MARCO CESAR SOMAZZ 37 Se 52 Fisioterapeuta contente 21

REPARO DA LESÃO DE NERVO CIÁTICO ATRAVÉS DE AUTOTRANSPLANTE DE MÚSCULO ESQUELÉTICO EM RATOS: RETALHO OBTIDO COM INJECÕES INTRAMUSCULARES DE ANESTÉSICOS LOCAIS

.

·--- \*

entrador: so-orientador: her por 1036/83 du neu way 02/02/94 Orientador: Frof. Dr. Humberto Santo Neto Ultimate Comorientadora: Profm Drm Maria Júlia Marques Elt

The market of the M/BROY

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental (Área de Anatomia) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PIRACICABA 1994

> UNICAMP WINI OFECA CENTRAL

## DEDICATÓRIA

A MEUS PAIS, QUE ME FIZERAM EXISTIR, QUE ME MODELARAM HOMEM PARA O ESTUDO, PARA O TRABALHO E PARA A VIDA.

> A MARIA DE LOURDES, AMIGA DE TODOS OS DIAS

AO PROF. DR. HUMBERTO SANTO NETO, PELA ORIENTAÇÃO SEGURA, PRECISA E CONSTANTE DURANTE A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO, O NOSSO AGRADECIMENTO E GRATIDÃO.

į

#### AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>\*</sup> Miralva Aparecida de Jesus Silva, pela amizade dedicada, constante incentivo <u>e</u> auxílio no trabalho de documentação fotográfica.

A Prof<sup>®</sup> Dr<sup>®</sup> Maria Júlia Marques, pelas valiosas sugestões e imprescindível colaboração.

A Prof<sup>®</sup> Dr<sup>®</sup> Vilma Cloris de Carvalho, que nos recebeu no Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, oferecendo a oportunidade de nos iniciar na pesquisa e contribuir para nossa formação.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone, pela amizade dedicada e importantes sugestões apresentadas na redação deste trabalho.

, A Prof<sup>\*</sup> Rosana Teodori Macher pelo incentivo durante a confecção desta tese.

Aos Técnicos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula, pela dedicação e presteza na preparação do material histológico e fotográfico.

A Secretária Silvia Helena Burghi Kalaf, pela gentileza e eficiência na digitação computadorizada deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMF, pelo uso do Laboratório de Microscopia.

# INDICE

	pág.
INTRODUÇÃO	<b>0</b> 2
OBJETIVO	07
REVISÃO DA LITERATURA	09
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS	30
ILUSTRAÇÕES	36
DISCUSSÃO	50
CONCLUSSES	71
RESUMO	73
SUMMARY	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

. ..

INTRODUÇÃO

Nas lesões nervosas periféricas onde ocorre axotmesis o reparo é normalmente feito através da sutura entre as duas extremidades. Contudo isto só é possível se o segmento nervoso lesado for de pequena extensão. Em lesões mais extensas, a sutura cria uma situação de tensão, que prejudica a irrigação local. Com isto os resultados não são satisfatórios (TERZIS et al, 1975; SUNDERLAND, 1978).

No geral, aceita-se que em lesões onde a perda de substância é de mais de 3cm, a simples conexão entre os cotos nervosos é inadequada. Nestes casos o reparo cirúrgico é geralmente feito através de um enxerto autólogo de nervo periférico. Usualmente um nervo sensitivo originário do próprio paciente substitui o segmento nervoso lesado, sendo o nervo sural mais utilizado como nervo doador (SUNDERLAND, 1978; HUDSON et al, 1979; MILLESI, 1982).

A técnica do enxerto autólogo apresenta limitações e inconvenientes, por exemplo, quando o nervo lesado for de calibre maior que o nervo sural, torna-se necessário o uso de vários segmentos do nervo doador. Para isso emprega-se a técnica conhecida como "enxerto de cabo", onde diversos segmentos do nervo doador são suturados uns paralelos aos outros entre as extremidades do nervo lesado. Obviamente com este método o número de suturas é maior e isto freqüentemente leva a formação de uma cicatriz com conseqüente isquemia na região do implante. O resultado final é que a regeneração axonal geralmente não é satisfatória. Outras vezes o segmento nervoso perdido é por

demais extenso, e a "quantidade" do nervo doador insuficiente para o reparo. Outro inconveniente, embora de menor consequência é o fato de que a remoção do nervo doador produz perda da sensibilidade da área inervada (FAWCETT & KEYNES, 1986).

Diante desse quadro, diversos laboratórios têm-se empenhado em identificar um elemento que possa ser utilizado na reparação nervosa periférica. As pesquisas envolvem materiais biológicos e não biológicos como, por exemplo: colágeno, artérias, veias, moléculas de adesão celular, tubos de silicone e polietileno (FIELDS et al, 1989). Além disto, incluem-se as pesquisas referentes aos transplantes alogênicos de nervos (ZALEWSKI & GULATI, 1982; IDE et al, 1990; TOHYAMA et al, 1990) ou xenogênicos (OSAWA et al, 1987).

Um dos elementos mais promissores para a substituição do enxerto nervoso é o músculo esquelético.

A idéia da utilização de retalhos musculares no reparo cirúrgico de nervos periféricos lesados, segundo GLASBY (1990) remonta à CAUSEY (1955).

Até o presente, a literatura mostra cerca de dezessete trabalhos experimentais e um trabalho em humanos, onde enxertos de retalhos musculares foram usados com sucesso no reparo da lesão nervosa periférica.

Na realidade o que interessa quando se utiliza o retalho muscular são os "tubos de membrana basal" do músculo, porque é através deles que ocorre a regeneração dos

З

axônios (KEYNES et al, 1984 e IDE, 1984). Em virtude disto, antes de ser implantado, o músculo doador deve sofrer um tratamento onde o conteúdo sarcoplasmático das fibras musculares é destruído e removido, preservando-se a membrana uacal. Portanto, a preparação do retalho muscular, configura-se numa importante etapa para o sucesso da reparação nervosa.

De fato, apesar do sucesso comprovado da regeneração axonal através da membrana basal muscular, o que se tem discutido e procurado aprimorar é o método de obtenção da mesma.

Os métodos iniciais de IDE (1984) e KEYNES et al (1984) preconizam o tratamento químico do músculo antes de ser implantado entre os cotos nervosos. Através desse tratamento, necessita-se de dezesseis horas para destruição e remoção do conteúdo sarcoplasmático. Após isto o músculo é comprimido entre duas superfícies planas para completar o "esvaziamento".

GLASBY et al (1986a) consideraram este método por demais trabalhoso e desenvolveram uma nova técnica para obtenção da membrana basal muscular. Esta consiste em submeter o retalho muscular a choque térmico.

Apesar do método de GLASBY et al (1986a) se mostrar menos trabalhoso e mais rápido que aquele de KEYNES et al (1984) ele apresenta alguns inconvenientes. Assim, o segmento muscular inicialmente retirado deve ser bem maior que a extensão nervosa a ser reparada, pois através do

congelamento ocorre uma forte retração muscular. Além disto o fragmento torna-se friável dificultando sua conexão cirúrgica aos cotos nervosos.

.

.

. •

.

.

. .

# OBJETIVO

.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a possibilidade de se obter um retalho muscular formado por tubos de membrana basal através de uma nova técnica: injeções intramusculares de anestésicos locais.

REVISÃO DA LITERATURA

ŕ

Tendo em vista que de uma forma indireta estamos neste trabalho abordando fenômenos de degeneração e regeneração nervosa periférica, apresentaremos a seguir uma rápida revisão de alguns aspectos referentes ao tema. Posteriormente seguir-se-á uma apresentação da literatura referente à utilização dos retalhos musculares na reparação nervosa periférica.

### A) ESTRUTURA NORMAL DO NERVO PERIFÉRICO

Os nervos periféricos são constituídos por conjuntos de axônios mielínicos e amielínicos envoltos por células de Schwann e baínhas conjuntivas.

Em geral, os axônios mielínicos apresentam diâmetro maior que 1,0 micrômetro. As células de Schwann situam-se ao longo do maior eixo do axônio e formam a baínha de mielina. O espaço existente entre uma e outra célula de Schwann constitui o nodo de Ranvier, local onde o axônio encontra-se destituído da baínha de mielina. Cada célula de Schwann relaciona-se com um axônio (ELFVIN, 1968; LANDON & HALL, 1976; FETERS et al, 1976).

Quanto aos axônios amielínicos, apresentam em geral diâmetro menor que 1,0 micrômetro, estando envolvidos, total ou parcialmente, por processos citoplasmáticos das células de Schwann.

Contrariamente aos axônios mielínicos, nos amielínicos as células de Schwann relacionam-se com vários axônios (5 a

25) no entanto, não formam a baínha de mielina. Ao longo desses conjuntos de axônios, as células de Schwann se encontram justapostas apresentando interdigitação e sobreposição de suas membranas (ELFVIN, 1968; LANDON & HALL, 1976; PETERS et al, 1976).

Os conjuntos de axônios amielínicos, bem como cada axônio mielínico é revestido externamente por uma membrana basal. Esta membrana é contínua, não se interrompendo em nenhum ponto, nem mesmo entre as células de Schwann vizinhas. Assim, estes axônios (mielínicos e amielínicos) residem no interior de um "tubo de lâmina basal" próprio, que se estende desde sua emergência na medula espinhal ou tronco encefálico até o seu alvo final na periferia (IDE et al, 1970).

O espaço entre as membranas basais dos axônios mielínicos e os conjuntos de axônios amielínicos, é preenchido pelo endoneuro. Através de análises ultraestruturais está demonstrado que o endoneuro é formado principalmente por fibrilas colágenas, alguns fibroblastos, destituídos de membrana basal, eventuais mastócitos e capilares sanguíneos (SHANTHA & BOURNE, 1968; PETERS et al, 1976; JUNQUEIRA et al, 1979; USHIKI & IDE, 1986).

Com relação aos capilares endoneurais, estudos ultraestruturais têm mostrado que suas células estão unidas por junções do tipo apertada (tight junction), similares às dos capilares presentes no sistema nervoso central, e contém numerosas vesículas (RAPOPORT, 1976; MICHEL et al, 1984;

OLSSON, 1984). Este fato tem sido interpretado por diversos autores como evidência da presença de uma barreira hematonervosa que contribui para a manutenção da homeostasia no microambiente endoneural (RECHTHANB & RAFOFORT, 1987; WEERASURIYA et al, 1989).

Revestindo externamente os fascículos nervosos encontra-se uma baínha conjuntiva denominada perineuro (PETERS & MUIR, 1959; GAMBLE & BREATHNACH, 1965).

Ao microscópio eletrônico a membrana axonal ou axolema situa-se imediatamente abaixo da baínha de mielina que circunda o axônio. No axoplasma encontra-se numerosas mitocôndrias, grande quantidade de microtúbulos e neurofilamentos difusamente distribuídos (PETERS et al, 1976).

As células perineurais estão dispostas concentricamente e são revestidas por uma lâmina basal (PETERS et al, 1976). Feixes de fibras colágenas dispõem-se no sentido longitudinal do nervo entre as células perineurais. Estas apresentam em seu interior abundantes vesículas, que parecem participar do transporte seletivo de substâncias através do perineuro. Estas características e os capilares endoneurais têm sido apontados como responsáveis pela manutenção da homeostase no microambiente endoneural (SHANTHA & BOURNE, 1968; OLSSON & KRISTENSSON, 1973; PETERS et al, 1976; OLDFORS & JOHANSSON, 1979; SHINOWARA et al, 1982; RECHTHAND & RAPOPORT, 1987; WEERASURIYA et al, 1987).

íí

Os nervos plurifasciculados, apresentam externamente uma baínha denominada epineuro, que engloba todos os seus fascículos. É constituído por grande quantidade de fibras colágenas, fibroblastos e vasos sangüíneos (PETERS et al, 1976; JUNQUEIRA et al, 1979; MONTES et al, 1984). Os fibroblastos do epineuro sintetizam o colágeno e, envolvem com seus processos vários feixes de fibras colágenas, possuem um extenso retículo endoplasmático rugoso e não apresentam membrana basal (PETERS et al, 1976).

## B) ASPECTOS DA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA

Imediatamente após a lesão de um nervo periférico inicia-se uma série de alterações nos mecanismos intracelulares, que visam a reparação da lesão. Tais eventos são expressos por modificações na morfologia dos constituintes nervosos, tanto proximal como distalmente à lesão.

Essas alterações foram inicialmente descritas por WALLER (1850) e após isto seguiu-se uma grande quantidade de trabalhos visando a compreensão desses fenômenos. Inicialmente foram empregadas técnicas argênticas e observações em microscopia óptica. Seguiu-se a isto o emprego de técnicas eletrofisiológicas e o uso de microscopia eletrônica. Mais recentemente os fenômenos da degeneração e regeneração nervosa têm sido estudadas através de técnicas imunohistoquímicas. Assim sendo, a literatura é

hoje por demais extensa e há diversos pontos a serem esclarecidos. Apesar disto existe uma base estabelecida para explicação do fenômeno (para revisão ver FAWCETT & KEYNES, 1990).

Está estabelecido que a intensidade da reação à lesão depende da forma e da gravidade da mesma. Assim por exemplo, são mais acentuadas nos casos de transecção do nervo que nos esmagamentos.

O efeito retrógrado mais precocemente observado quando se pratica uma secção nervosa ocorre no corpo do neurônio e é representada por um fenômeno conhecido como cromatólise. Ela representa a dispersão dos ribossomos e de parte do retículo endoplasmático rugoso. Além disto, o corpo celular torna-se entumescido e o núcleo migra para a periferia. A rapidez com que essas alterações se instalam, bem como sua duração, depende de alguns fatores como idade e distância entre o corpo celular e o sítio da lesão. Segundo FAWCETT & KEYNES (1990), em alguns casos o significado funcional dessas alterações é obscuro mas no geral acredita-se que elas representam eventos moleculares ligados a síntese proteica e ao transporte axoplasmático. Admite-se também que essas alterações citoplasmáticas podem resultar na morte celular.

Se o neurônio sobreviver à lesão, algumas horas após pode-se observar sinais de regeneração axonal na extremidade proximal do nervo. Tanto os axônios mielínicos como os amielínicos começam a formar os primeiros brotamentos

axonais ou neuritos em regeneração (BRAY & AGUAYO, 1974; YAWO & KUNO, 1983).

Sabe-se também que imediatamente após a lesão inicia-se no coto distal do nervo um processo autolítico caracterizado por tumefação e lise mitocondrial, desintegração dos microtúbulos e neurofilamentos, entumescimento axoplasmático que resulta finalmente em fragmentação do axônio (SCHLAEPFER & MICKO, 1978).

Algumas horas após a desintegração axonal observa-se também que as células de Schwann e os envultórios mielínicos do nervo começam a exibir as primeiras alterações estruturais. Os sinais iniciais são de hipertrofia das células de Schwann e, ao redor da primeira semana, a baínha de mielina torna-se fragmentada (ABRAHAMS et al. 1980; PTSALOS et al, 1980; LUBINSKA, 1982). Durante esta etapa observa-se também a presença de macrófagos e proliferação das células de Schwann. Destaca-se nesse evento o fato de que a membrana basal das células de Schwann permanece inalterada. As células de Schwann em proliferação tornam-se alongadas e formam-se colunas no interior dos "tubos" de membrana basal. Essas colunas são conhecidas como tubos endoneurais ou bandas de BUNGNER (FAWCETT & KEYNES, 1990). Portanto, cada uma das bandas de BUNGNER encontra-se no interior do seu próprio tubo de membrana basal que envolvia as fibras nervosas originais (IDE et al, 1990). É nesse microambiente que ocorre a regeneração axonal.

Aceita-se hoje que a membrana basal das células de Schwann possuem determinadas moléculas, como por exemplo, a laminina que é promotora de neuritos, atuando como substratos para os axônios em regeneração direcionando o crescimento dos mesmos (SANES, 1989; FAWCETT & KEYNES, 1990).

Os axônios que sobrevivem a lesão cruzam o sítio da mesma e penetram no coto distal em direção aos órgãos alvos. Está claro que a colonização do coto distal pelos axônios regenerados representam um ponto crítico para o sucesso da regeneração dos órgãos alvos e conseqüentemente de sua recuperação funcional.

No fenômeno da regeneração nervosa periférica deve-se considerar também a interação entre as moléculas do ambiente extracelular e os cones de crescimento. Diversos trabalhos têm demonstrado ação estimulatória de algumas moléculas, como por exemplo, o fator de crescimento nervoso (NGF), as quais seriam produzidas por células não neurais (VARON, 1985; FAWCETT & KEYNES, 1990).

# C) RETALHOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO NO REPARO DA LESÃO NERVOSA

Segundo GLASBY (1990) a primeira referência sobre o uso de músculo em reparação nervosa deve-se a CAUSEY (1955). O experimento de CAUSEY (1955) consistiu em reparar uma secção

de nervo ciático em coelho, a partir de autotransplante de músculo esquelético. Neste caso o músculo foi simplesmente transportado de seu leito juntamente com seu pedículo vascular. Os resultados desse procedimento foram comparados àqueles em que o reparo nervoso foi feito através de autoenxerto de nervo fibular. CAUSEY (1955) observou, então, que em ambos os casos o crescimento axonal foi limitado e que poucos axônios alcançavam a região do enxerto. Há de se considerar as precárias condições para realização de microcirurgia em relação àquelas hoje existentes. Diante desses resultados precários a técnica foi abandonada até o início da década de 1980.

A retomada do uso de músculo esquelético para o reparo da lesão nervosa foi baseada nos estudos de SANES et al (1978) e de IDE et al (1983). SANES et al (1978) observaram que no músculo desnervado há intenso brotamento axonal no decorrer da reinervação. Propuseram, então, que a membrana basal da fibra muscular, ou substâncias a ela associadas atuam estimulando e direcionando os cones de crescimento para os sítios onde existiam as junções neuromusculares. Por sua vez IDE et al (1983) observaram que os axônios regeneram no interior dos tubos de membrana basal das células de Schwann e admitiram haver semelhanças químicas entre a membrana basal e aquela das fibras musculares.

KEYNES et al (1984) e IDE (1984) prepararam retalhos musculares para o reparo nervoso, onde o objetivo era

produzir "tubos de membrana basal" das fibras musculares e observar a regeneração axonal neste material biológico.

O trabalho de KEYNES et al (1984) mostrou que as fibras nervosas crescem coaxialmente dentro dos tubos de membrana basal muscular. Observaram também que os eventos regenerativos assemelham-se àqueles vistos na regeneração axonal após neurotmese. Entretanto, eles não avaliaram o quadro regenerativo no coto distal.

As observações de IDE (1984) confirmaram que os axônios em regeneração têm uma forte tendência em crescer dentro de tubos de membrana basal muscular. Segundo esse autor um determinado axônio permanece confinado ao tubo em que inicialmente ingressou.

Deve-se a FAWCETT & KEYNES (1986) a demonstração efetiva de que retalhos de músculo esquelético podem ser utilizados na reparação da lesão nervosa periférica, inclusive no homem. Os retalhos musculares de 0,5 cm a 4 cm foram implantados respectivamente em nervos ciáticos de camundongos e ratos. Dados histológicos e eletrofisiológicos demonstraram que a regeneração nervosa é praticamente da mesma ordem daquela observada nos autoenxertos de nervo periférico.

Apesar do sucesso no uso de retalho muscular , o método de preparação do retalho empregado por FAWCETT & KEYNES

(1986) foi considerado por GLASBY et al (1986a).como muito trabalhoso. Eles introduziram, então, uma nova técnica baseada no congelamento do músculo doador.

GLASBY et al (1986b) mostraram que, quatorze dias após o implante desse tipo de enxertos em ratos, os axônios em regeneração começam a invadí-lo e ao redor do trigésimo dia já se encontram no coto distal. Ao redor do terceiro mês o número de axônios ao nível do enxerto era semelhante ao do coto distal. Ao redor do sexto mês ele era aproximadamente o mesmo dos animais normais.

Quando se estuda regeneração nervosa periférica um ponto importante a ser considerado é a espécie animal.

Aceita-se que alguns animais de laboratório, como o rato e camundongo, possuem grande capacidade de regeneração nervosa periférica. Assim, os resultados obtidos com esses animais devem ser vistos com ressalvas (GRABB, 1982).

Em função disto alguns pesquisadores estudaram a regeneração através de retalhos musculares em outros modelos experimentais.

GATTUSO et al (1988a) pesquisaram a regeneração nervosa periférica em primatas. A técnica de preparação do retalho foi aquela de GLASBY et al (1986a). Um retalho muscular de cerca de 2cm foi implantado no nervo mediano na altura da fossa do cotovelo. Verificaram, então, que uma recuperação

funcional parcial ocorre cinco meses após a cirurgia. Admite-se que a recuperação parcial deveu-se ao fato de que nesse período desenvolveu-se um quadro de atrofia muscular irreversível. Contudo, a morfologia das junções neuromusculares eram semelhantes àquelas dos animais normais.

A reparação nervosa periférica de lesões com até 5 cm de comprimento, em ovelhas, mostrou que o número de axônios regenerados no coto distal é maior se comparada com aquela observada quando se utiliza "enxerto de cabo" (GLASBY et al, 1990).

NORRIS, et al (1988) trataram pacientes com lesão de nervo digital, através do reparo cirúrgico, com autotransplante de retalho muscular esquelético. Os segmentos restaurados tinham entre 15 a 25 mm de extensão, e os retalhos foram obtidos da margem inferior do músculo peitoral maior. O método utilizado para a confecção do retalho foi o de GLASBY et al (1986a), e ao final do 11º mês, sete pacientes foram considerados como tendo um excelente nível de recuperação funcional.

Segundo PEREIRA, et al (1990), os retalhos de membrana basal muscular podem ser utilizado no tratamento de lesões nervosas crônicas, como por exemplo, aquelas produzidas pela lepra, tendo sido empregado experimentalmente com sucesso.

A viabilidade da regeneração nervosa através dos tubos de membrana basal muscular tem sido demonstrado em outros trabalhos como os de GATTUSO et al (1988a,b), GATTUSO et al

(1989), GLASBY et al (1986d; 1990), GSCHMEISSNER et al (1990), FENELEY et al (1991), FAWCETT & KEYNES (1990) e GLASBY et al (1990, 1991).

Até o presente diversos autores vem reafirmando a eficácia de tubos de membrana basal obtidos a partir de retalhos musculares para a regeneração nervosa periférica, enfatizando algumas vantagens deste tipo de enxerto em relação aos enxertos nervosos tais como: fácil manuseio, obtenção e conservação; confecção na forma e tamanho desejados; não necessitam de grandes incisões para serem obtidos; podem ser estocados e provavelmente poderão ser obtidos em animais e utilizados no homem.

## MATERIAL E MÉTODOS

•

No sentido de se determinar a dose e o músculo mais adequado a ser utilizado, realizamos estudos preliminares que consistiram no seguinte:

#### I) ESTUDOS PRELIMINARES

Foram estudados inicialmente 36 ratos Wistar femeas, com 6 a 7 semanas de idade os quais foram divididos em 12 lotes de três animais. Em cada lote, cada animal recebeu injeção intramuscular de mesmo volume, concentração e tipo de anestésico.

Os anestésicos testados foram a bupivacaína a 2% e cloridrato de lidocaína a 0,5% e 2%. Os músculos injetados foram o sóleo ou tibial anterior, sendo que em cada animal apenas um dos músculos foi injetado. Durante todo o procedimento experimental os animais encontravam-se sob anestesia geral induzida por inalação de éter etílico.

Dezoito animais foram sacrificados vinte e quatro horas após a injeção e os restantes ao final de quarenta e oito horas. Após este período, o músculo foi retirado e os animais sacrificados por inalação de éter etílico. O fragmento muscular foi, então, processado por métodos de rotina em microscopia óptica e corado com hematoxilinaeosina. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico e fotografadas em fotomicroscópio ZEISS-JENA.

#### **II) EXPERIMENTOS DEFINITIVOS**

#### A) ANIMAIS

Foram utilizados dezenove ratos Wistar femeas com 6 a 7 semanas de idade na época da cirurgia. Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central da UNICAMP.

Os animais foram divididos em três grupos. O primeiro grupo formado por cinco animais, serviu Para análise da morfologia normal do nervo ciático. O segundo grupo, formado por seis animais, recebeu autotransplante de retalho muscular do músculo tibial anterior. O terceiro grupo, formado por oito ratos recebeu autotransplante do músculo sóleo.

## B) CONFECÇÃO DO RETALHO MUSCULAR

### B.i) Injeção dos Anestésicos

Os animais foram levemente anestesiados por inalação de éter etílico. Procedeu-se, então, a depilação das regiões ântero-lateral da perna direita nos casos do músculo tibial anterior e póstero-lateral para o músculo sóleo.

Sob microscópio cirúrgico ZEISS e com o animal em decúbito ventral fez-se uma pequena incisão na região preparada para exposição dos músculos.

Com seringa de iml e agulha de 13x4, injetou-se 0,3ml de cloridrato de lidocaína (Xilocaína® - Merrell Lepetit) à 2% na porção média do músculo tibial anterior nos animais do segundo grupo. O mesmo procedimento foi realizado nos casos do músculo sóleo, sendo que o volume injetado foi de 0,1ml de anestésico. Em seguida a ferida cirúrgica foi fechada com dois ou três pontos de sutura feitos com fio de algodão 6-0 (ETHICON).

Após se recuperarem da anestesia, os animais foram mantidos com ração e água "ad libitum", durante vinte quatro horas no Biotério do Departamento de Anatomia do IB da UNICAMP.

#### B.2) Retirada do Retalho Muscular

Vinte e quatro horas após os animais terem recebido as injeções de cloridrato de lidocaína foram novamente anestesiados. Fara tal foi injetado intraperitonialmente uma mistura de 1:1 de cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>R</sup> - 50 mg/ml) e cloridrato de tiazina (Rumpun<sup>R</sup> - 2g/100 ml) na dose de 0,3 ml/100 g de peso corporal. Imediatamente após o animal mostrar sinais de anestesia geral as regiões glútea e posterior da coxa esquerda foram depiladas.

A seguir, procedeu-se a retirada dos retalhos musculares. Para isto os animais foram colocados em decúbito ventral e com auxílio do microscópio cirúrgico, a ferida cirúrgica do dia anterior foi novamente aberta.

No caso do músculo tibial anterior foi retirado um bloco com aproximadamente 7 mm de comprimento e 2-3 mm de diâmetro. Sob lupa e com o retalho muscular banhado em solução salina 0,9%, procedeu-se a uma fina dissecção do

fragmento colhido, deixando-o com diâmetro levemente superior ao do nervo ciático e com comprimento de 5 mm.

Nos casos em que os retalhos musculares foram obtidos a partir do músculo sóleo, os procedimentos iniciais também visaram a abertura da ferida ciúrgica feita anteriormente. Para a confecção do retalho propriamente dito o músculo sóleo foi seccionado proximal e distalmente, e retirado quase que todo seu ventre muscular. Também com auxílio de lupa procedeu-se a "lapidação" do retalho com exerese das extremidades tendinosas. Ao final tinha-se um bloco de 3-4 mm de comprimento e diâmetro semelhante ao do nervo ciático. A seguir suturou-se a pele dos animais com dois ou três pontos com fio de algodão 6.0 (ETHICON).

#### C) IMPLANTE DO RETALHO

A cirurgia do implante muscular foi realizada imediatamente após a obtenção deste. Ainda com o animal em decúbito ventral e com auxílio do microscópio cirúrgico, a pele da região glútea e posterior da coxa esquerda foi aberta com uma incisão de 1 cm de comprimento, acompanhandose o trajeto da projeção do nervo ciático na superfície corpórea. Os planos musculares foram afastados até a visualização e exposição do nervo ciático.

Nos casos dos animais que receberam o implante de músculo tibial anterior, o nervo ciático foi seccionado com

tesoura microcirúrgica de tal forma que um segmento de cerca de 1 mm de comprimento fosse retirado. Após a retração natural dos cotos proximal e distal do nervo ciático, o que produziu uma distância de 4-5 mm entre os mesmos, procedeuse o implante do retalho muscular autólogo.

Os segmentos proximal e distal do nervo foram fixados no retalho muscular através de dois Pontos para cada coto e com sutura epineural. As suturas foram feitas com fio monofilamento nylon 10.0 DERMALON. Tomou-se o cuidado para que os cotos não ficassem sob tensão.

No caso dos animais que receberam o autotransplante muscular proveniente do músculo sóleo o nervo ciático foi exposto da mesma forma anteriormente descrita. Entretanto, ele foi simplesmente seccionado com uma tesoura microcirúrgica. Nenhum fragmento do nervo foi retirado. Após retração natural dos cotos proximal e distal procedeu-se o implante de um segmento de 3-4 mm da mesma forma anteriormente descrita para o músculo tibíal. Em ambos os casos, suturou-se o plano muscular com dois pontos com fio de algodão 6.0 e em seguida a pele.

D) SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DO MATERIAL

Após período de sobrevida de 50 dias, os animais foram anestesiados da mesma forma descrita para a retirada e implante dos retalhos.

Com auxílio do microscópio cirúrgico o nervo ciático foi exposto e fixado "*in situ*" com fixador de KARNOVSKY (1965) modificado contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7.3. O fixador à 4°C foi deixado banhando o nervo por cerca de 10 minutos.

Após esse período de fixação o nervo ciático foi retirado e seccionado em dois segmentos, um correspondente à região do retalho muscular e o outro referente ao coto distal.

Os fragmentos eram deixados na mesma solução fixadora por um período de 1-2 horas e pós-fixados por duas horas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.3, desidratado em etanol e óxido de propileno e incluído em resina Araldite Uegama®.

Cortes transversais de un micrômetro foram feitos com navalha de vidro em ultramicrótomo LKB e corados com azul de toluidina a 1% em solução aquosa de Bórax a 1% para microscopia óptica. Cortes ultrafinos foram obtidos com navalhas de diamante e corados com acetato de uranila a 5% em água e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). Para microscopia óptica o material foi fotografado em fotomicroscópio Zeiss-Jena. Para microscopia eletrônica o material foi examinado e fotografado em microscópio eletrônico Zeiss EM-10, operados a 60 kV.

E) OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS NERVOS CIÁTICOS NORMAIS

Os procedimentos utilizados para a anestesia, retirada e preparação para a microscopia eletrônica foram os mesmos descritos respectivamente nos itens B2; e D.

RESULTADOS

#### A) ASPECTOS HISTOLÓGICOS DOS RETALHOS MUSCULARES

Vinte e quatro horas após a injeção do cloridrato de lidocaína a 2%, os dois músculos mostram extensa mionecrose com infiltrado inflamatório. Entretanto, na periferia observa-se fibras musculares sobreviventes. A população destas é maior no músculo tibial anterior.

Apesar do intenso infiltrado inflamatório no músculo tibial anterior, parte das fibras necróticas ainda não está presente. Estas apresentam características de necrose coagulativa como aumento da basofilia, aspecto vítreo do sarcoplasma; desorganização e condensação das miofibrilas e ausência do núcleo. Outra parte das fibras necróticas já removidas, mostra apenas o contorno celular o qual provavelmente é formado por restos do sarcolema e membrana basal (FIG. 1 e 2).

No músculo sóleo o processo de remoção do material necrótico está em fase mais adiantada. O infiltrado inflamatório é mais intenso e predominam as fibras musculares "vazias", as quais são reconhecidas pelos seus contornos (FIG. 3 e 4). Praticamente toda a área de secção transversal apresenta-se com esse aspecto.

Nos dois casos, os retalhos dos músculos sóleo e tibial anterior, apesar de apresentar infiltrado inflamatório perivascular e da pavimentação leucocitária do endotélio vascular, não se observam sinais de oclusão arterial.

B) ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO NERVO NORMAL

No exame dos 5 nervos ciáticos os aspectos morfológicos gerais mostram as características descritas na literatura (Fig. 5).

O perineuro está formado por camadas de células achatadas dispostas concentricamente e entre elas identificam-se feixes de fibras colágenas.

Os axônios apresentam-se geralmente com perfil circular. No endoneuro são identificados feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente ao maior eixo dos axônios, capilares, ocasionalmente mastócitos e fibroblastos.

Os axônios mielínicos mostram-se revestidos pela célula de Schwann e sua baínha de mielina. No axoplasma são identificados microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias. Conjuntos de axônios amielínicos estão revestidos por uma única célula de Schwann (Fig. 6).

### C) ASPECTOS MACROSCÓPICOS NO LOCAL DO IMPLANTE

Após 50 dias nos dois grupos estudados, o aspecto macroscópico no local do segmento implantado é semelhante.

Aparentemente a região correspondente ao fragmento implantado apresenta diâmetro ligeiramente maior que aqueles correspondentes ao restante do nervo. Observa-se também que a região implantada possui uma coloração amarelada e uma
extensa rede vascular. Esses aspectos permitem identificar com relativa facilidade os limites entre o implante e os cotos proximal e distal. Chama atenção o aumento de tecido adiposo disposto especialmente na face profunda do nervo regenerado.

## D) ASPECTOS HISTOLÓGICOS AO NÍVEL DO IMPLANTE

A regeneração axonal é observada tanto nos retalhos do músculo tibial como nos do sóleo, em todos os casos estudados (Fig. 7, 8, 9 e 10).

Os axônios mielínicos mostram-se agrupados em pequenos fascículos (minifascículos) delimitados por células semelhantes às perineurais (Fig. 11 e. 12). A maioria apresenta ultraestrutura compatível com o normal. No axoplasma identificam-se neurotúbulos, microfilamentos e mitocôndrias aleatoriamente distribuídas. No endoneuro notase aumento no teor de fibras colágenas, fibroblastos e mastócitos em relação ao normal. Observa-se também feixes de axônios amielínicos, envoltos por células de Schwann (Fig. 13).

Com frequência, ao nível do implante, são observados axônios mielínicos em degeneração. Caracteristicamente, a membrana axolemal mostra-se retraída em relação a camada mais interna da baínha de mielina. O axoplasma apresenta-se com aumento da eletrondensidade. A baínha de mielina mostra

sinais de desintegração (Fig. 13). Esses aspectos são vistos em todos os casos.

O perineuro mostra diferentes graus de organização. Em alguns casos as células perineurais apresentam-se frouxamente dispostas ao redor do nervo regenerado, parecendo que estão ainda em processo de organização (FIG. 11). A microscopia eletrônica verifica-se que o perineuro está formado por diversas camadas de células e entre elas fibras colágenas (FIG. 14).

Em alguns casos observa-se pequenos grupos de feixes axonais externamente ao epineuro.

Em todos os casos, tanto para o músculo sóleo como para o tibial anterior, na periferia do retalho são identificadas fibras musculares (FIG. 7, 8, 9, 10). Entretanto, a população destas fibras parece sempre maior nos casos do tibial anterior. Apesar de atróficas, as fibras tem miofibrilas com arquitetura que lembrava o normal, bem como núcleos perifericamente situados (FIG. 8 e 10).

## E) ASPECTOS HISTOLÓGICOS AO NÍVEL DO COTO DISTAL

O achado mais importante é que em todos os casos estudados o coto distal é invadido e colonizado pelos axônios em regeneração (FIG. 15 e 16).

O arranjo geral dos axônios assemelha-se ao normal, exceção feita a um aparente aumento do colágeno endoneural.

A população celular consiste de células de Schwann e os axônios a elas associados. Um achado característico é a ausência de minifascículos.

O perineuro apresenta-se formado por seis a oito camadas de células circunferencialmente dispostas e com membrana basal num arranjo essencialmente semelhante ao do nervo normal. Em alguns casos são observados pequenos feixes axonais situados externamente ao epineuro (FIG. 17).

FIGURAS

FIG. 1 - Corte transversal do músculo tibial anterior 24 horas após injeção de 0,3 ml de cloridrato de lidocaína a 2%. Observar infiltrado inflamatório e fibras musculares necróticas em fagocitose (setas). HE. <u>400X</u>

FIG. 2 - Corte transversal do músculo tibial anterior. Observar fibras musculares "vazias" (\*). HE. <u>1.200X</u>

•





FIG. 3 - Corte longitudinal do músculo sóleo, 24 horas após injeção do anestésico. Fibras musculares necróticas removidas por intenso infiltrado inflamatório. Observar à esquerda os contornos das fibras musculares (setas). HE. <u>100X</u>

FIG. 4 - Corte transversal do músculo sóleo, 24 horas após a injeção. Observar predomínio de fibras musculares vazias (pontas de seta). HE. <u>300X</u>



FIG. 5 - Corte transversal do nervo ciático de animais normais no terco médio da coxa. Observe dois fascículos separados por células perineurais (PERsetas) e no canto superior esquerdo o epineuro. Tetróxido de ósmio. <u>100X</u>

FIG. 6 - Corte transversal do nervo ciático normal. Axônios mielínicos (Mie) com células de Schwann (S) e amielínicos (Ami-setas). <u>Z.000X</u>

(



FIG. 7 - Regeneração axonal do enxerto de músculo tibial anterior. Observar feixes de axônios e fibras musculares na periferia. Tetróxido de ósmio. <u>180X</u>

FIG. 8 - Detalhe da figura anterior. Notar fibras musculares atróficas (\*) e entre elas pequenos feixes axonais (setas). Tetróxido de ósmio. <u>1.000X</u> ł.



FIG. 9 - Regeneração axonal do enxerto de músculo sóleo. Observar feixes de axônios e fibras musculares na periferia. Tetróxido de ósmio. <u>200X</u>

FIG. 10 - Detalhe da figura anterior. Fibras musculares atróficas. Observar bandas A (seta curva), I (seta reta) e Vasos (ponta de seta). Tetróxido de ósmio. <u>800X</u>



FIG. 11 - Corte espesso do nervo ciático regenerado ao nível do retalho de músculo tibial anterior. Observar axônios dispostos em minifascículos. Tetróxido de ósmio. <u>250X</u>

ļ.



FIG. 12 - Micrografia eletrônica de axônios regenerados ao nível do retalho muscular. Feixes de axônios amielínicos (\*). Célula perineural (seta) envolvendo axônio. Axoplasma com microtúbulos e neurofilamentos. Observar citoplasma das células de Schwann (S) e aumento do colágeno endoneural (COL). 12.500X



FIG. 13 - Micrografia eletrônica de axônio em degeneração ao nível do retalho muscular (\*). Notar aumento da eletrondensidade axoplasmática, retração axolemal e desintegração da baínha de mielina. Notar núcleo de célula de Schwann e axônios amielínicos (S). <u>12.000X</u>



FIG. 14 - Micrografia eletrônica de células perineurais e feixes de fibras colágenas entre elas (\*) ao nível do retalho muscular. <u>30.000X</u>

ŗ



FIG. 15 - Corte espesso de nervo ciático regenerado ao nível do coto distal. Observar ausência de minifascículos e axônios em degeneração (setas). Tetróxido de ósmio. <u>300X</u>



FIG. 16 - Detalhe da fotografia anterior. Notar axônios em degeneração (setas). Capilar (C). Tetróxido de ósmio. <u>1.200X</u>

ļ





• •

· · ·

# DISCUSSÃO

.

## A) SOBRE O PREPARO DO RETALHO MUSCULAR

O primeiro método para o tratamento do músculo foi proposto por KEYNES et al (1984). Nesse procedimento, o fragmento muscular era inicialmente imerso em água destilada à 0°C por 15 minutos e lavado em uma mistura de cloreto de cálcio e imidazol (pH 7,2), permanecendo por duas horas. A seguir, lavado em cloreto de potássio (pH 8,2) e deixado por duas horas em uma solução 0,09% de trietanolamina (pH 8,7-9,0). O fragmento era, então, lavado novamente em cloreto de potássio (pH 8,2), ficando nesta solução durante toda a noite. Após isto, com o objetivo de remover o conteúdo sarcoplasmático, o fragmento muscular era comprimido entre duas superfícies planas. Conforme referido pelos próprios autores, esse método deveria ser aprimorado pois, cerca de 50% do sarcoplasma não era removido.

Atualmente, o método mais utilizado é o de GLASBY et al (1986a), que consiste em mergulhar o fragmento muscular em nitrogênio líqüido e, em seguida, lavá-lo em água destilada. Apesar de ser menos trabalhoso e demorado que o método anterior, GLASBY et al (1986a) chamam atenção para algumas dificuldades. Assim, por exemplo, o fragmento muscular original deve ser bem mais extenso que aquele desejado pois, durante o congelamento sofre forte retração. Em geral, o fragmento muscular congelado torna-se "quebradiço", dificultando a sutura do mesmo nos cotos nervosos.

Além das dificuldades acima citadas a confecção do retalho muscular tem exigido cuidados de laboratório como, por exemplo, minimizar os riscos de contaminação. Isto motivou-nos a estudar a possibilidade de se criar um novo método, de confecção menos trabalhosa e que pudesse ser feito "*in vivo*".

A fundamentação teórica do novo método por nós idealizado reside no fato de que os anestésicos locais são potentes agentes miotóxicos e podem produzir, em função da dose, extensa e rápida necrose de fibras musculares esqueléticas (BENOIT & BELT, 1972).

A mionecrose é observada logo nos primeiros minutos após a injeção (JONES, 1982; NONAKA et al, 1983), sendo que a extensão e intensidade da lesão dependerão especialmente da concentração e do volume de anestésico injetado.

Admite-se que a patogênese da mionecrose deve-se inicialmente à lesão sarcolemal, seguida de entrada súbita e abundante do íon cálcio extracelular para o sarcoplasma. É bem conhecido o fato de que a concentração de íons Ca<sup>++</sup> no meio extracelular é cerca de 10.000 vezes maior que no sarcoplasma, onde a concentração de Ca<sup>++</sup> livre é de 10<sup>-7</sup>M (FARBER, 1982). Estes íons, de fundamental importância para a ativação do mecanismo de contração muscular, são rigidamente controlados através de bombeamento ativo a nível

das membranas do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias, bem como pela bomba de cálcio do sarcolema.

Na fibra em repouso, o sistema troponina-tropomiosina (proteínas reguladoras) impede a interação entre a actina e a miosina. O potencial de ação faz com que o Ca<sup>++</sup> seja liberado do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma e, quando a concentração atinge 10<sup>-5</sup>M, o Ca<sup>++</sup> liga-se a troponina a qual sofre transformações estruturais que se transmitem à tropomiosina. Essas alterações nas proteínas reguladoras tornam possível a interação do sistema actinamiosina e, conseqüentemente, a contração muscular (HUXLEY, 1974; COHEN, 1975). Por ocasião da lesão sarcolemal, os íons em excesso produziriam hipercontração das miofibrilas com conseqüente mionecrose.

Algumas horas após a injeção de anestésicos instala-se um quadro inflamatório, caracterizado inicialmente pelo predomínio de neutrófilos e, a seguir, pelo afluxo de macrófagos. A intensidade da lesão, bem como da resposta inflamatória, também depende da concentração e do volume do anestésico. Contudo, aceita-se que ao redor da sexta hora tem início a remoção do material necrótico e, dentro de vinte e quatro horas, grande parte do material já tenha sido removido.

Um fato a ser destacado é que, durante toda a etapa da resposta inflamatória, a membrana basal mantém-se presente e

aparentemente inalterada (NONAKA et al, 1983: SANTO NETO, 1987). Após a remoção do material necrótico, as fibras musculares pré-existentes estão representadas apenas pelo seu contorno de membrana basal e fragmentos sarcolemais. Nesta fase há um predomínio de "tubos de membrana basal muscular", semelhantes aos produzidos pelos métodos químicos de KEYNES et al, 1984 e físicos de GLASBY et al ,1986a.

Assim, imaginamos poder construir os retalhos de membrana basal muscular a partir de injeções intramusculares de anestésicos locais.

A produção dos tubos de membrana basal com este método seria relativamente fácil, se não tivéssemos que considerar o fenômeno da regeneração muscular.

O músculo estriado esquelético possui grande capacidade regenerativa. Isto tem sido observado mesmo após lesões intensas, como as produzidas pela fragmentação do músculo e nos transplantes musculares livres (para revisão ver CARLSON, 1986).

A capacidade de regeneração muscular parece dependender, principalmente, da sobrevivência das células satélites (CARLSON, 1986).

A célula satélite foi descrita inicialmente por MAURO (1961) no músculo esquelético de rã e, desde então, tem sido encontrada em uma série de vertebrados, inclusive em camundongos. É uma célula fusiforme, mononucleada situada

entre a membrana basal e o sarcolema, do qual é separada por um espaço de 15-20nm (REGER & CRAIG, 1968). Sua localização e aspecto se confundem àqueles dos núcleos das fibras musculares. O que torna a avaliação de suas condições funcionais impossível à microscopia óptica e muito difícil à microscopia eletrônica (MAURO, 1979).

Inicialmente, imaginamos que a obtenção de um retalho muscular ideal exigiria a morte das células satélites. Caso contrário, teríamos regeneração axonal e muscular ocorrendo simultaneamente.

Dados da literatura mostram que as células satélites possuem grande resistência aos agentes químicos e físicos causadores de isquemia, resistindo inclusive aos métodos de fragmentação de um músculo.

é justamente sobre esta capacidade da célula satélite de resistir aos processos isquêmicos que se assenta a base teórica dos enxertos musculares livres para restauração da função muscular. Estes consistem em transplantar um determinado músculo sem que sua irrigação e reinervação sejam cirurgicamente restabelecidas. No primeiro dia após o implante as fibras musculares mais profundamente situadas sofrem necrose, mas as células satélites permanecem viáveis. A partir delas o músculo consegue sua "*restitutio ad integrum*" (CARLSON et al, 1979, CARLSON 1986).

As células satélites também têm se mostrado resistentes aos anestésicos locais. No músculo sóleo elas não são afetadas por injeção de 0,5 ml de bupivacaína a 0,5% (NONAKA

et al., 1983). Lidocaína, mepivacaína e procaína em volume de 0,5 ml e concentração de 0,5% também não produzem lesões de fibras musculares, tampouco de células satélites. Por outro lado, a bupivacaína a 2% produz também lesões vasculares levando a trombose da rede microcirculatória local.

Fortanto, o primeiro passo a ser estabelecido neste trabalho foi o tipo do anestésico local, sua concentração e dosagem que provocasse extensa mionecrose. Desejávamos também que a reprodução das células satélites fosse dificultada ao máximo, melhor ainda se impedida. Ao mesmo tempo, ele não deveria produzir lesões vasculares, especialmente trombose, o que diminuiria o afluxo de células inflamatórias. Isto dificultaria a remoção do material necrótico, que seria obviamente indesejável.

Considerando-se os eventos regenerativos musculares, deveríamos determinar também quanto tempo após a injeção do anestésico o músculo estaria em condições ideais para ser utilizado como implante.

Sabe-se que a regeneração da fibra muscular, via de regra, mostra seus primeiros indícios morfológicos ao redor da 36<sup>m</sup> hora após a injeção. Nesse tempo o quadro regenerativo é caracterizado pela presença de pequenos mioblastos. Ao redor do quarto dia, já se observa população de miotubos. O tempo em que estes eventos ocorrem independe da natureza do agente nocivo (BENOIT & BELT, 1972; NONAKA et al, 1983; QUEIROZ et al, 1984; SANTO NETO, 1987).

Durante o fenômeno da regeneração muscular, a fusão dos mioblastos em miotubos e o crescimento destes é feito no interior dos tubos de membrana basal muscular (ALLBROOK, 1962; VRACKO & BENDITT, 1972; BISCHOFF, 1979). Considerando que o nosso objetivo era de implantar "tubos vazios de membrana basal" procuramos estabelecer o tempo em que o retalho muscular deveria ser implantado, após o mesmo ter recebido a injeção do anestésico. Caso contrário, estaríamos transplantando tubos de membrana basal preenchidos com fibras musculares em regeneração. Desde que este fato ocorre no interior da membrana basal, imaginamos que a regeneração das fibras musculares poderia competir com a regeneração axonal.

Na tentativa de solucionar essas questões, antes da avaliação da regeneração axonal propriamente dita, fizemos um estudo piloto. Deste estudo, concluímos que o músculo sóleo e o tibial anteríor apresentam extensa mionecrose vinte e quatro horas após a injeção de cloridrato de lidocaína a 2%. Para o músculo tibial anterior o volume necessário é de 0,3 ml e para o sóleo é de 0,1 ml. Nesse tempo, praticamente toda a população de fibras necróticas sido removida no músculo sóleo. O havia quadro característico era a presença de um rico infiltrado inflamatório e as antigas fibras musculares estavam circundadas por tênues estruturas, às quais provavelmente representavam a membrana basal e restos sarcolemais. Por outro lado, no músculo tibial anterior boa parte das fibras

necróticas ainda permaneciam, mas a atividade fagocítica era intensa.

As diferenças nos índices de remoção entre os dois músculos estudados estão de acordo com a literatura. Está estabelecido que os músculos de contração lenta como o sóleo possuem maior sensibilidade aos anestésicos locais (BENOIT & BELT, 1972; NONAKA et al, 1983). Assim, era esperado que os processos degenerativos e reparativos se instalassem mais precocemente neste músculo. O quadro morfológico observado vinte e quatro horas após a injeção atendia parte de nosso objetivo, uma vez que estavam presentes tubos de membrana basal praticamente vazios.

Diante disto, imaginamos que o quadro de "esvaziamento" das fibras musculares e a ausência de fibras musculares em regeneração poderiam ser compatíveis com a regeneração axonal, pois FAWCETT & KEYNES (1986) relataram que através de seu método cerca de 50% dos restos necróticos resistem ao esvaziamento e mesmo assim ocorreu regeneração. Concluímos que 24 horas após a injecão do anestésico seria o tempo adequado para que as fibras musculares ficassem desprovidas de seu conteúdo sarcoplasmático, restando principalmente tubos de membrana basal.
## B) SOBRE A REGENERAÇÃO AXONAL

O sucesso ou falência da reparação da lesão nervosa periférica é determinado pela regeneração axonal no sítio do implante, pela proporção desses axônios que alcançam o coto distal e também pelo restabelecimento de suas conexões com o órgão alvo. Nossas observações qualitativas mostraram que os axônios cresceram na região do implante e, em todos os casos, recolonizaram o coto distal.

Apesar das diferenças no teor de "tubos vazios" na ocasião do implante, observamos que o quadro geral da regeneração foi semelhante nos dois tipos de retalhos.

Esses dados não são surpreendentes, uma vez que no reparo de nervos com músculo não tratado, ou seja, com as fibras musculares intactas, também ocorre regeneração axonal.

As diferenças fundamentais ficam por conta do tempo em que se inicia a colonização do retalho e do coto distal. Ele é maior quando se usam músculos não tratados. Assim, por exemplo, duas semanas após o reparo, o número de axônios mielínicos ao nível do implante é cerca de dez vezes maior no músculo tratado em relação ao não tratado (GLASBY et al, 1986b). Outros autores relatam que, na primeira semana após o implante, o número de axônios ao nível do retalho e no coto distal é duas vezes maior em músculos tratados do que em músculos não tratados. Contudo, ao redor da terceira semana esses números são semelhantes para os dois tipos de retalhos (FENELEY et al, 1991).

Desde que na ocasião do implante o músculo tibial anterior apresentava uma maior população de fibras necróticas, não é improvável que os implantes com músculo sóleo tenham recebido axônios em regeneração mais precocemente que aqueles do tibial anterior.

Este fato merece um estudo mais detalhado pois, a melhor recuperação funcional motora e sensitiva do músculo depende do tempo em que ele permanece desnervado. Desde o trabalho pioneiro de GUTMANN & YDUNG (1944) sabe-se que o teor de fibrose intersticial muscular é diretamente proporcional ao tempo de desnervação do músculo. A partir de um determinado momento, a fibrose intersticial atua como um fator mecânico impedindo a chegada dos cones de crescimento aos sítios juncionais.

Outro ponto a ser discutido sobre nossos resultados refere-se a constatação da presença de fibras musculares morfológicamente íntegras ao nível do retalho muscular, após cinquenta dias de sobrevida.

Duas observações devem ser feitas. A primeira diz respeito ao fato de que nos dois casos estudados, especialmente nos retalhos de músculo sóleo, as fibras musculares íntegras dispunham-se na periferia do nervo regenerado. A segunda refere-se a população dessas fibras musculares. Esta pareceu-nos nitidamente maior quando foram empregados retalhos do músculo tibial anterior.

Esses achados estão de acordo com o quadro por nós verificado nos estudos preliminares. Conforme já registrado, naquele momento havia diferenças entre a população de fibras musculares necróticas não removidas e também de fibras viáveis.

As fibras musculares necróticas foram removidas e as fibras viáveis provavelmente comportaram-se como no caso dos transplantes musculares lívres (CARLSON, 1973, 1986; CARLSON et al, 1979; SCHULTZ et al, 1988).

Assim sendo, é provável que, quando o retalho muscular foi implantado, as fibras não necróticas dispostas na periferia tenham sido nutridas por difusão.

Nesse sentido, é importante considerar que o aspecto das fibras musculares presentes ao nível do retalho era de fibras pré-existentes. Não notamos a presença de fibras musculares regeneradas, cuja característica básica é a posição central do núcleo (CARLSON, 1973, 1986; QUEIROZ et al, 1984; SANTO NETO, 1987). Este fato permitiu-nos considerar ser provável que as células satélites, de algum modo, foram impedidas de se diferenciar ou mesmo sobreviver após a ação do cloridrato de lidocaína.

A presença de fibras musculares ao nível da prótese em geral, não é referida pelos autores que utilizaram retalhos musculares para a regeneração axonal, com exceção de GLASBY

et al (1986b). É provável que realmente nos retalhos confeccionados por congelamento não ocorra a presença de fibras musculares. Seguramente as fibras musculares não resistem ao tratamento. Neste particular o método de GLASBY et al (1986a), seria vantajoso em relação ao nosso.

Um achado constante em nossos resultados foi a presença de minifascículos axonais ao nível do implante. Esses eram caracterizados pela presença de axônios mielínicos e amielínicos, cujo diâmetro total do minifascículo assemelhava-se ao de uma fibra muscular. Resultado semelhante é descrito em trabalhos que se utilizam de membrana basal muscular para o reparo nervoso (FAWCETT & KEYNES, 1986; GLASBY et al, 1986c; GLASBY et al, 1990; GLASBY, 1990; GSCHMEISSNER et al, 1990; PEREIRA et al, 1990; FENELEY et al., 1991; GLASBY et al, 1991).

Contudo, a presença de minifascículos no processo de regeneração nervosa periférica não é um achado exclusivo da regeneração em retalhos musculares. Este fenômeno tem sido observado também em nervos regenerados em próteses tubulares (LANGONE, 1991), autotransplante de nervos (JENQ & COGGESHALL, 1987), e mesmo após transecções de nervos periféricos (SUNDERLAND, 1978).

A formação dos minifascículos é o produto final de uma següência de eventos morfológicos os quais são conhecidos como compartimentalização.

6i

Segundo MORRIS et al (1972) a presença de agrupamentos de axônios mielínicos e amielínicos, em nervos periféricos regenerados é conhecida desde os trabalhos iniciais de RANVIER (1878); RAMON Y CAJAL (1928); RANSON (1912); NAGEOTTE (1922). Esse fenômeno foi também descrito como "hiperneurotização" das bandas de BUNGNER (SCHROEDER, 1968).

Nos estágios iniciais da compartimentalização, as expansões das futuras células perineurais dispõem-se de forma concêntrica delimitando pequenos feixes axonais em início de mielinização e axônios amielínicos, associados à células de Schwann. Durante algum tempo houve discussão a respeito da origem das células perineurais (SHANTHA & BOURNE, 1968), entretanto, recentemente BUNGE et al (1989) empregando técnicas de biologia molecular demonstraram que as células perineurais originam-se de fibroblastos.

Em uma segunda etapa ocorre sobreposição das expansões das futuras células perineurais, que permanecem dispostas circunferencialmente segregando elementos nervosos e fibras colágenas no seu interior. Finalmente, os fascículos apresentam-se bem delimitados, o que é feito por 2 a 4 células perineurais, entremeadas por feixes de fibras colágenas (MORRIS et al, 1972).

O tempo de duração e da formação dos fascículos depende das condições em que ocorre a regeneração axonal. Em camundongos a regeneração do nervo ciático no interior de próteses tubulares vazias inicia-se ao redor da segunda semana e completa-se na quarta semana (LANGONE, 1991).

Apesar disto aceita-se, no geral, que a formação dos fascículos se completa entre a 5° e 6° semana de regeneração e que estes minifascículos também são delimitados por células neo formadas (UZMAN & VILLEGAS, 1983; SCARAVILLI, 1984; Le BEAU et al, 1988b; FIELDS et al, 1989).

Nossos resultados mostram que no 50° dia após o implante, os minifascículos estão completamente desenvolvidos ao nível do retalho muscular. O aspecto geral da minifasciculação é semelhante ao descrito nas pesquisas onde retalhos musculares foram preparados por outros métodos (GLASBY et al, 1986b; FAWCETT & KEYNES, 1986; GSCHMEISSNER et al, 1990; MATTAR et al, 1990; PEREIRA et al, 1990).

Aceita-se que funcionalmente a compartimentalização restabelece a homeostasia para a regeneração axonal. MORRIS et al (1972) denominaram de "unidades de regeneração" a cada um dos futuros minifascículos, cujos componentes representariam brotamentos axonais de um único axônio.

Entende-se também que a destruição do perineuro atuaria como estímulo para a formação dos minifascículos. Durante a regeneração axonal no interior de próteses vazias, a resposta pós-traumática é seguida por migração e proliferação celular em direção ao tubo. Os fibroblastos representam uma grande fração dessa população celular (FIELDS et al, 1989). Dessa forma os fibroblastos

precursores das células perineurais alcançariam o sítio de regeneração.

Nossas observações mostram que os minifascículos estão delimitados por células perineurais. Admitimos essa possibilidade a partir do fato de que as células que circundam os axônios apresentam membrana basal em ambas as faces. Este fato tem servido como característica diferencial entre células perineurais e fibroblastos. Além disto, quando analisado em microscopia eletrônica, um fibroblasto típico possui retículo endoplasmático rugoso bastante desenvolvido (SHANTHA & BOURNE, 1968).

Não há na literatura referências sobre a origem dos precursores das células perineurais, quando se utilizam retalhos de membrana basal. Também não foi nosso objetivo estudar esse aspecto. Contudo entendemos que, da mesma forma que ocorre em outras situações, os fibroblastos devem invadir o retalho muscular, não só pelas extremidades do retalho mas também a partir de todo o leito em que foi colocado. Além disso, podemos admitir que eles tenham origem no próprio interstício do retalho muscular implantado.

Ao nível do coto distal não observamos presença de minifascículos, o que está de acordo com a literatura.

Em alguns casos foram observados pequenos feixes de axônios mielinizados externamente ao epineuro. Quadro semelhante foi relatado com o emprego de retalhos musculares (FAWCETT & KEYNES, 1986) e em autotransplante de nervo periférico (MACKINNON et al, 1986). É provável que isto

ocorreu em função das variações individuais da conexão do implante com os cotos nervosos.

FAWCETT & KEYNES (1986), referem que a rota seguida pelos axônios durante seu crescimento depende da maneira como o implante é alinhado. Aceita-se que nos transplantes de nervos os axônios que não são "envolvidos" pelas unidades de regeneração desviam-se para a periferia (MACKINNON et al, 1986).

Uma importante diferença entre nossos achados e aqueles da literatura, referentes ao emprego dos retalhos musculares, refere-se ao aspecto dos axônios mielínicos.

Nossas observações mostram que frequentemente, tanto ao nível do retalho como no coto distal há evidentes sinais de degeneração axonal. Eles são representados principalmente pela desintegração da baínha de mielina e aumento da elétron-densidade axoplasmática.

Na literatura não há referências sobre a ocorrência de degeneração axonal no interior do retalho após o tempo de sobrevida de cinquenta dias ou mais (GLASBY et al, 1986b; MATTAR et al, 1990).

Entretanto, processos de degeneração Walleriana são descritos até o terceiro mês pós-implante de autoenxerto de nervo ciático, em ratos (MACKINNON et al, 1986).

Esse fato nos leva a crer que os axônios em degeneração do coto distal, eram os pré-existentes. A favor desta

hipótese temos as observações de RODRIGUES DE OLIVEIRA (1993), as quais mostram que cinquenta dias após a transecção do nervo ciático e, na ausência intencional de regeneração no coto distal, este ainda apresenta sinais de degeneração axonal.

Acreditamos que outra possível explicação para a existência de axônios em degeneração deve-se ao fenômeno conhecido como "sprouting" ou brotamento axonal.

Está bem estabelecido que o fenômeno do brotamento é uma resposta característica à lesão neuronal, independente da natureza desta. Ele foi observado mesmo após desnervação parcial ou tratamento com neurotoxinas que bloqueiam a transmissão nervosa ou o transporte axonal (GORIO, 1984; WERNIG & HERRERA, 1986; ROBBINS, 1988). Os brotamentos originam-se ao nível dos nodos de RANVIER ou no local onde os axônios perdem sua baínha de mielina. O resultado final desse fenômeno é que de cada axônio original produz diversos ramos axonais mielinizados. Os brotamentos axonais crescem distalmente em direção aos órgãos alvos.

Portanto, em um determinado período de sobrevida o número de axônios mielínicos distalmente à lesão é bem maior que aqueles do coto proximal e também que a população de corpos neuronais no corno anterior da medula.

Após um período de brotamento segue-se um processo de eliminação dos axônios excedentes. O tempo em que isto

ocorre depende de alguns fatores, como por exemplo, intensidade da lesão e a distância entre o sítio da lesão e o corpo celular.

Para GLASBY et al (1986b), nesse período o número de axônios tanto ao nível do retalho, quanto no coto distal, apresenta-se em ascensão. Entendemos que isto possa ser atribuído às diferentes condições experimentais. Entretanto, o assunto merece reconsideração.

A degeneração axonal após regeneração em próteses tubulares tem sido atribuída à ação constrictiva exercida pela parede dos tubos a partir de certo período (Le BEAU et al, 1988a; LANGONE, 1991). Não é improvável que também na interface retalho muscular e coto distal a sutura possa produzir fibrose com conseqüente degeneração axonal. Contudo, entendemos que esta seria a hipótese menos aceita para explicação de nossos achados, pois ao procedermos o implante do retalho, apenas dois pontos de sutura em cada extremidade foram empregados para a conexão.

Outro aspecto a ser destacado refere-se a reconstituição do perineuro ao nível do retalho muscular.

Nossas observações à nível de microscopia óptica são de que várias camadas de células, permeadas por feixes de fibras colágenas, dispõem-se concentricamente ao redor do nervo regenerado. De fato, isto ficou claro na análise à microscopia eletrônica. Esses dados estão de acordo àqueles

da literatura sobre retalhos musculares (GLASBY et al, 1990).

Apesar de ter sido empregado com sucesso no reparo de segmentos com 5 cm em ovelhas (GLASBY et al, 1990) e 4 cm em coelhos (FAWCETT & KEYNES, 1986), imagina-se que o emprego da membrana basal muscular seria limitado por sua incapacidade de "sustentar" a regeneração axonal por distâncias maiores.

Recentemente, foi demonstrado que o retalho muscular é inicialmente invadido por células de Schwann oriundas do coto proximal e que a migração dessas células antecede ou, no máximo, coincide com a regeneração dos axônios (FENELEY et al, 1991).

O mesmo foi observado quando se utilizam enxertos de nervos congelados, onde as células de Schwann originais são mortas e substituídas por células provenientes do coto proximal, que irão sustentar os axônios em regeneração.

Concluiu-se que o crescimento axonal sempre é feito em um substrato de células de Schwann, independente do tipo de material utilizado para o reparo da lesão nervosa. Assim, os autoenxertos musculares podem ser utilizados efetivamente como substitutos dos transplantes de nervos congelados.

Está claro que em situações onde se possa aumentar o índice de mitose das células de Schwann, bem como sua velocidade de migração, estaríamos aumentando a possibilidade do uso de enxertos musculares (FENELEY et al, 1991) com sucesso.

Entendemos que o método de obtenção do retalho por nós preconizado é relativamente de fácil confecção. Da mesma forma, observamos que a confecção do retalho a partir do músculo tibial anterior do rato seria mais fácil, pois sua situação topográfica, imediatemente abaixo da pele, permite injeções transcutâneas.

Do ponto de vista da aplicação desses retalhos no homem, teoricamente entendemos que ele apresenta vantagens em relação àqueles obtidos por congelamento. Há sempre um músculo disponível no local da lesão nervosa a ser reparada. Assim, este poderia ser injetado transcutaneamente e um retalho obtido a partir da mesma incisão cirúrgica a ser feita para a reparação nervosa. Outra vantajem é que seria preparado "in vivo", diminuindo os riscos de contaminação.

Assim entendemos que os resultados deste trabalho são promissores no sentido de poder se oferecer um novo método para obtenção do retalho muscular. Apesar disto, estudos sistemáticos deverão ser efetuados, com o objetivo de se comparar os mesmos resultados com aqueles obtidos pelos métodos classicamente empregados para a confecção de retalhos musculares.

CONCLUSÕES

7

ţ

Os resultados deste trabalho conduziram-nos às seguintes conclusões:

 A) Injeções intramusculares de anestésicos locais permitem a obtenção de "tubos de membrana basal" através dos quais ocorre regeneração nervosa periférica.

B) Retalhos musculares que levam a uma boa regeneração axonal podem ser obtidos com injeções de 0,3 ml de lidocaína a 2% no músculo tibial anterior e 0,1 ml no músculo sóleo, de ratos.

C) Os retalhos devem ser implantados vinte e quatro horas após terem recebido as injeções.

D) Em todos os casos o coto distal foi invadido e colonizado pelos axônios em regeneração.

ţ

E) Este trabalho está caracterizado como modelo experimental.

RESUMO

.

.

Foram realizados autotransplantes de retalhos musculares em 19 ratos wistar fêmeas com 6 a 7 semanas de idade. Em um grupo de 6 animais utilizou-se o músculo tibial anterior; um segundo grupo formado por 8 ratos recebeu retalho obtido através do músculo sóleo e, o terceiro com 5 animais serviu para análise da morfologia normal do nervo ciático. Os músculos a serem enxertados receberam uma injeção de cloridrato de lidocaína (Xilocaína®) a 2%, sendo que nos casos do músculo tibial anterior o volume foi de 0,3 ml e no grupo do músculo sóleo foi de 0,1 ml. Estes procedimentos foram realizados sob anestesia induzida por inalação de éter etílico e executados na perna direita dos animais. Após vinte e quatro horas, os ratos foram novamente anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar<sup>®</sup>) e cloridrato de tiazina (Rumpum<sup>®</sup>) na dose de 0.3ml/100 de peso corporal. A seguir a região glútea e posterior da coxa esquerda foram depiladas. Procedeu-se, então, a retirada do fragmento muscular com auxílio do microscópio cirúrgico e realizada uma fina dissecção do retalho, deixando-o com um diâmetro ligeiramente superior ao do nervo ciático e comprimento de 5 mm nos casos do tibial anterior e de 3-4 mm nos casos do músculo sóleo. Ainda sob lupa, a pele da região glútea e posterior da coxa esquerda foi aberta e o nervo ciático exposto. Com uma tesoura microcirúrgica seccionou-se o nervo e retirou-se ŧιm fragmento de i mm de comprimento. Suturou-se, então, o

implante entre os cotos nervosos com um ponto em cada extremidade com fio monofilamento nylon 10.0 Dermalon.

Após um período de sobrevida de 50 dias, os ratos foram anestesiados e, com o auxílio do microscópio cirúrgico o nervo ciático foi exposto e fixado *in situ* com fixador Karnovsky (1965). O fixador a 4°C foi deixado banhando o nervo por 10 minutos. A seguir, o nervo foi retirado e seccionado em dois fragmentos, um correspondendo à região do implante e o outro ao coto distal. Estes foram então processados para microscopia eletrônica.

Observamos que, o tratamento empregado na preparação dos retalhos musculares permitiu o crescimento axonal a partir do coto proximal. Estes atravessaram a região do implante e colonizaram o coto distal. Isto foi possível uma vez que, o cloridrato de lidocaína provocou intensa mionecrose tendo como resultado a formação de tubos de membrana basal muscular "vazios", através do qual ocorreu a regeneração dos axônios.

SUMMARY

Evacuated muscle is a possible substitute for nerve autografts in the repair of damage peripheral nerves. Previous experiments have shown that killed or evacuated muscle grafts are as effective as nerve autografts for briding gaps of up to 4 mm between proximal and distal nerve stumps. Evacuated muscle rafts are made of extracellular matrix components, which are good substrates for axon growth in vitro. However there are some difficults to obtain the muscle autografts. In the present we have studied the possibility of a new method to obstain this graft. In forty adult female mice the tibialis anterior muscle (8 animals) and soleus muscle (& animals) were injected by 0,3 ml and 0,1 ml of the lidocaine hydrochloride respectively. Twentyfor hours later each animal receveid a muscle autograft. There the ciatic nerve left was seccionated and the graft was inserid by a 10.0 their mononylon surgical under microscopic. Fifty days after, the animals that received the muscle graft, were anesthetised by ketamine hydrochloride and xylazine and the graft region and the distal end as well, were processed by eletronic microscopic methods.

Our results showed the fifty days after implants both region graft and distal end were recolonized by mielinic and amielinic axons. The ultrastructural aspects, remind that ones observed by others methods of nerve repair by muscle graft.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.

I.

- ABRAHAMS, P.H.; DAY, A.; ALLT, G. Schwann cell plasma membrane changes induced by nerve crush. A freezefracture study. Acta Neuropathol., (Berlin), 50: 85-90, 1980.
- ALLBROOK, D. An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. J. Anat., 96: 137-152, 1962.
- BENDIT, P.W. & BELT, W.D. Some effects of local anesthetic agents on skeletal muscle. Experimental Neurology, 34: 264-278, 1972.
- BISCHOFF, R. Tissue culture studies on the origin of myogenic cells during muscle regeneration in the rat. In MAURO, A. (Ed). Muscle Regeneration. Reven-Press. New York. pág. 13-29, 1979.
- BRAY, G.M. & AGUAYO, A.J. Regeneration of peripheral unmyelinated nerves. Fate of the axonal 'sprouts which develop after injury. J. Anat., 117: 517-29. 1974.
- BUNGE, M.B.; WOOD, P.M.; TYNAN, L.B.; BATES, M.L.; SANES, J.R. Ferineurium originates from fibroblasts: demonstration *in vitro* with a retroviral marker. Science, 243: 229-31, 1989.
- CARLSON, B.M. The degeneration of skeletal muscle: a review. Am. J. Anat., 137: 119-150, 1973.
- CARLSON, B.M.; HANSEN-SMITH, F.M.; MAGON, D.K. The life history of a free muscle graft. In Mauro, A. (Ed.). Muscle regeneration. Raven-Press. New York. pág. 493-507, 1979.

- CARLSON, B.M. Regeneration of entire skeletal muscles. Fed. Proc., 45: 1456-1460, 1986.
- CAUSEY. Apud GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. Clinical Anatomy, 3: 161-182, 1990.
- COHEN, C. The protein switch of muscle contraction. Sci. Am., 233(5): 36-45, 1975.
- ELFVIN, L.G. The structure and composition of motor, sensory, and autonomic nerves and nerves fibers. In: THE STRUCTURE and function of nervous tissue. Ed. G.H. Bourne. New York, Academic Press, 1968. v. 1, p. 325-77.
- FARBER, J.L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. Lab. Invest., 47: 114-123, 1982.
- FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve reapair. J. Neurosurg., 65: 354-63, 1986.
- FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. Ann. Rev. Neurosci., 13: 43-60, 1990.
- FENELEY, M.R.; FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. The role of Schwann cells in the regeneration of peripheral nerve axons through muscle basal lamina grafts. Experimental Neurology, 114: 275-285, 1991.
- FIELDS, R.D.; LE BEAU, J.M.; LONGO, F.M.; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. Progr. Neurobiol., 33: 87-137, 1989.

- GAMBLE, H.J. & BREATHNACH, A.S. An electron-microscope study of human foetal peripheral nerves. J. Anat., 99: 573-84, 1965.
- GATTUSO, J.M.; DAVIES, A.H.; GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; HUANG, C.L.-H. Peripheral nerve repais using muscle autografts. Recovery of transmission in primates. J. Bone Joint Surg., 70: 524-529, 1988a.
- GATTUSO, J.M.; GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E. Recovery of peripheral nerves after surgical repair with treated muscle grafts. Morphometric Assessment. Neuro-Orthopedics 6: 1-6, 1988b.
- GATTUSO, J.H.; GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; NORRIS, R.W. A comparision of immediate and delayed repair of peripheral nerves using freeze-thawed autologous skeletal muscle grafts in the rat. Br. J. Plast. Surg., 42: 306-313, 1989.
- GLASBY, M.A.; HITCHCOCK, R.J.I.; HUANG, C.L-H. Effect of muscle basement membrane on regeneration of rat sciatic nerve. J. Bone Joint Surg., 68: 829-833, 1986a.
- GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; HITCHCOCK, R.J.I; HUANG, C.L-H. The dependence of nerve regeneration through muscle grafts in the rat on the availability and orientation of basement membrane. J. Neurocytol., 15: 497-510, 1986b.

- GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; HITCHCOCK, R.J.I; HUANG, C.L-H.; de SOUZA, B.A. Comparison of nerve regeneration through nerve and muscle grafts in rat sciatic nerve. Neuroorthopaedics, 2: 21-28, 1986c.
- GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E.;HUANG, C.L-H.; de SOUZA, B.A. Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. The journal of hand surgery 11: 347-351, 1986d.
- GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. Clinical Anatomy, 3: 161-182, 1990.
- GLASBY, M.A.; GILMOUR, J.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; HEMS, T.E.J.; MYLES, L.M. The repair of large peripheral nerves using skeletal muscle autografts: a comparison with cable grafts in the sheep femoral nerve. Br. J. Flast. Surg., 43: 169-78, 1990.
- GLASBY, M.A.; DAVIES, A.H.; GATTUSO, J.M.; HEYWOOD, A.J. Specificity for homonymous pathways following repair of peripheral nerves with treated skeletal muscle autografts - in the primate. Br. J. Plast. Surg., 44: 135-41, 1991.
- GORIO, A. Sprouting and regeneration of peripheral nerve. In: THE NODE of Ranvier. Eds. J.C. Zagoren, S. Fedoroff. New York, Academic Press, 1984. p.353-88.
- GRABB, W.C. Frimary and secondary nerve repair. Letter to the Editor. Plast. Reconst. Surg., 70: 275-280, 1982.

- GSCHMEISSNER, S.E.; GATTUSO, J.M.; GLASBY, M.A. Morphology of nerve fibers regenerating through freeze-thawed autogenous skeleta muscle grafts in rats. Clinical Anatomy 3: 107-119, 1990.
- GUTMANN, E. & YOUNG, J.Z. The reinnervation of muscle after various periods of atrophy. J. Anat., 78: 15-43, 1944.
- HUDSON, A.R.; HUNTER, D.; KLINE, D.G. et al. Histological studies of experimental interfascicular graft repair. J. Neurosurg., 51: 333-340, 1979.
- HUXLEY, A.F. Muscle contraction. J. Physiol., 243: 1-43, 1974.
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. Brain Res., 288: 61-75, 1983.
- IDE, C. Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle. Neurosci Res., 1: 379-391, 1984.
- IDE, C.; OSAWA, T.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. Progr. Neurobiol., 34: 1-38, 1990.
- JENQ, C.B. & COGGESHALL, R.E. Sciatic nerve regeneration after autologous sural nerve transplantation in the rat. Brain Res., 406: 52-61, 1987.
- JONES, G.N. Protein synthesis in bupicacaine (Marcaine) treated regenerating skeletal muscle. Muscle & Nerve, 5: 281-290, 1982.

- JUNQUEIRA, L.C.U., MONTES, G.S. ; KRISZTAN, R.M. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. Cell Tissue Res., 202: 453-60, 1979.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 27: 137A, 1965.
- KEYNES, R.J.; HOPKINS, W.G.; HUANG, L.H. Regeneration of mouse peripheral nerves in degeneration skeletal muscle. Guidance by residual muscle fibre basement membrane. Brain Res., 295: 275-281, 1984.
- LANDON, D.N. & HALL, S. The myelinated nerve fiber. In: THE PERIPHERAL nerve. Ed. D.N. Landon. London, Chapman and Hall, 1976. p. 1-105.
- LANGONE, F. Estudo ultra-estrutural e morfométrico dos nervos regenerados no interior de próteses tubulares. São Faulo, 1991. 201p. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Faulo).
- 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., 17: 161-72, 1988a.
- LE BEAU, J.M.; LaCORBIERE, M.; POWELL, H.C.; ELLISMAN, M.H.; SCHUBERT, D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. Brain Res., 459: 93-04, 1988b.

- LUBINSKA, L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. Brain Res.,233: 227-40, 1982.
- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; HUNTER, D.A.; TRUED, S. Nerve regeneration in the rat model. **Peripheral Nerve** Repair and Regeneration, 1: 41-48, 1986.
- MATTAR, R.; STARCK, R.; GUARNIERI, M.V.; AZZE, R.J.; MITTELDORF, C.S.; FERREIRA, M.C. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos. Estudo experimental. Rev. Bras. Ortop., 25(8): 287-292, 1990.
- MAURO, A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 493-495, 1961.

MAURO, A. Muscle regeneration. Raven Press. New York, 1979.
MICHEL, M.E.; SHINOWARA, N.L.; ODMAN, S.; RAPOPORT, S.I.
Morphology of endoneurial blood vessels of frog sciatic
nerve during vascular perfusion. Microvasc. Res., 28:
220-32, 1984.

- MILLESI, H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. Scand J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl., 19: 25-37, 1982.
- MONTES, G.S., COTTA-PEREIRA, G.; JUNQUEIRA, L.C.U. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. Adv. Cell Neurobiol., 5: 177-218, 1984.

- 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. 124: 103-130, 1972.
- NAGEOTTE, J. L'organisation de la matière dans ses rapports avec la vie. Paris: F. Alcan, 1922.
- NONAKA, I.; TAKAGI, S.; ISHIURA, S.; NAKASE, H.; SUGITA, H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). Acta Neuropathol. (Berl) 60: 167-174, 1983.
- NORRIS, R.W.; GLASBY, M.A.; GATTUSO, J.M.; BOWDEN, R.E.M. Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. A new technique J. Bone Joint Surg., 70: 530-533, 1988.
- OLDFORS, A. & JOHANSSON, B.R. Barriers and transport properties of the perineurium. Acta Neuropathol. (Ber1.), 47: 139-43, 1979.
- OLSSON, Y. Vascular permeability in the peripheral nervous system. In: PERIPHERAL neuropathy. Eds. P.J. Dyck, P.K. Thomas, E.H. Lambert and R. Bunge. Philadelphia, Saunders, 1984. p. 579-97.
- OLSSON, Y. & KRISTENSSON, K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. Acta Neuropathol., 23: 105-11, 1973.

- OSAWA, T.; IDE, C.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through cryo-treated xenogeneic nerve grafts. Arch. Histol. Jap., 50(2): 193-208, 1987.
- PATSALOS, F.N.; BELL, M.E.; WIGGINS, R.C. Pattern of myelin breakdown during sciatic nerve Wallerian degeneration: reversal of the order of assembly. J. Cell Biol.: 87: 1-5, 1980.
- PEREIRA, J.H.; COWLEY, S.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; BOWDEN, R.E.M.; TURK, J.L. Denatured muscle grafts for nerve repair. An experimental model of nerve damage in leprosy J. Bone Joint Surg. Br 72-B: 874-80, 1990.
- PETERS, A. & MUIR, A.R. The relation ship between axons and Schwann cells during developmente of peripheral nerves in the rat. Q. J. Exp. Physiol., 44: 117-30, 1959.
- PETERS, A.; PALAY, S.L. ; WEBSTER, H. deF. The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Fhiladelphia, Saunders, 1976. 406p.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; SIMIONI, L.R.; FRANCESCHI, J.P. Muscle necrosis and regenaration after envenomation by Bothrops Jararacussu snake venow Toxicon, 22: 339-346, 1984.
- RAMON Y CAJAL,S. Apud FIELDS, R.D.; LE BEAU, J.M.; LONGO, F.M.; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. Frogr. Neurobiol., 33: 87-137, 1987.
- RANSON, S.W. Degeneration and regeneration of nerve fibers. J. Comp. Neurol., 22: 487-545, 1912.

- RANVIER, M.L. Leçons sur l'histologie du système nerveeus. Paris, F. Savy, 1878.
- RAPOPORT, S.I. Blood Brain in Physiology and Medicine. New York, Raven Press, 1976. p.
- RECHTHAND, E. & RAPOPORT, S.I. Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the bloodnerve barrier. Frogr. Neurobiol., 28: 303-43, 1987.
- REGER, J.F. & CRAIG, A.S. Studies on the fine structure of muscle fibers and associated satellite cells in hypertrophic human deltoid muscles. Anat. Rec., 162: 483-500, 1968.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at light pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208-212, 1963.
- ROBBINS, N. Plasticity of adult neuromuscular junctions. In: NERVE-MUSCLE cell trophic communication. Ed. H.L. Fernandez e J.A. donoso, Florida, CRC press, 1988. p. 199-215.
- RODRIGUES DE OLIVEIRA, A.L. Estudo morfológico e morfométrico do nervo ciático de ratos antes e após transecção total. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, 1993.
- SANES, J.R. Extracellular matrix molecules that influence neural development. Ann. Rev. Neurosci., 12: 491-516, 1989.

- SANES, J.R.; MARSHALL, L.M.; MCMAHAN, U.J. Reinnervation of muscle fibre basal lamina after removal of myofibres. Differentation of degenerating axons at original synaptic sites. Journal of Cell Biology, 78: 176-98, 1978.
- SANTO NETO, H. Aspectos morfológicos das alterações musculares produzidas pelo veneno de Bothrops jararacussu e seus componentes: estudo com microscopia óptica e eletrônica. São Paulo, 1987. 121p. Tese de Doutorado -Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Faulo.
- SCARAVILLI, F. Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in a nerve encased in a plastic tube. J. Anat., 139: 411-24, 1984.
- SCHLAEPFER, W.W. & MICKO, S. Chemical and structural , changes of neurofilaments in transected rat sciatic nerve. J. Cell Biol., 78: 369-78, 1978.
- SCHROEDER, J.M. Die Hyperneurotisation Büngnerscher Bänder bei der experimentellen Isoniazid Neuropathie: Fhasenkontrast und elektronenni-kroskopishe Untersuchungen. Virchows Arch. Abt. B1: 131-156, 1968.
- SCHULTZ, E.; ALBRIGNT, D.J.; JARYSZAK, D.L.; DAVID, T.L. Survival of satellite cells in whole muscle transplants. Anatomical record 222: 12-17, 1988.
- SHANTHA, T.R. & BOURNE, G.H. The perineural epithelium- a new concept. In: THE STRUCTURE and function of nervous tissue. Ed. G.H. Bourne. New York, Academic Press, 1968. v. 1, p. 379-459.

- SHINOWARA, N.L.; MICHEL, M.E.; RAPOPORT, S.I. Morphological correlates of permeability in the frog perineurium: vesicles and "transcellular channels". Cell Tissue Res, 227: 11-22, 1982.
- SUNDERLAND, S. Nerves and nerves injuries. Edinburg, Churchill Livingstone, 1978. p.483-650.
- TERZIS, J.; FAIBISOFF, B.; WILLIAMS, H.B. The nerve gap, suture under tension versus graft. Plastic. Reconstr. Surg., 56: 166-70, 1975.
- TOHYAMA, K.; IDE, C.; OSAWA, T. Nerve regeneration through the cryoinjured allogeneic nerve graft in the rabbit. Acta Neuropathol., 80: 138-44, 1990.
- USHIKI, T. & IDE, C. Three-dimensional architecture of the endoneurium with special reference to the collagen fibril arrangement in relation to nerve fibers. Archs. Histol. JNP., 49: 553-63, 1986.
- UZMAN, B.G. & VILLEGAS, G.M. Mouse sciatic nerve regeneration through semipermeable tubes: a quantitative model. J. Neurosci. Res., 9: 325-38, 1983.
- VRACKO, R. & BENDITT, E.P. Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observation on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. J. Cell Biol., 55: 406-419, 1972.
- VARON, S. Factors promoting the growth of the nervous system. Discussions Neurosci., 2: 9-62, 1985.

- WALLER, A.V. Apud FIELDS, R.D.; LE BEAU, J.M.; LONGO, F.M.; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. Progr. Neurobiol., 33: 87-137, 1989.
- WERNID, A. & HERRERA, A.A. Sprouting and remodelling at the nerve-muscle junction. Prog. Neurobiol, 27: 251-91, 1986.
- WEERASURIYA, A.; CURRAN, G.L.; FODUSLO, J.F. Blood-nerve transfer of albumin and its implications for the endoneurial microenvironment. BRAIN RES., 494: 114-21, 1989.
- YAWO, H. & KUNO, M. How a nerve fiber repairs its cut end: involvement of phospholipase A2. Science, 222: 1351-3, 1983.
- ZALEWSKI, A.A, & GULATI, A.K. Evaluation of histocompatibility as a factor in the repair of nerve with a frozen nerve allograft. J. Neurosurg., 56: 550-554, 1982.