solução de Wisconsin/Belzer e nos nervos frescos, poderia ser explicado pela menor sobrevivência de células de Schwann no enxerto durante o período de conservação naquela solução.

De fato, durante a degeneração Walleriana as células de Schwann, à medida que se separam dos axônios em degeneração no interior do enxerto, entram em divisão mitótica e passam a formar as chamadas bandas de Büngner (Ide, 1990; Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997). Estas bandas são cordões celulares organizadas no interior de tubos de membrana basal produzida pelas próprias células de Schwann. A membrana basal, por sua vez, é constituída principalmente por colágeno IV e laminina, que é um potente fator indutor e estimulador do crescimento de neuritos (Varon, 1985; Salonen e cols., 1987; Fawcett e Keynes, 1990; Tona, 1993). É por esses tubos que crescem os axônios em regeneração. Além disso, conforme já mencionado, durante esse processo, as células de Schwann passam a produzir grande quantidade de fatores neurotróficos, tais como NGF, BDNF e outras neurotrofinas (Heumann e cols., 1987; Taniuchi e cols., 1988, Funakoshi e cols., 1993).

Dessa forma, podemos inferir que a regeneração axonal através dos enxertos dependerá da disponibilidade de fatores indutores de neuritos e de fatores neurotróficos produzidos pelas células de Schwann no interior dos enxertos. Sendo menor número de células de Schwann viáveis nos enxertos conservados na solução de Collins no momento do transplante, a regeneração das fibras nervosas tornou-se mais lenta ou menos intensa nestes enxertos.

Outro dado importante que evidenciou uma lentificação do processo regenerativo, e que poderia estar associado à atividade das células de Schwann, foi a presença de um maior número de resíduos de mielina nos enxertos mantidos em solução de Collins em comparação aos demais tipos de enxerto, conforme já referimos.

A remoção desses resíduos parece ser efetuada colaborativamente entre as células de Schwann e os macrófagos (Scheid e Friede, 1987; Reichert e cols., 1994; Bruck e cols., 1995). Poder-se-ia supor então, que a morte de células de Schwann, durante o processo de conservação, aumentaria o tempo para a remoção da mielina e dos axônios em degeneração. A favor dessa hipótese está o fato, amplamente estudado, de que camundongos da linhagem C57BL/Ola apresentam um retardo importante do processo regenerativo axonal associado ao retardo da degeneração Walleriana nos nervos periféricos (Perry e cols., 1990; Glass e cols., 1993; Brown e cols., 1994).

Por outro lado, devemos considerar também que os macrófagos invadem o enxerto a partir dos cotos proximal e distal, quer por migração pelo tecido do enxerto, quer através dos novos vasos sangüíneos que se formam (Bruck e cols., 1995). Embora não tenhamos avaliado experimentalmente este ponto, é plausível supor que a invasão de macrófagos possa ter sido menos intensa nos enxertos previamente conservados na solução de Collins, em função talvez de uma maior dificuldade de neovascularização desse enxerto.

Dentro desse contexto fica claro que o principal papel das soluções conservadoras na preservação de nervos está em garantir a viabilidade celular, principalmente das células de Schwann.

Assim, os componentes da solução de Collins, na sua maioria eletrólitos, parece não serem suficientes para assegurar otimamente tal viabilidade. Em contraposição, a solução de Wisconsin/Belzer possui alguns elementos na sua composição que devem contribuir especialmente para a sobrevivência celular.

Dentre os componentes da solução de Wisconsin/Belzer devemos destacar o alopurinol, que protege a célula contra a ação de radicais livres de oxigênio durante a isquemia, através da inibição da xantina-oxidase (Toledo-Pereyra, 1977; Koyama, 1985; Southard e cols, 1987). O lactobionato de potássio, por sua vez, também protege a célula contra a ação dos radicais livres de oxigênio, fornece potássio à célula e, juntamente com a rafinose, atua osmoticamente reduzindo o edema tissular (Sumitomo e cols., 1992a,b; Figueiredo, 1997). Estes componentes devem ter atuado sobre as células de Schwann e células epi e perineurais do enxerto, contribuindo para a sua sobrevivência.

Outro importante componente da solução de Wisconsin/Belzer para a manutenção da viabilidade celular parece ser a glutathione. Este composto é usado pela célula em muitas reações metabólicas, incluindo-se o metabolismo de peróxido e hidrogênio e lipoperóxidos (Ametani e cols, 1990; Kerr-Conte, 1991; Vreugdenhil e cols., 1992). Trabalhos tem demonstrado que este composto é depletado na célula devido à isquemia durante procedimentos de conservação a frio (Ametani e cols, 1990; Kerr-Conte, 1991; Vreugdenhil e cols., 1992). Este fato parece tornar a célula mais sensível à ação dos radicais livres de oxigênio e, conseqüentemente, reduzindo sua viabilidade (Ametani e cols, 1990; Kerr-Conte, 1991; Vreugdenhil e cols., 1992). Assim, a presença de glutathione na solução de Wisconsin/Belzer pode ter sido uma das razões da melhor regeneração axonal observada com este tratamento.

Quanto à adenosina, embora não esteja claro se este é um componente essencial na composição da solução de Wisconsin/Belzer para conservação de órgãos a curto prazo, ela é um importante fator para a estimulação da síntese de ATP, o que certamente contribuiu para a viabilidade celular no enxerto nervoso (Belzer e cols., 1983; Ametani e cols., 1990; Figueiredo, 1997).

Por sua vez, a presença do hidroxietilamato parece contribuir para a estabilização da membrana celular durante a fase de hipotermia. Tem sido demonstrado que as membranas lipídicas se convertem da forma gel ou de um estado líquido cristalino a um tipo mais rígido de estrutura, quando submetidas a temperaturas baixas. Este fato parece levar a um aumento da permeabilidade com a perda de componentes osmóticos ativos da célula (Figueiredo, 1997). Assim, o hidroxietilamato, através de seu efeito coloidal, pode ter contribuído também para reduzir este efeito da hipotermia sobre as células do enxerto.

Dentre os componentes iônicos comuns à solução de Wisconsin/Belzer e solução de Collins, devemos destacar o magnésio. Este íon tem sido considerado como um importante inibidor da Na-K ATPase e protetor de membrana celular (Figueiredo, 1997). Assim, a presença deste íon nestas soluções pode ter contribuído eficazmente também na preservação da viabilidade das células de Schwann.

De fato as soluções conservadoras tem sido classificadas como de primeira, segunda e terceira geração. As de primeira e segunda geração são também denominadas intracelulares, por terem baixa concentração de sódio e alta concentração de potássio, além de possuírem magnésio elevado. As soluções de terceira geração são mais sofisticadas, mantendo o padrão intracelular e tamponante, também com magnésio, são acrescidas de substâncias energéticas,

coloidosmóticas e de capturadores ("scavengers") de radicais livres de oxigênio (Belzer e cols., 1992; Figueiredo, 1997).

A solução de Wisconsin/Belzer deve ser considerada de terceira geração, e nossos resultados evidenciaram claramente sua maior eficácia na conservação de enxertos nervosos. Contudo, é ainda pequena a base teórica para a preparação de soluções que otimizem a viabilidade celular nos diferentes enxertos tissulares que se queira empregar. Em particular, no que se refere à criação de um banco de nervos para transplante, esta base deverá nascer de técnicas advindas de estudos minuciosos das necessidades fisiológicas e bioquímicas das células do nervo periférico conservado em situação ex-vivo.

Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos neste sentido para, assim, melhor compreender o mecanismo da morte celular e retardar este acontecimento final no nervo a ser transplantado.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1. A manutenção de segmentos de nervos na solução conservadora de Wisconsin/Belzer ou na solução conservadora de Collins por 24 ou 72 horas preserva sua organização estrutural macro e microscópica após esses períodos.
2. A solução conservadora de Wisconsin/Belzer foi mais eficaz que a solução conservadora de Collins na manutenção da viabilidade das células do nervo envolvidas no processo regenerativo axonal, considerando-se as características morfológicas e morfométricas dos enxertos nervosos 50 dias após o transplante.
3. As células de Schwann, principais elementos celulares que dão suporte à regeneração das fibras nervosas, devem ter sido particularmente preservadas pela ação dos diversos componentes da solução conservadora de Wisconsin/Belzer, considerando-se que a regeneração nos enxertos mantidos nestas solução foi semelhante ao enxertos frescos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMETANI, M.S.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. Importance of glutathione and adenosine in cold storage of the kidney. **Transplant. Proc.**, **22**:469-471, 1990.
- ANSSELIN, A.D. and POLLARD, J.D. Immunopathological factors in peripheral nerve allograft rejection: quantification of lymphocyte invasion and major histocompatibility complex expression. **J. Neurol. Sci.**, **96**:75-88, 1990.
- ANSSELIN, A.D.; POLLARD, J.D.; DAVEY, D.F. Immunossuppression in nerve allografting: is it desirable? **J. Neurol. Sci.**, **112**:160-169, 1992.
- ANSSELIN, A.D.; WESTLAND, K.; POLLARD, J.D. Low dose, short term Cyclosporin A does not protect the Schwann cells of allogenic nerve grafts. **Neurosci. Lett.**, **119**:219-222, 1990.
- ARCE,V.; POLLOCK, R. A.; PHILIPPE, J. M. ; PENNICA, D. ;HENDERSON, C. E. ; D'LAPEYRIERE,O. Synergistic effects of schwann and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1). **J. Neurosci.**,**18**:1440-1448 , 1998.
- ARCHIBALD, S.J.; KRARUP, C.; SHEFNER, J. et al. A collagen based guide conduit for peripheral nerve repair:an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and primates. **J.Comp.Neurol.**,**306**:685-696,1991.
- ASHUR, H.; VILNER ,Y.; FINSTERBUSH, A. et al. Extent of fiber regeneration after peripheral nerve repairs:silicone splint vs. suture, gap vs. graft. **Exp.Neurol.**,**97**:365-374,1987.
- BAIN, J.R. ; MACKINNON, S. E. ; HUDSON, A. R.; FALK, R. E., FALK, J. A. and HUNTER, D. A. The peripheral nerve allograft: A dose-response curve in the rat immunosuppressed with cyclosporin A. **Plast. Reconstr. Surg.**,**82**:447-455, 1988 a.
- BAIN, J.R. ; MACKINNON, S. E. ; HUDSON, A. R.; FALK, R. E., FALK, J. A. and HUNTER, D. A. The peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosupressed with cyclosporin A. **Plast. Reconstr. Surg.**,**82**:1052-1066, 1988 b.
- BELZER, F.O., D'ALESSANDRO, A.M.; HOFFMANN, R.M.; KNECHTLE, S.J.; REED, A.; PIRSCH, J.D.; KALAYOGLU, M.; SOLLINGER, H.W. Ther use of UW solution in clinical transplantation. **Ann. Surg.**, **215**(6):579-585,1992.
- BELZER, F.O.; SOLLINGER, H.W.; GLASS, N.R.; MILLER, D.T.; HOFFMANN, R.M.; SOUTHARD, J.H. Beneficial effects of adenosine and phosphate in kidney preservation. **Transplantation**, **36**:633-635, 1983.
- BENTLEY ,F.H.; HILL, M. Nerve grafting. **Br. J. Surg.**,**24**:368-387, 1936.

- BENTLEY, F. H. ; HILL, M. The possibilities of nerve grafting. **Br. Med. Surg.**,**14**:352-353, 1940.
- BENTO, R.F.; MINITI,A. Comparision between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in intratemporal facial nerve of cats. **Acta Oto-Laryngol.**,**465**:5-36,1989.
- BENZEL, E.C. Management of peripheral Nerve Trauma. In:**The pratice of neurosurgery**, Willians&Wilkins, Baltimore, 1996, p.2849-2857.
- BEUCHE,W. and FRIED,R.L. The role of non-resident cells in wallerian degeneration. **J.Neurocytol.**,**13**:767-796,1984
- BLOCK, M.M. Microtubule transport and assembly cooperate to generate the microtubule array in growing axons. **Brain Res.**,**102**:61-77,1994.
- BORA Jr. ; F.W.; PLEASURE, D.E.; DIDIZIAN, N.A. A study of nerve regeneration and neuroma formation afeter nerve suture by various techniques,**J.Hand Surg.Am.**, **1**:138-143,1976.
- BRAUN, R.M. Comparative studies of neurorraphy and sutureless peripheral nerve repair. **Surg.Gynecol.Obs.**,**36**:15-18,1966.
- BREIDENBACH, W. B. Vascularized nerve grafts. A practical approach. **Orthop. Clin. North Am.**,**19**:81-89, 1988.
- BREIDENBACH, W.B.; TERZIS, J.K. The anatomy of free vascularized nerve grafts. **Clin. Plast. Surg.**,**11**:65, 1984.
- BROWN, M.C.; PERRY, V.H.; HUNT, S.P.; LAPPER, S.R. Further studies on motor and sensory nerve regeneration in mice with delayed Wallerian degeneration. **Eur. J. Neurosci.**, **6**:420-428, 1994.
- BRUCK, W.; BRUCK, Y.; MARUSCHAK, B.; FRIEDE, R.L. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. **Acta Neuropathol.**, **89**:363-367, 1995.
- BRUNELLI, G. ; BRUNELLI, F. Strategy and timing of peripheral nerve surgery. **Neurosurg. Rev.**,**13**:95-102, 1990.
- BRUNELLI, G. Attuali orientamenti per la riparazione die nervi della mano. **Riv.Chir.Mano**,**7**:40,1969.
- BUEHLER, M.J.; SEABER, A.V.; URBANIAK,J.R. The relationship of functional return to varying methods of nerve repair. **J.Reconstr.Microsurg.**,**6**:61-69,1990.

- CABAUD, H.E.; RODKEY, W.G.; McCARROLL, H.R. et al. Epineural and perineural fascicular nerve repairs : a critical comparison. **J.Hand Surg. Am.**,1:131-137, 1976.
- CAJAL, S.R. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner, p.459,1959.
- CAMPBELL, J.B.; BASSET, A. L.; BOHLER, J. Frozen-irradiated homografts shielded with microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. **J.Traumat.** 3:303-311, 1963.
- CARPENTER, M.B. Human neuroanatomy , Interamericana, 7a ed., p.700, 1988.
- CHUNG, P. K. e CHUNG, S.K. Evaluation of Imuran and Locke's solution in peripheral nerve homografts. **Exp. Neurol.**, 42:141-145, 1974.
- COLEMAN, C. C. Surgical treatment of peripheral nerve injuries. **Surg. Gynecol. Obstet.**,78:113-124, 1944.
- DAHLIN, L.B. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. **Brain Res.**,679:274-280,1995.
- DANDY, W. E. A method of restoring nerves requiring resection. **JAMA**,122:35-36, 1943.
- DAS GUPTA, T.K. Mechanisms of rejection of peripheral nerve allografts. **Surg. Gynecol. Obstet.**,125:1058-1068, 1967.
- DAY-ALLEN, R. The microtubule as in an intracelular engine. **Sci. Am.**,256:26-33, 1987.
- DELLON, A.L. Evaluation of sensibility and reeducation of sensation and hand. Williams&Wilkins ,Baltimore, 1981.
- DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. An. alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. **Plast.Reconstr.Surg.**,82:849-856,1988.
- DODD,J. and JESSEL, T.M. Axon guidance and patterning of neuronal projections in vertebrates. **Science**,242:641-799,1988.
- DONAT, J.R. and WISNIEWSKI, H.M. The spatio Temporal pattern of wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. **BrainPress**, 53:41-53,1973.
- DUCKER, T.B.; HAYES, G. Experimental improvements in the use of silastic cuff of peripheral nerve repair. **J.Neurosurg.**,28:582,1968.

- ELSBERG, C.A. Technic of nerve suture and nerve grafting. **JAMA**, **8**:1422-1427, 1919.
- ELY, J.B. and CAUTEUX, N. Envelope venoso. Contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. **Rev.AMRIGS** (Assoc. Med. Rio Grande Sul), Porto Alegre, **27**:447-453, 1983.
- EPSTEIN, J.A. Neurography following experimental nerve suture and crush injury. **J.Neuropathol. Exp.Neur.**, **7**:419-427, 1949.
- EVANS, P.J.; AWERBUCK, D.C.; and MACKINNON, S.E.; WADE, J.A.; MCKEE, N.H. Isometric Contractile function following nerve grafting: A study of graft storage. **Muscle & Nerve**, **17**:1190-1200, 1994
- EVANS, P.J.; MACKINNON, S.E.; BEST, T.J.; WADE, J.A.; AWERBUCK, D.C.; MAKINO, A.P.; HUNTER, D.A.; MIDHA, R. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. **Muscle & Nerve**, **18**:1128-1138, 1995
- EVANS, P.J.; MIDHA, R.; MACKINNON, S.E. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. **Prog. Neurobiol.**, **43**:187-233, 1994
- FAVARO, G.; LANGONE, F.; SCHIAVINATO, A.; LINI, E.; SPINI, S.; CAVICCHIOLI, L.; DORIGATI, F.; GOVONI, E. Peripheral nerve regeneration through resorbable hyaluronic acid ester and silicone nerve guides. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **18**:271.2, 1992
- FAWCETT, J. W. and KEYNES, R. J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, **65**:354-363, 1986.
- FAWCETT, J.W. and KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**, **13**:43-60, 1990.
- FENELEY, M. R.; FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. The role of Schwann cells in the regeneration of peripheral nerve axons through muscle basal lamina grafts. **Exp. Neurol.**, **144**:275-285, 1991.
- FIGUEIREDO, J.F. Fisiologia e Fisiopatologia da Conservação de Órgãos. In **Captção de Órgãos para Transplante**. Ubirajara Ferreira, coord. - Campinas, SP : Gráfica e Editora Tecla Tipo., 1997 p.165-183.
- FLYNN, W.F., Peripheral Nerve Injuries in the hand. In: **Hand Surgery**, 2nd Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1975, p.282-294.
- FRANCEL, P.C.; FRANCEL, T.J.; MACKINNON, S.E., and HERTL, C. Enhancing Nerve Regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. **J. Neurosurg.**, **87**:887-892, 1997.

- FREEMAN, B.S. Adhesive neural anastomosis. **Plast. Reconstr.Surg.**,**35**:167-176, 1965.
- FULLERTON, A. On the use of a sleeve of vein in the nerve suture. **Br.Med.J.**,**28**:320,1915.
- FUNAKOSHI, H.; FRISÉN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSK,T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V.M.K. and PERSSON, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J.Cell Biol.**,**123**(2):445-465,1993.
- GERHRMANN, J.; MONACO, S.; KREUTZBERG, G.W. Spinal cord microglial cells and DRG satellite cells rapidly respond to transection of the rat sciatic nerve. **Rest. Neurol. Neurosc.**, **2**:181-198, 1991a.
- GERHRMANN, J.;SCHOEN, S.W.; KREUTZBERG, G.W. Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. **Acta Neuropathol.**, **82**:442-455, 1991b.
- GIBSON, K.L.; REMSON,L.; SMITH, A. et al. Comparison of nerve regeneration through different types of neural prostheses. **Microsurgery**,**12**:80-85,1991.
- GLASS, J.D.; BRUSHART, T.M.; GEORGE, E.B.; GRIFFIN, J.W. Prolonged survival of transected nerve fibers in C57BL/Ola mice is a intrinsic characteristics of the axon. **J. Neurocytol.**, **22**:311-321, 1993.
- GORIO, A. Sprouting and regeneration of peripheral nerve. In The node of Ranvier. Eds.JC. Zagoren,S. Fedoroff. New York, Academic Press,1984. p.353-358.
- GRIFFIN, J.W.; KIDD, G. and TRAPP, B.D. Interaction Between axons and Schwann cells in **Peripheral Neuropathy**. Eds.P.J. Dick , P.K. Thomas,J.W.Griffin, P.A. Low and J.F. Poduslo. Saunders, Philadelphia, 1993, p.317-330.
- GRIFFIN, J.W.; LOBATO, C.; GLASS, J.D. The resident macrophage system of peripheral nerves. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**,**50**:321, 1991.
- GROCHOWICZ, P.; ROMANIUK, A.; DIAMANTSTEIN, T.; OLSZEWSKI, W.L. Cyclosporin A versus monoclonal antibody immunosuppression in peripheral nerve allografting. **Transplant. Proc.**, **21**:3181-3182, 1989
- GULATI, A. K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. **J. Neurosurg.**,**68**:117-123 , 1988.
- GULATI, A.K. Axon regeneration through blood vessel allografts after Cyclosporin treatment. **J. Neurosurg.**, **70**:115-121, 1989.

- GULATI, A.K. and ZALEWSKY, A.A. Basement membrane component changes in nerve allografts and isografts. **Muscle Nerve**, **8**:280-283, 1985.
- GUTMANN, E. and SANDERS, F.K., Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. **J. Physiol., Lond.**, **101**:489-517, 1943.
- HAFTEK, J. and THOMAS, P.K. Electron microscope observation on the effects of localized crush injuries on the connective tissues of peripheral nerves. **J.Anat.**,**103**:233-243,1968.
- HAM,A.W. Sistema nervoso. **Histologia 8.Ed.**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1983, p.489-500 .
- HAMAMBERG, H.; PIEHL, F. CULLHEIM, S. ; FJELL,J.; HOKFELT, T.; FRIED, K. GNDF mRNA in schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. **Neuroreport**,**7**:857-860, 1996.
- HARE, G.M.T.; EVANS, P.J.; MACKINNON, S.E.; NAKAO, Y.; MIDHA, R.; WADE, J.A.; HUNTER, D.A.; HAY, J.B. Effect of cold preservation on lymphocyte migration into peripheral nerve allografts in sheep. **Transplantation**, **56**:154-162, 1993.
- HARRIS, M. E. and TINDALL, S. C. Techniques of peripheral nerve repair. **Neurosurg. Clin. North Am.**,**2**:93-104, 1991
- HEUMANN, R.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; MEYER, M.; RADEKE, M.J.; MISKO, T.P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development , degeneration and regeneration:role of macrophages. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**,**84**:8735-8739,1987
- HOLMES, W. Histological observations on the repair of nerves by autografts. **Brit. J. Surg.**,**35**:167-173, 1947.
- HUDSON, A.R.; HUNTER, D.; KLINE, D.G. et al. Histological studies of experimental interfascicular graft repairs,**J.Neurosurg.**,**51**:333-340,1979.
- HUGHES, R.A.; ATKINSON, P.F.; GRAY, I.A.; TAYLOR, W.A. Major histocompatibility antigens and lymphocytes subsets during experimental allergic neuritis in the Lewis rat. **J. Neurol.**, **234**:390-395, 1987.
- HURST, L.C. e BADALAMENTE, M.A. Biochemical proprieties of peripheral nerve. In: **OPERATIVE nerve repair and reconstruction**,1991. Ed. R.H. Gelberman. Philadelphia, Lippincott, p.55-73.
- IDE, C. Nerve regenration and Schwann cell basal lamina: observations of the long-term regeneration. **Archs. Histol. Jap.**, **46**:243-257, 1983.

- IDE, C.; OSAWA, T.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogenic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. **Progr. Neurob.** **34**:1-38, 1990.
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, **288**: 61-75, 1983.
- JENSEN, S.; WALLACE, M.N.; DAHLERUP, B. Cryopreservation of rat peripheral nerve segments later used transplantation. **NeuroReport**, **1**:243-246, 1990.
- KERR-CONTE, J.; BOUDJEMA, K.; SOUTHARD, J.H.; CINQUALBRE, J. Mechanism of hypothermic cell death: glutathione prevents injury in hepatocytes during hypothermic (4°C) preservation. **Transplant. Proc.**, **23**:2405-2406, 1991.
- KHAN, S. and WIGLEY, C. Different effects of a macrophage cytokine on proliferation in astrocytes and Schwann cells. **Neuro Report**, **5**:1381-1385, 1994
- KLINE, D.G.; HAYES, G.J. An experimental evaluation of the effect of a plastic adhesive, methyl 2-cyanoacrylate, on neural tissue. **J.Neurosurg.**, **20**, 647-654, 1963.
- KLINE, D.G.; HACKETT, E.R.; MAY, P.F. Evaluation of nerve injuries by evoked potentials and eletromyography. **J. Neurosurg.** **31**:138 , 1969.
- KOYAMA, I. The role of oxygen free radicals in mediating reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. **Transplantation**, **40**:590-596, 1985
- KUENZEL, K. H. , FISCHER, C. ; ANDERL, H. The ulnar nerve as vascularized nerve transplant. Anatomy: arterial vascular supply. **J. Reconstr. Microsurg.**, **2**:175, 1986.
- LANGONE, F. Estudo ultra-estrutural e morfométrico de nervos regenerados no interior de próteses tubulares. São Paulo, 1991, 201p. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- LANGONE, F.; LORA, S.; VERONESE, F.M.; CALICETI, P.; PARNIGOTTO, P.P.; VALENTI, F. and PALMA, G. Peripheral Nerve Repair using a Poly(organo)Phosphazene Tubular Prothesis. **Biomaterials**, **16**:347-353, 1995.
- LANGONE, F.; OLIVEIRA, A.L.R.; ESQUISATTO, M.A.M.; CARENZA, M.; CALICETI, P. ; LORA, S. Peripheral nerve repair using a new based collagen tubular prosthesis: morphological analysis. **1st Smith & Nephew Intemtional Symposium - Advances in Tissue Engineering and Biomaterials Abstracts**, 55, 1997.
- LEFFERT, R.D. Surgery of the Peripheral Nerves and Brachial Plexus. In: **Operative Neurosurgical Techniques indications, Methods, and results**. Grune&Stratton, 2nd Ed., 1988, p.1563-1582.

- LERICHE, R. Des causes d'échec des sutures nerveuses. **Presse Med.**,**48**:345-348,1940.
- LEVI, A.D.; EVANS, P.J.; MACKINNON, S.E.; BUNGE, R.P. Cold storage of peripheral nerves: an in vitro assay of cell viability and function. **Glia**, **10**(2):121-131, 1994.
- LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**, **237**:1154-1162, 1987
- LOCKERBIE, R.O. The neuronal growth cone : a review of this locomotory, navigational and target recognition capabilities. **Neuroscience**,**20**:719-729,1987.
- LONGO, F.; MANTHORPE, M.; WILLIAMS, L.R.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Temporal changes in neuronotrophic activities accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Exp. Neurol.**, **81**:756-769, 1983b.
- LONGO, F.M.; HAYMAN, E.G.; DAVIES, G.E.; RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Brain Res.**, **309**:105-117, 1984.
- LONGO, F.M.; MANTHORPE, M.; SKAPER, S.D.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Neuronotrophic activities accumulate in vivo within silicone nerve regeneration chambers. **Brain Res.**, **262**:109-116, 1983a.
- LORA,S.; CARENZA,M.; CALICETI,P.; ESQUISATTO,M.A.M.; OLIVEIRA,A.L.R.; LANGONE,F. A new based collagen tubular prosthesis for nerve repair. **1st Smith & Nephew International Symposium - Advances in Tissue Engineering and Biomaterials Abstracts**, 56, 1997.
- LUBINSKA, L. Patterns of wallerian degeneration of myelinated fibers in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve: interpretation of role of axoplasmatic flow of the trophic factor. **Brain Res.**,**233**:227-240,1982.
- LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N. et al. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium, epineurium in preformed mesothelial tubes - an experimental study on the sciatic nerve of rats. **J.Neurosci.Res.**,**6**:265-281,1981.
- LUNN, E.R., BROWN,M.C., PERRY, V.H. The Pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neurosci.**,**35**(1):157-165,1990.
- MACKINNON, S. E. New directions in peripheral nerve surgery. **Ann. Plast. Surg.**,**22**:257-273, 1989.

- MACKINNON, S. E.; HUDSON, A. R.; FALK, R. E. et al. The nerve allograft response - an experimental model in the rat. **Ann. Plast. Surg.**,**14**:334-339, 1985.
- MACKINNON, S.E. Techniques of Nerve Repair. In: **The practice of neurosurgery**, Williams & Wilkins, Baltimore, 1996, p.2879-2908.
- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; BAIN, JR.; FALK, R.E.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration in the immunosuppressed host. **Plast. Reconstr. Surg.**,**79**:436-444, 1987.
- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; FALK, R.E.; KLINE, D.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: an immunological assessment of pretreatment methods. **Neurosurgery**,**14**: 167-171, 1984a.
- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; FALK, R.E.; KLINE, D.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: an immunological assessment of regeneration across pretreated nerve allografts. **Neurosurgery**,**15**: 690-693, 1984b.
- MACKINNON, S.E.; MIDHA, R.; BAIN, J.; HUNTER, D. WADE, J. An assessment of regeneration across peripheral nerve allografts in rats receiving short course of Cyclosporin A. **Neuroscience**, **46**:585-593, 1992.
- MARAGH, H.; MEYER, B.S.; DAVENPORT, D. et al. Morphofunctional evaluation of fibrin glue versus microsuture nerve repairs. **J.Reconstr. Microsurg.**,**v.6**:331-337, 1990.
- MARMOR, L. Regeneration of peripheral nerves defects by irradiated homografts. **Lancet**, **1**:1191-1192, 1963.
- MARMOR, L. Nerve grafting in peripheral nerve repair. **Surg. Clin. North Am.**,**52**:1177-1187, 1972.
- MARMOR, L. Regeneration of peripheral-nerve defects by irradiated homografts. **Lancet**,**1**:1191-1192, 1963.
- MARTIN, J.R. and WEBSTER, H de F. Mitotic schwann cells in developing nerve : their changes in shape, fine structure and axons relationships. **Dev. Biol.**,**32**:417-431, 1973.
- MIDHA, R. ; EVANS, P. J.; MACKINNON, S.E. ; BEST, T. J. ; HARE, G. M. T. ; HUNTER, D. A. and WADE, J. A. Comparison of regeneration across nerve allografts with temporary or continuous cyclosporin A. immunosuppression **J. Neurosurg.**,**78**:90-100, 1992 b.
- MILLES, H. ; MEISSL, G.; BERGER, A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. **J. Bone Joint Surg.**,**54**:727-750, 1972.

- MILLES, H. Microsurgery of peripheral nerves. **Hand**,**5**:157-160, 1973.
- MILLES, H. Peripheral nerve surgery today: turning point or continuous development? (Review Article) **J. Hand Surg. [Am]**,**15**:281-287, 1990.
- MILLES, H. Reappraisal of nerve repair, **Surg.Clin.North.Am.**,**61**:321-340,1981.
- MILLES, H. The nerve gap. Theory and clinical practice. **Hand Clin.**,**2**:651-663, 1986.
- MOBERG, E. The unsolved problem-how to test the functional value of hand sensibility. **J. hand.** ,1991, 105-110.
- MONACO, S.; GEHRMANN, J.; RAIVICH, G.; KREUTZBERG, W. MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. **J. Neurocytol.**,**21**:623-634, 1992.
- MOORE, K.L. , Sistema Nervoso, **Embriologia Clínica**, 2.ed., Editora Interamericana, Rio de Janeiro, 1975, p.50-60.
- NAFZIGER, H.C. Methods to secure end-to-end suture of peripheral nerves. **Surg.Gynecol.Obstetr.****32**:193-204, 1921.
- NARAKAS, A. Les greffes nerveuses, expérience clinique. **Ann. Chir. Main**,**8**:302-311,1989.
- NATHANIEL, E.J.H. and PEASE, D.C. Regenerative changes in dorsal roots following Wallerian degeneration. **J. Ultrastruct.Res.**,**9**:533-549, 1963.
- NORRIS, R. W.; GLASBY, M. A.; GATTUSO, J. M. et al. Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. A new technique. **J. Bone Joint Surg. [Br]**,**70**:530-533,1988.
- OLDFORS, A. and JOHANSON, B.R. Barriers and transport properties of the perineurium. **Acta Neuropathol. (Berl.)**,**47**:139-143,1979.
- ORGEL, M.G.; TERZIS, J.K. Epineural vs. perineural repair. An ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration, **Plast. Reconstr. Surg.**,**60**:80-91,1977.
- ORTIZ-HIDALGO, C., and WELLER R.O. Peripheral Nervous System. In:**Histology for Pathologists**, Raven Press Ltd., 2nd Ed., 1997, p.193.
- OSAWA, T.; IDE, C.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through cryo-treated xenogeneic nerve grafts. **Archs Histol. Jap.**,**50**:193-208, 1987.
- OSAWA, T.; IDE, C.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through the allogenic nerve grafts in mice. **Archs. Histol. Jap.**,**49**:69-81, 1986.

- PERRY, V.H. and GORDON, S. Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. **J. Exp. Med.**, **166**:1138-1143, 1987.
- PERRY, V.H. and BROWN, M.C. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. **Bioessays** **14**:401-406, 1992.
- PERRY, V.H.; BROWN, M.C.; LUNN, E.R.; TREE, P.; GORDON, S. Evidence that very slow Wallerian degeneration in C57BL/Ola mice is a intrinsic properties of the peripheral nerve. **Eur. J. Neurosci.**, **2**:802-808, 1990.
- PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H. de F. The fine structure of the nervous system : The neurons and sprouting cells. Saunders, Phyladelphia, 1976, p.406.
- PHAM, H.N.; PADILLA, J.A.; NGUYEN, K.D. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. **J.Reconstr.Microsurg.**, **7**:31-36, 1991.
- POLLARD, J. D.; GYE, R. S.; MCLEOD, J. G. An assessment of immunosuppressive agents in experimental peripheral nerve transplantation. **Surg. Gyn. Obstet.**, **132**:839-845, 1971.
- POLLARD, J.D. and FITZPATRICK, L. An ultrastructural comparison of peripheral nerve allografts and autografts. **Acta Neuropathol.**, **23**:152-165, 1973.
- POLLARD, J.D. and McLEOD, J.G. Fresh and predegenerated nerve allografts and isografts in trembler mice. **Muscle Nerve**, **4**:274-281, 1981.
- POLLARD, J.D.; GYE, R.S.; McLEOD, J.G. An assessment of immunosuppressive agents in experimental peripheral nerve transplantation. **Surgery Gynec. Obstet.**, **132**:839-845, 1971.
- POLLARD, J.D.; McLEOD, J.G.; GYE, R.S. Regeneration through peripheral nerve allografts. An electrophysiological and histological study following the use of immunosuppressive therapy. **Archs. Neurol.**, **28**:31-37, 1973.
- POLLOCK, L.J., and DAVIS, L. Peripheral Nerve Injuries. Hoeber, 1923.
- RAIVICH, G. and KREUTZBERG, G.W. Expression of growth factor receptors in injured nervous tissue. I. Axotomy leads to a shift in the cellular distribution of specific B-nerve growth factor binding in the injured regenerating PNS. **J.Neurocytol.**, **16**:689-700, 1987.
- REICHERT, F.; SAADA, A; ROTSHENKER, S. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophages phenotypes: phagocytosis and galactose-specific lectine MAC-2. **J. Neurosci.**, **14**:3231-3245, 1994
- ROSS, M.H. Tecido Nervoso, **Histologia Texto e Atlas**. 2.Ed., Editora Médica Panamericana , Rio de Janeiro, 1993, p.241-304.

- ROULEAU, M.; CREPEAU, J.; TETREAULT, L. et al. Facial Nerve sutures: epineural versus perineural sutures, **J.Otolaryngol.**,**10**:338-342, 1981.
- RUWE, P.A. e TRUMBLE, T.E. A functional evaluation of cryopreserved peripheral nerve autografts. **J. Reconstr. Microsurg.**,**6**:239-244, 1990.
- SALONEN, V.; PELTONEN, J.; ROYTTA, M.; VIRTANEN, I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. **J.Neurosci.**,**16**:713-720,1987.
- SANDERS, F.K. and YOUNG, J.Z. The degeneration and reinnervation of grafted nerves. **J. Anat.**, **76**:143-163,1943.
- SCHEID, P. and FREIDE, R.L. Myelin phagocytosis in wallerian degeneration, Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. **Acta Neuropathol. (Berlin)**, **75**:77-84, 1987.
- SCHOLZ, A. and REID, G. Ion Channels in human axons. **J.Neurophysiol.**,**70**:1274-1279, 1993.
- SEDDON, H. J. Nerve Grafting **J. Bone Joint Surg.**,**45**:447-461,1963.
- SEDDON, H. J. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. **Brit. J. Surg.**,**35**:151-167, 1947.
- SEDDON, H.J. Peripheral Nerve Injuries. Lond.:Her Majesty's Stationary Office,1954. (Medical Research Council;special reports series 282)
- SEDON, H.J. Three types of nerve injury. **Brain**, **66**:237-288,1943.
- SINGH, R. Experience with allografts in the surgery of peripheral nerves (experimental study). **Acta Neurochir.**,**34**:195-201, 1976.
- SINGH, R.; MECHELSE, K.; STEFANKO, S. Role of tissue typing on preserved nerve allografts in dogs. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**,**40**:865-871, 1977.
- SOUTHARD, J.H.; MARSH, D.C.; McANULTY, J.F.; BELZER, F.O. The importance of O₂-derived free radical injury to organ preservation and transplantation. **Transplant. Proc.**, **19**:1380-1381, 1987
- SPEIGEL, I. J. Full autogenous nerve graft. **J. Neurosurg.**,**6**:421-422, 1949.
- STEVES, A.; SCHABET, M.; SCHOTT, K; WIETHÖLTER, H. Role of endoneural cells in experimental allergic neuritis and characterisation of a resident phagocytic cell. **Acta Neuropathol.**,**77**:412-419, 1989.
- STOLL, G.; GRIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system : Participation of both schwann cells an macrophages in myelin degradation. **J. Neurocytol.**,**18**:671-683,1989.

- STRASBERG, S.R.; MACKINNON, S.E.; HARE, G.M.; NARINI, P.P.; HERTL, C. HAY, J.B. Reduction in peripheral nerve allograft antigenicity with warm and cold temperature preservation. **Plast. Reconstr. Surg.**, **97(1)**:152-160, 1996.
- SUMITOMO, R.; DOHI, K.; URUSHIRAHARA, T.; JAMIESON, N.V.; ITO, H.; SUMIMOTO, K.; FUKUDA, Y. An examination of the effects of the solution containing histidine and lactobionate for heart, pancreas, and liver preservation in the rat. **Transplantation**, **53**:1206-1210, 1992a.
- SUMITOMO, R.; LINDELL, S.L.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. A comparison of histidine-lactobionate and UW solution in 48-hour liver preservation. **Transplantation**, **54**:610-614, 1992b.
- SUNDERLAND, S. and RAY, L. J. The selection and use of autografts for bridging gaps in injured nerves. **Brain**, **70**:75-92, 1947.
- SUNDERLAND, S. **Nerve and Nerve Injuries**. 2nd. Ed. Edinburg, Scotland: Churchill Livingstone, 1978.
- SUNDERLAND, S. Funicular suture and funicular exclusion in repair of severed nerves, **Brit. J. Surg.**, **40**:580-587, 1953.
- TAJIMA, K.; TOHYAMA, K.; IDE, C.; ABE, M.; MARIOKA, I. Regeneration through nerve allografts in the cynomolgous monkey (*Macaca fascicularis*). **J. Bone Joint Surg.**, **73**:172-785, 1991.
- TANIUCHI, M.; CLARKE, H.B.; SCHWEITZER, J.B.; JOHNSON, E.M. Expression of nerve growth factor receptor by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, suppression by axonal contact and binding properties. **J. Neurosci.**, **8**:664-681, 1988.
- TERZIS, J. Clinical microsurgery of peripheral nerve: the state of the art. **Clin. Plast. Surg.**, **6**:247-267, 1979.
- TOHYAMA, K.; IDE, C.; OSAWA, T. Nerve regeneration through the cryoinjured allogenic nerve graft in the rabbit. **Acta Neuropathol.**, **80**:138-144, 1990.
- TOLEDO-PEREYRA, L.H. Clinical effects of allupurinol on preserved kidneys: a randomized double-bind study. **Ann. Surg.**, **185**:128-136, 1977.
- TONA, A.; PERIDES, G.; RAHEMTULIA, F.; DAHL, D. Extracellular Matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. **J. Histochem. Cytochem.**, **41(4)**:593-599, 1993.
- TORVIK, A. Central chromatolysis and the axon reaction: a reappraisal. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **2**:423-473, 1976.

- VAN BEEK, A. L. and KLEINERT, H. E. Practical microneurorrhaphy. **Orth. Clin. North Am.**,**8**:377-386, 1977.
- VARON, S.; MANTHORPE, M.; LONGO, F.M.; WILLIAMS, L.R. Growth factors in regeneration of neural tissues. In: NERVE organ, and tissue regeneration: research perspective. Ed. F.J. Seil. New York, Academic Press, 1983. p. 127-155
- VASS, K. and LASSMAN, H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. **Am. J. Pathol.**,**137**: 789-800, 1990.
- VREUGDENHIL, P.K.; EVANS, W.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. Glutathione depletion in cold-storage organs. **Transplant. Proc.**, **22**:455-457, 1990.
- WADHWANI, K.C. and RAPOPORT, S.E. Transport properties of vertebrate blood-nerve barrier : Comparison with blood-brain barrier. **Prog in neurobiol.****43**:235-279,1994.
- WALLER, A.V. Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. **Philos. Trans. R. Soc.**,**140**:423-9,1850.
- WATABE, K.; FUKUDA, T.; TANAKA, J.; HONDA, H.; TOYOHARA, K.; SAKAY, O. Spontaneously immortalized adult mouse schwann cells secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities., **J. Neurosci Res.**,**41**:279-290, 1995.
- WAXMAN, S.G. and RITCHIE, J.M. Organization of ion channels in myelinated nerve fiber, **Science**,**228** :1502-1507,1985.
- WEISS, P. Nerve regeneration in the rat following tubular splicing of severed nerves. **Arch. Surg.**,**46**:525-527,1943.
- WEISS, P. Reunion of stumps of small nerves by tubulation instead of suture. **Science**,**93**:66-68,1941.
- WEISS, P. Sutureless reunion of severed nerves with elastic cuffs tantalum. **J. Neurosurg.**,**1**:219-225, 1994 a .
- WEISS, P. The technology of nerve regeneration: a review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. **J. Neurosurg.**,**1**:400-449, 1994b.
- WHITE, D.J.G. NAGAO, T.; DAVIES, H.S. **Cyclosporin A**. Elsevier Biomedical : Oxford, 1982.
- WHITE, F.V.; TOFWIS, A.D.; GOODRUM, J.F.; NOVICKI, D.I.; BOULDING, T.W.; MORREL, P. Lipid metabolism during early stages of wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. **J. Neurochemistry**,**52**:1085-1092, 1989.

- WONG, A.Y.C. and SCOTT, J.J.A. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. **Exp. Neurol.**,**114**:364-366, 1991.
- WOODHALL, B. Peripheral Nerve Injury. **Surg. Clin. North Am.**,(a) 1147 (b) 1162 (c),p:1165,1954.
- YU, L.T.; ENGLAND, J.; HICKEY, W.F.; SUMMER, A.; RHEE, E.; ROSTAMI, A.; LAROSSA, D. Survival and function of peripheral nerve allografts after cessation of long-term Cyclosporin immunosuppression in rats. **Transplant. Proc.**, **21**:3178-3180, 1989.
- ZALEWSKI, A. A. and GULATI, A. K. Rejection of nerve allograft after cessation of immunosuppression with cyclosporin A. **Transplantation**,**31**:88-89, 1981.
- ZALEWSKI, A.A. and GULATI, A.K. Survival of nerve allografts in sensitized rats treated with Cyclosporin A. **J. Neurosurg.**,**60**:828-834, 1984.
- ZALEWSKI, A.A. and GULATI, A.K. Evaluation of histocompatibility as a factor in the repair of nerve with a frozen nerve allograft. **J. Neurosurg.**,**56**:550-554, 1982.
- ZALEWSKI, A.A.; FAHY, G.M.; AZZAN, N.A.; AZZAN, R.N. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. **J. Comp. Neurol.**, **331**:134-147, 1993.

ABSTRACT

Traumatic lesions are very often on peripheral nervous system, and have reserved prognostic when a loss important nerve segment occurs. However, the knowledge about the cellular and the molecular events promoting the nerve regeneration, besides the use of microsurgical techniques, gives a better perceptive to improve the peripheral nerve repair nowadays. In this scenario, several assays were done to develop a nerve bank that would be used for surgery when a graft is necessary to repair a nerve gap. In this study we investigate the morphological and quantitative aspects of the nerve regeneration across autologous nerve grafts previously stored in two types of preserve solutions. Forty Wistar male rats were used and 16 of them had the left and right tibial nerves removed and stored during 24 or 72 hours in Wisconsin/Belzer solution or in Collins solution (4°C). Following previous storage period those nerves are processed for histology. Other 4 animals had the left and the right tibial nerve removed and immediately processed for histology. A group of 15 animals had the left tibial nerve removed and stored during 24 and 72 hours in Wisconsin/Belzer solution or in Collins solution and subsequently transplanted in the right side. Other 5 animal had the left tibial nerve removed and immediately transplanted to the right side. After 50 days of the transplant, the animals were reoperated to remove the nerve graft. It was exposed, dissected, fixed "in situ" using a fixative solution (2% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde, in PBS 0,1M, pH 7,4) and removed. Following, the nerve graft was postfixed in OsO₄ and embedded in resin. Semi-thin (1,0 µm) cross sections of the middle region of the nerve graft were obtained, stained in toluidine blue and observed in light microscopy. To perform the quantitative analysis the cross section of the graft was sampled in 5 different fields and the density of myelinated nerve fibers on 10⁴µm² was computed using an electronic counter. The morphological analysis shows that the structure of the nerve was well preserved after 24 or 72 hours storage in Wisconsin/Belzer or Collins solutions. The nerve fiber regeneration, 50 days after the graft transplantation, was more advanced in the grafts previously stored in Wisconsin/Belzer solution related to the graft stored in Collins solution, and similar to the observed in fresh nerve graft. The quantitative data confirm these morphological results. The nerve fibers density in nerve graft previously stored during 24 or 72 hours in Wisconsin/Belzer solution was significantly ($p < 0,05$) higher [433±12 and 430±20 (mean±s.e.m), respectively] than the observed in nerve graft previously stored in Collins solution (344±20 and 327±29). But it was similar to the observed in fresh nerve graft (407±13). These results reveal that composition of Wisconsin/Belzer solution is better than the composition of Collins solution to storage peripheral nerve grafts. Moreover, the similar nerve fiber regeneration observed in fresh nerve graft to that observed in nerve graft previously stored in Wisconsin/Belzer solution, suggest that its components have a positive effects on viability of the cells in the nerve graft implicate on axonal regeneration.