

**ROSANA MACHER TEODORI**

**REGENERAÇÃO AXONAL ATRAVÉS DE  
AUTOTRANSPLANTE DE RETALHO DE MÚSCULO  
ESQUELÉTICO OBTIDO A PARTIR DE INJEÇÃO DE  
ANESTÉSICO LOCAL**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Biologia e Patologia Buco-Dental da  
Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Mestre.

Piracicaba  
Estado de São Paulo  
1996

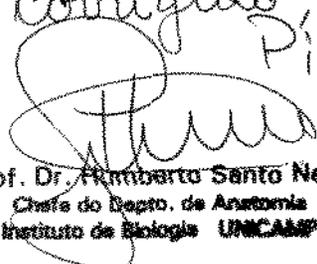
T264r

29523/BC

ROSANA MACHER TEODORI

REGENERAÇÃO AXONAL ATRAVÉS DE  
AUTOTRANSPLANTE DE RETALHO DE MÚSCULO  
ESQUELÉTICO OBTIDO A PARTIR DE INJEÇÃO DE  
ANESTÉSICO LOCAL

*Este exemplar foi devidamente  
corrigido conforme resolução CCPG/036/83  
Piracicaba, 18/12/96*

  
Prof. Dr. Humberto Santo Neto  
Chefe do Depto. de Anatomia  
Instituto de Biologia UNICAMP

Dissertação apresentada ao Curso de  
Biologia e Patologia Buco-Dental da  
Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Humberto Santo  
Neto †

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Júlia  
Marques †

UNICAMP

Piracicaba  
Estado de São Paulo  
1996

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	Piracicaba
T264r	
V. E.	
TOMBO BC/	29523
PROC.	28/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/02/97
N.º CPD	

CM-00096960-3

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP**

T264r	<p>Teodori, Rosana Macher.</p> <p>Regeneração axonal através de autotransplante de retalho de músculo esquelético obtido a partir de injeção de anestésico local. / Rosana Macher Teodori. - Piracicaba : [s.n.], 1996.</p> <p>108f. : il.</p> <p>Orientador : Humberto Santo Neto.</p> <p>Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1.Músculos - Transplante. 2.Regeneração do sistema nervoso. 3. Nervo - Cirurgia. 4. Anestésicos. I. Santo Neto, Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>19.CDD - 617.95 591.48 612.81 615.781</p>
-------	---

**Índices para o Catálogo Sistemático**

1. Músculos - Transplante	617.95
2. Regeneração do sistema Nervoso	591.48
3. Nervo - Cirurgia	612.81
4. Anestésicos	615.781



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 13/12/96, considerou o candidato aprovado.

1. Humberto Santo Neto

Handwritten signature of Humberto Santo Neto in black ink, written over a horizontal line.

2. Fausto Bérzin

Handwritten signature of Fausto Bérzin in black ink, written over a horizontal line.

3. Marco César Somazz

Handwritten signature of Marco César Somazz in black ink, written over a horizontal line.

## DEDICATÓRIA

Não é preciso ser grande para  
se realizar grandes coisas...

À Laura,  
que ainda pequenina, me revelou o  
sentido da vida.

A

Júlia Raquel Negri, pela amizade e incentivo durante esta trajetória

Aos meus pais, Mário e Hilda,  
por me educarem para o estudo  
e para a vida.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa da UNICAMP (FAEP)
- FAPESP pelo apoio à montagem do Laboratório de Estudos do Sistema Neuromuscular (Processos nº 911812-8 e nº 956956-9).

Agradecemos à UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA, pelo apoio através da liberação de horas para o desenvolvimento deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto, pela orientação competente, paciente e segura durante a elaboração deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Marco Cesar Somazz, pelo interesse e atenção com que acompanhou este trabalho, bem como pela valiosa dedicação, colaboração e amizade.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Júlia Marques, do Departamento de Anatomia do I.B. - UNICAMP, pela atenção e imprescindível contribuição para a elaboração e redação deste trabalho.
- À Prof<sup>a</sup> Miralva Aparecida de Jesus Silva, pela amizade e incentivo constante.
- Às Prof<sup>as</sup> Miriam Ribeiro Campos e Maria Luiza O. Polacow, do Depto. de Ciências Biológicas - UNIMEP, pelo apoio e incentivo ao início do programa.
- Ao Prof. Dr. Francesco Langone e Prof. Alexandre Leite R. de Oliveira, do Departamento de Anatomia do I.B. - UNICAMP, pela atenção e importantes sugestões apresentadas.

- Aos técnicos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio R. de Paula, do Departamento de Anatomia do I.B. - UNICAMP, pela presteza no preparo do material histológico e confecção das fotografias.
- À técnica Eliene Ap. Orsini Narvaes Romani, do Departamento de Morfologia da FOP - UNICAMP, pela dedicação e preparo do material para microscopia eletrônica.
- Ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, do Departamento de Morfologia da FOP - UNICAMP, pelo auxílio e atenção a nós dispensada.
- Ao Prof. Dr. José Merzel, pela atenção e sugestões apresentadas.
- À Profª Drª Sônia Maria De Stefano Piedade, do Depto. de Matemática e Estatística da ESALQ/USP, pela amizade e dedicação na análise estatística dos resultados.
- À Secretária Silvia Helena Burghi Kalaf, do Depto. de Anatomia do I.B. - UNICAMP, pela gentileza e atenção na digitação de parte deste trabalho.
- À Georgete Negri, pela colaboração na digitação e diagramação deste trabalho.
- À Emanuel Dias de Oliveira e Ezer Dias de Oliveira, pelo incentivo e apoio durante a confecção deste trabalho.
- À Sra. Marlene de Lima Francisco, do Departamento de Anatomia do I.B. - UNICAMP, pelo empenho na manutenção dos animais utilizados.

- Ao Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, pelo uso do microscópio eletrônico de transmissão EM10 - Zeiss e do Fotomicroscópio Zeiss.
- Ao Departamento de Biologia Celular do IB-UNICAMP, pela utilização do ultramicrótomo.
- Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa da ESALQ-USP, pelo uso do microscópio eletrônico de transmissão EM 900 - Zeiss.
- À Luzia de Fátima da Silva, Bibliotecária da FOP-UNICAMP, pela orientação na organização das Referências Bibliográficas.
- A Deus, por tudo.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>OBJETIVO</b> .....	8
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	9
1. Organização Estrutural do Nervo Periférico.....	9
2. Aspectos da Degeneração e Regeneração Nervosa Periférica.....	12
3. Métodos Empregados na Reparação da Lesão Nervosa Periférica	15
4. Músculo Esquelético no Reparo das Lesões Nervosas.....	18
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
1. Grupo de Enxerto de Músculo (Confecção e Implante).....	30
2. Grupo de Enxerto de Nervo.....	32
3. Grupo para Observações da Regeneração Espontânea.....	33
4. Grupo Controle.....	33
5. Sacrifício dos Animais e Retirada do Material.....	33
6. Análise Quantitativa.....	35
7. Tratamento Estatístico.....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	38
1. Características Macroscópicas no Local do Enxerto.....	38

	Página
2. Características Histológicas do Nervo Normal.....	39
3. Características Histológicas do Coto Proximal.....	40
4. Características Histológicas da Região do Enxerto.....	40
5. Características Histológicas do Coto Distal.....	41
6. Análise Quantitativa.....	43
<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
1. Retalhos Musculares já Utilizados.....	58
2. Bases Biológicas da Idealização do Retalho a partir de Injeções. de Anestésicos Locais.....	61
3. Sobre a Regeneração Axonal.....	64
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>72</b>
Gráfico.....	72
Tabelas.....	73
<b>SUMMARY.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 : Aspecto pós-cirúrgico do implante de músculo previamente tratado com o anestésico.....	47
Figura 2 : Nervo ciático regenerado após 50 dias do enxerto muscular.....	47
Figura 3 : Aspecto histológico do músculo sóleo 24 horas após a injeção de cloridrato de lidocaína.....	48
Figura 4 : Corte transversal do coto proximal do nervo ciático de rato do grupo de enxerto de músculo .....	49
Figura 5 : Corte transversal do coto proximal do nervo ciático de rato do grupo de enxerto de nervo .....	49
Figura 6 : Micrografia eletrônica do coto proximal do nervo ciático de rato do grupo de enxerto de músculo .....	50
Figura 7 : Micrografia eletrônica do coto proximal do nervo ciático de rato do grupo de enxerto de nervo .....	50
Figura 8 : Corte transversal do nervo ciático regenerado ao nível do enxerto de músculo.....	51
Figura 9 : Corte transversal do nervo ciático regenerado ao nível do enxerto de nervo .....	51
Figura 10 : Micrografia eletrônica ao nível do enxerto muscular.....	52
Figura 11 : Micrografia eletrônica ao nível do enxerto muscular.....	52
Figura 12 : Corte transversal do coto distal do nervo ciático de rato do grupo de enxerto de músculo .....	53
Figura 13 : Corte transversal do coto distal do nervo ciático de rato do grupo de enxerto de nervo .....	53
Figura 14 : Corte transversal ao nível do coto distal do nervo ciático de um animal do grupo de enxerto de músculo .....	54

	Página
Figura 15 : Corte transversal ao nível do coto distal do nervo ciático de um animal do grupo de enxerto de nervo .....	54
Figura 16 : Micrografia eletrônica do coto distal do nervo ciático de um animal do grupo de enxerto de músculo.....	55
Figura 17 : Corte transversal do segmento distal do nervo ciático de um animal do grupo de regeneração espontânea .....	55
Figura 18 : Micrografia eletrônica de um segmento do nervo ciático de um animal do grupo controle.....	56
Figura 19 : Micrografia eletrônica do nervo ciático normal.....	56
Figura 20 : Plate mostrando o aspecto da região do enxerto e coto distal nos dois grupos experimentais em relação ao grupo controle.....	57
Gráfico 1 : Relação entre médias e C.V. nos dois tratamentos.....	72

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 : Número de axônios por tratamento.....	45
Tabela 2 : Análise de Variância com Teste F.....	73
Tabela 3 : Análise de Variância com Teste de Tukey.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Apud** : em

**et al.** : e outros

**In** : em

**Op. cit.** : na obra citada

# REGENERAÇÃO AXONAL ATRAVÉS DE AUTOTRANSPLANTE DE RETALHO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO OBTIDO A PARTIR DE INJEÇÃO DE ANESTÉSICO LOCAL

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da regeneração axonal através de retalho de lâmina basal muscular obtido por injeção intramuscular de um anestésico local. O quadro regenerativo nessa situação foi comparado à regeneração axonal em autoenxerto de nervo.

Um grupo de animais teve o músculo sóleo direito exposto, recebendo injeção de 0,1 ml de cloridrato de lidocaína a 2%. Após 24 horas, o ventre muscular do sóleo foi retirado, sofrendo uma fina dissecação para a confecção de um retalho de 5 mm de comprimento e espessura semelhante à do nervo ciático. Em seguida, o nervo ciático esquerdo foi seccionado e o retalho muscular implantado na fenda entre os dois cotos do nervo, com sutura epineural. Outro grupo de animais teve o nervo ciático esquerdo exposto, seccionando-se um fragmento de 5 mm, que sofreu inversão de 180° e foi imediatamente fixado aos cotos com sutura epineural. O grupo controle consistiu de nervos ciáticos de animais normais.

Após 50 dias de sobrevida, o nervo ciático esquerdo foi exposto, fixado "*in situ*" e dividido em 3 porções: coto proximal, coto distal e região do enxerto, os quais foram processados para microscopia eletrônica. Em seguida, procedeu-se a análise qualitativa e quantitativa dos axônios regenerados nos dois grupos experimentais (autotransplante de músculo e autotransplante de nervo), bem como no grupo controle.

Nossos resultados mostraram que em todos os animais houve recolonização do coto distal. A análise qualitativa mostrou não haver diferenças entre os axônios dos dois grupos no que diz respeito ao aspecto ultraestrutural, incluindo distribuição de microtúbulos, neurofilamentos, bainha de mielina, células de Schwann, etc. Na região do enxerto, nos dois grupos, a distribuição dos axônios era característica, formando minifascículos. Os axônios eram aparentemente menores em diâmetro e espessura de bainha de mielina, quando comparados ao coto proximal e controle. No coto distal observou-se a reorganização em fascículos, com axônios ainda aparentemente menores em diâmetro e espessura de bainha de mielina.

A análise quantitativa mostrou que, no grupo de enxerto de músculo, o número de axônios no coto distal ( $13792,57 \pm 1145,10$ ) foi maior, mas não estatisticamente significativo em relação àquele do enxerto de nervo ( $13592,43 \pm 1420,04$ ).

Concluiu-se que a regeneração axonal através de autoenxerto de lâmina basal de músculo esquelético obtido com injeção de anestésico local foi da mesma ordem daquela verificada em autoenxerto de nervo.

**PALAVRAS-CHAVE:**

1. Músculos - Transplante
2. Regeneração do Sistema Nervoso
3. Nervos - Cirurgia
4. Anestésicos

## INTRODUÇÃO

A regeneração nervosa periférica é um exemplo típico de plasticidade ao nível do sistema nervoso. Dentro de poucas horas após a lesão nervosa, brotos axonais crescem no sentido de reinervar o músculo. Porém, a recuperação funcional muitas vezes é incompleta. No sentido de otimizar o processo regenerativo, diferentes abordagens têm sido pesquisadas.

Diante de uma lesão que provoca a perda de um segmento considerável do nervo, torna-se inviável a realização de simples sutura dos cotos nervosos, uma vez que isso provocaria tensão excessiva no nervo, interferindo com sua irrigação e facilitando a formação de tecido cicatricial, o que atuaria como um impedimento mecânico ao crescimento axonal.

Nesses casos, se utiliza o nervo sural na forma de autoenxerto. Porém, quando o nervo lesado tem diâmetro maior que o nervo a ser enxertado, é preciso unir paralelamente vários segmentos do nervo doador (cable graft) para implantar entre os cotos do nervo lesado. Este procedimento também leva a uma cicatrização exagerada, comprometendo a regeneração. Além disso ainda há o inconveniente da presença de parestesia no território de inervação do nervo doador. Com o objetivo de minimizar, ou até eliminar esses inconvenientes, muitos pesquisadores têm se empenhado em desenvolver formas alternativas para o reparo nervoso, sendo bastante explorado atualmente o uso de **músculo esquelético**, entre outros, como substâncias

adesivas (YOUNG & MEDAWAR<sup>111</sup>, 1940; SEDDON & MEDAWAR<sup>85</sup>, 1942; TARLOV<sup>95</sup>, 1944, 1950; NISHIHARA & McCAFFREY<sup>67</sup>, 1989), tubos de silicone (LUNDBORG<sup>55</sup> et al., 1982; MADISON<sup>59</sup> et al., 1988; STENSAAS<sup>93</sup> et al., 1989; SPECTOR<sup>92</sup> et al., 1991), tubos de polietileno (DA SILVA & LANGONE<sup>16</sup>, 1989; MARQUES, 1992), tubos de poliésteres (DA SILVA<sup>17</sup> et al., 1984; MADISON<sup>61,60</sup> et al., 1984, 1985), substâncias biocompatíveis como o ácido poliglicólico (HENTZ<sup>40</sup> et al., 1991), veias (WEISS<sup>107</sup>, 1943; RICE & BERSTEIN<sup>77</sup>, 1984; WALTON<sup>105</sup> et al., 1989), colágeno (ROSEN<sup>78</sup> et al., 1989; MACKINNON & DELLON<sup>57</sup>, 1990), neurografia a laser (BAILES<sup>4</sup> et al., 1989; TERRIS & FEE<sup>97</sup>, 1993), etc.

Entre todas estas alternativas, a utilização de autoenxerto de músculo esquelético tem promovido resultados bastante satisfatórios.

A partir dos estudos de KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984), verificou-se que a membrana basal muscular possuía características químicas e composição molecular muito semelhante às da membrana basal da célula de Schwann. Sabendo que os axônios de um nervo lesado crescem no interior dos tubos de membrana basal das células de Schwann, essa semelhança levou outros pesquisadores a estudar também a possibilidade de crescimento axonal no interior de tubos de membrana basal muscular "vazios" (IDE<sup>42</sup>, 1984; GLASBY<sup>32,35,33</sup> et al., 1986a,b,c ; FAWCETT & KEYNES<sup>21</sup>, 1986; DAVIES<sup>18</sup> et al., 1987; NORRIS<sup>69</sup> et al., 1988; SOMAZZ<sup>90</sup>, 1994).

O "esvaziamento" dos tubos de membrana basal muscular para a utilização do músculo esquelético como enxerto, exigia um tratamento prévio

do músculo, que provocasse necrose e remoção de seu conteúdo sarcoplasmático, preservando os tubos de membrana basal.

KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984), atingiram parcialmente esse objetivo através do tratamento químico e posterior compressão mecânica do fragmento muscular, para eliminação do conteúdo sarcoplasmático. Porém, além de ser um método moroso e trabalhoso, promovia o esvaziamento de apenas 50% do sarcoplasma.

Mais tarde, em 1986, GLASBY<sup>32</sup> et al., estabeleceram um novo método de tratamento do enxerto, baseado em choque térmico e osmótico do fragmento muscular, o que levava à separação da membrana basal de seu conteúdo sarcoplasmático, que era então destruído. Apesar de trazer bons resultados, esse método ainda apresentava algumas desvantagens, pois em função do choque térmico, o fragmento muscular se mostrava retraído, demandando a retirada de um fragmento muito maior que o necessário para o enxerto, além de se tornar quebradiço, dificultando a realização da sutura e portanto, favorecendo a formação de tecido cicatricial.

HALL & ENVER<sup>39</sup> (1994), preconizaram a técnica de pré-aquecimento do retalho muscular a 60°C e 80°C e constataram que o padrão de reinervação nos enxertos tratados a 60°C era semelhante ao observado em enxertos tratados por congelamento-descongelamento. Já nos enxertos aquecidos a 80°C, os cones de crescimento não penetraram no enxerto, provavelmente por inativação térmica dos componentes da lâmina basal muscular, que favorecem a regeneração.

SOMAZZ<sup>90</sup>, (1994), demonstrou a viabilidade de se construir retalhos de membrana basal muscular a partir de injeções intramusculares de anestésico local.

Esse método se fundamenta no efeito miotóxico dos anestésicos locais, o que acarreta necrose rápida das fibras musculares esqueléticas. Com isto, os tubos de membrana basal muscular "vazios" são obtidos e utilizados como enxerto no reparo de lesões nervosas periféricas.

## **OBJETIVO**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia da regeneração axonal através de enxerto de lâmina basal muscular obtido por injeção intramuscular de cloridrato de lidocaína a 2%. Para isso, foram estudadas comparativamente as características ultraestruturais e quantitativas de axônios regenerados em autoenxerto de músculo e autoenxerto de nervo.

## REVISÃO DA LITERATURA

A regeneração nervosa periférica é um tema de enorme importância dentro da Neurobiologia e conseqüentemente, acumulou ao longo das duas últimas décadas uma vasta literatura envolvendo os mais diferentes aspectos da regeneração axonal. Dessa forma, seria impossível, além de não pertinente, discorrer a respeito de toda a revisão bibliográfica. Assim, faremos uma rápida revisão apenas dos aspectos que julgamos estar mais diretamente relacionados ao tema deste trabalho.

A fim de facilitar a leitura, apresentaremos a literatura de uma forma didaticamente dividida, e na seguinte ordem: 1) **Organização Estrutural do Nervo Periférico**, 2) **Aspectos da Degeneração e Regeneração Nervosa Periférica**, 3) **Métodos Empregados na Reparação da Lesão Nervosa Periférica**, e 4) **Emprego de Músculo Esquelético no Reparo das Lesões Nervosas**.

### 1. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO NERVO PERIFÉRICO

O nervo periférico é constituído por feixes de fibras nervosas miélinicas e amielínicas, envolvidas por células de Schwann e bainhas conjuntivas. Nas fibras miélinicas, a célula de Schwann forma a bainha de mielina ao redor de cada axônio, enquanto nas fibras amielínicas, a célula de Schwann envolve

diretamente os axônios desprovidos de mielina, sendo vários axônios amielínicos envolvidos por uma única célula de Schwann. Células de Schwann vizinhas são separadas entre si pelo nodo de Ranvier, nas fibras mielínicas, enquanto nas fibras amielínicas elas são diretamente contínuas. Um aspecto interessante ao presente trabalho é destacar o fato de que cada célula de Schwann apresenta-se revestida por membrana basal. A membrana basal é encontrada sobre a superfície externa de várias células, como as células epiteliais, endoteliais, musculares lisa e estriada, células gliais e células de Schwann. Foi descrita pela primeira vez a nível de microscopia de luz, por TODD & BOWMAN<sup>100</sup>, (1957) e revista por KEFALIDES<sup>49</sup> et al., (1979), consistindo de três subcamadas: a) lâmina lúcida (ou lâmina rara); b) lâmina densa; c) lâmina reticular. A lâmina basal é um sinônimo de lâmina densa, também chamada de membrana basal. A lâmina densa da membrana basal da célula de Schwann mede aproximadamente 30-40 nm de espessura e a lâmina lúcida é ainda mais delgada. A lâmina reticular é uma fina camada mal delimitada, constituída de um delicado material filamentoso e algumas fibrilas colágenas. Com relação à arquitetura molecular, aceita-se que a lâmina basal consiste de uma matriz de colágeno tipo IV, associada a glicoproteínas como a laminina (TIMPL<sup>99</sup> et al., 1979; FOIDART<sup>26</sup> et al., 1980), e nidogênio. Proteoglicanas, como heparan-sulfato, estão distribuídas entre as subcamadas, sendo mais concentradas na região externa da lâmina reticular (KANWAR & FARQUHAR<sup>46</sup>, 1979; FARQUHAR<sup>47</sup>, 1973; FARQUHAR<sup>20</sup>, 1981; YOKOTA<sup>110</sup> et al., 1983).

As bainhas conjuntivas estão representadas pelo endoneuro, perineuro e

epineuro. Estas bainhas representam o tecido conjuntivo de suporte do nervo periférico.

O endoneuro envolve cada fibra nervosa e está constituído por uma frouxa matriz de colágeno, apresentando uma relação especial com as fibras nervosas, pois as fibrilas colágenas endoneurais são fortemente unidas ao redor de cada fibra nervosa, para formar as paredes de suporte conhecidas por tubos endoneurais (PETERS<sup>73</sup> et al., 1976; SUNDERLAND<sup>84</sup>, 1978).

O perineuro envolve externamente cada fascículo e está constituído de várias camadas de células achatadas, desempenhando o papel de proteção mecânica, atuando também como uma barreira de difusão, auxiliando dessa forma a preservação do microambiente intrafascicular especializado (OLDFORS & JOHANSSON<sup>70</sup>, 1979; KRISTENSSON & OLSSON<sup>52</sup>, 1971; OLSSON & KRISTENSSON<sup>71</sup>, 1973). Segundo LUNDBORG<sup>54</sup>, (1987), o número de camadas do perineuro varia de acordo com o diâmetro dos fascículos.

O epineuro envolve externamente os fascículos, servindo como uma camada protetora para os mesmos durante os movimentos das extremidades e protege os fascículos de traumas externos. No epineuro estão presentes fibroblastos, macrófagos e mastócitos. As fibrilas colágenas do epineuro são mais espessas que as do endoneuro e perineuro.

Em que pese o papel mecânico dessas três camadas conjuntivas, elas participam ativamente dos processos fisiológicos, bem como dos aspectos moleculares envolvidos na manutenção e preservação dos nervos periféricos.

Também nos processos de lesão-reparação do nervo, a presença e a integridade dessas camadas são essenciais.

## **2. ASPECTOS DA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

É bem sabido o fato que após a secção total de um nervo inicia-se uma sequência de modificações espaço-temporais envolvendo aspectos bioquímicos, celulares e moleculares, cujo objetivo final é o de restaurar o nervo lesado. Um dos aspectos mais marcantes dessa resposta é a degeneração axonal.

A degeneração do axônio é consequência da interrupção da continuidade com seu centro trófico, o corpo celular. Essa degeneração é conhecida como degeneração Walleriana e leva à desintegração e remoção do axônio e dos restos de mielina, preparando o ambiente através do qual os axônios em regeneração devem crescer. Tanto o axônio quanto a bainha de mielina degeneram, deixando "vazios" os tubos de membrana basal que envolviam a fibra nervosa original (FAWCETT & KEYNES<sup>22</sup>, 1990).

A remoção dos restos de mielina é mediada pelos macrófagos e pelas células de Schwann. A importância dessas últimas nesse processo tem sido demonstrada por estudos *in vivo*, onde as células de Schwann sofrem intensa proliferação durante a degeneração Walleriana (ABERCROMBIE & JOHNSON<sup>1</sup>, 1946; THOMAS<sup>98</sup>, 1966; BRADLEY & ASBURY<sup>9</sup>, 1970; ALLT<sup>2</sup>,

1976). Também tem sido demonstrado que a membrana axonal e os restos de mielina estimulam as células de Schwann a entrar em mitose (SALZER & BUNGE<sup>80</sup>, 1980; SALZER<sup>81</sup> et al., 1980) e os macrófagos que fagocitaram a mielina produzem um meio facilitador para a multiplicação das células de Schwann (BAICHWAL<sup>3</sup> et al., 1988). Por outro lado, considera-se que a degeneração dos próprios axônios ocorre de maneira autolítica (IDE<sup>43</sup> et al., 1990).

As células de Schwann, desprovidas de axônios, permanecem vivas, se tornam alongadas e seus processos delgados se interdigitam com os processos das células de Schwann vizinhas, formando uma coluna de células, denominada coluna de células de Schwann ou bandas de BÜNGNER. Interessantemente, a lâmina basal da célula de Schwann permanece íntegra durante o processo de degeneração Walleriana (IDE<sup>43</sup> et al., 1990).

Logo após a lesão, o corpo celular sofre alterações estruturais e funcionais. Há um aumento do volume do corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia e alterações na estrutura do citoplasma, denominada cromatólise. Esta reação reflete a preparação metabólica para a reposição da perda do volume axoplasmático, devido à perda do segmento distal do axônio, ocorrendo uma concentração de R.N.A. para o aumento da síntese protéica. As reações no corpo celular variam com a proximidade da lesão; lesões proximais podem levar à morte do corpo celular (LUNDBORG<sup>54</sup>, 1987).

Assim como nos processos gerais de inflamação, a reparação inicia-se dentro de poucas horas após a lesão. Os axônios do coto proximal produzem

grande quantidade de brotos colaterais e terminais que avançam distalmente. Um aspecto característico na regeneração nervosa é a presença de "unidades de regeneração", representadas por grande número de brotos amielínicos aglomerados, originários de um mesmo axônio, que crescem sob os tubos endoneurais, em direção aos órgãos terminais.

Na porção mais distal de cada broto há um cone de crescimento, uma protuberância da qual se originam vários filopódios, que exploram o ambiente através de movimentos constantes. Quantidades consideráveis de actina têm sido demonstradas nos filopódios, indicando seu importante papel para a mobilidade destes (YAMADA<sup>109</sup> et al., 1971; WOLOSEWICK & PORTER<sup>108</sup>, 1976; LUNDBORG<sup>54</sup>, 1987; PLEASURE<sup>74</sup>, 1980; BUETTNER<sup>10</sup>, 1995).

A membrana basal da célula de Schwann desempenha importante papel na condução dos axônios, fornecendo um arcabouço aos axônios em regeneração. Contudo a importância da membrana basal durante a regeneração axonal parece não ser apenas mecânica, existindo alguns trabalhos que sugerem um papel trófico (BUNGE<sup>11</sup>, 1983; IDE<sup>45</sup> et al., 1983; GIANNINI & DYCK<sup>30</sup>, 1990; FENELEY<sup>23</sup> et al., 1991; SORENSON<sup>91</sup> et al., 1993). WANG<sup>106</sup> et al., (1992), reafirmam o papel trófico da laminina presente na lâmina basal da célula de Schwann, considerando sua localização, principalmente na superfície interna da célula, sendo reconhecida pelos brotos axonais que então invadem a lâmina basal durante o processo de regeneração.

### **3. MÉTODOS EMPREGADOS NA REPARAÇÃO DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Segundo FIELDS<sup>25</sup> et al., (1989), os primeiros experimentos envolvendo sutura de nervo foram descritos por FERRAR, no século XVII. No século XIX, BAUDENS<sup>5</sup>, (1836), e VON LANGENBECK<sup>103</sup>, (1876), realizaram sutura direta dos cotos nervosos, porém, os materiais utilizados causavam reação inflamatória e a cicatrização decorrente da sutura resultava numa "linha de sutura", onde os axônios se tornavam desorganizados, com seu trajeto bloqueado e frequentemente estrangulados no interior de neuromas. Além disso, a sutura direta dos cotos nervosos pode provocar tensão no local do reparo, levando à constrição dos vasos intraneurais e propiciando uma fibrose.

Na tentativa de minimizar o processo cicatricial, um material adesivo originário do plasma sanguíneo foi utilizado (YOUNG & MEDAWAR<sup>111</sup>, 1940; SEDDON & MEDAWAR<sup>85</sup>, 1942; TARLOV<sup>95,96</sup>, 1944, 1950; NISHIHIRA & Mc CAFFREY<sup>67</sup>, 1989), porém os resultados são semelhantes ou inferiores àqueles onde se utiliza sutura epineural e a anastomose geralmente falha devido a pequena força elástica de conexão (MILLES<sup>65</sup>, 1984; BECKER<sup>6</sup> et al., 1984; BOEDTS<sup>7</sup>, 1987; SMAHEL<sup>89</sup> et al., 1987).

Outra forma de facilitar a reparação nervosa periférica foi desenvolvida utilizando-se tubos que pudessem conduzir os axônios em regeneração em direção à porção distal do nervo.

Os tubos são constituídos de materiais de natureza sintética ou biológica, destacando-se o silicone (LUNDBORG<sup>55,56</sup> et al., 1982; MADISON<sup>59</sup> et al., 1988; STENSAAS<sup>93</sup> et al., 1989; SPECTOR<sup>92</sup> et al., 1991), polietileno (DA SILVA & LANGONE<sup>16</sup>, 1989; MARQUES<sup>62</sup>, 1992), poliésteres (DA SILVA<sup>17</sup> et al., 1984; MADISON<sup>61,60</sup> et al., 1984, 1985), substâncias biocompatíveis como o ácido poliglicólico (HENTZ<sup>40</sup> et al., 1991), veias (WEISS<sup>107</sup>, 1943; RICE & BERSTEIN<sup>77</sup>, 1984; WALTON<sup>105</sup> et al., 1989), e colágeno (ROSEN<sup>79</sup> et al., 1979; MADISON<sup>59</sup> et al., 1988; MACKINNON & DELLON<sup>57</sup>, 1990).

A tubulização, através dos diversos materiais citados, fornece orientação mecânica aos axônios em crescimento, minimiza a cicatrização pela formação de uma barreira que diminui a invasão de células do tecido conjuntivo, favorece o acúmulo de substâncias tróficas no interior do tubo, além de permitir a manipulação do microambiente de regeneração e não formar "linha de sutura".

Segundo FIELDS & ELLISMAN<sup>24</sup>, (1986), após 3 a 4 semanas da tubulização, os axônios amielínicos associados às células de Schwann começam a invadir o coto distal. Axônios mielínicos já estavam presentes no coto distal do nervo ciático de rato, após 5 a 6 semanas da tubulização. Entretanto, o número e o diâmetro dos axônios mielínicos regenerados não atingem os valores de nervos normais, após intervalos de tempo mais longos.

De forma geral, o método de tubulização mostrou resultados satisfatórios, com excessão da utilização de osso e fáscia, porém, LE BEAU<sup>53</sup> et al., (1988), consideram que apesar da regeneração aparentemente bem sucedida logo

após a tubulização, nervos regenerados mostram evidências de degeneração e desmielinização, que são mais intensas quanto maior o tempo após a implantação dos tubos de silicone. Os autores atribuem esse fato à presença de forças constrictivas que atuam sobre o nervo durante seu crescimento através do tubo e coto distal, que podem impedir a maturação normal quando a prótese tubular se mantém por longo tempo.

Nesse sentido, TERRIS & FEE<sup>97</sup>, (1993), consideram que atualmente a tubulização parece não oferecer vantagens sobre o método tradicional de reparo por sutura epineural, e certamente mostrará melhores resultados a partir da introdução de um material absorvível ou que se dissolva quando o processo regenerativo esteja concluído, evitando a compressão nervosa crônica do nervo regenerado.

A neurografia a laser é outro método que tem sido apoiado por alguns autores que consideram seus resultados comparáveis aos de reparo por sutura epineural, especialmente no que tange à velocidade de condução e densidade dos axônios (BAILES<sup>4</sup> et al., 1989). Porém, este método necessita investigações adicionais, uma vez que seu poder de anastomose é insuficiente, proporcionando elevada taxa de deiscência no nervo (KORFF<sup>51</sup> et al., 1992).

Dentre as alternativas já desenvolvidas, o método de reparo mais utilizado na prática clínica atual é o autoenxerto de nervo, porém ainda se esbarra em inconvenientes. Quando o diâmetro do nervo lesado é maior que o doador, há necessidade de unir paralelamente várias porções do nervo doador

(cable graft), o que propicia cicatrização excessiva em detrimento de uma regeneração axonal adequada. Além disso, a remoção do nervo doador resulta em perda sensitiva na área desnervada.

Apesar das inúmeras alternativas para substituição do autoenxerto nervoso, uma das mais promissoras é o emprego de autoenxerto de músculo esquelético. Essa idéia baseia-se no fato de que a membrana basal muscular possui propriedades químicas e composição molecular semelhante àquela das células de Schwann (KEYNES<sup>50</sup> et al., 1984).

Muitos autores têm demonstrado que axônios em regeneração podem crescer através da lâmina basal de músculo esquelético (IDE<sup>42</sup>, 1984; KEYNES<sup>50</sup> et al., 1984; GLASBY<sup>32,35,33</sup> et al., 1986a,b,c; FAWCETT & KEYNES<sup>21</sup>, 1986; DAVIES<sup>18</sup> et al., 1987; NORRIS<sup>69</sup> et al., 1988; SOMAZZ<sup>90</sup>, 1994). É de interesse citar que esses trabalhos não são apenas experimentais, incluindo também entre eles alguns resultados bastante satisfatórios de reparo no homem (NORRIS<sup>69</sup> et al., 1988; CALDER & NORRIS<sup>12</sup>, 1993).

#### **4. MÚSCULO ESQUELÉTICO NO REPARO DAS LESÕES NERVOSAS**

Segundo FIELDS<sup>25</sup> et al., (1989), e GLASBY<sup>31</sup>, (1990), a primeira referência ao uso de músculo no reparo nervoso foi feita por CAUSEY<sup>14</sup>, (1955), que trabalhou no reparo de uma secção de nervo ciático de coelho através de autotransplante de músculo esquelético. Neste caso, o músculo foi transplantado de seu leito juntamente com seu pedículo vascular. Ele

comparou seus resultados àqueles em que o reparo foi feito por autoenxerto de nervo fibular. Observou que havia um crescimento limitado de axônios através do enxerto nos dois grupos, havendo menor quantidade de fibras nervosas no enxerto de músculo. Além disso, a maturação dessas fibras pareceu ser atrasada neste grupo. GLASBY<sup>31</sup>, em 1990, considera que estes resultados possam ser devidos à técnica cirúrgica empregada, relativamente primitiva se comparada às desenvolvidas atualmente. Diante desses resultados, a técnica foi abandonada, sendo retomada apenas trinta anos mais tarde por IDE<sup>45</sup> et al., (1983), e KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984).

IDE<sup>45</sup> et al., em 1983, também observaram axônios em regeneração no interior dos tubos de membrana basal muscular, admitindo haver semelhanças químicas entre essa membrana basal e aquela das células de Schwann. Considerando que a membrana basal das células de Schwann desempenha um papel fundamental na regeneração axonal, admitiu-se que a membrana basal muscular também pudesse ser utilizada no reparo da lesão nervosa periférica.

Em 1984, KEYNES<sup>50</sup> et al., desenvolveram um protocolo a fim de preparar retalhos de músculo esquelético no reparo da lesão nervosa. De acordo com este método, um determinado fragmento muscular é tratado por uma variedade de produtos químicos, cuja finalidade é retirar o conteúdo citoplasmático da fibra muscular. A evacuação final é obtida pela compressão do fragmento muscular entre duas superfícies planas. Os autores concluíram que as fibras nervosas crescem coaxialmente através dos tubos de membrana

basal das fibras musculares no enxerto. Em trabalhos posteriores, entretanto, os próprios preconizadores do método são categóricos em afirmar que ele necessita ser melhorado (FAWCETT & KEYNES<sup>21</sup>, 1986).

Em 1986, FAWCETT & KEYNES<sup>21</sup> compararam autoenxerto de nervo e autoenxerto de músculo preparado por evacuação do mioplasma, em ratos e coelhos. Depois de três meses, avaliaram os dois grupos funcional e eletrofisiologicamente, e observaram que o autoenxerto de lâmina basal muscular foi tão bem sucedido quanto o autoenxerto de nervo: o número e tamanho dos axônios, bem como a recuperação funcional do membro e velocidade de condução axonal foram as mesmas nos dois grupos de animais. Os autores sugeriram então que os enxertos de músculo preparados desta forma poderiam ser úteis no reparo de nervos em humanos. No entanto, havia ainda o inconveniente de que a técnica promovia o esvaziamento de apenas 50% do conteúdo sarcoplasmático, além de ser um método demorado e trabalhoso.

GLASBY<sup>32</sup> et al., (1986a), preconizaram um novo método de obtenção do enxerto muscular, que se baseia em choque térmico e hiperosmótico do fragmento muscular. Com este procedimento separa-se a membrana basal muscular de seu conteúdo sarcoplasmático e o sarcoplasma é dessa forma destruído. Os autoenxertos assim tratados eram alinhados coaxialmente e implantados entre os cotos do nervo ciático de ratos. Eles concluíram que o enxerto muscular era bastante promissor no reparo nervoso, uma vez que foi possível a regeneração através do mesmo, com colonização do coto nervoso

distal.

Praticamente todos os trabalhos subsequentes utilizam-se do método de Glasby e têm demonstrado em diferentes situações, que o emprego de músculo esquelético pode ser uma boa opção no reparo das lesões nervosas.

Num trabalho posterior, GLASBY<sup>35</sup> et al., (1986b), investigaram como a orientação do enxerto muscular afetava a regeneração, utilizando autoenxerto de músculo tratado por congelamento e descongelamento, implantado em nervo ciático de rato. Eles compararam os resultados de um grupo em que o enxerto foi alinhado coaxialmente aos axônios, a outro grupo em que o enxerto foi colocado perpendicularmente, formando um ângulo de 90° com os mesmos. Observaram que a recuperação ocorreu nos dois grupos, porém mais lentamente no grupo cujos tubos de membrana basal estavam em ângulo reto com as fibras nervosas.

GLASBY<sup>33</sup> et al., (1986c), fizeram a retirada de um fragmento de 1 cm do nervo ciático de rato e o reimplantaram a fresco. Os resultados foram comparados aos de outro grupo de animais onde se realizou autoenxerto de músculo tratado por congelamento/descongelamento, alinhado coaxialmente. Os dois grupos experimentais foram observados aos 7, 14, 28, 51 e 101 dias. Aos 28 dias no enxerto e aos 51 dias no nervo distal, não havia diferença significativa no número de axônios mielínicos em cada grupo e potenciais de ação compostos extracelulares puderam ser obtidos com a mesma facilidade nos dois grupos. Além disso, não havia diferença significativa nos índices de maturação (diâmetro do axônio e diâmetro da fibra) no ponto médio dos

enxertos de nervo e músculo, em todos os tempos após 28 dias. Estes resultados encorajaram o uso clínico do enxerto muscular, que se mostrou adequado ao reparo nervoso.

GLASBY<sup>34</sup> et al., (1986d), realizaram autoenxerto de músculo tríceps tratado por congelamento-descongelamento, em nervo radial de sagüis. Após 6 meses da cirurgia, fizeram a avaliação funcional e observaram que ocorreu transmissão de potenciais de ação composto extracelular através do enxerto, em ambas as direções. Os autores sugerem que tais enxertos poderiam ser usados no reparo de nervos periféricos em humanos.

GATTUSO<sup>27</sup> et al., em 1988, trabalharam com enxerto de músculo autógeno em nervo mediano de primatas, utilizando o método de congelamento-descongelamento. Depois de 28 dias do enxerto foi observado desnervação total do músculo flexor radial do carpo. Após 150 dias havia evidência eletrofisiológica de recuperação da condução através do enxerto, com recuperação funcional parcial do músculo. Histologicamente, se observou a presença de fibras nervosas e novas junções neuromusculares funcionais. Eles observaram que a reinervação efetiva dos músculos alvo é possível após o reparo do nervo através de autoenxerto de músculo esquelético.

Esses mesmos autores demonstraram que, embora a reinervação dos músculos alvo tenha ocorrido, proporcionando um nível aceitável de recuperação funcional, as fibras nervosas regeneradas não recuperaram seu diâmetro normal, havendo um atraso na maturação dessas fibras. Observaram que a recuperação do nervo através dessa técnica é superior àquela obtida

com a técnica de "cabo de enxerto", apontando uma vantagem potencial na utilização de autoenxerto de músculo para o reparo de nervos em humanos.

NORRIS<sup>69</sup> et al., (1988), aplicaram a técnica de autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento, no reparo de nervo digital em 8 pacientes com idade entre 15 e 61 anos. O material de enxerto foi obtido do músculo peitoral maior, que depois de tratado foi interposto coaxialmente entre os cotos proximal e distal do nervo lesado, por sutura epineural. Os pacientes foram avaliados pelo grau de recuperação das sensações táteis e discriminativas. Verificou-se um excelente nível de recuperação, demonstrando ser este um método que pode oferecer vantagens significativas sobre os enxertos de nervo convencional ou os "cabos de enxerto", especialmente quando uma grande extensão do nervo é envolvida.

GATTUSO<sup>28</sup> et al., em 1989, submeteram um grupo de ratos à reparação imediata de nervo ciático transecionado, utilizando a técnica de autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento, comparando-os a outro grupo onde a reparação foi tardia (de 3 a 56 dias após a lesão). Depois de 100 dias da cirurgia todos os animais foram estudados. Eles observaram que nos grupos de reparação tardia abaixo de 56 dias, apesar de haver uma redução significativa na média de remielinização das fibras, não havia diferença significativa no diâmetro e no número de fibras mielinizadas em relação ao grupo de reparação imediata. Porém, nos casos em que o reparo do nervo foi realizado após 56 dias da lesão, o resultado foi incompatível com a recuperação funcional.

PEREIRA<sup>72</sup> et al., (1990), trabalharam com o reparo de nervo tibial de cobaias, induzindo o granuloma micobacteriano, provocado pelo *Mycobacterium leprae* no nervo tibial desses animais. A avaliação foi feita entre 7 e 100 dias, no sentido de se observar o dano máximo ao nervo. A área do nervo correspondente ao granuloma foi então retirada, unindo-se os cotos com um autoenxerto de músculo vasto lateral desnaturado por choque térmico. A avaliação clínica após 5 meses mostrou boa recuperação sensorial e motora, compatível com os achados histológicos. Concluíram que a técnica de enxerto muscular pode ter grande valor no tratamento de lesões nervosas crônicas.

MATTAR<sup>63</sup> et al., (1990), realizaram lesões no nervo ciático de ratos, com reconstrução imediata, comparando os resultados de enxerto de nervo convencional e enxerto de membrana basal obtido do músculo glúteo máximo, após tratamento por congelamento-descongelamento. Depois de 60 dias do enxerto, os fragmentos intermediários e distais a este foram analisados revelando, à microscopia óptica, numerosos axônios mielinizados formando unidades de regeneração, sem diferenças morfológicas significativas entre os dois grupos, indicando a eficácia da regeneração quando se utiliza enxerto de membrana basal de músculo esquelético.

GSCHMEISSNER<sup>37</sup> et al., em 1990, realizaram autoenxerto de músculo esquelético tratado por congelamento-descongelamento, em nervo ciático de ratos. Depois de um período de 294 a 315 dias, os nervos foram processados histologicamente, coletando-se as porções proximal, intermediária e distal do nervo do grupo enxertado, bem como o nervo contralateral no mesmo nível

correspondente ao enxerto. Eles observaram que a regeneração foi bem sucedida através do enxerto muscular e o coto distal foi recolonizado. Após 300 dias do implante, a região correspondente ao enxerto mostrou a presença de minifascículos e no coto distal, evidenciou-se a arquitetura normal do nervo, ausência dos minifascículos e aspectos semelhantes à histologia do nervo controle. Apontam que diante de uma falha ou ruptura do perineuro, inicia-se a proliferação de células semelhantes às células perineurais, que envolvem as fibras nervosas no sentido de fornecer um ambiente endoneural apropriado à regeneração, o que ocorre em todas as formas de reparo de nervos periféricos.

GLASBY<sup>31</sup> et al., (1990), compararam a recuperação das características morfológicas, durante a regeneração de nervo femoral de carneiros, em tempos variáveis, acima de 10 meses após o reparo nervoso. Grupos de carneiros que receberam autoenxerto de músculo sartório tratado por congelamento-descongelamento, alinhado coaxialmente, foram comparados com aqueles que receberam três cordões de cabo de enxerto autógeno, originário de nervo cutâneo. Foi observado maior número de fibras nervosas na porção distal ao enxerto de músculo em relação ao cabo de enxerto, em todos os tempos após o implante (4, 6 e 10 meses). Os índices de maturação das fibras nervosas não eram significativamente diferentes entre os dois grupos aos 10 meses. Os autores concluíram que os enxertos de músculo podem ser usados com sucesso para o reparo de grandes nervos mistos danificados, em substituição ao cabo de enxerto.

GLASBY<sup>36</sup> et al., (1991), investigaram se os brotos axonais apresentavam especificidade por seus cotos distais homônimos durante a regeneração através de um enxerto muscular. Procederam a ressecção de 2 cm dos nervos mediano e ulnar de micos. Esse espaço foi preenchido por um enxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento. Num grupo de micos, os cotos proximal e distal de ambos os nervos foram suturados nas extremidades do enxerto muscular em seu arranjo anatômico ortotópico (com os nervos homônimos alinhados). Num segundo grupo de animais, os cotos distais dos nervos foram transpostos de forma que o coto distal do nervo ulnar fosse alinhado em relação ao coto proximal do nervo mediano e vice-versa. Após 5 meses, procederam o exame eletrofisiológico e, em seguida, o material foi processado histologicamente. Eles sugeriram não haver uma influência de tropismo específica entre os nervos homônimos e seus músculos alvo. Quanto ao diâmetro das fibras nervosas, não houve diferença significativa entre os grupos, indicando um grau similar de maturação, independentemente da rota de reconexão com os órgãos terminais. Os autores concluem que a reinervação do segmento nervoso distal pode ocorrer mesmo na ausência de quaisquer influências distais.

FENELEY<sup>23</sup> et al., (1991), utilizaram técnicas imunohistoquímicas para o estudo do crescimento axonal e migração das células de Schwann em nervo ciático de ratos, submetidos a enxerto muscular tratado pelo método de WALLIS<sup>104</sup> et al., (1980), para remoção do mioplasma. Observaram axônios em crescimento no enxerto onde a maioria estava associado às células de Schwann. A migração das células de Schwann em associação com axônios no

coto proximal, foi mais rápida e mais extensiva que no coto distal. Uma análise comparativa entre os enxertos musculares evacuado e não evacuado revelou que em 7 dias havia o dobro de axônios regenerados no grupo de enxerto evacuado, porém em 20 dias, o número de axônios era similar nos dois grupos. Os autores sugerem que a regeneração axonal é dependente da migração das células de Schwann.

BRYAN<sup>9</sup> et al., (1993), estudaram a influência da laminina, da matriz extracelular, sobre a regeneração nervosa periférica. Este estudo consistiu na comparação entre enxerto de lâmina basal muscular, tratado por congelamento-descongelamento e enxerto de nervo. Os enxertos de lâmina basal pré-tratados com anticorpos anti-laminina proporcionaram uma redução de até 90% do número total de axônios regenerados, com decréscimo significativo na velocidade de condução do nervo. Esses achados sugerem o importante papel da laminina da membrana basal na regeneração nervosa através de enxertos musculares.

A literatura relewa o aparecimento de uma nova maneira de se confeccionar o retalho muscular, através do trabalho de HALL & ENVER<sup>39</sup>, (1994), que consiste no pré-aquecimento do retalho muscular a 60°C e 80°C. Os enxertos musculares foram implantados no nervo ciático de ratos. Eles constataram que o padrão de reinervação através de enxertos tratados por aquecimento a 60°C era semelhante àquele observado através de enxertos tratados por congelamento-descongelamento. Embora o aquecimento a 60°C não elimine completamente as células musculares no enxerto, contribuindo

para uma falha clínica de muitos enxertos, observa-se que a presença de músculo em regeneração no enxerto, aparentemente não evita a regeneração axonal entre os tubos de sarcolema. Já nos enxertos aquecidos a 80°C, os cones de crescimento foram incapazes de penetrar nos enxertos, ainda ocupados com mioplasma. Os autores sugerem que o aquecimento além dos 60°C altere alguns componentes da lâmina basal, como a laminina e a fibronectina, necessários ao crescimento do axônio, sendo que estes componentes não se alteram pelo congelamento-descongelamento ou pelo aquecimento a 60°C. Consideram que a falha dos axônios e/ou células de Schwann em se desenvolver nos enxertos musculares tratados a 80°C, pode estar relacionada à inativação térmica dos componentes da lâmina basal, que são conhecidos por exercer importante função no crescimento axonal. Portanto, a ausência de fragmentação, facilidade de sutura e menor retração do enxerto tratado à 60°C, são fatores que podem ter importância no seu uso clínico.

Não obstante o sucesso no emprego de retalhos de músculo esquelético, tanto experimentalmente como em alguns casos clínicos, ainda tem-se defrontando com dificuldades na utilização dos enxertos e no preparo do material a ser transplantado. A literatura mostra basicamente três formas de se preparar o enxerto, cada uma delas com suas vantagens e desvantagens. Recentemente em nosso laboratório, foi desenvolvido um método baseado no emprego de anestésicos locais como elemento básico no preparo do enxerto (SOMAZZ<sup>90</sup>, 1994). Naquela ocasião o autor se preocupou apenas em

demonstrar a viabilidade do método por ele preconizado.

Neste trabalho, tivemos como objetivo avaliar a eficácia da regeneração axonal através de enxerto de lâmina basal muscular obtido por injeção intramuscular de cloridrato de lidocaína a 2%. Foram estudadas comparativamente as características morfológicas e quantitativas de axônios regenerados em autoenxerto de músculo e autoenxerto de nervo em relação ao controle, além da observação da regeneração espontânea.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 26 ratos Wistar fêmeas, com 6 a 7 semanas de idade, pesando em média 160 g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP.

Os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo I : 7 ratos que receberam autotransplante de músculo sóleo previamente tratado com cloridrato de lidocaína.

Grupo II : 7 ratos que receberam autotransplante de nervo ciático;

Grupo III : 5 ratos cujo nervo ciático foi seccionado e mantido em seu leito.

Grupo IV : 7 ratos utilizados para a análise morfo-quantitativa do nervo ciático normal.

### **1. GRUPO DE ENXERTO DE MÚSCULO (CONFECÇÃO E IMPLANTE)**

Para o preparo dos enxertos musculares, os animais foram levemente anestesiados por inalação de éter etílico. Procedeu-se então a depilação e assepsia do membro posterior direito do animal. Em seguida fez-se uma abertura de cerca de 10 mm de comprimento na região póstero-lateral da perna. Com seringa de 1 ml e agulha 13 x 4, injetou-se no músculo sóleo direito um volume de 0,1 ml de cloridrato de lidocaína (xylocaína<sup>R</sup>) a 2% -

Merrell Lepetit. A seguir, a ferida cirúrgica foi fechada com 3 pontos de fio de algodão 6-0 (ETHICON).

Após o efeito da anestesia, os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*, durante 24 horas, no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia - UNICAMP.

A retirada do retalho muscular ocorreu 24 horas após a injeção do cloridrato de lidocaína. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>R</sup> - 50 mg/ml) e cloridrato de tiazina (Rumpun<sup>R</sup> - 2 g/100 ml) 1:1, em dose de 0,3 ml/100 g de peso corporal. Após os primeiros sinais de anestesia geral, os animais foram posicionados em decúbito ventral e as regiões glútea e posterior da coxa esquerda foram depiladas. A seguir, a ferida cirúrgica do dia anterior foi aberta, expondo-se o músculo sóleo. Seccionou-se suas extremidades, retirando-se o ventre muscular e suturando-se novamente a pele.

Sob microscópio cirúrgico, fez-se a "lapidação" do retalho, onde o fragmento coletado sofreu uma fina dissecação, obtendo-se um bloco retangular de 5 mm de comprimento e espessura semelhante à do nervo ciático.

Logo após a obtenção do retalho muscular, realizou-se a cirurgia de implante. A pele da região glútea e posterior da coxa esquerda foi aberta com uma incisão de 15 mm, acompanhando o trajeto da projeção do nervo ciático na superfície. Os planos musculares foram afastados até visualização e exposição do nervo ciático. A uma distância padrão da borda inferior do

músculo glúteo, fez-se uma secção no nervo utilizando uma tesoura microcirúrgica.

A fenda produzida pela retração natural dos cotos nervosos foi medida com papel milimetrado e a retirada de um pequeno fragmento do nervo ciático foi necessária para padronizar o tamanho da fenda em 5 mm. Nesse espaço procedeu-se a fixação do retalho muscular, com 2 pontos de sutura epineural em cada coto, utilizando-se fio monofilamento nylon 10-0 DERMALON (Fig. 1). Em todos os casos, tomou-se o cuidado para que os cotos não ficassem sob tensão.

## **2. GRUPO DE ENXERTO DE NERVO**

Em relação à assepsia e anestesia, os animais deste grupo foram submetidos aos mesmos procedimentos empregados no grupo anteriormente descrito. Após exposição e visualização do nervo, seccionou-se um fragmento de 5 mm do nervo ciático esquerdo. Este sofreu uma inversão de 180° e foi imediatamente fixado aos cotos, por dois pontos de sutura epineural, utilizando-se fio monofilamento nylon 10-0 DERMALON.

Após a recuperação anestésica, os animais foram mantidos nas mesmas condições daqueles do grupo anterior.

### **3. GRUPO PARA OBSERVAÇÕES DA REGENERAÇÃO ESPONTÂNEA**

Os procedimentos para anestesia, assepsia e exposição do nervo ciático foram os mesmos citados anteriormente. O nervo ciático esquerdo foi seccionado e mantido em seu leito, preservando-se uma fenda de 5 mm entre suas extremidades.

Em todos os grupos experimentais, após os procedimentos cirúrgicos, realizou-se a sutura dos planos muscular e cutâneo, com fio de algodão 6-0 (ETHICON). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, com ração e água *ad libitum*.

### **4. GRUPO CONTROLE**

Os animais desse grupo, apesar de não terem sofrido intervenção cirúrgica, permaneceram sob as mesmas condições daquelas dos demais grupos experimentais.

### **5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E RETIRADA DO MATERIAL**

Após o período de sobrevivência de 50 dias, os animais foram anestesiados com uma mistura de 1:1 de cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>R</sup> - 50 mg/ml) e

cloridrato de tiazina (Rumpun<sup>R</sup> - 2 g/100ml) em dose de 0,3 ml/100g de peso corporal.

O nervo ciático esquerdo foi exposto e fixado *in situ* à 4°C, durante 10 minutos com fixador Karnovsky (1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.3.

Os nervos ciáticos dos animais dos grupos I e II foram retirados e em seguida divididos em 3 porções correspondendo a: 1) região do coto proximal, 2) região do retalho, e 3) região correspondente ao coto distal. Estas porções foram identificadas a partir dos pontos de sutura que permaneceram no local, desde a realização das cirurgias.

Os animais do grupo III também tiveram o nervo ciático dividido nas porções proximal, intermediária e distal, porém a determinação destas porções se deu pela característica do tecido que interpunha os cotos nervosos, que se apresentava como um fino cabo de união, em alguns animais, ou como uma massa semelhante a um neuroma, em outros.

Os animais do grupo controle tiveram o nervo ciático esquerdo seccionado na região correspondente ao enxerto nos demais grupos experimentais.

Os fragmentos do nervo ciático dos animais dos 4 grupos experimentais foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.3, por duas horas, imersos em uranila 5% durante 24 horas, desidratados em

soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA).

Foram obtidos cortes transversais de 1  $\mu$ m com navalha de vidro, em ultramicrotomo LKB, que foram corados com azul de toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1%, para microscopia óptica. Cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante e corados com acetato de uranila a 5%, em água e citrato de chumbo (REYNOLDS<sup>76</sup>, 1963).

## **6. ANÁLISE QUANTITATIVA**

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se um método de contagem por amostragem, descrito a seguir:

Os cortes semi-finos foram fotografados em fotomicroscópio CARL ZEISS, obtendo-se a imagem do corte transversal com objetiva de 6.3x, o que permitiu calcular a área total do nervo através das fotos.

Em seguida fotografou-se também 5 campos em cada corte transversal, aleatoriamente distribuídos, com objetiva de 100x, a partir do que se pôde calcular a área de cada campo.

Esse procedimento envolveu os cotos proximais e distais dos grupos de enxerto de nervo e músculo, bem como os nervos controle.

Quando o nervo apresentava dois ou mais fascículos, suas áreas eram calculadas separadamente e posteriormente somadas para se obter a área total.

As medidas das fotos (em mm<sup>2</sup>) foram informadas a um computador DIGITAL - DEC pc 333 sxLp, acoplado a uma mesa digitalizadora Summa Sketch II - professional Summagraphics. Após a calibração do equipamento, este pôde calcular a proporção entre os dois diferentes aumentos, obtendo-se as áreas do nervo como um todo e de cada campo analisado.

Em seguida foi feita a contagem simples de cada axônio, em todos os campos analisados, com o auxílio de um contador digital.

O valor da amostra foi obtido dividindo-se a somatória da área dos 5 campos pela área total do nervo, multiplicando-se por 100 para se chegar à porcentagem da amostra, que foi de 5%.

Exemplo: Área total do nervo = 5.08782 mm<sup>2</sup>

$\Sigma_A$  campos = 0.258 mm<sup>2</sup>

$0.258 : 5.08782 \times 100 = 5.0\%$

portanto, 5.0% é o valor da amostra

Através de regra de três simples, multiplicando-se o número de axônios presentes na amostra por 100 e dividindo-o pelo valor da amostra, obteve-se a estimativa do número de axônios presentes em cada região do nervo estudado.

Diante do valor da amostra, a soma do número de axônios contados

em cada campo correspondeu ao total de axônios presentes na amostra

ou seja:

$$\begin{array}{r} 409 \text{ axônios} \text{ ----- } 5.0\% \\ x \text{ ----- } 100\% \\ x = 8.180 \text{ axônios} \end{array}$$

O grupo de regeneração espontânea não foi submetido à análise morfométrica, uma vez que a regeneração axonal foi absolutamente precária, restringido-se a raros axônios de diâmetro reduzido.

## 7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Após a obtenção da área de cada campo em relação à área total do nervo, bem como do número de axônios em cada campo, as médias do número de axônios dos cotos proximal e distal de cada nervo foram calculadas.

De posse desses dados, aplicou-se o "teste F" e em seguida o "teste de Tukey", que permitiu estabelecer a diferença mínima significativa, ou seja, a menor diferença de médias de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa, em determinado nível.

## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS NO LOCAL DO ENXERTO

Após 50 dias do implante, as características morfológicas do nervo regenerado nos animais que receberam enxerto de músculo sóleo e enxerto de nervo, eram semelhantes entre si. Reconheceu-se facilmente o local do enxerto, uma vez que se apresentava mais espessado e com coloração ligeiramente amarelada em relação ao restante do nervo. Chamou a atenção a maior quantidade de tecido conjuntivo nessa região, caracterizado pela aderência do nervo aos tecidos vizinhos (Fig. 2).

No grupo de regeneração espontânea, os aspectos macroscópicos do nervo ciático, de um modo geral, mostraram perda de rota, neuroma e fibrose. Estes achados foram confirmados na análise histológica. Alguns animais apresentavam um "cabo" de regeneração delgado unindo as duas extremidades do nervo. Outros animais tinham o nervo ciático se dirigindo diretamente aos músculos da coxa, o que também foi confirmado na análise histológica, onde raros feixes de axônios eram observados em meio às fibras musculares.

## 2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO NERVO NORMAL

Nos sete animais analisados, os aspectos morfológicos acompanhavam a descrição da literatura. Foram identificados axônios mielínicos, cada qual envolvido pela célula de Schwann e bainha de mielina, bem como grupos de axônios amielínicos, onde uma única célula de Schwann, através de suas projeções citoplasmáticas, envolvia vários axônios desprovidos de mielina. Tanto as fibras mielínicas quanto as amielínicas eram envolvidas por uma membrana basal delgada e contínua.

Envolvendo externamente os fascículos nervosos observou-se o epineuro, que se apresentava vascularizado e com espessura maior que das demais bainhas conjuntivas, apresentando mastócitos com relativa frequência.

Envolvendo cada fascículo nervoso se observou o perineuro, constituído por várias camadas de células com aspecto fusiforme, dispostas concêntricamente, permeadas por fibras colágenas. Em seu citoplasma estavam presentes mitocôndrias e muitas vesículas eletrólucidas dispersas aleatoriamente. Estas células perineurais se caracterizam pela presença de membrana basal .

No endoneuro, foram observados feixes de fibras colágenas, aparentemente de diâmetro menor que o colágeno epineural, dispostas paralelamente aos axônios, além de capilares de diâmetro variável, porém menores que os epineurais, e eventualmente, mastócitos e fibroblastos. A

ultraestrutura do axoplasma exibia neurofilamentos, microtúbulos e mitocôndrias, também dispersos aleatoriamente (Figs. 18 e 19).

### **3. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO COTO PROXIMAL**

Nos animais dos três grupos experimentais as características histológicas foram semelhantes. Foram observadas fibras nervosas mielinizadas que apresentavam diferentes diâmetros, com bainhas de mielina de espessura variável (Figs. 4 e 5). A arquitetura geral, bem como a ultraestrutura das fibras nervosas do coto proximal dos animais que receberam autoenxerto de músculo, mostravam-se no geral dentro da normalidade. Contudo, em alguns animais, foram observados alguns axônios em degeneração. Este quadro não difere daquele visto para os casos em que os animais receberam autoenxerto de nervo, bem como nos de regeneração espontânea. A degeneração caracterizava-se por sinais de retração e desintegração da bainha de mielina, seguida por segmentação do axoplasma e rompimento das mitocôndrias (ver figuras 6 e 7).

### **4. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DA REGIÃO DO ENXERTO**

A regeneração axonal ocorreu em todos os animais dos grupos de enxerto de músculo e de enxerto de nervo.

As fibras nervosas se apresentaram tipicamente distribuídas, com

formação de minifascículos. Estes apresentavam um número variável de axônios em seu interior, mais agrupados no centro do enxerto que periféricamente (Figs. 8 e 9). Envolvendo cada minifascículo se observava células semelhantes às células perineurais (Fig. 8).

Alguns axônios mostravam sinais de degeneração, definidos pela retração da bainha de mielina, além do aumento do número de vasos sanguíneos e células de Schwann. À microscopia eletrônica observava-se a retração da membrana axolemal em relação à camada mais interna da bainha de mielina, aumento da eletrondensidade do axoplasma e desintegração da bainha de mielina. O diâmetro dos axônios e espessura das respectivas bainhas de mielina eram visivelmente menores ao nível dos enxertos, em relação ao coto proximal (comparar Figs. 4 e 5 com Figs. 8 e 9). Observou-se também a presença de alguns mastócitos. No mais, os axônios mostraram-se normais; o axoplasma se apresentava constituído de neurofilamentos, microtúbulos e mitocôndrias (Figs. 10 e 11 ).

## **5. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO COTO DISTAL**

Houve recolonização do coto distal em todos os animais dos grupos de enxerto de músculo e enxerto de nervo. Os cotos distais se mostraram reorganizados em fascículos, envolvidos pela bainha perineural. As células perineurais estavam dispostas concentricamente ao redor dos fascículos, formando várias camadas, intercaladas por fibras colágenas.

O epineuro que envolvia esses fascículos estava composto por fibras colágenas, com disposição longitudinal ao nervo, além de fibroblastos e vasos sanguíneos. Em alguns casos, evidenciou-se a presença de minifascículos no epineuro. O endoneuro mostrou maior quantidade de colágeno.

Foram observadas fibras nervosas mielínicas com menor diâmetro e bainhas de mielina mais delgadas em relação ao coto proximal, porém, a disposição geral dessas fibras era semelhante ao nervo normal, estando ausentes os minifascículos (Figs. 12, 13, 14 e 15). Observar também fig. 16.

Foi possível perceber nitidamente as diferenças entre coto proximal, região do enxerto e coto distal dos dois primeiros grupos experimentais, comparados entre si e com o controle (Figs. 4 e 5; 8 e 9; 12 e 13). Observar também Fig. 20.

Para o grupo de regeneração espontânea, em geral, houve um pobre crescimento axonal. Apesar da presença de minifascículos na região correspondente ao espaço deixado entre os dois cotos nervosos, os axônios não recolonizaram o coto distal, na maior parte dos casos (Fig. 17).

Em apenas um dos cinco animais estudados, houve recolonização do coto distal, que apresentou axônios mielínicos organizados em três fascículos, envolvidos por perineuro e epineuro, sendo que vários axônios mostraram sinais de degeneração. Chamava a atenção a presença de mastócitos, indicando uma possível reação inflamatória no local.

Um dos casos permitiu observar um pequeno grupo constituído de 5 axônios, em meio a grande quantidade de tecido adiposo. Não era possível

observar o perineuro envolvendo esses axônios. Em dois casos, observou-se pequenos feixes de fibras mielinizadas, envolvidos por perineuro e vários axônios mostravam sinais de degeneração. Esses se localizavam no interstício de células musculares. Num outro caso, observou-se a formação de três fascículos, envolvidos por perineuro, porém mostrando extensa proliferação de tecido fibroso. Aqui também havia presença de mastócitos.

## 6. ANÁLISE QUANTITATIVA

O **coto proximal** do nervo dos grupos de enxerto de nervo e enxerto de músculo, foi avaliado e comparado ao grupo controle. Observou-se uma diferença significativa na média de axônios entre o grupo de enxerto de nervo ( $11039,00 \pm 1943,69$ ) e o controle ( $8012,57 \pm 351,64$ ), ao nível de 1% de probabilidade, porém, apesar de haver maior número de axônios no grupo de enxerto de nervo ( $11039,00 \pm 1943,69$ ) que no enxerto de músculo ( $9245,14 \pm 713,07$ ), essa diferença não foi significativa ao mesmo nível de probabilidade.

A mesma avaliação se fez para o **coto distal**, onde se observou que a média do número de axônios no grupo de enxerto de nervo ( $13592,43 \pm 1420,04$ ) e no grupo de enxerto de músculo ( $13792,57 \pm 1145,10$ ) eram estatisticamente diferentes da média do grupo controle ( $8012,57 \pm 351,64$ ), ao nível de 1% de probabilidade. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos de enxerto de nervo e enxerto de músculo neste nível.

No **grupo de enxerto de músculo**, a média do número de axônios no coto distal era maior ( $13792,57 \pm 1145,10$ ) e estatisticamente diferente do coto proximal ( $9245,14 \pm 713,07$ ) e do controle ( $8012,57 \pm 351,64$ ), ao nível de 1% de probabilidade.

O **grupo de enxerto de nervo** também foi analisado, sendo que o coto distal apresentou um número médio de axônios maior ( $13592,43 \pm 1420,04$ ) e estatisticamente diferente do coto proximal ( $11039,00 \pm 1943,69$ ) e do controle ( $8012,57 \pm 351,64$ ), ao nível de 1% de probabilidade.

Os resultados quantitativos foram expressados na tabela 1, a seguir:

Tabela 1: Número de axônios por tratamento

Repetição	Enxerto Músculo		Enxerto Nervo		Controle
	CPM	CDM	CPN	CDN	CN
1	8620	11833	10955	13577	8162
2	9041	14163	12594	13507	7914
3	8451	14725	8303	11893	8180
4	8909	13145	11545	14348	8594
5	9269	13730	12245	12441	8035
6	10196	13564	13155	13126	7550
7	10230	15388	8476	16255	7653
média	9245,14	13792,57	11039,00	13592,43	8012,57
desvio	713,07	1145,10	1943,69	1420,04	351,64
C.V.	7,71	8,30	17,61	10,45	4,39

Legenda:

CPM : coto proximal - enxerto de músculo

CDM : coto distal - enxerto de músculo

CPN : coto proximal - enxerto de nervo

CDN : coto distal - enxerto de nervo

CN : controle

## FIGURAS

Fig. 1 - Aspecto pós-cirúrgico do implante de músculo previamente tratado com o anestésico. Observar os pontos de sutura (setas retas). Aumento 15x.

Fig. 2 - Nervo ciático regenerado após 50 dias do enxerto muscular. Observar que a região do enxerto pode ser delimitada pelos pontos de sutura presentes (setas retas). Aumento 15x.

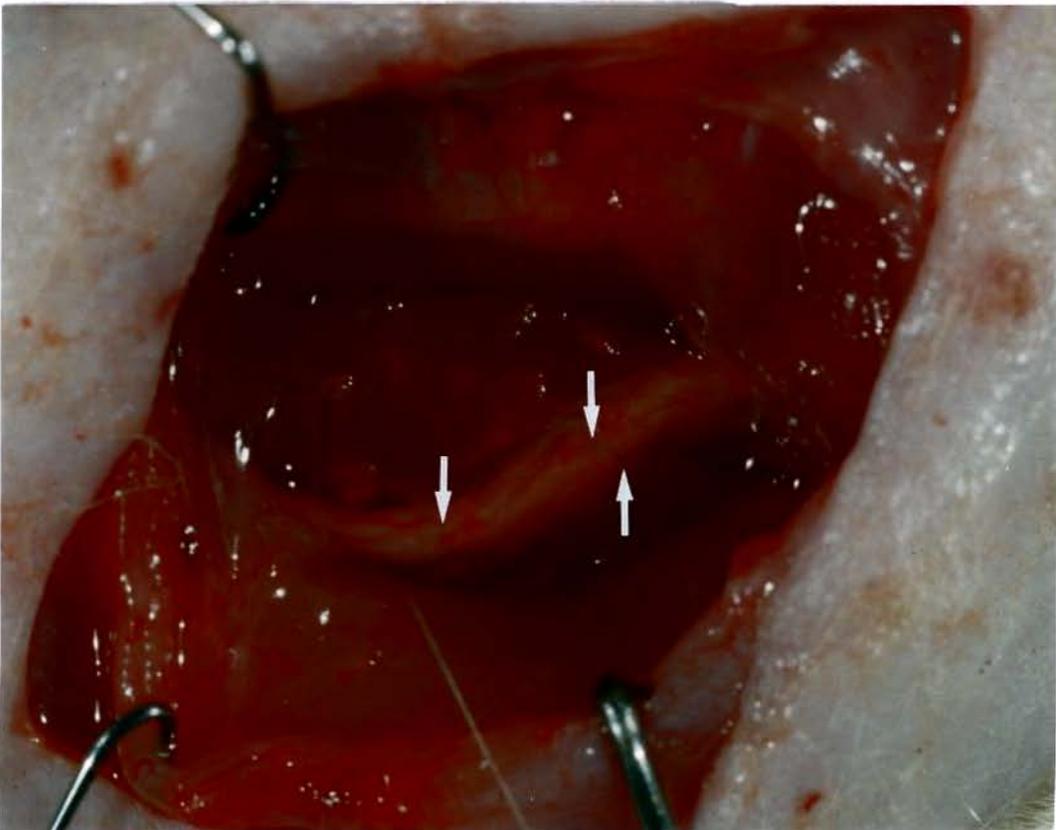
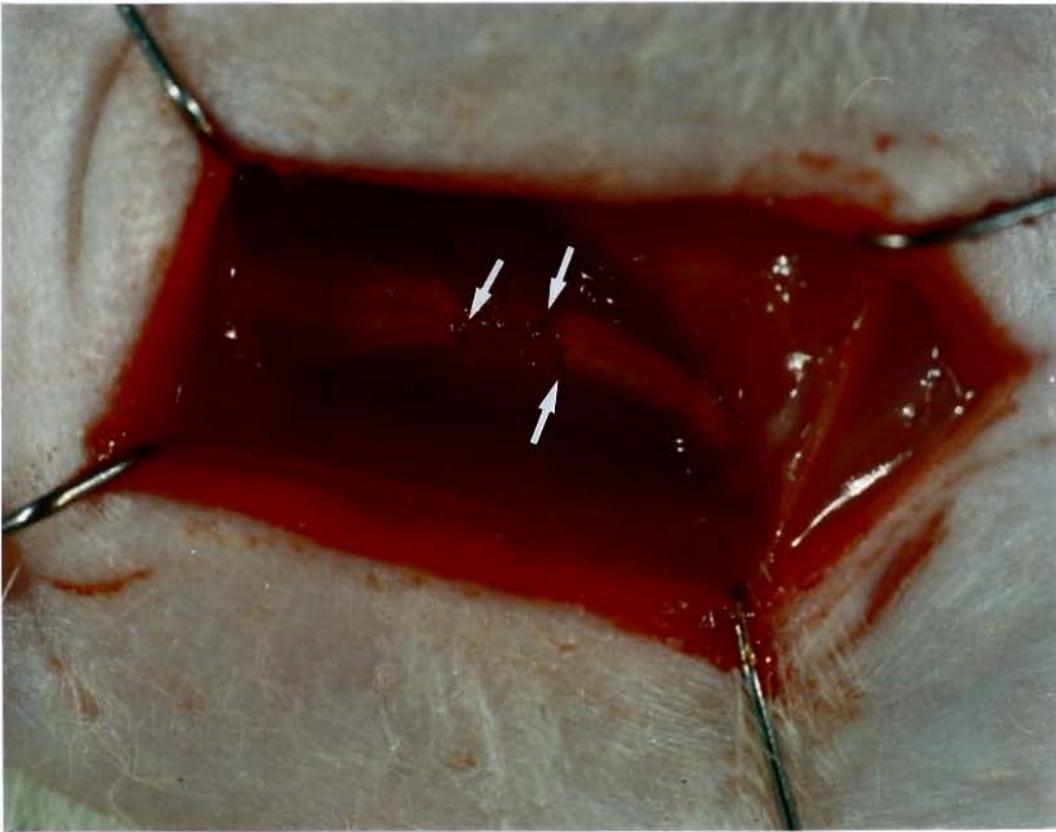


Fig. 3 - Aspecto histológico do músculo sóleo 24 horas após a injeção de cloridrato de lidocaína. Observar ausência de conteúdo sarcoplasmático na maioria das fibras (cabeça de seta). HE. 400x.

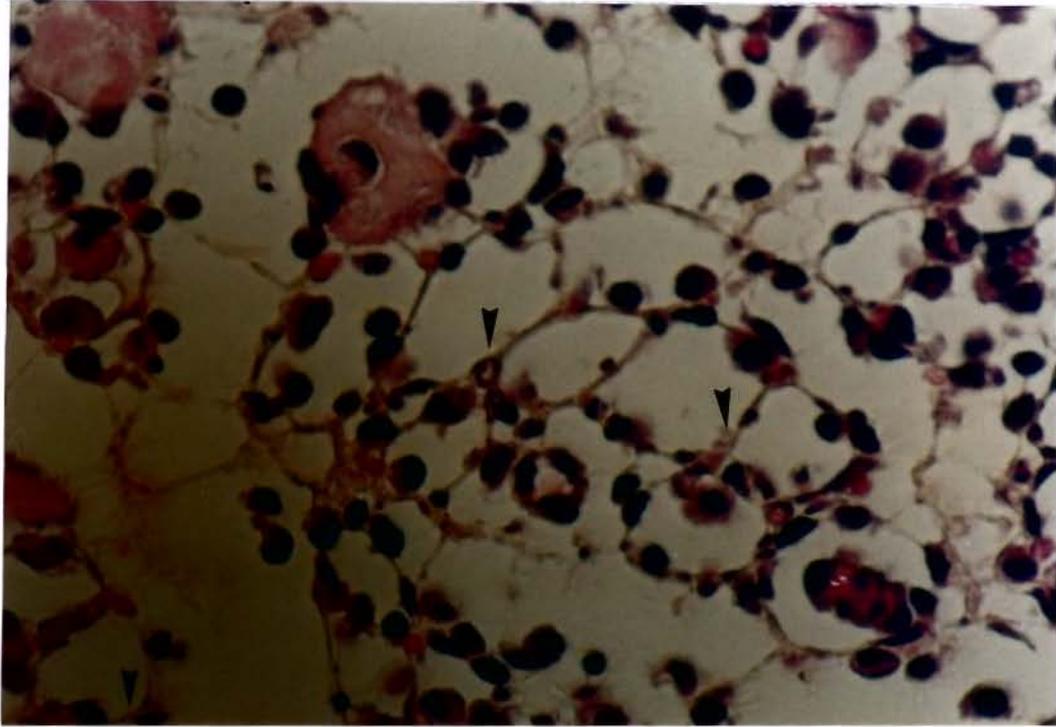


Fig. 4 - Corte transversal do coto proximal do nervo ciático de rato (GRUPO DE ENXERTO DE MÚSCULO). Observar a distribuição das fibras nervosas, o diâmetro dos axônios e espessuras variáveis das bainhas de mielina. Notar também vaso sanguíneo (V) e axônios em degeneração (setas retas). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

Fig. 5 - Corte transversal do coto proximal do nervo ciático de rato (GRUPO ENXERTO DE NERVO). Observar a disposição das fibras nervosas, vários axônios em degeneração (setas retas) e vaso sanguíneo (V). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

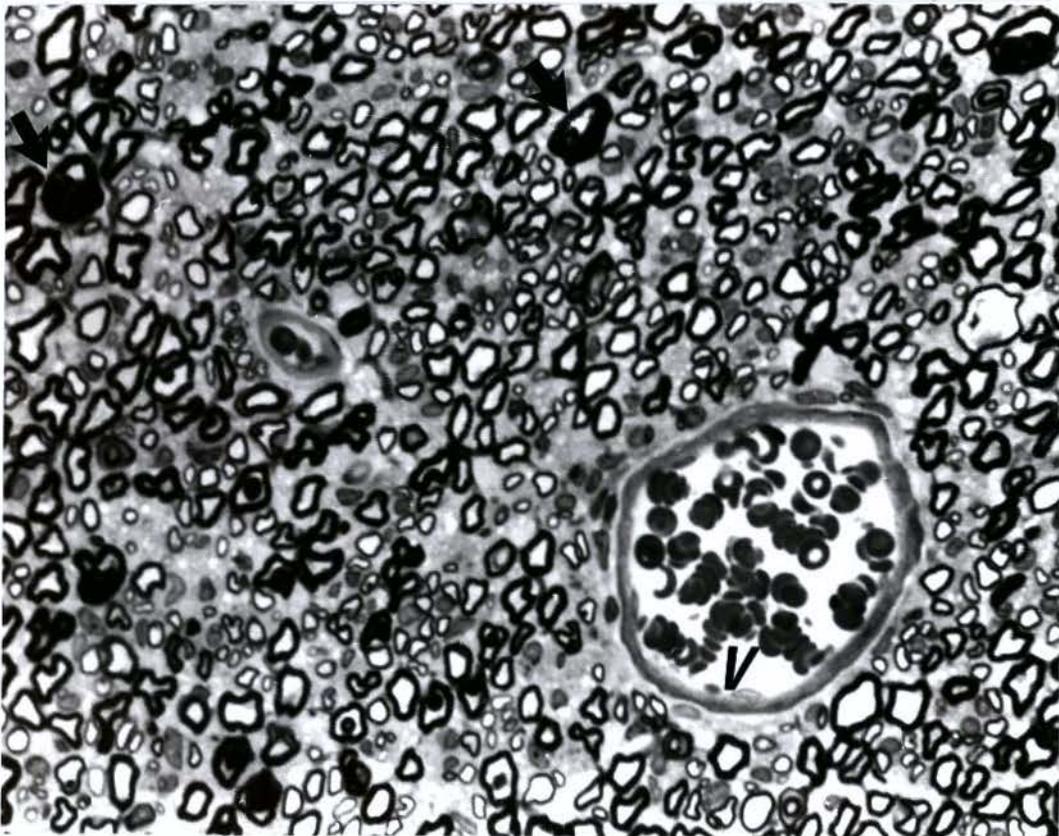
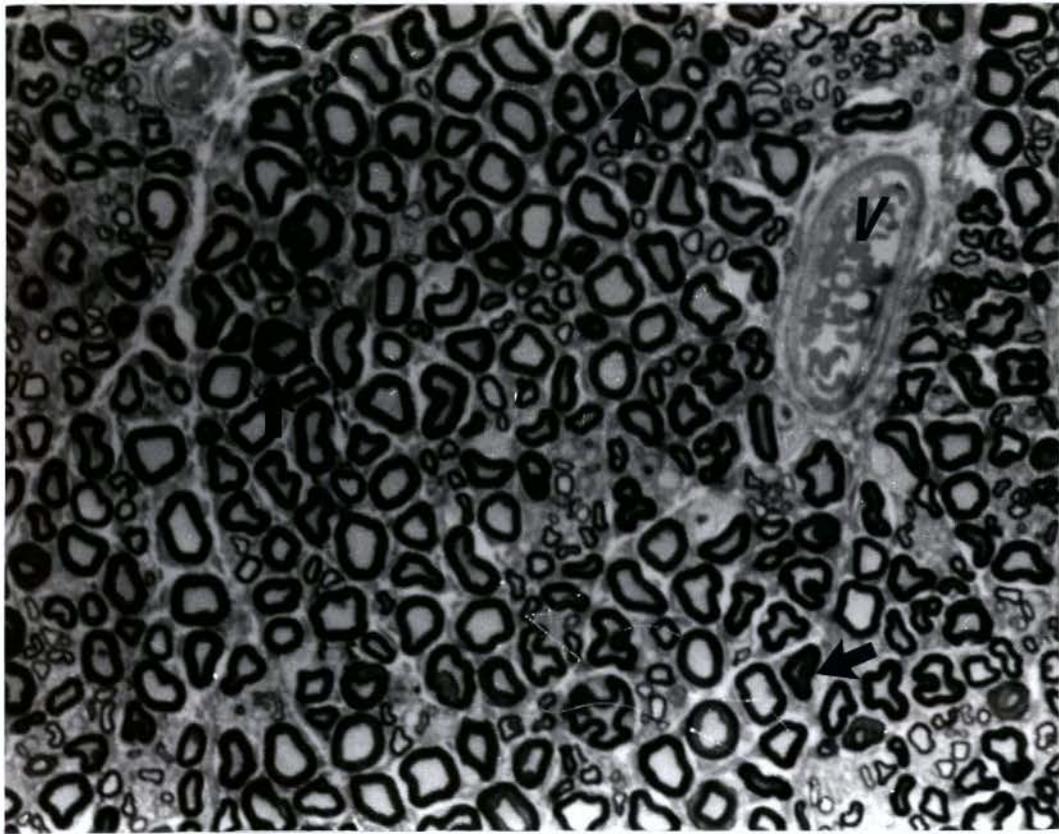


Fig. 6 - Micrografia eletrônica do coto proximal do nervo ciático de rato (GRUPO DE ENXERTO DE MÚSCULO). Observar axônios mielínicos (Mie), axônios amielínicos (★), célula de Schwann (S), axônio em degeneração (seta reta) e colágeno (COL). Tetróxido de ósmio. Aumento 5.076x.

Fig. 7 - Micrografia eletrônica do coto proximal do nervo ciático de rato (GRUPO DE ENXERTO DE NERVO). Observar axônios em degeneração com evidente desintegração da bainha de mielina (setas curvas) e núcleos de Schwann (S). Tetróxido de ósmio. Aumento 6.490x.

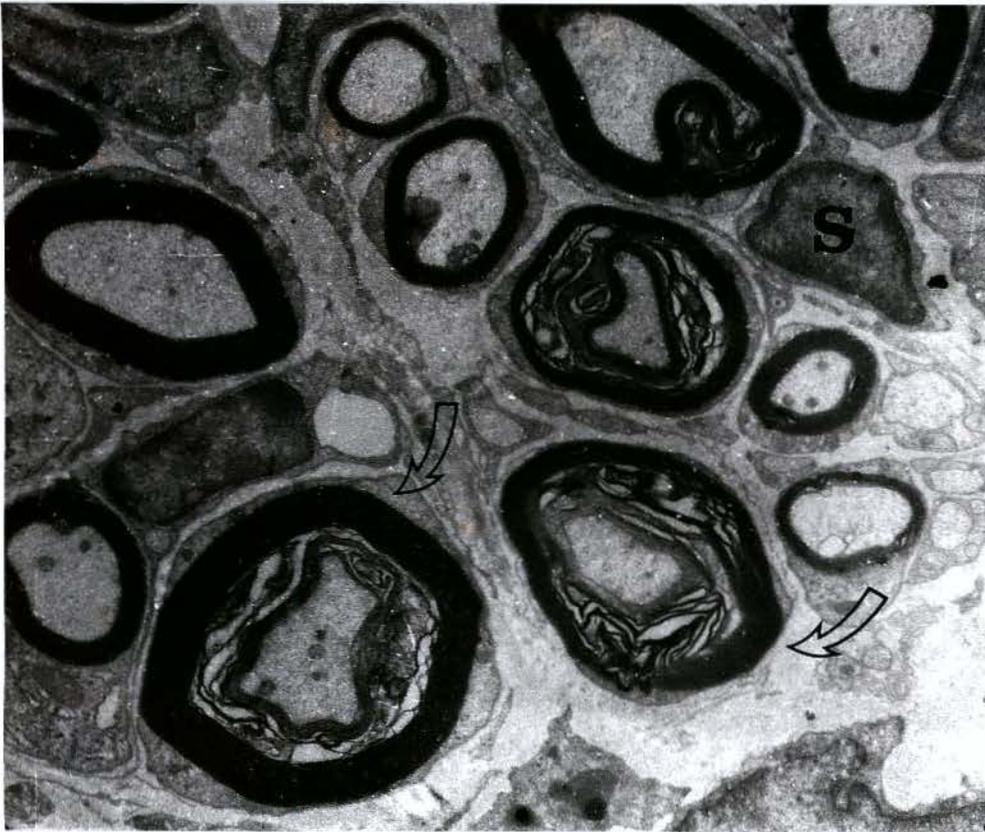
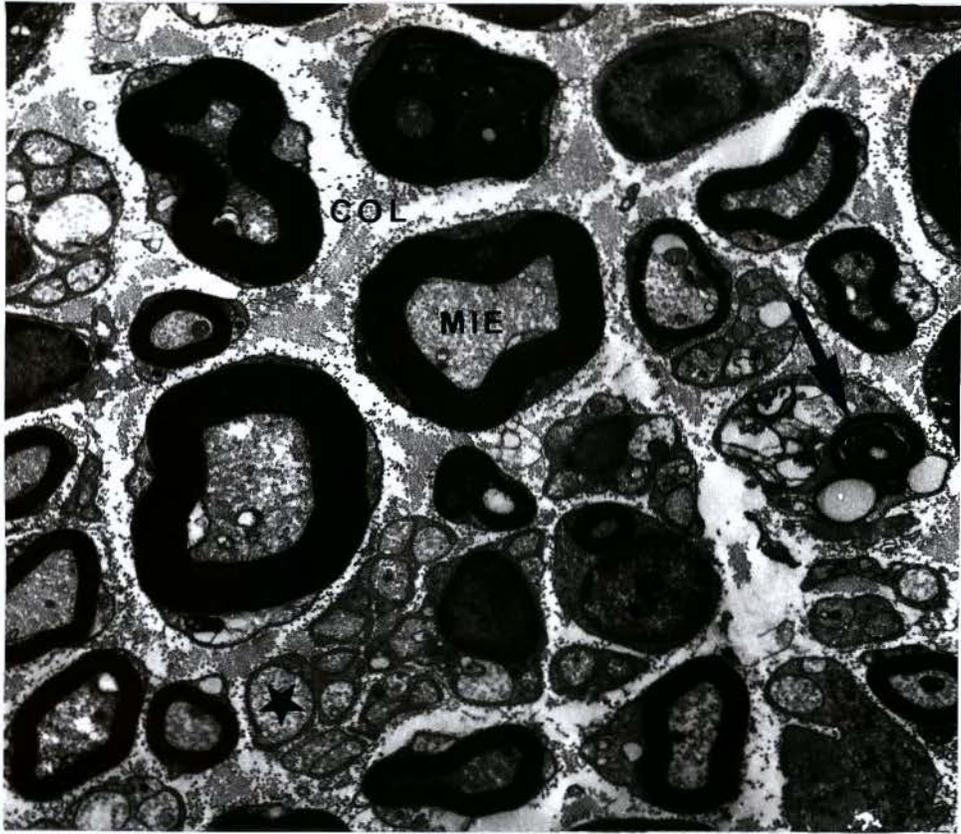


Fig. 8 - Corte transversal do nervo ciático regenerado ao nível do enxerto de músculo. Observar formação de minifascículos, perineuro (seta reta) e vaso sanguíneo (seta curta). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

Fig. 9 - Corte transversal do nervo ciático regenerado ao nível do enxerto de nervo. Notar minifascículos (setas curtas). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

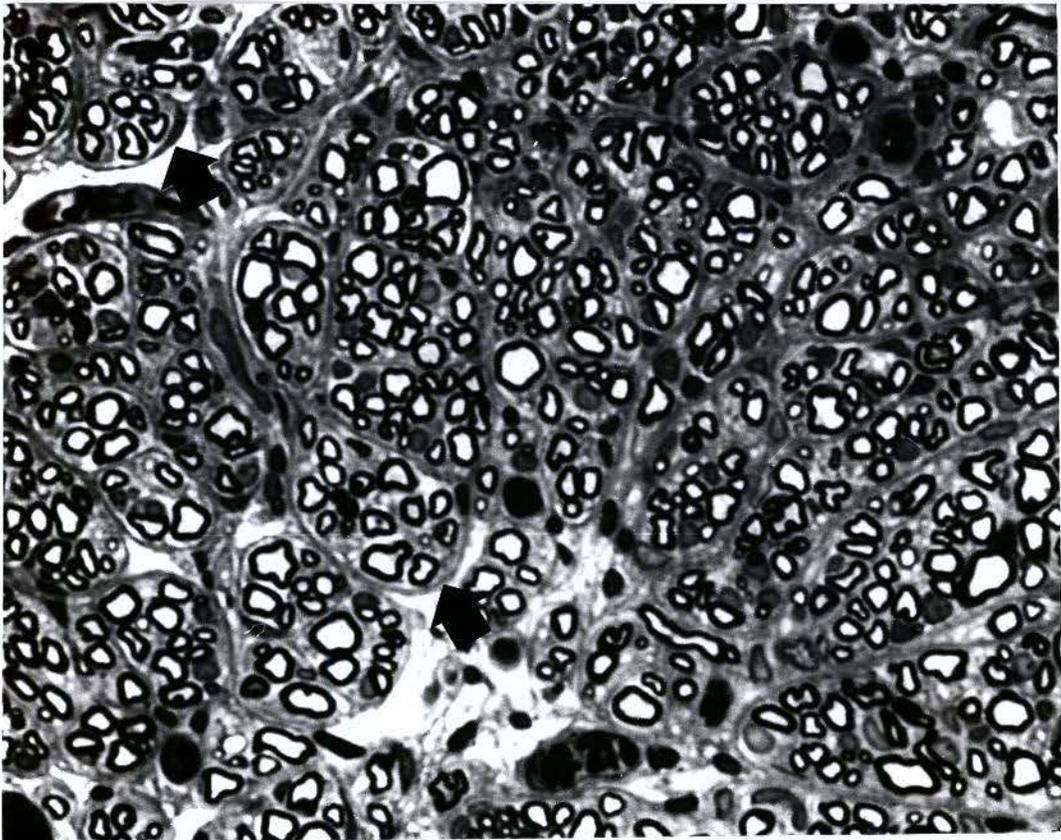
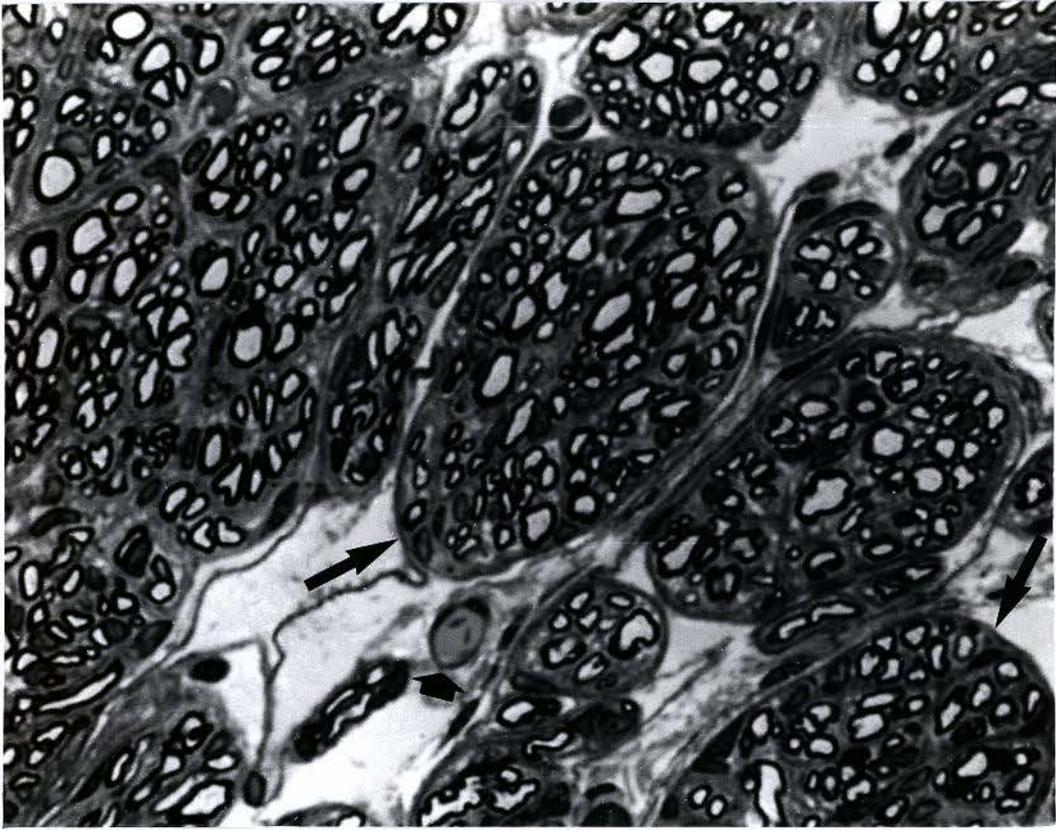


Fig. 10 - Micrografia eletrônica mostrando minifascículos ao nível do enxerto muscular. Observar o interior de um minifascículo contendo vários axônios mielínicos (Mie) e amielínicos (★), núcleo da célula de Schwann (S) e núcleo de célula perineural (P). Tetróxido de ósmio. Aumento 11.850x.

Fig. 11 - Micrografia eletrônica mostrando o núcleo da célula perineural (P) e o axoplasma com microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias (AXP), ao nível do enxerto muscular. Tetróxido de ósmio. Aumento 11.850x.

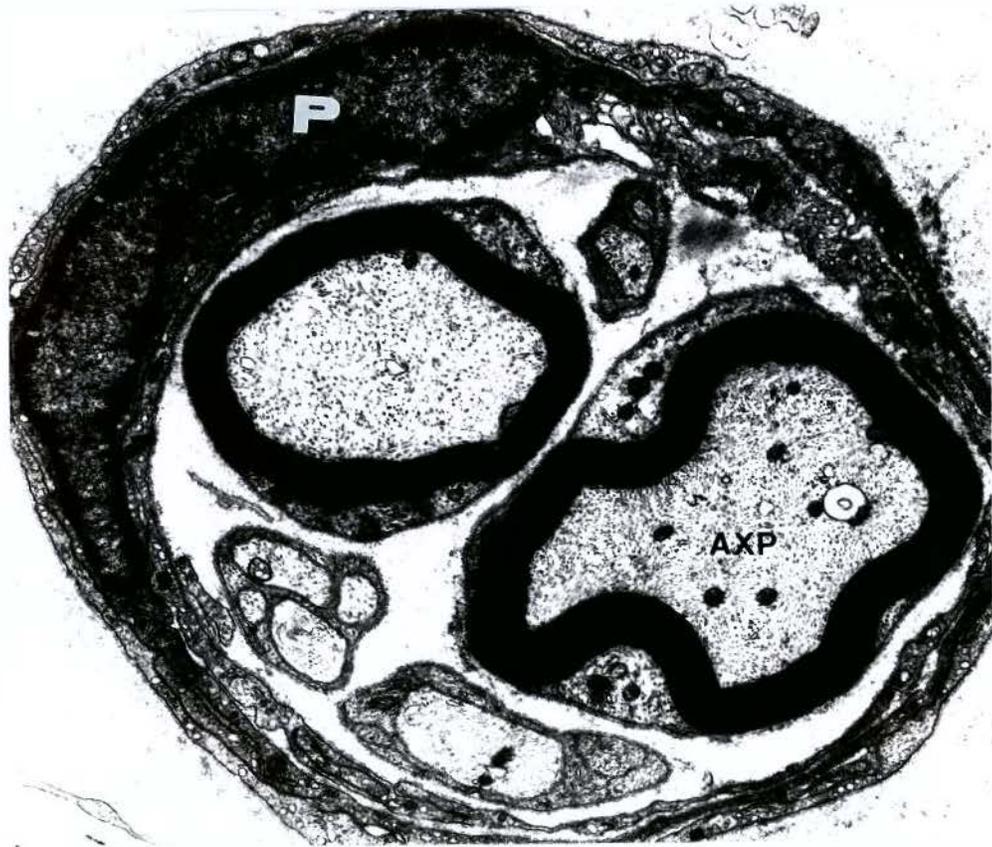


Fig. 12 - Corte transversal do coto distal do nervo ciático (GRUPO ENXERTO DE MÚSCULO). Observar distribuição característica dos axônios mielínicos (setas retas), vasos sanguíneos (V). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

Fig. 13 - Corte transversal do coto distal do nervo ciático (GRUPO ENXERTO DE NERVO). Notar distribuição dos axônios mielínicos (setas retas) e vasos sanguíneos (V). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

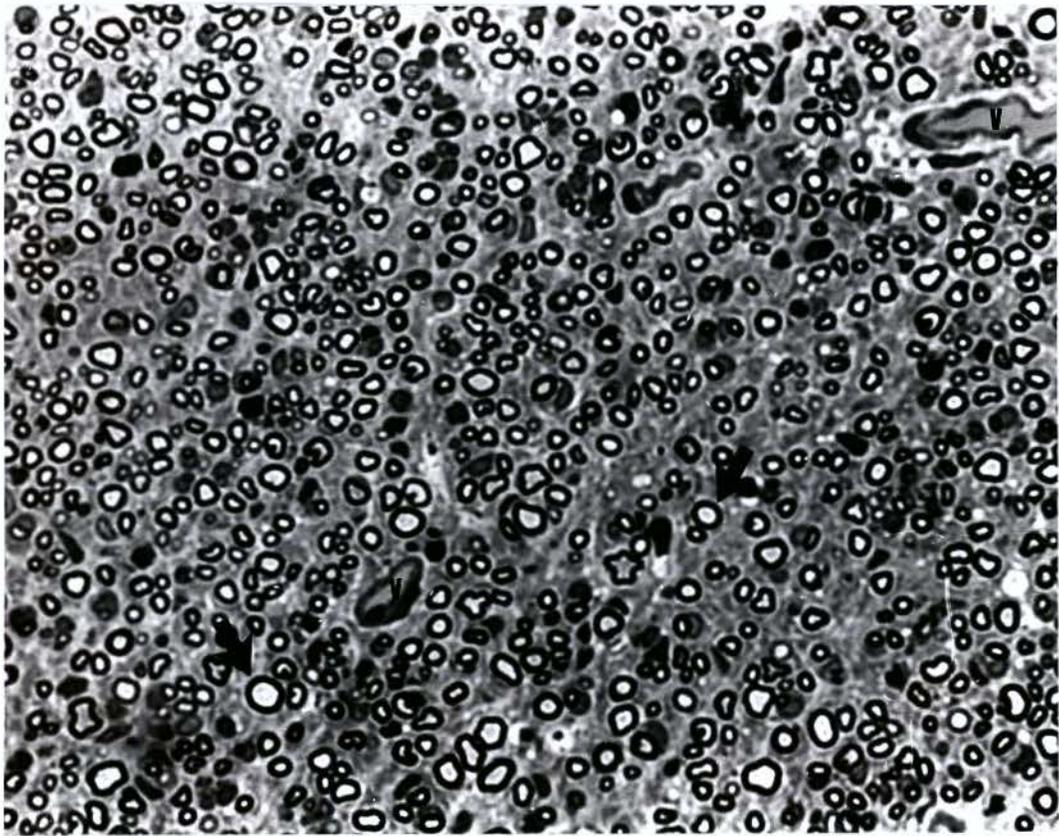
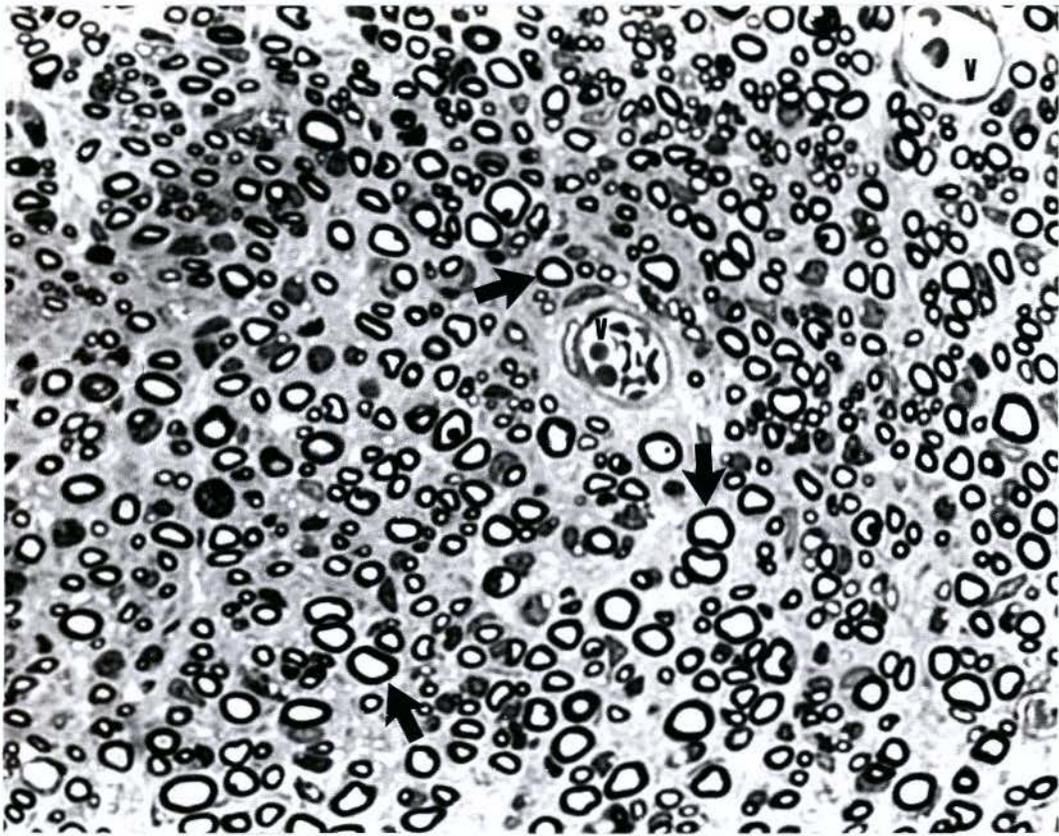


Fig. 14 - Corte semifino ao nível do coto distal do nervo ciático (GRUPO ENXERTO DE MÚSCULO). Observar diâmetro dos axônios e espessuras das bainhas de mielina, axônios em degeneração (setas retas). Tetróxido de ósmio. Aumento 575x.

Fig. 15 - Corte semifino ao nível do coto distal do nervo ciático (GRUPO ENXERTO DE NERVO). Observar axônios regenerados (setas curtas), axônios em degeneração (setas longas), mastócito (cabeça de seta). Tetróxido de ósmio. Aumento 575x.

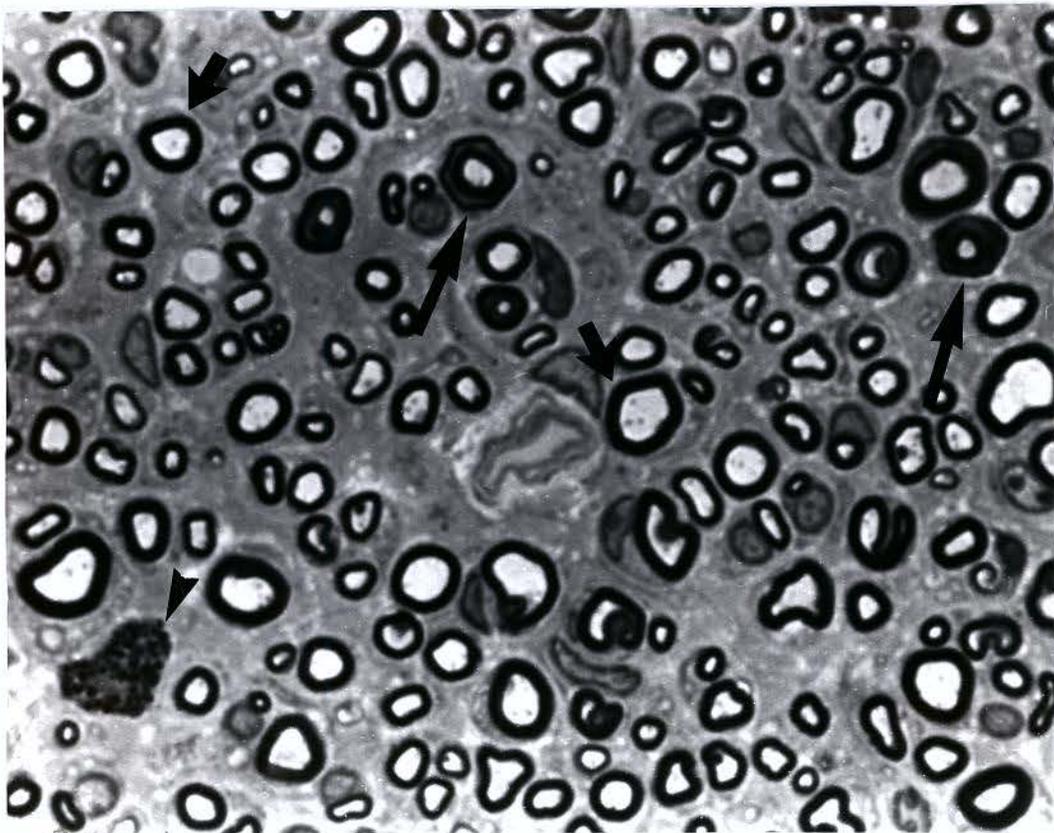
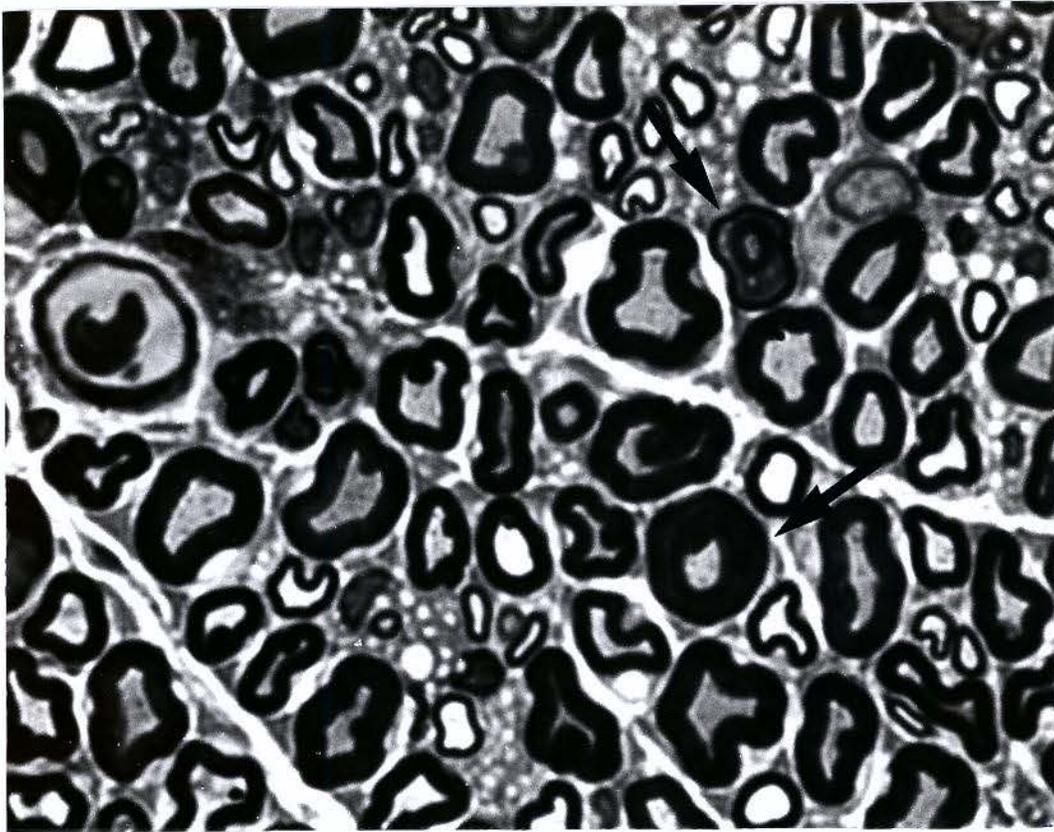


Fig. 16 - Micrografia eletrônica do coto distal do nervo ciático (GRUPO ENXERTO DE MÚSCULO). Observar axônios mielínicos (Mie), axônios amielínicos (★) e núcleo da célula de Schwann (S). Tetróxido de ósmio. Aumento 13.035x.

Fig. 17 - Corte transversal do nervo ciático (GRUPO DE REGENERAÇÃO ESPONTÂNEA), ao nível do segmento distal. Observar ausência de fibras nervosas e vários núcleos de fibroblastos (setas retas) e mastócitos (setas curvas). Tetróxido de ósmio. Aumento 230x.

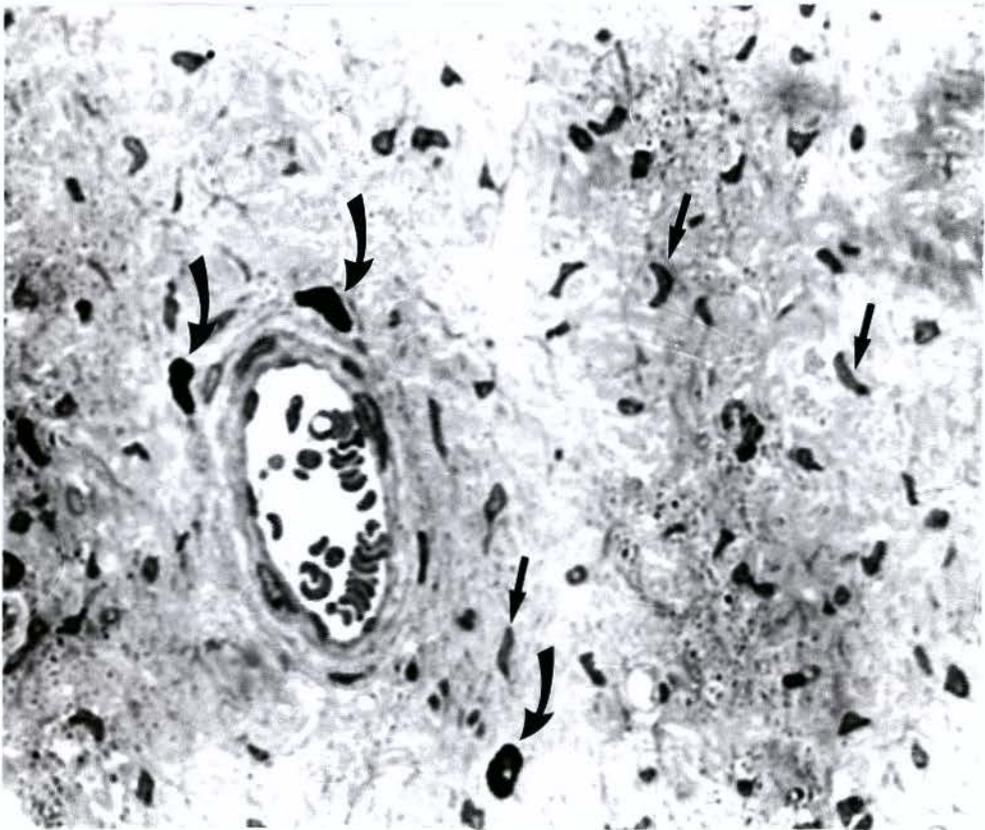
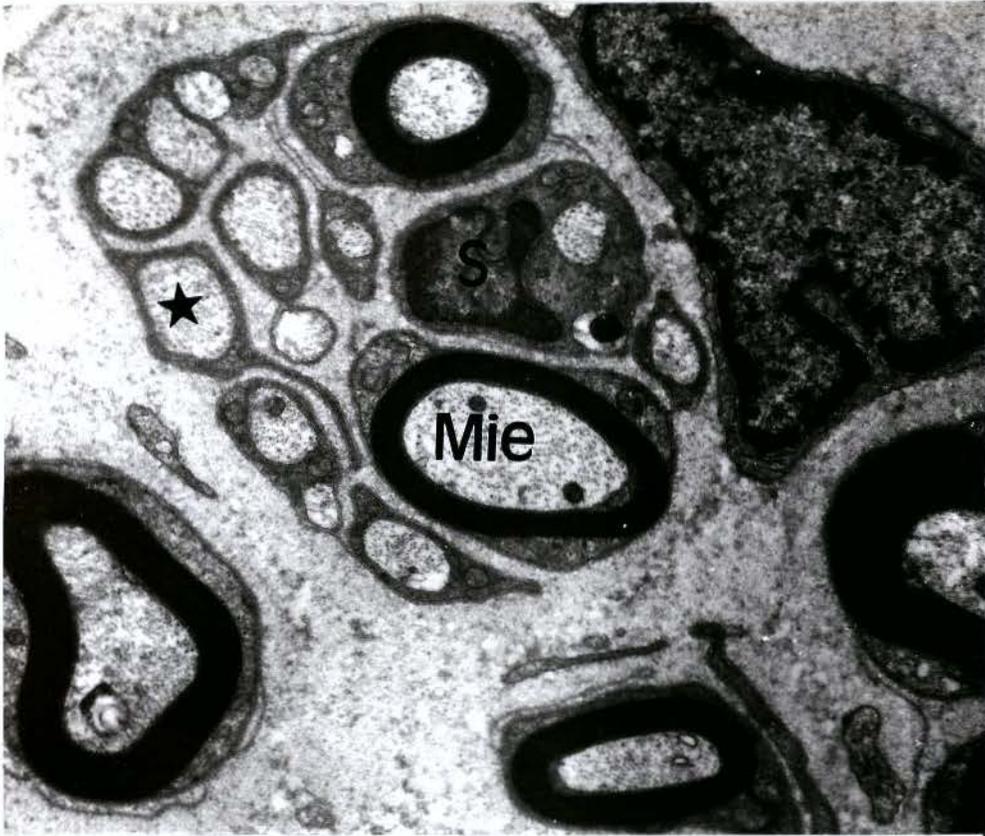


Fig. 18 - Micrografia eletrônica (GRUPO CONTROLE). Observar axônios mielínicos (Mie), grupos de axônios amielínicos (★), núcleos de Schwann (S) e colágeno endoneural (COL). Tetróxido de ósmio. Aumento 10.500x.

Fig. 19 - Micrografia eletrônica do nervo ciático normal. Observar o perineuro (setas retas), axônio mielínico (Mie) e o núcleo da célula de Schwann (S), grupo de axônios amielínicos (★) e colágeno (COL). Tetróxido de ósmio. Aumento 16.500x.

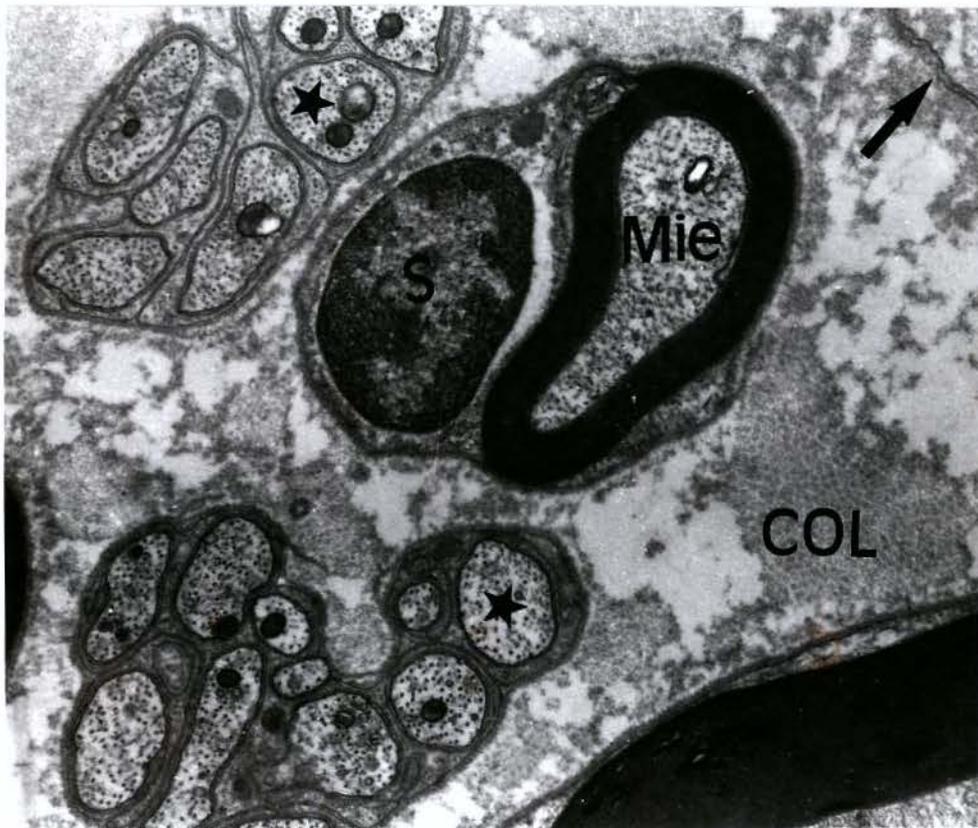
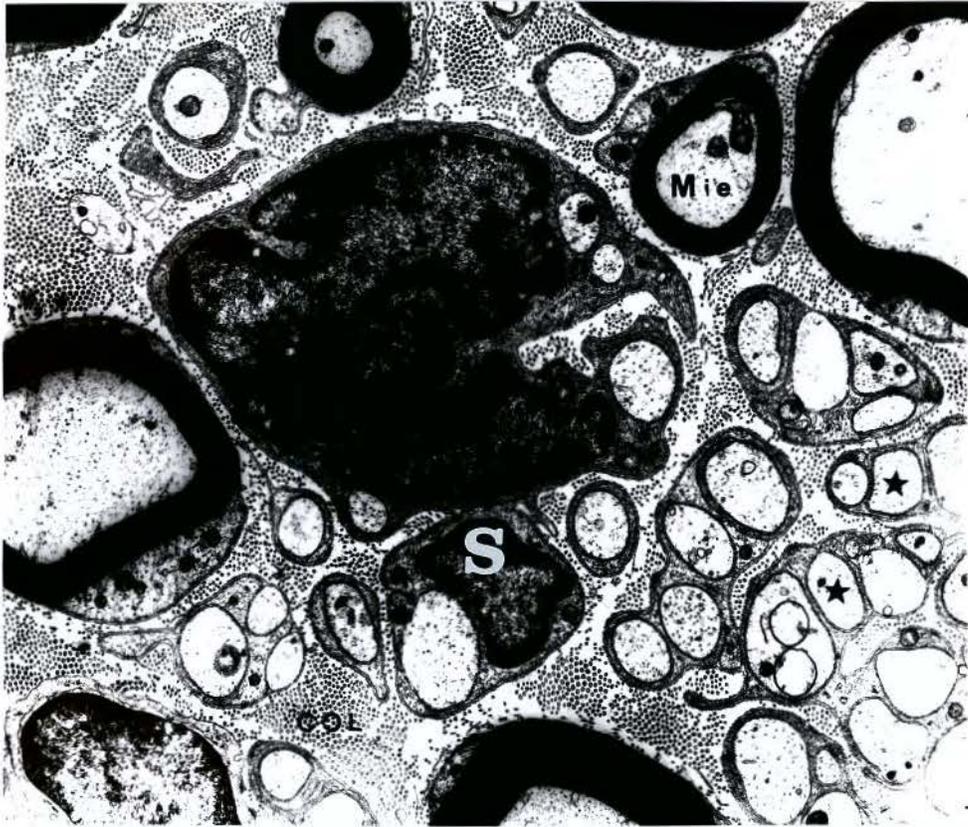
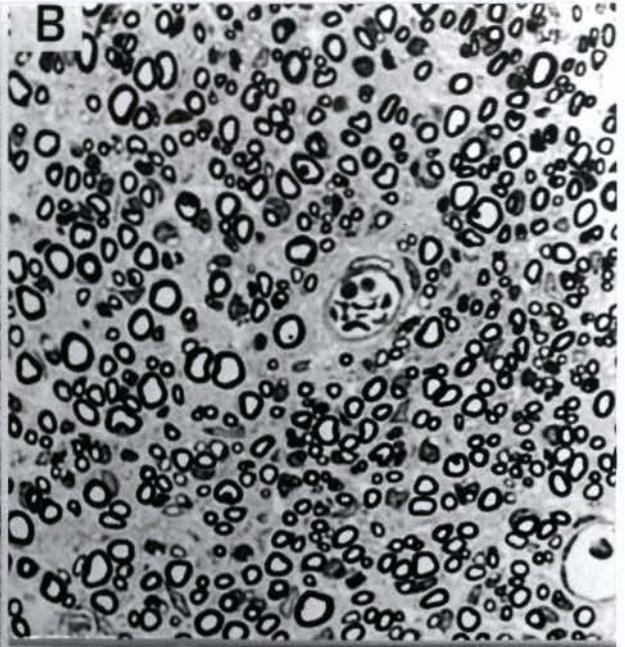


Fig. 20 - Aspecto da região do enxerto nos grupos de enxerto de músculo (A) e enxerto de nervo (C), bem como do coto distal do grupo de enxerto de músculo (B) e enxerto de nervo (D), em relação ao grupo controle (E). Observar a disposição das fibras nervosas, o calibre dos axônios e espessuras de bainha de mielina. Tetróxido de Ósmio. Aumento 179,4x.



## DISCUSSÃO

### 1. RETALHOS MUSCULARES JÁ UTILIZADOS

Conforme mencionado anteriormente, o objetivo deste trabalho foi estudar a eficácia do autoenxerto de músculo esquelético, preparado a partir de injeções de anestésico local. A viabilidade do autoenxerto de músculo esquelético já foi anteriormente comprovada e o que se pretende agora é demonstrar o sucesso da regeneração axonal. Para isso, estudamos comparativamente a regeneração axonal através de autoenxerto de lâmina basal muscular e autoenxerto de nervo.

Até recentemente, a literatura mostrava basicamente a existência de dois métodos para o preparo do enxerto de músculo. O primeiro deles, preconizado por KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984), e o segundo, mais comumente empregado, que foi desenvolvido por GLASBY<sup>32</sup> et al., (1986a).

O emprego de fragmentos de músculo esquelético para o reparo de lesão nervosa fundamenta-se nos trabalhos de SANES<sup>82</sup> et al., (1978), e de IDE<sup>45</sup> et al., (1983). Eles observaram que durante a reinervação havia um intenso brotamento axonal no músculo desnervado, o que os levou a considerar que a membrana basal da fibra muscular, ou substâncias a ela associadas, teriam papel fundamental em estimular e direcionar os cones de crescimento para os locais onde havia junções neuromusculares. Em 1983, IDE<sup>45</sup> et al., observaram que os axônios regeneravam-se no interior dos tubos de

membrana basal das células de Schwann e admitiram haver semelhanças químicas entre a membrana basal das células de Schwann e aquela das fibras musculares. É nessa idéia que se baseia o presente trabalho.

O método estabelecido por KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984), consistia em submeter o fragmento muscular a tratamento químico, pela imersão deste em água destilada a 0°C por 15 minutos, enxaguando-o em uma mistura de cloreto de cálcio a 10 mM e imidazol a 2 mM (pH 7.2), permanecendo embebido nesta mistura por 2 horas. Em seguida, o fragmento muscular era enxaguado em uma mistura de cloreto de potássio a 30 mM e tampão Tris a 3 mM (pH 8.2), permanecendo imerso nesta solução durante toda a noite. Logo após, o fragmento era transferido para uma solução 0,09% de trietanolamina (pH 8.7 a 9.0) e nela mantida por um período entre uma e duas horas em temperatura ambiente. Entretanto, este procedimento não era suficiente para a remoção de todo o conteúdo sarcoplasmático. Para completar a remoção, se fazia necessária a compressão do músculo entre duas superfícies planas. Com esse procedimento, observaram o crescimento coaxial das fibras nervosas no interior dos tubos de membrana basal muscular. Porém, o inconveniente deste método é que promovia um esvaziamento de apenas 50% do mioplasma, além de ser muito trabalhoso e demorado, o que levou aos próprios autores afirmarem a necessidade de aperfeiçoar a técnica de preparo do retalho.

Dois anos mais tarde, GLASBY<sup>32</sup> et al., (1986a), preconizaram um novo método para a obtenção do enxerto de lâmina basal. Este método consistia em mergulhar um fragmento de músculo em nitrogênio líquido e, em seguida,

enxaguá-lo em água destilada estéril. Este procedimento provoca um choque térmico e osmótico do fragmento muscular, separando a fibra muscular de sua membrana basal, com conseqüente remoção do conteúdo sarcoplasmático e preservação da membrana basal. Atualmente, este é o método mais utilizado, pois permite recolonização satisfatória da porção distal do nervo. Porém, durante o processo de congelamento, ocorre retração de cerca de 50% do fragmento muscular, além do que este se torna friável, o que dificulta a realização da sutura.

Considerando estas dificuldades, SOMAZZ<sup>80</sup>, (1994), sentiu-se motivado a estudar a possibilidade de se criar um novo método de confecção do enxerto muscular que fosse menos trabalhoso e que pudesse ser realizado "in vivo". Este pesquisador preconizou o método de obtenção do enxerto através de injeções de um anestésico local (cloridrato de lidocaína).

Neste trabalho demonstramos que a obtenção de retalhos musculares através da injeção de anestésicos locais apresenta algumas vantagens em relação aos métodos anteriormente descritos: a) não há retração exagerada do fragmento muscular; b) a sutura é feita com relativa facilidade, uma vez que o material se mantém consistente; c) não há necessidade de esvaziamento complementar por processos físicos; d) não é preciso dispor de acessórios relacionados à manutenção do nitrogênio líquido; e) diminui-se o risco de contaminação, uma vez que o preparo do fragmento não ocorre por procedimentos laboratoriais (congelamento ou tratamento químico).

## 2. BASES BIOLÓGICAS DA IDEALIZAÇÃO DO RETALHO A PARTIR DE INJEÇÕES DE ANESTÉSICOS LOCAIS

O método por nós empregado, fundamenta-se no fato de que os anestésicos locais são potentes agentes miotóxicos, capazes de produzir extensa e rápida necrose das fibras musculares esqueléticas. É bem sabido que após os primeiros minutos da injeção do anestésico ocorre mionecrose, cuja extensão e intensidade dependem da concentração e do volume de anestésico injetado. O processo de mionecrose tem início com a lesão do sarcolema, havendo uma entrada súbita de grande quantidade de íons cálcio extracelular para o sarcoplasma, o que acarreta uma hipercontração das miofibrilas, com conseqüente degeneração das fibras musculares. A entrada dos íons cálcio deve-se ao fato de que no meio extracelular sua concentração é cerca de 10.000 vezes maior que no sarcoplasma, onde a concentração de cálcio livre é de  $10^{-7}M$  (FARBER<sup>20</sup>, 1982).

É bem estabelecido que o processo inflamatório inicia-se algumas horas após a injeção do anestésico, com predomínio de neutrófilos e, em seguida, macrófagos. A intensidade da lesão e da resposta inflamatória são dependentes da concentração e volume do anestésico, bem como do tipo de anestésico empregado. Apesar destas variações, aceita-se no geral que por volta da sexta hora após a injeção, inicia-se a remoção do material necrótico e, em 24 horas, praticamente todo este material é removido. Trabalhos prévios têm demonstrado que o cloridrato de lidocaína a 2% também é capaz de

provocar esse efeito. Em que pese a intensa mionecrose, a membrana basal permanece íntegra (NONAKA<sup>68</sup> et al., 1983).

Depois de removido o material necrótico, permanece apenas o envoltório de membrana basal das fibras musculares e fragmentos sarcolemais (Fig. 3). Isso permite a obtenção de tubos de membrana basal muscular semelhantes àqueles produzidos pelo método químico de KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984), e físico de GLASBY<sup>32</sup> et al., (1986).

Apesar de contar com as vantagens anteriormente descritas, a obtenção do retalho muscular pelo método aqui exposto apresenta um ponto a ser considerado: trata-se do processo de regeneração muscular.

A capacidade de regeneração muscular parece estar estreitamente relacionada à sobrevivência das células satélites. Isso tem sido observado depois de lesões intensas como aquelas consequentes à fragmentação do músculo e em transplantes musculares livres (CARLSON<sup>14</sup>, 1986).

Segundo REGER & CRAIG<sup>75</sup>, (1968), a célula satélite é mononucleada e fusiforme, localizada entre a membrana basal e o sarcolema, do qual é separada por um espaço de 15-20 nm. MAURO<sup>64</sup>, (1979), verificou que sua localização e aspecto se confundem àqueles dos núcleos das fibras musculares, o que dificulta a avaliação de suas condições funcionais até mesmo em microscopia eletrônica. Dessa forma a observação da viabilidade ou não da célula satélite é difícil de ser feita, não sendo possível concluir do presente trabalho que as células satélites estão inviabilizadas.

Considerando-se a capacidade de resistência das células satélites, um

ponto importante no desenvolvimento desse trabalho foi o de utilizar dose e concentração do anestésico que inviabilize a proliferação das mesmas. Neste trabalho, não investigamos a necrose das células satélites, porém, nossos resultados são bastante claros no sentido de que, de alguma forma, houve inibição da proliferação das células satélites, o que foi comprovado pela ausência de regeneração muscular no local do enxerto.

SOMAZZ<sup>90</sup>, (1994), mostrou que para o músculo sóleo, a dose de 0,1 ml de cloridrato de lidocaína a 2%, permite obter extensa mionecrose com remoção de praticamente todas as fibras necróticas, num tempo de 24 horas após a injeção do anestésico. Observou que durante este período, estava presente no músculo um infiltrado inflamatório e as antigas fibras musculares estavam circundadas por tênues estruturas interpretadas como sendo a membrana basal e restos do sarcolema.

Ficou então estabelecido que o método de utilização de anestésico local promovia extensa necrose muscular, garantindo a presença dos tubos de membrana basal praticamente "vazios". Os brotos axonais originários da porção proximal do nervo ciático lesado puderam crescer através destes tubos e recolonizar a porção distal. Vale salientar que não se observou a presença de fibras musculares regeneradas ao nível do retalho muscular, o que permitiu ao autor supor que, de alguma forma as células satélites foram impedidas de se diferenciar ou até mesmo sobreviver após a ação do cloridrato de lidocaína a 2% (SOMAZZ<sup>90</sup>, 1994)

Baseados nesses achados, obtivemos enxertos de membrana basal muscular, utilizando o cloridrato de lidocaína a 2%, por ser um método rápido,

que promove a evacuação do sarcoplasma de forma efetiva, através de um processo inflamatório que leva à remoção *in vivo* do conteúdo sarcoplasmático. Em consequência da necrose das fibras musculares, este método permite obter tubos de membrana basal "vazios".

### 3. SOBRE A REGENERAÇÃO AXONAL

No presente trabalho, a avaliação da região do enxerto mostrou a presença de axônios mielínicos, organizados na forma de minifascículos, cada um formado em média por 6 a 12 axônios (Figs. 8 e 9). Resultados semelhantes foram obtidos por KEYNES<sup>50</sup> et al., (1984) e GLASBY<sup>32</sup> et al., (1986a), que utilizaram tratamento químico e físico, respectivamente, dos enxertos musculares.

A disposição dos axônios no interior dos minifascículos é peculiar de nervos regenerados, independente do material de enxerto empregado. GSHMEISSNER<sup>37</sup> et al., (1990), verificaram que uma falha no perineuro ou sua ruptura parecia fornecer um estímulo para a compartimentalização. Para muitos autores, a compartimentalização é considerada uma expressão anatômica do mecanismo destinado a restabelecer o ambiente endoneural (MORRIS<sup>66</sup> et al., 1972; GLASBY<sup>31</sup> et al., 1990; GSHMEISSNER<sup>37</sup> et al., 1990).

Observou-se também que no centro do enxerto havia maior número de fibras nervosas em regeneração, agrupadas em minifascículos que se dispunham de forma mais aglomerada em relação à periferia do enxerto, onde

havia minifascículos menores, individuais e mais espaçados. Segundo GSHMEISSNER<sup>37</sup> et al., (1990) e GATTUSO<sup>27,29</sup> et al., (1988), o número de células e axônios incluídos em cada minifascículo parece ser determinado pela sua posição dentro do enxerto, sendo maior o número de minifascículos no centro do enxerto.

Cada minifascículo era envolvido por células semelhantes às células perineurais, dispostas concentricamente ao redor destes. Estas células perineurais favorecem um ambiente endoneural apropriado, facilitando a maturação das fibras (GATTUSO<sup>27,29</sup> et al., 1988), além de fornecer uma barreira de difusão entre os espaços extracelular e endoneural (HUXLEY & STAMPFLI<sup>41</sup>, 1951; SHANTHAVEERAPPA & BOURNE<sup>88,87,86</sup>, 1962, 1963, 1968).

Segundo GSHMEISSNER<sup>37</sup> et al., (1990), os axônios em regeneração e suas respectivas células de Schwann se tornam rodeados por uma armação frouxa de finos processos celulares, que a princípio se assemelham a fibroblastos e, em estágios mais tardios, estas células produzem uma membrana basal, exibindo todas as características morfológicas de verdadeiras células perineurais. A origem destas células é ainda incerta, embora os fibroblastos endoneurais ou células de Schwann não diferenciadas, sejam seus possíveis precursores.

No presente trabalho, a constatação de que o enxerto muscular foi bem sucedido se deu pela avaliação qualitativa, através da análise histológica, e pela contagem dos axônios mielínicos. Os resultados mostram que, no grupo

que recebeu enxerto de músculo, o número médio de axônios presentes no coto proximal do nervo foi de 9245,14 ( $\pm$  713,07) enquanto que o número médio encontrado no coto distal foi de 13792,57 ( $\pm$  1145,10). Estes números mostram que os brotos axonais do coto proximal conseguiram atravessar o enxerto e atingir o coto distal, como ocorre nos enxertos de nervo tradicionais. Por sua vez, nos animais submetidos a autoenxerto de nervo, o número médio de axônios no coto proximal foi de 11039,00 ( $\pm$  1943,69) ao passo que no coto distal foi de, 13592,43 ( $\pm$  1420,04), comprovando a recolonização do coto distal.

Um dado importante deste trabalho resulta da comparação do número de axônios nos cotos distais dos dois grupos experimentais (Grupo de enxerto de músculo e enxerto de nervo). Nossos resultados mostram que, no primeiro caso, o número de axônios foi de 13792,57 ( $\pm$  1145,10), e no segundo caso, foi de 13592,43 ( $\pm$  1420,04). Apesar dessa diferença numérica, a análise estatística mostra que não houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, entre os dois grupos estudados.

Esses dados demonstram que a eficácia da regeneração axonal é da mesma ordem de amplitude daquela observada nos autotransplantes de nervo, realizados por outros autores.

Neste trabalho, o número médio de axônios para o grupo controle (8012,57) foi compatível com os achados de SCHMALBRUCH<sup>83</sup>, (1986), que obteve uma média de 7469,25 axônios em nervo ciático de ratos Wistar normais.

Após secção de um nervo, os axônios da porção proximal originam vários brotos que crescem no interior dos tubos de membrana basal da célula de Schwann (IDE<sup>45</sup> et al., 1983; KEYNES<sup>50</sup> et al., 1984; GLASBY<sup>31</sup>, 1990; IDE & KATO<sup>44</sup>, 1990).

Desta forma, o número de axônios na porção distal à lesão é superior em relação à porção proximal, após certo tempo do procedimento cirúrgico. Em trabalhos utilizando tubulização, verifica-se que após 3 a 4 semanas, axônios amielínicos associados às células de Schwann começam a invadir o coto distal. Após 5 a 6 semanas, verifica-se também axônios mielínicos (FIELDS & ELLISMAN<sup>24</sup>, 1986; LE BEAU<sup>53</sup> et al., 1988).

A literatura referente à regeneração nervosa periférica aponta vários autores que realizaram estudos quantitativos em diferentes espécies animais e em nervos distintos. De um modo geral, o fenômeno de brotamento axonal ocorre, sendo que após o estabelecimento da conexão com o órgão alvo, há um decréscimo no número de axônios presentes no nervo e os valores finais chegam a ser inferiores ao controle.

A contagem dos axônios após 50 dias da cirurgia demonstra que o fenômeno de brotamento axonal ainda está ativo, portanto, espera-se que esse número venha a diminuir com tempos de sobrevida maiores.

Embora não se tenha procedido a análise morfométrica, notou-se que o diâmetro dos axônios e a espessura das bainhas de mielina, no local do enxerto e no coto distal, são menores em relação ao coto proximal.

GUTMANN & SANDERS<sup>38</sup>, (1943), mostraram que a recuperação dos diâmetros normais das fibras nervosas pode ocorrer após lesão por compressão, porém, após transecção e reparo do nervo, mesmo sob condições ideais em laboratório, a medida exata de maturação em relação ao diâmetro do axônio e espessura da bainha de mielina, nunca foi alcançada. Contrariamente, CRAGG & THOMAS<sup>16</sup>, (1964), observaram que mesmo após compressão, o diâmetro da fibra alcançava apenas 89% dos valores controle, depois de um ano, em coelhos. SCHRÖDER<sup>84</sup>, (1972), mostrou que após compressão, no rato, embora o diâmetro dos axônios alcançasse os valores controle aos 6 meses após a cirurgia, a espessura da bainha de mielina era de apenas 79% do valor normal, após 1 ano.

Segundo GATTUSO<sup>27,29</sup> et al., (1988), em ratos submetidos a enxerto de músculo tratado pela técnica de congelamento-descongelamento, a porcentagem de recuperação do diâmetro das fibras em relação aos valores controle foi de 81% para a região do enxerto e 83% para o nervo distal. Quanto à espessura das bainhas de mielina, estes valores foram de 68% no enxerto e 78% no nervo distal. Segundo os autores, estes resultados são melhores, ou pelo menos comparáveis, aos resultados estabelecidos por outros autores e, provavelmente, muito superiores aos resultados obtidos após "cabo de enxerto". MACKINNON<sup>58</sup> et al., (1986), realizando enxerto de nervo em ratos, também observaram que o número de fibras nervosas foi maior na região do enxerto e no nervo distal, em relação a porção proximal, porém estas fibras eram de menor diâmetro. Portanto, embora não tivéssemos procedido a mensuração de outros parâmetros que avaliam a regeneração, como a

espessura da bainha de mielina, diâmetro axonal, razão G, etc., é de se esperar que esses parâmetros sejam diferentes do grupo controle.

Os resultados aqui obtidos apontam a eficiência do método de tratamento do enxerto muscular utilizando o cloridrato de lidocaína a 2%, uma vez que não há diferença significativa entre a média de axônios nos cotos distais dos grupos de autoenxerto de músculo e autoenxerto de nervo.

É oportuno considerar-se algumas vantagens da utilização do enxerto muscular em relação ao enxerto de nervo, destacando a organização da lâmina basal muscular, com uma série de tubos paralelos envolvendo individualmente cada fibra muscular. Essa lâmina basal, além de apresentar semelhanças químicas com a lâmina basal das células de Schwann, fornece uma grande área de superfície através da qual os cones de crescimento podem migrar no sentido do maior eixo dos tubos, cujo diâmetro normalmente é maior que o das fibras nervosas mais calibrosas de um nervo periférico (IDE<sup>45</sup> et al., 1983; IDE<sup>42</sup>, 1984; TOHYAMA & IDE<sup>102</sup>, 1984; TOHYAMA<sup>101</sup>, 1985; GLASBY<sup>31</sup>, 1990). Essa estrutura muscular facilitaria o crescimento axonal, não havendo necessidade, como ocorre nos enxertos de nervo, de se construir "cabos de enxerto" para abranger todo o diâmetro do nervo lesado, o que aumenta a infiltração de tecido conjuntivo.

Quanto à forma de tratamento empregado para a desnaturação do músculo, o uso de cloridrato de lidocaína a 2% ainda aponta vantagens em relação aos demais métodos, por promover necrose rápida e eficiente do músculo, poupá-lo de retração e manter o estado físico do retalho muscular, o que permite a realização das suturas sem dificuldades e evita excesso de

cicatrização. Além disso, é considerado um método simples e rápido, que provoca necrose muscular *in vivo*, minimizando os riscos de contaminação.

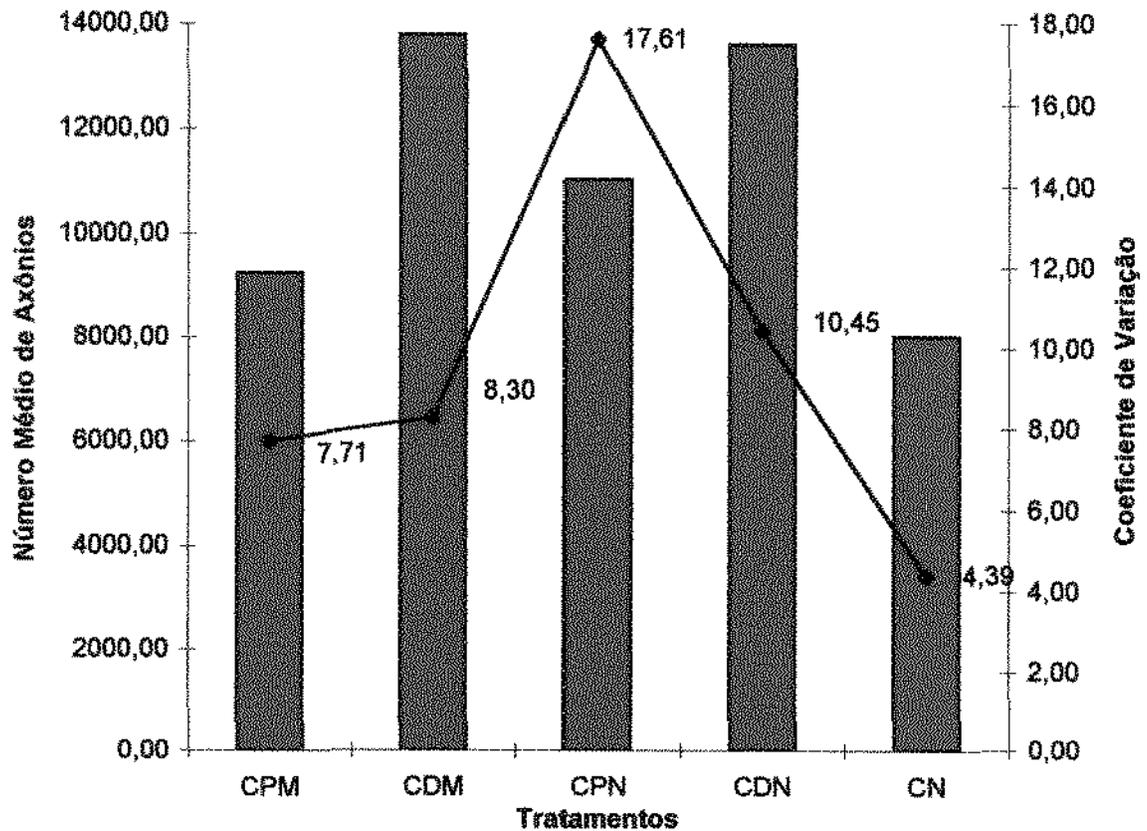
Os resultados obtidos neste trabalho contemplam o objetivo proposto, porém; temos a clareza de que o material coletado ainda nos permite a avaliação de outros parâmetros que poderão reafirmar nossas conclusões, cujos estudos deverão ser realizados futuramente.

## CONCLUSÕES

- A ação do cloridrato de lidocaína a 2% provocou o esvaziamento do conteúdo sarcoplasmático e, aparentemente, não alterou a membrana basal muscular.
- A eficácia da regeneração axonal através de autoenxerto de músculo tratado com cloridrato de lidocaína a 2%, é da mesma ordem daquela observada nos autoenxertos de nervo.
- A conexão entre os cotos nervosos seccionados é importante para a recolonização da porção distal do nervo.

## ANEXO 1

**Gráfico 1: Relação entre médias de axônios e C.V. nos grupos de enxerto de músculo, enxerto de nervo e controle**



Legenda:

CPM : coto proximal (enxerto de músculo)

CDM : coto distal (enxerto de músculo)

CPN : coto proximal (enxerto de nervo)

CDN : coto distal (enxerto de nervo)

CN : controle

## ANEXO 2

Tabela 2 : Análise de variância com Teste F, dos grupos de enxerto de músculo e enxerto de nervo

Coeficiente de variação	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	
		Músculo	Nervo
Tratamento	2	64874528.76**	54616418.61**
Resíduo	18	647785.57	1972704.96
Total	20	-	-

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 3 : Análise de variância com Teste de Tukey, dos grupos de enxerto de músculo, enxerto de nervo e controle.

Tratamentos	Médias	
	Músculo	Nervo
CP	9245 AB	11039 A
CD	13792 A	13592 A
CN	8012 B	8012 B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade

## **AXONAL REGENERATION THROUGH MUSCLE BASAL LAMINA AUTOGRAFT OBTAINED BY LOCAL ANESTHETIC INJECTION**

### **SUMMARY**

The aim of the present investigation was to study the efficacy of axonal regeneration after sciatic nerve cut and repair by muscle basal lamina autografts. It was done in comparison with axonal regeneration through nerve autograft.

In one group of animals, muscle basal lamina autograft was obtained by injecting soleus muscle of adult mice with 2% lidocaine hydrochloride. Twenty-four hours later a fragment of the injected muscle was dissected out and trimmed in order to get a graft big enough to fill a gap of 5 mm. The left sciatic nerve was then cut and repaired with the graft held by epineural sutures at the proximal and distal nerve stumps. In another group, a fragment of 5 mm was dissected out from the left sciatic nerve and replaced at the same site by epineural sutures.

Fifty days after surgery, animals from both groups (nerve autograft and muscle basal lamina autograft) were sacrificed and three fragments of the left sciatic nerve (distal and proximal to the grafted site and the grafted site itself)

were processed for electron-microscopy.

Ultrastructural analysis showed that there were no differences between regenerated axons in muscle autograft and nerve autograft. Also the overall arrangement of the axons at the graft site was in accordance with that described in the literature.

Quantitative results show that in both cases axons crossed the graft site and reached distal stump. We noticed that there are no significant differences on the axonal regeneration between nerve autograft and muscle basal lamina autograft. On the nerve autograft we observed 13.592 ( $\pm$  1420) myelinated regenerated axons on the distal stump, and on the muscle basal lamina autograft 13.792 ( $\pm$ 1145). These differences were not statistically significant.

We conclude that muscle basal lamina grafts offer conditions that allow axonal regeneration in a very similar way to that observed with a regular nerve autograft.

**KEY- WORDS:**

1. Muscle - Autograft
2. Nervous system regeneration
3. Nerve - surgery
4. Anesthetic

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. ABERCROMBIE, M., JOHNSON, M. The collagen content of rabbit sciatic nerve during Wallerian degeneration. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, London, v. 9, p.113-118, 1946.
2. ALLT, G. Pathology of the peripheral nerve. In: **The Peripheral Nerve**, LANDON, D.N., ed., London: Chapman & Hall, 1976, p. 666-739.
3. BAICHWAL, R.R., BIGBEE, J.W., De VRIES, G.H. Macrophage-mediated myelin related mitogenic factor for cultured Schwann cells. **Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 85, n. 5, p. 1701-1705, Mar. 1988.
4. BAILES, J.E., COZZENS, J.W., HUDSON, A.R. Laser-assisted nerve repair in primates. **J. Neurosurg.**, Springfield, v. 71, n. 2, p. 266-272, Aug.1989.
5. BAUDENS, J. Cliniques des plaies d'armes à feu, Paris: **J. B. Baillière**, p. 610, 1836. *Apud* FIELDS, R. D. et al. *Op. cit.* Ref. 25.
6. BECKER, C.M., GUEUNING, C.O., GRAFF, G.L. Sutures or fibrin glue for divided rat nerves: Schwann cell and muscle metabolism. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 1, n. 2, p. 139-145, Oct. 1984.

---

\* De acordo com a NBR-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

7. BOEDTS, D. A comparative experimental study on nerve repair. **Arch. Oto-Rhino Laryngol.**, New York, v. 244, n. 1, p. 1-6, 1987.
8. BRADLEY, W.G., ASBURY, A.K. Duration of synthesis phase in neurilemma cells in mouse sciatic nerve during regeneration. **Expl. Neurol.**, New York, v. 26, n. 2, p. 275-282, Feb.1970.
9. BRYAN, D.J. et al. Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 92, n. 5, p. 927-940, Oct. 1993.
10. BUETTNER, H.M. Nerve Growth Dynamics: Quantitative models for nerve development and regeneration. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v. 745, p. 210-221, 1995.
11. BUNGE, R.P. Recent observations on the control of Schwann cell functions. **Anat. Rec.**, Philadelphia, Suppl. 1: 3-25., 1983.
12. CALDER, J.S., NORRIS, R.W. Repair of mixed peripheral nerves using muscle autografts: a preliminary communication. **Br. J. plast. Surg.**, Edinburgh, v. 46, n. 7, p. 557-564, Oct. 1993.
13. CARLSON, B.M. Regeneration of entire skeletal muscles. **Fed. Proc.**, Bethesda, 45, n. 5, p. 1456-1460, Apr. 1986.

14. CAUSEY, G. The functional importance of the blood supply of peripheral nerve. **Ann. R. Coll. Surg.**, London, 16: 367-383, 1955. *Apud* GLASBY, M.A., *Op. cit.* Ref. 31.
15. CRAGG, B.G., THOMAS, P.K. The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres. **J. Physiol.**, London, 171: 164-175, 1964.
16. DA SILVA, C.F., LANGONE, F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration in vivo. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 22(6): 691-694, 1989.
17. -----, et al. Laminin gel stimulates axonal regeneration in vivo. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 10: 85-91, 1984.
18. DAVIES, A.H. et al. Peripheral nerve growth through differently orientated muscle matrices. **Neuro-Orthopedics**, New York, v. 4, p. 62-73, 1987.
19. FARBER, J.L. Biology of disease: Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Lab. Invest.**, New York, v. 47, n. 2, p. 114-123, Aug. 1982.
20. FARQUHAR, M.G. The glomerular basement membrane: A selective macromolecular filter. In: HAYD, E.D. ed. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York: Plenum Press, 1981, p. 335-378.

21. FAWCETT, J.W., KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, Springfield, v. 65, n. 3, p. 354-363, Sept. 1986.
22. ———, ———. Peripheral nerve regeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, 13: 43-60, 1990.
23. 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. **Expl. Neurol.**, New York, v. 114, n. 3, p. 275-285, Dec. 1991.
24. FIELDS, R.D., ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. **Expl. Neurol.**, New York, v. 92: 61-74, 1986.
25. ———, et al. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Prog. Neurobiol.** New York, 33: 87-134, 1989.
26. FOIDART, J.M. et al. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. **Lab. Invest.**, New York, v. 42, n. 3, p. 336-342, Mar. 1980.

27. GATTUSO, J.M., GLASBY, M.A., GSCHMEISSNER, S.E. Recovery of peripheral nerves after surgical repair with treated muscle grafts (2) Morphometric Assessment. **Neuro-Orthopedics**, New York, v. 6, p. 1-6, 1988.
28. GATTUSO, J.M. et al. A comparison of immediate and delayed repair of peripheral nerves using freeze-thawed autologous skeletal muscle grafts - in the rat. **Br. J. plast. Surg.**, Edinburgh, v. 42, n. 3, p. 306-313, May. 1989.
29. ———, et al. Peripheral nerve repair using muscle autografts (1) Recovery of transmission in primates. **J. Bone Jt. Surg.**, Boston, v. 70, n. 4, p. 524-529, Aug. 1988.
30. GIANNINI, C., DYCK, P.J. The fate of Schwann cell basement membranes in permanently transected nerves. **J. Neuropath. exp. Neurol.**, Baltimore, v. 49, n. 6, p. 550- 563, Nov. 1990.
31. GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: Developing a new method of nerve repair. **Clinical Anatomy**, New York, v. 3, p. 161-182, 1990.
32. ———, HITCHCOCK, R.J.I., HUANG, C.L-H. Effect of muscle basement membrane on regeneration of rat sciatic nerve. **J. Bone Jt. Surg.**, Boston, v. 68, n. 5, p. 829-833, Nov. 1986a.

33. GLASBY, M.A. et al. Comparison of nerve regeneration through nerve and muscle grafts in rat sciatic nerve. **Neuro-Orthopaedics**, New York, 2: 21-28, 1986c.
34. ———. et.al. Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. **J. Hand Surg.**, (Am) St. Louis, v. 11, n.3, p. 347-351, Oct. 1986d.
35. ———. et al. Dependence of nerve regeneration through muscle grafts on the availability and orientation of basement membrane in rats. **J. Neurocytol.**, London, v. 15, n. 4, p. 497-510, Aug. 1986b.
36. ———. et al. Specificity for homonymous pathways following repair of peripheral nerves with treated skeletal muscle autografts - in the primate. **Br. J. plast. Surg.**, Edinburgh, v. 44, n. 2, p. 135-141, Feb./Mar. 1991.
37. GSCHMEISSNER, S.E., GATTUSO, J.M., GLASBY, M.A. Morphology of nerve fibers regenerating through freeze-thawed autogenous skeletal muscle grafts in rats. **Clinical Anatomy**, New York, v. 3, p. 107-119, 1990.
38. GUTMANN, E., SANDERS, F.K. Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. **J. Physiol.**, Cambridge, 101: 489-518, 1943.

39. HALL, S.M., ENVER, K. Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts: An immunohistochemical and electron microscopic study. **J. Hand Surg.**, [Br] Edinburgh, v.19(4): 444-451, Aug. 1994.
40. HENTZ, V.R. et al. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. **J. Hand Surg.**, (Am) St. Louis, v. 16, n. 2, p. 251-261, Mar. 1991.
41. HUXLEY, A.F., STAMPFLI, R. Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibers. **J. Physiol.**, Cambridge, 112: 496, 1951.
42. IDE, C. Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle. **Neurosci. Res.**, Limerick Ireland, 1: 379-391, 1984.
43. ———, OSAWA, T., TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. **Prog. Neurobiol.**, New York, v. 34, n. 1, p. 1-38, Apr. 1990.
44. ———, KATO, S. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci. Res.**, Suppl. 13, p. 157-164, 1990.
45. ———. et al. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, New York, 288: 61-75, 1983.

46. KANWAR, Y.S., FARQUHAR, M.C. Anionic sites in the glomerular basement membrane. *In vivo* and *in vitro* localization to the laminae rarae by cationic probes. **J. Cell Biol.**, New York, v. 81, n. 1, p. 137-153, Apr. 1979a.
47. ———, ———. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. **Proc. natn. Acad. Sci.**, U.S.A., Washington, v. 76, n. 3, p. 1303-1307, Mar. 1979.
48. KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, v. 27, p. 137a, 1965.
49. KEFALIDES, N.A., ALPER, R., CLARK, C.C. Biochemistry and metabolism of basement membranes. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 61, p. 167-228, 1979.
50. KEYNES, R.J., HOPKINS, W.G., HUANG, C.L-H. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane. **Brain Res.**, New York, v. 295, n. 2, p. 275-281, Mar. 1984.
51. KORFF, M., et al. An investigation of the potential for laser nerve welding. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 106, n. 4, p. 345-350, Apr. 1992.

52. KRISTENSSON, K., OLSSON, Y. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers. Differences between mature and immature animals. **Acta Neuropathol.** Berlin, v. 17, n.2, p. 127-138, 1971.
53. LE BEAU, J.M., ELLISMAN, M.H., POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **J. Neurocytol.**, California, 17: 161-172, 1988
54. LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. **Acta orthop. scand.**, Kobenhavn. v. 58, n. 2, p. 145-169, Apr. 1987.
55. ———. et al. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. **J. Neuropath. exp. Neurol.** Baltimore, v. 41, n. 4, p. 412-422, Jul. 1982.
56. ———. et al. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. **Expl. Neurol.** v. 76, n. 2, p. 361-375, May 1982.
57. MACKINNON, S.E., DELLON, A.L. A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (Collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 6, n. 2, p. 117-121, Apr. 1990.
58. ———. et al. Nerve regeneration in the rat model. **Peripheral Nerve repair and Regeneration**, 1: 41-48, 1986.

59. MADISON, R.D., DA-SILVA, C.F., DIKES, P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prosthesis. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 447, n. 2, p. 322-334, May. 1988.
60. ———. et al. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and laminin containing gel. **Expl. Neurol.**, New York, v. 88, n. 3, p. 767-772, Jun. 1985.
61. ———. et al. Nontoxic nerve guide tubes support neovascular growth in transected rat optic nerve. **Expl. Neurol.**, New York, v. 86, n. 3, p. 448-461, Dec. 1984.
62. MARQUES, M.J. **Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares.** São Paulo, 1992, 139p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
63. MATTAR Jr., R., et al. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos: Estudo Experimental. **Rev. Bras. Ortop.**, São Paulo, v. 25, n. 8, p. 287-292, Ago.1990.
64. MAURO, A. **Muscle regeneration.** New York: Raven Press, 1979.
65. MILLESI, H. Nerve grafting. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, 11, n. 1, p. 105-112, Jan. 1984.

66. MORRIS, J.H., HUDSON, A.R., WEDDELL, G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". **Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.**, Berlin, Wien. v. 124, n. 1, p. 103-130, 1972.
67. NISHIHIRA, S., McCAFFREY, T.V. Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 100, n. 1, p. 17-21, Jan. 1989.
68. NONAKA, I., et al. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). **Acta Neuropathol.** New York/Berlin, v. 60, n.3/4, p. 167-174, 1983.
69. NORRIS, R.W., et al. Peripheral nerve repair, a new technique using muscle autografts. **J. Bone Jt Surg.**, Boston, v. 70, n. 4, p. 530-533, Aug. 1988.
70. OLDFORS, A., JOHANSSON, B.R. Barriers and transport properties of the perineurium. A ultrastructural study with I - labeled albumin and horseradish peroxidase in normal and protein-deprived rats. **Acta Neuropathol.** New York/Berlin, v. 47, n. 2, p. 139-143, Jul. 1979.
71. OLSSON, Y., KRISTENSSON, K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. **Acta Neuropathol.**, New York, v.23, n. 2, p.105-111, Jan. 1973.

72. PEREIRA, J.H., et al. Denatured muscle grafts for nerve repair: An experimental model of nerve damage in leprosy. **J. Bone Jt. Surg.**, Boston, v. 72, n. 5, p. 874-880, Sep. 1990.
73. PETERS, A., PALAY, S.L., WEBSTER, H. de F. In: **The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells.** Phyladelphia: Saunders, 1976. 406p.
74. PLEASURE, D. Axoplasmic transport. In: SUMMER, A. ed., **The Physiology of peripheral nerve disease.** Phyladelphia: Saunders, 1980. p. 221-237.
75. REGER, J.F., CRAIG, A.S. Studies on the fine structure of muscles fibers and associated satellite cells in hypertrophic human deltoid muscles. **Anat. Rec.**, New York, v. 162, n. 4, p. 483-500, Dec. 1968.
76. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at light pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, 17:208-212, 1963.
77. RICE, D.H., BERSTEIN, F.D. The use of autogenous vein for nerve grafting. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 92, n. 4, p. 410-412, Aug. 1984.
78. ROSEN, J. M., PHAM, H.N., HENTZ, V.R. Fascicular tubulization: a comparison of experimental nerve repair techniques in the cat. **Ann. Plast. Surg.**, Boston, 22, n. 6, p. 467-478, Jun. 1989.

79. ROSEN, J. M., HENTZ, V.R., KAPLAN, E.N. Fascicular sutureless and suture repair of the peripheral nerves: a comparison study in laboratory animals. **Orthop. Rev.**, New York, v. 8, p. 85-92, 1979.
80. SALZER, J.L., BUNGE, R.P. Studies of Schwann cell proliferation. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration and direct injury. **J. Cell Biol.**, New York, v. 84, n. 3, p. 739-752, Mar. 1980.
81. ———, et al. Studies of Schwann cell proliferation. II. Characterization of the stimulation and specificity of the response to a neurite membrane fraction. **J. Cell Biol.**, New York, v. 84, n. 3, p. 753-766, Mar. 1980.
82. SANES, J.R., MARSHALL, L.M., Mc MAHAN, U.J. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers: differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. **J. Cell Biol.**, New York, v. 78, n. 1, p. 176-198, Jul. 1978.
83. SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic Nerve. **Anat. Rec.**, v. 162, p. 71-81, 1986
84. SCHRÖDER, J.M. Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. **Brain Res.**, Osaka, v. 45, n. 1, p. 49-65, Oct. 1972.

85. SEDDON, H.J., MEDAWAR, P.B. Fibrin suture of human nerves. **Lancet**, London, 2: 87, 1942.
86. SHANTHAVEERAPPA, T.R., BOURNE, G.H. The perineurial epithelium - a new concept. In: BOURNE, G.H. ed. **The structure and function of nervous tissue**. New York: Academic Press, 1968, v.1, p. 379-459.
87. -----, -----. The perineurial epithelium: nature and significance. **Nature**, London, 199: 577, 1963.
88. -----, -----. The perineurial epithelium: a metabolically active continuous protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. **J. Anat.**, Cambridge, 96: 527, 1962.
89. SMAHEL, J., MEYER, V.E., BACHEM, U. Glueing of peripheral nerves with fibrin: experimental studies. **J. Reconstr. Mircrosurg.**, New York, v. 3, n. 3, p. 211-219, Apr. 1987.
90. SOMAZZ, M.C. **Reparo da lesão de nervo ciático através de autotransplante de músculo esquelético em ratos: retalho obtido com injeções intramusculares de anestésicos locais**. Campinas, 1994, 90p. Tese (Doutorado) - Fac. de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

91. SORENSON, E.J., WINDEBANK, A.J. Relative importance of basement membrane and soluble growth factors in delayed and immediate regeneration of rat sciatic nerve. **J. Neuropathol. exp. Neurol.**, Baltimore, v. 52, n.3, p. 216-222, May. 1993.
92. SPECTOR, J.G. et al. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 101, p. 1109-1123, Oct. 1991.
93. STENSAAS, L. et al. Snug tubular enclosures reduce extrafascicular axonal escape at peripheral nerve repair sites. **Expl. Neurol.**, New York, v. 103, n.2, p. 135-145, Feb. 1989.
94. SUNDERLAND, S. In: **Nerves and nerve injuries**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1978.
95. TARLOV, I.M. Autologous plasma clot suture of nerves: Its use in clinical surgery. **J. Am. med. Ass.**, Chicago, 126: 741, 1944.
96. ———. In: **Plasma clot suture of peripheral nerves and nerve roots**. Springfield Field: Charles C. Thomas, 1950.
97. TERRIS, D.J., FEE, Jr., W.E. Current issues in nerve repair. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, St. Louis, v. 119, n. 7, p. 725-731, Jul. 1993.

98. THOMAS, P.K. The cellular response to nerve injury. I. The cellular outgrowth from the distal stump of the transected nerve. **J. Anat.**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 287-303, Apr. 1966.
99. TIMPL, R. et al. Laminin-A glycoprotein from basement membrane. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 254, n. 19, p. 9933-9937, Oct. 1979.
100. TODD, R.B., BOWMAN, W. In: **The Physiological Anatomy and Physiology of Man**, Philadelphia: Blanchard and Lea, 1957. p.129, 523-660.
101. TOHYAMA, K. The localization of lectin-binding sites on Schwann cell basal lamina. **J. Neurocytol.**, London, v. 14, n. 1, p. 49-61, Feb. 1985.
102. ———, IDE, C. The localization of laminin and fibronectin on Schwann cell basal lamina. **Arch. Histol. Jpn.**, Nigata, v. 47, n. 5, p. 519-532, Nov. 1984.
103. VON LANGENBECK. Verhandl. d. deutsch. Gesselch f. Chir. (Funfter Congress). p. 111-112, 1876. *Apud* FIELDS, R.D., *Op. cit.* Ref. 25.
104. WALLIS, I., KOENIG, E., ROSE, S. The preparation of a sarcolemmal fraction from evacuated muscle slices. **Biochim. biophys. Acta**, New York. v. 599, n. 2, p. 505-517, Jul. 1980.

105. WALTON, R.L. et al. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 84, n. 6, p. 944-949, Dec. 1989.
106. WANG, G-Y., HIRAI, K-I., SHIMADA, H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum - treated nerve grafts. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 570, n. 1/2, p. 116-125, Jan. 1992.
107. WEISS, P. Nerve reunion with sleeves of frozen-dried artery in rabbits, cats and monkeys. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, New York. 54: 274-277, 1943.
108. WOLOSEWICK, J. J., PORTER, K.R. Stereo high-voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line WI - 38. **Am. J. Anat.**, New York, v. 147, n. 3, p. 303-309, Nov.1976.
109. YAMADA, K.M., SPOONER, B.S., WESSELLS, N.K. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. **J. Cell Biol.**, New York. v. 49, n. 3, p. 614-635, Jun. 1971.
110. YOKOTA, R., TOHYAMA, K., IDE, C. Distribution of anionic sites on the basal lamina of Schwann cells. **Neurosci. Lett.**, Limerick Ireland, v. 41, n. 1/2, p. 49-54, Oct. 1983.
111. YOUNG, J.Z., MEDAWAR, P.B. Fibrin suture of peripheral nerves. **Lancet**, London, 2: 126-128,1940.