

ROSANA MACHER TEODORI

**REGENERAÇÃO AXONAL APÓS REPARO NERVOSO COM
ENXERTO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO: ESTUDO
MORFOMÉTRICO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Biologia e Patologia Buco-Dental.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

PIRACICABA
2000



ROSANA MACHER TEODORI

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**REGENERAÇÃO AXONAL APÓS REPARO NERVOSO COM
ENXERTO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO: ESTUDO
MORFOMÉTRICO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 22/09/2000
Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

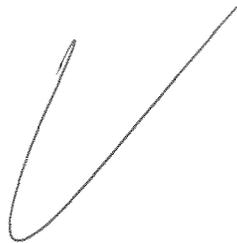
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Humberto Santo Neto
Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello
Prof. Dr. Fausto Bérzin
Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos
Prof. Dr. Joffre Guazzelli Filho

Piracicaba
2000

200017310

N.º CHAMADA :
T/Unicomp
T265r
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 43047
PROC. 16.278/00
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 10/11/00
N.º CPD _____



CM-00153419-B

Ficha Catalográfica

T264r Teodori, Rosana Macher.
Regeneração axonal após reparo nervoso com enxerto de
músculo esquelético: estudo morfométrico. / Rosana Macher
Teodori. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
114p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Humberto Santo Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Músculos – Transplante. 2. Sistema nervoso – Regeneração.
3. Anestésicos. I. Santo Neto, Humberto. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 14 de Julho de 2000, considerou a candidata ROSANA MACHER TEODORI aprovada.

1. Prof. Dr. HUMBERTO SANTO NETO _____

2. Prof. Dr. JOFFRE GUAZZELLI FILHO _____

3. Prof. Dr. FAUSTO BERZIN _____

4. Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO _____

5. Prof. Dr. GERSON EDUARDO ROCHA CAMPOS _____

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei” ... (1 Coríntios, 13).

À LAURA, que me fez compreender o mais amplo significado da palavra “amor”.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos amigos-irmãos

Júlia Raquel Negri e José Carlos T. M. Teodori

Pela presença constante, paciência, incentivo e apoio a mim dedicados durante a realização deste trabalho.

Vocês estarão sempre do lado esquerdo do peito, dentro do coração.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos meus pais, Mario e Hilda, pelo exemplo de conduta que me orientou para encarar os estudos e a vida.

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

- Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- 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).
- FAPESP pela aquisição do Sistema de Análise de Imagem KONTRON – KS 400 – ZEISS (Processo nº 96/7166-4).

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

AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Sr. Diretor Antonio Wilson Sallum.
- Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto, pela orientação competente, paciente e segura durante a elaboração deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Marco Cesar Somazz, do Departamento de Anatomia do I.B. – UNICAMP e da Faculdade de Ciências da Saúde da UNIMEP, pelo interesse e atenção com que acompanhou este trabalho, bem como pela valiosa dedicação, colaboração e amizade.
- À Prof^a Dr^a 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^a Miralva Aparecida de Jesus Silva, pela amizade e incentivo constante.
- À Sra. Marlene de Lima Francisco, do Departamento de Anatomia do I.B. - UNICAMP, pelo empenho na manutenção dos animais utilizados.

- 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.
- À mestranda Mônica Machado Novaes, do Departamento de Morfologia da FOP – UNICAMP, pela orientação na elaboração de estratégias para a realização da análise morfométrica, bem como na operação do sistema de Análise de Imagens.
- Ao Prof. Dr. José Merzel, do Departamento de Morfologia da FOP – UNICAMP, pela atenção e sugestões apresentadas e pela orientação durante a realização da análise morfométrica.
- A Ezér Dias de Oliveira Júnior, doutorando em Máquinas Agrícolas – FEAGRI/UNICAMP, pela dedicação na análise estatística dos resultados.
- À Georgete Negri, pela colaboração na digitação e diagramação deste trabalho.

- Ao Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão EM10 - Zeiss e do Fotomicroscópio Zeiss.
- Ao Departamento de Biologia Celular do I.B.-UNICAMP, pela utilização do ultramicrotomo.
- 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.

"O experimentador, para ser digno de tal nome, deve ser ao mesmo tempo teórico e prático. Deve ter de uma maneira completa a arte de estabelecer os fatos da experiência, que são os materiais da ciência; deve também dar-se conta claramente dos princípios científicos que dirigem nosso raciocínio em meio ao estudo experimental tão variado dos fenômenos da natureza. Seria impossível separar estas duas coisas: a cabeça e a mão. Uma mão hábil sem a cabeça que a dirige é um instrumento cego; a cabeça sem a mão que a execute permanece impotente".

Claude Bernard, *Introdução ao Estudo da Medicina Experimental*

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUÇÃO | 7 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 1. Organização Estrutural do Nervo Periférico..... | 13 |
| 2. Degeneração e Regeneração Nervosa Periférica..... | 16 |
| 3. Métodos Utilizados no Reparo da Lesão Nervosa Periférica..... | 20 |
| 4. Emprego de Músculo Esquelético no Reparo das Lesões Nervosas..... | 26 |
| OBJETIVO | 41 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 1. Grupo I: Enxerto de Músculo (Confecção e Implante)..... | 43 |
| 2. Grupo II: Enxerto de Nervos..... | 45 |

| | Página |
|--|-----------|
| 3. Grupo III: Observação da Regeneração Espontânea | 46 |
| 4. Grupo IV: Controle..... | 46 |
| 5. Sacrifício dos Animais e Retirada do Material..... | 46 |
| 6. Análise Morfométrica | 48 |
| 7. Tratamento Estatístico..... | 52 |
| RESULTADOS | 53 |
| 1. Características Macroscópicas no Local do Enxerto..... | 53 |
| 2. Características Histológicas do Nervo Normal..... | 54 |
| 3. Características Histológicas da Região do Enxerto..... | 55 |
| 4. Características Histológicas do Coto Distal..... | 56 |
| 5. Análise Morfométrica do Grupo Controle e Coto Distal dos Grupos Experimentais..... | 58 |
| DISCUSSÃO | 75 |
| 1. Sobre o Emprego de Enxertos Musculares..... | 75 |

| | | |
|----|--|----|
| 2. | Bases Biológicas da Idealização do Retalho a partir de Injeções de Anestésicos Locais | 77 |
| 3. | Sobre a Regeneração Axonal..... | 81 |
| 4. | Análise Morfométrica | 84 |
| | CONCLUSÃO | 95 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1 : Aspecto pós-cirúrgico do enxerto muscular tratado com cloridrato de lidocaína a 2% | 64 |
| Figura 2 : Aspecto do nervo isquiático regenerado após 50 dias do enxerto muscular..... | 65 |
| Figura 3 : Característica histológica do músculo sóleo 24 horas após a injeção do anestésico | 66 |
| Figura 4 : Micrografia eletrônica do nervo isquiático normal | 67 |
| Figura 5 : Micrografia eletrônica do nervo isquiático normal . | 68 |
| Figura 6 : Micrografia eletrônica do nervo isquiático de rato regenerado ao nível do enxerto de nervo | 69 |
| Figura 7 : Micrografia eletrônica do nervo isquiático de rato regenerado ao nível do enxerto muscular | 70 |
| Figura 8 : Micrografia eletrônica do coto distal do nervo isquiático regenerado a partir de enxerto de nervo .. | 71 |
| Figura 9 : Micrografia eletrônica do coto distal do nervo isquiático regenerado a partir de enxerto muscular... | 72 |
| Figura 10 : Aspecto da região do enxerto e coto distal nos dois grupos experimentais, em relação ao grupo controle..... | 73 |
| Figura 11 : Corte transversal do nervo isquiático normal | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1 : Diâmetro do axônio para os diferentes tratamentos . | 58 |
| Tabela 1.1 : Análise de Variância para o diâmetro do axônio | 58 |
| Tabela 2 : Diâmetro da fibra nervosa para os diferentes tratamentos | 59 |
| Tabela 2.1 : Análise de Variância para o diâmetro da fibra nervosa..... | 59 |
| Tabela 3 : Espessura da bainha de mielina para os diferentes tratamentos..... | 60 |
| Tabela 3.1 : Análise de Variância para a espessura da bainha de mielina..... | 60 |
| Tabela 4 : Razão G para os diferentes tratamentos | 61 |
| Tabela 4.1 : Análise de Variância para razão G | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apud : em

et al. : e outros

in : em

Op. Cit. : na obra citada

REGENERAÇÃO AXONAL APÓS REPARO NERVOSO COM ENXERTO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO: ESTUDO MORFOMÉTRICO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar morfometricamente a regeneração axonal em autoenxerto de lâmina basal muscular tratado com injeção intramuscular de cloridrato de lidocaína a 2% e estabelecer uma análise comparativa com a regeneração obtida através de autoenxerto de nervo. Para isto foram avaliados os diâmetros dos axônios mielínicos e das fibras nervosas regeneradas, além da espessura de suas respectivas bainhas de mielina.

Ratos adultos tiveram 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 dissecção para confecção de um retalho de 5 mm de comprimento e espessura semelhante à do nervo isquiático. Em seguida, o nervo isquiático esquerdo foi seccionado e o retalho muscular implantado na fenda entre os cotos nervosos, com sutura epineural. Outro grupo de animais teve o nervo isquiático esquerdo exposto, seccionando-se um fragmento de 5 mm, que sofreu inversão de 180° e foi imediatamente fixado aos cotos com sutura epineural. Um terceiro grupo teve o nervo isquiático

seccionado e mantido no leito, sem reconexão. O grupo controle consistiu de nervos isquiáticos de animais normais.

Após 50 dias de sobrevivência, o nervo isquiático esquerdo foi exposto, fixado *in situ* e dividido em 3 porções: coto proximal, coto distal e região do enxerto, que foram processadas para microscopia eletrônica, sendo que os axônios regenerados nos dois grupos experimentais (autotransplante de músculo e autotransplante de nervo) e grupo controle foram analisados histologicamente e morfometricamente. O grupo de regeneração espontânea não foi submetido a análise morfométrica em função da pobre regeneração axonal observada.

Nossos resultados apontam que os axônios atingiram o coto distal em todos os animais dos dois grupos experimentais. A análise histológica mostrou não haver diferenças entre os axônios dos dois grupos no que diz respeito ao aspecto ultraestrutural. Na região do enxerto a distribuição dos axônios era característica, formando minifascículos, sendo restabelecida a organização fascicular no coto distal. A análise morfométrica mostrou não haver diferença significativa entre os dois grupos. Concluímos que o enxerto muscular tratado com cloridrato de lidocaína a 2% produziu um nível de maturação axonal semelhante àquele observado em autoenxerto de nervo.

PALAVRAS-CHAVE:

1. Músculos - Transplante
2. Regeneração do Sistema Nervoso Periférico
3. Reparo nervoso
4. Anestésicos Locais
5. Morfometria

**AXONAL REGENERATION AFTER NERVE REPAIR THROUGH MUSCLE
BASAL LAMINA: MORPHOMETRIC INVESTIGATION.**

ABSTRACT

The aim of the present was to perform a morphometric study to comparatively evaluate axonal regeneration after muscle and nerve autografts. Adult rats had their right soleus muscles injected intracutaneously with 0,1 ml of 2% lidocaine hydrochloride. Twenty-four hours later the injected muscle was removed and a lidocaine muscle graft was obtained by trimming the muscle to a rectangular block of approximately 5.0 mm in length. The left sciatic nerve was exposed at the mid-thigh region and a segment removed so that a final 5.0 mm-long gap was produced. The muscle graft was coaxially autografted to the epineurium between the proximal and distal nerve stumps. In another group the left sciatic nerve was exposed and a 5.0 mm fragment was removed, inverted in 180 degrees and immediately autografted to the epineurium. In a third group the sciatic nerve was cut and kept in position, without surgical repair. Sciatic nerves from non-operated rats were used as controls. Axonal regeneration was studied ultrastructurally and morphometrically 50 days after the insertion of muscle and nerve autografts. No ultrastructural differences were seen in regenerated axons after muscle or nerve autografts; typically, minifascicles were present in the graft and the fascicular organization was reestablished in the distal stump.

Morphometric analyses showed no significant differences between the two groups. We conclude that the use of this model produced a level of maturation similar to that described in nerve autografts.

KEY WORDS:

1. Muscle autografts
2. Peripheral nerve system regeneration
3. Nerve repair
4. Local anesthetics
5. Morphometry.

INTRODUÇÃO

Lesão de nervos periféricos é uma consequência relativamente comum de traumas, sendo ainda o maior problema clínico, o seu tratamento. Poucas horas após a lesão inicia-se o crescimento de brotos axonais em direção à porção distal do nervo, no sentido de reinervar os órgãos-alvo. Porém, quando há perda de um segmento considerável do nervo (maior que 2 cm), 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. Há necessidade, então, de interposição de um enxerto no espaço criado entre os cotos nervosos seccionados, para restabelecer sua continuidade e favorecer a recuperação funcional (LUNDBORG, 1987; LE BEAU et al., 1988; HALL, 1997; FRANCELE et al., 1997 e SANTO NETO et al., 1998).

Na maioria das vezes emprega-se 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 implante entre os cotos do nervo lesado. Devido a necessidade de maior número de suturas, este procedimento também leva a uma cicatrização excessiva, 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 e obter o “material de enxerto” mais adequado e compatível com uma ótima recuperação funcional, diferentes abordagens vêm sendo desenvolvidas. Atualmente vem sendo bastante explorado o uso de **músculo esquelético**, entre outros, como substâncias adesivas (YOUNG & MEDAWAR, 1940; SEDDON & MEDAWAR, 1942; TARLOV, 1944, 1950; NISHIHIRA & McCAFFREY, 1989), tubos de silicone (LUNDBORG et al., 1982; WILLIAMS et al., 1983; MERLE et al., 1988; MADISON et al., 1988; STENSAAS et al., 1989; SPECTOR et al., 1991), tubos de polietileno (DA SILVA & LANGONE, 1989), tubos de poliésteres (DA SILVA et al., 1984; MADISON et al., 1984, 1985; SECKEL et al., 1984; DEN DUNNEN et al., 1993), substâncias biocompatíveis como o ácido poliglicólico (MACKINNON et al., 1988; HENTZ et al., 1991), veias (WEISS, 1943; RICE & BERSTEIN, 1984; WALTON et al., 1989), artérias (FRANCEL et al., 1997), colágeno (ROSEN et al., 1989; MACKINNON & DELLON, 1990), vidro biodegradável (LENIHAN et al., 1998b), papel (KAUPPILA et al., 1997), neurorrafia a laser (BAILES et al., 1989; KORFF et al., 1992), etc. Entre todas estas alternativas, a utilização de autoenxerto de músculo esquelético tem promovido resultados bastante satisfatórios.

A partir dos estudos de KEYNES 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. O fato de que os axônios de um nervo lesado crescem no interior dos tubos de membrana basal das células de Schwann, levou outros pesquisadores a estudar

também a possibilidade de crescimento axonal no interior de tubos de membrana basal muscular “vazios” (IDE, 1984; GLASBY et al., 1986a,b,c ; FAWCETT & KEYNES, 1986; DAVIES et al., 1987; NORRIS et al., 1988; SOMAZZ, 1994; SANTO NETO et al., 1998). O “esvaziamento” dos tubos de membrana basal muscular para a utilização do músculo esquelético como enxerto, exige um tratamento prévio do músculo que propicie necrose e remoção de seu conteúdo sarcoplasmático, preservando os tubos de membrana basal.

KEYNES 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, promove o esvaziamento de apenas 50% do sarcoplasma.

Mais tarde, em 1986, GLASBY et al., estabeleceram um novo método de tratamento do enxerto, baseado em choque térmico e osmótico do fragmento muscular, o que leva à separação da membrana basal de seu conteúdo sarcoplasmático, que é então destruído. Apesar de trazer bons resultados, esse método ainda apresenta algumas desvantagens, pois em função do choque térmico, o fragmento muscular apresenta forte retração, 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.

Em 1995, CALDER & GREEN apresentaram a técnica “*sandwich* nervo-músculo”, onde o enxerto muscular tratado por congelamento-descongelamento é dividido em dois fragmentos, cada qual unido a uma das extremidades do nervo isquiático de rato seccionado e, entre suas duas extremidades é interposto um segmento do nervo distal. O objetivo era favorecer um depósito imediato de células de Schwann no local do enxerto e aumentar a distância através da qual o enxerto muscular poderia suportar a regeneração, o que realmente ocorreu.

Outra técnica que vem sendo estudada comparativamente àquela de congelamento-descongelamento do enxerto muscular é o aquecimento do fragmento muscular em forno de micro-ondas (WHITWORTH et al., 1995; LENIHAN et al., 1998a). Os primeiros autores observaram menor índice de retração do fragmento muscular desnaturado por aquecimento em micro-ondas, além da rápida migração e maior volume de células de Schwann no interior do enxerto, sugerindo a possibilidade de seu uso na prática clínica. Já LENIHAN et al. (1998a) observaram uma mielinização mais efetiva no grupo tratado por congelamento-descongelamento, apontando uma dificuldade no controle preciso da temperatura no forno de micro-ondas.

Com o objetivo de contornar esses inconvenientes, considera-se aqui o trabalho de SOMAZZ (1994), que demonstrou a viabilidade de se construir retalhos de membrana basal muscular a partir de injeções intramusculares de anestésico local.

Esse método se baseia na ação miotóxica dos anestésicos locais, o que produz 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.

Apesar da eficiência do método de tratamento do enxerto muscular com anestésico local na regeneração nervosa periférica, permanece a indagação sobre o nível de maturação das fibras nervosas regeneradas através de enxerto muscular tratado por este método. Os trabalhos já publicados apontam, de forma unânime, que após lesão do nervo e subsequente regeneração, embora haja reinervação dos músculos alvo e razoável recuperação funcional, as fibras nervosas regeneradas não recuperam seu diâmetro normal, observando-se um atraso na maturação das fibras. Esses resultados foram obtidos através das mais diferentes técnicas de enxerto (GUTMANN & SANDERS, 1943; CRAGG & THOMAS, 1964; SCHRÖDER, 1972; GATTUSO et al., 1988b).

Assim, este trabalho visa investigar as características relacionadas à maturação das fibras regeneradas tanto através do enxerto muscular tratado por anestésico local, quanto do enxerto nervoso, caracterizando o autoenxerto de músculo tratado com anestésico local como mais uma alternativa para o reparo de nervos.

REVISÃO DA LITERATURA

No decorrer das últimas duas décadas multiplicaram-se as pesquisas envolvendo o tema “regeneração nervosa periférica”, por se tratar de assunto de fundamental importância dentro da Neurobiologia. O grande objetivo desses estudos é obter o máximo de recuperação funcional da área comprometida pela lesão, mesmo quando há perda de um segmento considerável do nervo.

Procuramos apontar aqui os resultados das pesquisas mais recentes, discorrendo mais detalhadamente sobre aquelas de maior relevância ao se considerar o objetivo deste trabalho. Assim, faremos uma rápida revisão da literatura organizando-a da seguinte forma: 1) **Organização Estrutural do Nervo Periférico**, 2) **Degeneração e Regeneração Nervosa Periférica**, 3) **Métodos Utilizados no Reparo 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 mielínicas e amielínicas, envolvidas por células de Schwann e bainhas conjuntivas. Nas fibras mielínicas, 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 a se destacar aqui é 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 através de microscopia de luz, por TODD & BOWMAN, (1957) e revista por KEFALIDES et al. (1979), consistindo de três subcamadas: a) lâmina lúcida (ou lâmina rara); b) lâmina densa; c) lâmina reticular. Com relação à arquitetura molecular, aceita-se que a lâmina basal consista de uma matriz de colágeno tipo IV, associada a glicoproteínas como a laminina (TIMPL et al., 1979; FOIDART 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, 1979b; FARQUHAR, 1981; YOKOTA et al., 1983).

As bainhas conjuntivas estão representadas pelo endoneuro, perineuro e epineuro. Estas bainhas representam o tecido conjuntivo de suporte e trófico 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 et al., 1976; SUNDERLAND, 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, 1979; KRISTENSSON & OLSSON, 1971; OLSSON & KRISTENSSON, 1973). Segundo LUNDBORG, (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. DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Após a compressão ou lesão de um nervo periférico inicia-se uma série de eventos que compreendem alterações moleculares e celulares que se originam no corpo celular e se estendem por todo o nervo com o objetivo de restaurar o nervo lesado.

O processo de lesão e regeneração do nervo envolve interações entre elementos celulares e entre estes e a matriz extracelular. Imediatamente após a axotomia os cotos proximal e distal do nervo se retraem, há perda do axoplasma e a membrana danificada entra em colapso. Os macrófagos são recrutados para o local da lesão durante a primeira semana pós-lesão, contribuindo para a lise e fagocitose da mielina e subsequente proliferação das células de Schwann. Tanto os macrófagos quanto as células de Schwann secretam substâncias mitogênicas e fatores de crescimento que desempenham importante papel na regeneração axonal e remielinização (TERENGHI, 1999).

Essa “reação em cascata” é denominada degeneração Walleriana e ocorre no coto distal durante os primeiros dias da lesão. Durante a degeneração Walleriana os axônios degeneram, suas bainhas de mielina se degradam, sendo

que os produtos da degeneração, juntamente com as substâncias secretadas pelos macrófagos, estimulam as células de Schwann no interior do coto distal a se proliferar dentro de seus tubos de lâmina basal (SALZER & BUNGE, 1980; SALZER et al., 1980). Estas células, desprovidas de axônios, 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 (IDE et al., 1990). A proliferação das células de Schwann se continua durante aproximadamente 2 semanas e as bandas de Büngner irão conduzir os axônios em regeneração na direção de seus órgãos alvo (TERENGGHI, 1999).

IDE et al., (1990) e HALL (1997), apontam um fato interessante que favorece o crescimento axonal durante o processo de regeneração: “a lâmina basal da célula de Schwann permanece íntegra durante o processo de degeneração Walleriana”, sobrevivendo à invasão de macrófagos durante o estágio agudo de degeneração ou desmielinização primária. HALL (1986, 1997), ressalta a importância vital das células de Schwann para o processo de regeneração axonal, destacando seu papel como fonte de fatores neurotróficos que se difundem do coto distal até a área lesada para exercer uma influência trófica sobre os axônios em regeneração do coto proximal. O contato com axônios em regeneração estimula uma segunda fase de proliferação das células de Schwann, mediada por um fator trófico derivado de neurônios, específico para células gliais.

No coto proximal ocorre uma degeneração axonal retrógrada até o primeiro nódulo de Ranvier, criando uma pequena área de degeneração Walleriana. Também o corpo celular sofre alterações estruturais e funcionais após a lesão. 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, 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 et al., 1971; WOLOSEWICK & PORTER, 1976; LUNDBORG, 1987; PLEASURE, 1980; BUETTNER, 1995). Alguns dos brotos axonais se degeneram devido a insuficiência de sinais de sobrevivência originários dos órgãos alvo, o que ocorre provavelmente na forma de fatores de crescimento (BRUSHART, 1993).

A membrana basal da célula de Schwann desempenha importante papel no direcionamento 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, 1983; IDE et al., 1983; GIANNINI & DYCK, 1990; FENELEY et al., 1991; SORENSON & WINDEBANK, 1993; HALL, 1997; TERENCEHI, 1999). WANG 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.

O processo de regeneração do nervo ocorre naturalmente desde que a continuidade entre os cotos do nervo lesado tenha sido preservada, como ocorre nos casos de compressão, onde a probabilidade dos brotos axonais crescerem através da lesão em direção às bandas de Büngner é alta (DE MEDINACELI & MERLE, 1991). Porém, se houver um espaço entre os cotos, os axônios em regeneração necessitam transpor um território não familiar antes de atingir o

“abrigo seguro” das bandas de Büngner. Nesse sentido, a probabilidade de o crescimento axonal ser bem sucedido através de um *gap* diminui à medida em que aumenta o intervalo entre os cotos (HALL, 1997).

3. MÉTODOS UTILIZADOS NO REPARO DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Segundo FIELDS et al. (1989) os primeiros experimentos envolvendo sutura de nervo foram descritos por FERRAR, no século XVII. No século XIX, BAUDENS (1836) e VON LANGENBECK (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, 1940; SEDDON & MEDAWAR, 1942; TARLOV, 1944, 1950; NISHIHIRA & Mc CAFFREY, 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, 1984; BECKER et al., 1984; BOEDTS, 1987; SMAHEL 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. O método de tubulização foi relatado pela primeira vez por GLÜCK, em 1880.

Os tubos são constituídos de materiais de natureza sintética ou biológica, destacando-se o silicone (LUNDBORG et al., 1982; WILLIAMS et al., 1983; MERLE et al., 1988; MADISON et al., 1988; STENSAAS et al., 1989; SPECTOR et al., 1991), polietileno (DA SILVA & LANGONE, 1989; MARQUES, 1992), acrílico (HURTADO et al., 1987), poliésteres (DA SILVA et al., 1984; MADISON et al., 1984, 1985; SECKEL et al., 1984; DEN DUNNEN et al., 1993), substâncias biocompatíveis como o ácido poliglicólico (MACKINNON et al., 1988; HENTZ et al., 1991), veias (WEISS, 1943; RICE & BERSTEIN, 1984; WALTON et al., 1989), artérias (FRANCEL et al., 1997), colágeno (ROSEN et al., 1979; MADISON et al., 1988; MACKINNON & DELLON, 1990), papel (KAUPPILA et al., 1997) e vidro biodegradável (LENIHAN et al., 1998b).

Entre os materiais citados, a tubulização tem sido extensamente estudada, pois apresenta vantagens como: fornecer orientação mecânica aos axônios em crescimento, minimizar a cicatrização pela formação de uma barreira que diminui a invasão de células do tecido conjuntivo, favorecer 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 (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 estão presentes no coto distal de nervo isquiático 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.

Apesar da regeneração aparentemente bem sucedida logo após a tubulização, LE BEAU et al. (1988), observaram que nervos regenerados mostravam evidências de degeneração, que eram mais intensas quanto maior o tempo após implante dos tubos de silicone, atribuindo esse fato à presença de forças constrictivas sobre o nervo durante seu crescimento através do tubo e coto distal. TERRIS & FEE (1993), a partir dessa observação, apontavam para a necessidade de introdução de um material absorvível que evitasse a compressão nervosa crônica do nervo regenerado.

Em 1998, CHAMBERLAIN et al., utilizaram tubos de colágeno degradável vazios e preenchidos com copolímero de colágeno-glicosaminoglicana (CG), em nervo isquiático de rato, comparando a regeneração axonal nesse modelo com aquela ocorrida no interior de tubos de colágeno e de silicone vazios. O crescimento axonal foi semelhante nos implantes de colágeno e de silicone

preenchidos com CG, em relação aos tubos vazios, enquanto nos implantes de silicone havia miofibroblastos ao redor de todo o comprimento do tubo, formando uma cápsula contrátil sobre o nervo regenerado. Considerando ser o tubo de colágeno degradável um material menos propenso a desenvolver cápsula contrátil, evitando a compressão sobre o nervo regenerado e consequente degeneração, os autores recomendam o uso desse material.

Pesquisas envolvendo material biodegradável na constituição dos tubos prosseguiram com LENIHAN et al. (1998b), que utilizaram tubo de vidro biodegradável de liberação controlada em nervo fibular de coelhos. Esta técnica foi comparada ao autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento e ao tubo de vidro contendo 1 cm de músculo tratado por congelamento-descongelamento. Após 6 meses do implante não se observou diferença entre o grupo onde se utilizou autoenxerto de músculo tratado e aquele onde o músculo tratado foi incluído em tubo de vidro, porém, no grupo onde apenas o tubo de vidro reunia os cotos nervosos, o nível de recuperação funcional foi inferior. O tubo utilizado é de vidro biodegradável constituído de polímeros inorgânicos baseados em fosfato de sódio, podendo seu grau de solubilidade ser modificado para alterar a composição e forma física dos constituintes do vidro. Os autores consideram que a técnica pode facilitar o estudo de diferentes métodos de enxerto e o teste de possíveis fatores químicos que poderiam aumentar a regeneração nervosa, uma vez que o tubo é facilmente

confeccionado e pode ter seu grau de solubilidade alterado para favorecer a dissolução mais rápida ou mais lenta.

Visando uma regeneração axonal adequada através do uso de material simples, de fácil acesso e de baixo custo, KAUPPILA et al. (1997) avaliaram comparativamente a regeneração nervosa através de neurorrafia tradicional e de reconexão coto-a-coto com papel umedecido, constituído de celulose e fibras de algodão, envolvendo as extremidades unidas dos cotos do nervo isquiático de rato. Observaram que ambas as técnicas de reconstrução permitiram o crescimento axonal através da lesão e concluíram que o tipo de papel utilizado pareceu ser aderente o suficiente para manter a aposição entre os cotos nervosos e sua estabilidade durante o processo de regeneração, e que o papel induziu maior cicatrização fibrosa ao redor da lesão, mas não houve interposição desse tecido cicatricial entre os cotos nervosos ou constrição do nervo regenerado.

A neurorrafia a laser é outro método que tem sido estudado por alguns autores que consideram seus resultados comparáveis aos de reparo por sutura epineural, especialmente no que se refere à velocidade de condução e densidade dos axônios (BAILES 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 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 apresenta

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 (FAWCETT & KEYNES, 1986).

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 et al., 1984).

Muitos autores têm demonstrado que axônios em regeneração podem crescer através da lâmina basal de músculo esquelético (IDE, 1984; KEYNES et al., 1984; GLASBY et al., 1986a,b,c; FAWCETT & KEYNES, 1986; DAVIES et al., 1987; NORRIS et al., 1988; SOMAZZ, 1994; SANTO NETO et al., 1998). É de interesse citar que esses trabalhos não são apenas experimentais, incluindo também entre eles alguns resultados bastante satisfatórios de reparo no homem (NORRIS et al., 1988; CALDER & NORRIS, 1993).

4. EMPREGO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO NO REPARO DAS LESÕES NERVOSAS

Segundo FIELDS et al. (1989) e GLASBY (1990), a primeira referência ao uso de músculo no reparo nervoso foi feita por CAUSEY (1955), que trabalhou no reparo de uma secção de nervo isquiático 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, 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 et al. (1983) e KEYNES et al. (1984).

IDE 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 et al., desenvolveram um protocolo a fim de preparar retalhos de músculo esquelético para o 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. O esvaziamento final é obtido 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, 1986).

Em 1986, FAWCETT & KEYNES compararam autoenxerto de nervo e autoenxerto de músculo preparado por esvaziamento 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 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 isquiático de ratos. Os autores concluíram que o enxerto muscular era bastante promissor no reparo nervoso, uma vez que foi possível a regeneração através do mesmo, havendo axônios no coto nervoso distal.

Posteriormente, GLASBY 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 isquiático de rato e 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 et al. (1986c) fizeram a retirada de um fragmento de 1 cm do nervo isquiático de rato, reimplantando-o 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 entre 7 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 et al. (1986d) realizaram autoenxerto de músculo tríceps braquial 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.

Até o momento 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.

GATTUSO et al., em 1988a, 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, os diâmetros das fibras nervosas regeneradas não retornam aos valores normais, 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 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 et al., em 1989, submeteram um grupo de ratos à reparação imediata de nervo isquiático 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 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 et al. (1990) realizaram lesões no nervo isquiático 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 et al., em 1990, realizaram autoenxerto de músculo esquelético tratado por congelamento-descongelamento, em nervo isquiático 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 (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 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 et al. (1991) utilizaram técnicas imunohistoquímicas para o estudo do crescimento axonal e migração das células de Schwann em nervo isquiático de ratos submetidos a enxerto muscular tratado pelo método de WALLIS et al. (1980), para remoção do mioplasma. Observaram que 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 esvaziados e não esvaziados revelou que em 7 dias havia o dobro de axônios regenerados no grupo de enxerto esvaziado, 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 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.

Recentemente, outro método de confecção do retalho muscular foi apresentado por HALL & ENVER (1994), que consiste no pré-aquecimento do retalho muscular a 60°C e 80°C. Os enxertos musculares foram implantados no nervo isquiático de ratos e constatou-se 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.

Com o objetivo de aumentar a distância através da qual um autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento pode suportar uma efetiva regeneração nervosa, CALDER & GREEN (1995) compararam a regeneração axonal através de autoenxerto de músculo tratado por esta técnica interposto em gaps de 1 cm e 1,5 cm, em nervo isquiático de ratos, àquela obtida através de um *sandwich* nervo-músculo, onde o enxerto muscular tratado foi dividido em dois pedaços, cada qual unido a uma das extremidades do nervo seccionado e, entre as duas extremidades dos enxertos musculares foi interposto um segmento de 2 mm do nervo distal, que serviu como fonte imediata de células de Schwann naquele local. Os resultados da avaliação do **nervo fibular** mostram ter havido um aumento significativo no número de fibras nervosas no grupo *sandwich* (1335) em relação ao grupo de enxerto de músculo (711), nos casos em que o *gap* foi de 1,5 cm, não havendo diferença significativa no diâmetro médio

das fibras entre os dois grupos. Além disso, nos *gaps* de 1,5 cm, a recuperação funcional através do *sandwich* foi maior que no autoenxerto de músculo, sendo comparável àquela obtida em autoenxerto de nervo. Os autores enfatizam a importância das células de Schwann e consideram que o uso de um segmento de nervo interposto pode aumentar significativamente a efetividade do autoenxerto de músculo congelado-descongelado, especialmente em longos *gaps* no nervo.

Estudando a utilização de enxerto muscular tratado por aquecimento em forno de micro-ondas, WHITWORTH et al. (1995) utilizaram diferentes métodos de desnaturação do músculo a ser utilizado para enxerto num espaço de 10 mm no nervo isquiático de ratos. Foi realizado autoenxerto de nervo em animais do grupo controle e autoenxerto de músculo em animais que foram divididos em outros três grupos, sendo o primeiro tratado com autoenxerto de músculo submetido a congelamento-descongelamento, o segundo tratado com choque térmico por calor seco em forno de micro-ondas (60 a 70° C), e o terceiro submetido a choque térmico e hipo-osmótico em água destilada estéril a 60° C. Os resultados mostraram retração de 58% nos autoenxertos tratados por congelamento-descongelamento, de 11% naqueles submetidos a aquecimento em micro-ondas e nenhuma retração naqueles aquecidos em água destilada estéril a 60° C; tendo sido a taxa de regeneração axonal mais rápida no grupo controle, seguida pelo grupo que sofreu aquecimento em micro-ondas, quando comparada aos demais grupos de enxerto muscular, e o grau de inflamação mais alto nos animais cujo enxerto foi submetido a aquecimento em água destilada estéril a

60° C, o que explica a pobre regeneração axonal observada neste grupo. Considerando o pequeno índice de retração, a rápida migração e maior volume de células de Schwann no interior do enxerto, além da facilidade de realização da técnica, os autores indicam o uso da técnica de aquecimento em micro-ondas para o reparo de curtos espaços em nervos periféricos, enfatizando seu uso na prática clínica.

Ainda utilizando o aquecimento do retalho muscular para o reparo de nervos lesados, LENIHAN et al. (1998a) estudaram o autoenxerto de músculo esquelético produzido por aquecimento em forno de micro-ondas doméstico durante 100 segundos, numa potência de 350 Watts e, em seguida, resfriado naturalmente durante 2 minutos e interposto no espaço de 1 cm de nervo fibular de coelhos. Esta técnica foi comparada à de autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento e os animais avaliados 6 meses após o implante. Não houve diferença significativa nos testes eletrofisiológicos entre os dois grupos, nem com relação ao diâmetro médio dos axônios, porém o diâmetro médio das fibras foi significativamente maior no grupo tratado por congelamento-descongelamento que naquele tratado por aquecimento, o que implica na mielinização mais efetiva no primeiro grupo. Os autores comentam que o preparo do retalho muscular aquecido em forno de micro-ondas mostrou-se difícil, especialmente no que se refere ao controle preciso da temperatura, que deveria estar acima de 60° C, mas não acima de 80° C, além do que as variações na espessura do fragmento muscular provocaram uma leve carbonização nas

margens do enxerto, enquanto seu centro era aquecido suficientemente. Isso implicou na redução do tamanho do enxerto, não devido à retração, como ocorre no congelamento, mas à necessidade de eliminação da extremidade carbonizada do enxerto muscular. Apesar dessas dificuldades, os autores apontam que se trata de uma técnica que pode ser usada como alternativa à de enxerto tratado por congelamento-descongelamento, mas destacam que não há evidências de que o músculo aquecido em micro-ondas suporte a regeneração em déficits maiores que 1 cm, enquanto o músculo tratado por congelamento-descongelamento apenas não é eficiente quando o déficit é maior que 5 cm.

Mesmo considerando o sucesso no emprego de retalhos de músculo esquelético, tanto experimentalmente como em alguns casos clínicos, ainda tem-se deparando com dificuldades na utilização dos enxertos e no preparo do material a ser transplantado.

No laboratório do I.B. - UNICAMP, foi desenvolvido um método baseado no emprego de anestésicos locais como elemento básico no preparo do enxerto (SOMAZZ, 1994), que se fundamenta na ação miotóxica do anestésico, promovendo degeneração das fibras musculares seguida de remoção do material necrótico, porém, preservando a membrana basal muscular. Com base nesses resultados, neste trabalho será realizada análise morfométrica de axônios regenerados através de autoenxerto de lâmina basal muscular tratado com injeção intramuscular de cloridrato de lidocaína a 2%, comparativamente ao autoenxerto de nervo, considerando-se a importância de consolidar a eficácia do

método empregado para tratamento do enxerto muscular, a partir do grau de maturação das fibras nervosas regeneradas.

OBJETIVO

Avaliar morfometricamente a regeneração axonal em nervo reparado por autoenxerto de lâmina basal muscular, obtido a partir de injeção intramuscular de cloridrato de lidocaína a 2% e estabelecer uma análise comparativa com a regeneração obtida através de autoenxerto de nervo.

Esta análise envolverá a avaliação do diâmetro dos axônios mielínicos e das fibras nervosas regeneradas, bem como a espessura de suas bainhas de mielina, o que deverá refletir a maturação das fibras regeneradas através do autoenxerto muscular e autoenxerto nervoso.

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 isquiático;

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

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

1. GRUPO I: ENXERTO DE MÚSCULO (CONFECÇÃO E IMPLANTE)

Para o preparo dos enxertos musculares, os animais foram 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^R) 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 em gaiolas separadas, 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^R - 50 mg/ml) e cloridrato de tiazina (Rumpun^R - 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 isquiático.

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 isquiático na superfície. Os planos musculares foram afastados até visualização e

exposição do nervo isquiático. 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 isquiático 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 II: 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 isquiático 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 III: OBSERVAÇÃO DA REGENERAÇÃO ESPONTÂNEA

Os procedimentos para anestesia, assepsia e exposição do nervo isquiático foram os mesmos citados anteriormente. O nervo isquiático 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 IV: 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^R –

50 mg/ml) e cloridrato de tiazina (Rumpun^R - 2 g/100 ml) em dose de 0,3 ml/100g de peso corporal.

O nervo isquiático 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 isquiáticos 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 isquiático 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 isquiático esquerdo seccionado na região correspondente ao enxerto nos demais grupos experimentais.

Os fragmentos do nervo isquiático 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, para coloração em bloco, desidratados em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA).

Foram obtidos cortes transversais de 1 μ m com navalha de vidro, em ultramicrótomo 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 1% (REYNOLDS, 1963).

6. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica se fez a partir de cortes semifinos do coto distal do nervo regenerado nos animais submetidos a enxerto de nervo e enxerto de músculo, bem como do nervo isquiático dos animais do grupo controle.

Os cortes transversais dos cotos distais dos nervos de cada grupo experimental e do controle foram corados com azul de toluidina e observados através do analisador de imagens Kontron Elektronik – KS 400 – 2.0, da Zeiss.

De acordo com CALIARI (1997), para a análise das lâminas histológicas, estabelecemos uma “macro”, ou seja, um conjunto de funções que permite executar automaticamente a seleção das imagens, a definição das condições de morfometria e a execução da medida, através do analisador de imagens.

As medidas foram realizadas de forma semi-automática.

Realizou-se a calibração geométrica do equipamento, especificando a unidade de medida “micrômetro”. Em seguida, procedeu-se a calibração de medidas geométricas para imagens provenientes do microscópio de luz, definindo na função *condition* o item *DCIRCLE* (diâmetro do círculo), objetivando a medida dos axônios.

Para a realização de medidas manuais, utilizou-se a função *region freehand*, que permite medir uma estrutura circundando-a diretamente no *display* (640x480) com o auxílio do *mouse*.

Cada lâmina histológica foi focalizada em objetiva de 100x, em imersão, e a imagem foi captada pelo sistema e visualizada *on line* no *display*, que realizou a normalização e congelamento desta, que pôde então ser devidamente mensurada.

Nos 5 campos aleatoriamente definidos, cada axônio mielínico foi contornado interna e externamente com o mouse, o que permitiu obter o diâmetro do axônio e da fibra nervosa, em micrômetros (FIG. 11).

A avaliação dos dados se fez através do *data list*, uma lista de resultados morfométricos. Para cada campo mensurado essa lista de resultados era transferida para o *excel*, formando o banco de dados de cada animal.

A partir desses dados, o diâmetro médio dos axônios de cada animal foi obtido através da somatória dos diâmetros internos dividido pelo número de axônios mensurados.

$$\varnothing_{\text{médio axônios}} = \frac{\sum \varnothing_{\text{int.}}}{n^{\circ} \text{axônios}}$$

Da mesma forma, o diâmetro médio das fibras se obteve pela somatória dos diâmetros externos dividido pelo número de fibras mensuradas.

$$\varnothing_{\text{médio fibras}} = \frac{\sum \varnothing_{\text{ext.}}}{n^{\circ} \text{fibras}}$$

A medida da espessura da bainha de mielina se fez subtraindo-se o diâmetro interno do externo e dividindo-se por dois.

$$e_{\text{mielina}} = \frac{\varnothing_{\text{ext.}} - \varnothing_{\text{int.}}}{2}$$

A espessura média das bainhas de mielina de cada animal também foi obtida dividindo-se a somatória das espessuras das bainhas de mielina pelo número de fibras analisadas.

$$e_{\text{média mielina}} = \frac{\sum e_{\text{mielina}}}{n^{\circ} \text{ fibras}}$$

A razão G resultou da divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

$$\text{razão } G = \frac{\varnothing_{\text{axônio}}}{\varnothing_{\text{fibra}}}$$

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

Para análise estatística dos dados morfométricos, os valores médios de cada grupo experimental, bem como do controle, foram analisados e comparados entre si, utilizando-se o “teste F”, seguido do “teste de Tukey-Kramer HSD”.

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, além da presença dos pontos de sutura. 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 isquiático, 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 isquiático 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

Em todos os animais os aspectos morfológicos foram essencialmente semelhantes àqueles descritos na literatura. Foram identificados axônios mielínicos, cada qual envolvido pela célula de Schwann e bainha de mielina (FIG.4), bem como grupos de axônios amielínicos, onde uma única célula de Schwann, através de suas projeções citoplasmáticas, envolvia vários axônios desprovidos de mielina (FIG.5).

Envolvendo externamente os fascículos nervosos observou-se o epineuro 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 (FIG.4).

3. 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 perifericamente. Envolvendo cada minifascículo se observava células semelhantes às células perineurais (FIG.10 – A e C).

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 (FIG.6). O diâmetro dos axônios e espessura das respectivas bainhas de mielina eram visivelmente menores ao nível dos enxertos, em relação ao coto proximal. 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 (FIG.7).

4. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO COTO DISTAL

Os axônios regenerados atingiram o coto distal do nervo 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.

As fibras nervosas mielínicas apresentavam menor diâmetro e bainhas de mielina mais delgadas em relação ao nervo normal. No entanto, notou-se a ausência de minifascículos, caracterizando-se uma disposição geral das fibras semelhante ao nervo normal (FIG.10 – B, D e E).

Conforme se observa nas figuras 8 e 9, o nervo regenerado através de transplante de nervo e músculo, respectivamente, apresenta sinais de que houve

reestruturação de sua organização interna, com presença de axônios mielinizados e grupos de axônios amielínicos acompanhados de suas respectivas células de Schwann, o perineuro envolvendo os fascículos nervosos e a presença de mitocôndrias, neurofilamentos e microtúbulos no axoplasma.

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. Em apenas um dos cinco animais estudados observou-se presença de 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, no interstício das células musculares, sendo que vários axônios mostravam sinais de degeneração. Em outro caso, observou-se a formação de três fascículos, envolvidos por perineuro, porém mostrando extensa proliferação de tecido fibroso e presença de mastócitos.

5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO GRUPO CONTROLE E COTO DISTAL DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Diâmetro dos Axônios:

Tabela 1: Diâmetro do axônio para os diferentes tratamentos

| Tratamento | Média (μm) | Desvio padrão (μm) | C.V. (%) |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|
| Controle | 7.8373 ^(a) | 0.4425 | 5,65 |
| Enxerto de nervo | 4.1706 ^(b) | 0.8487 | 20,35 |
| Enxerto de músculo | 4.1304 ^(b) | 0.3380 | 8,18 |

Letras iguais não diferem estatisticamente ($P < 0.05$).

Tabela 1.1: Análise de variância para diâmetro do axônio.

| Causas de variação | G.L. | Soma de quadrados | Quadrados médios | Razão F |
|--------------------|------|-------------------|------------------|---------|
| Tratamento | 2 | 63.4370 | 31.7185 | 92.3450 |
| Resíduo | 18 | 6.1826 | 0.3435 | Prob>F |
| Total | 20 | 69.6196 | 3.4810 | <0.0001 |

Observa-se na tabela 1 que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros médios dos axônios nos dois tratamentos, porém, quando estes foram comparados ao grupo controle, o diâmetro normal dos

axônios não foi atingido, havendo diferença estatisticamente significativa entre eles.

Diâmetro das Fibras:

Tabela 2: Diâmetro da fibra para os diferentes tratamentos

| Tratamento | Média (μm) | Desvio padrão (μm) | C.V. (%) |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|
| Controle | 12.4580 ^(a) | 0.4687 | 3.76 |
| Enxerto de nervo | 6.7284 ^(b) | 1.3800 | 20.512 |
| Enxerto de músculo | 6.7434 ^(b) | 0.4749 | 7.04 |

Letras iguais não diferem estatisticamente ($P < 0.05$).

Tabela 2.1: Análise de variância para diâmetro da fibra.

| Causas de variação | G.L. | Soma de quadrados | Quadrados médios | Razão F |
|--------------------|------|-------------------|------------------|---------|
| Tratamento | 2 | 152.7969 | 76.3984 | 97.5398 |
| Resíduo | 18 | 14.0986 | 0.7833 | Prob>F |
| Total | 20 | 166.8954 | 8.3448 | <0.0001 |

De forma semelhante, não houve diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros médios das fibras nervosas nos grupos de enxerto de nervo e enxerto de músculo. Quando estes grupos foram comparados ao

controle, observou-se que o diâmetro das fibras não atingiu os valores normais, havendo diferença significativa entre eles.

Espessura da bainha de mielina:

Tabela 3: Espessura da bainha de mielina para os diferentes tratamentos

| Tratamento | Média (μm) | Desvio padrão (μm) | C.V. (%) |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|----------|
| Controle | 1.1247 ^(a) | 0.0963 | 8.56 |
| Enxerto de nervo | 0.6394 ^(b) | 0.1388 | 21.71 |
| Enxerto de músculo | 0.6541 ^(b) | 0.0532 | 8.14 |

Letras iguais não diferem estatisticamente ($P < 0.05$).

Tabela 3.1: Análise de variância para espessura da bainha de mielina.

| Causas de variação | G.L. | Soma de quadrados | Quadrados médios | Razão F |
|--------------------|------|-------------------|------------------|---------|
| Tratamento | 2 | 1.0666 | 0.5333 | 50.9875 |
| Resíduo | 18 | 0.1883 | 0.0105 | Prob>F |
| Total | 20 | 1.2548 | 0.0627 | <0.0001 |

A tabela 3 mostra a estreita semelhança entre as espessuras das bainhas de mielina nos grupos de enxerto de nervo e enxerto de músculo, bem como a discrepância entre estes e o grupo controle. A diferença entre os dois

grupos experimentais e o grupo controle também foi significativa quando este parâmetro foi considerado.

Razão G:

Tabela 4: Razão G para os diferentes tratamentos

| Tratamento | Média | Desvio padrão | C.V. (%) |
|--------------------|-----------------------|---------------|----------|
| Controle | 0.6290 ^(a) | 0.0259 | 4.11 |
| Enxerto de nervo | 0.6201 ^(a) | 0.0199 | 3.21 |
| Enxerto de músculo | 0.6124 ^(a) | 0.0207 | 3.38 |

Letras iguais não diferem estatisticamente ($P < 0.05$).

Tabela 4.1: Análise de variância para razão G.

| Causas de variação | G.L. | Soma de quadrados | Quadrados médios | Razão F |
|--------------------|------|-------------------|------------------|---------|
| Tratamento | 2 | 0.0010 | 0.0005 | 0.9789 |
| Resíduo | 18 | 0.0090 | 0.0005 | Prob>F |
| Total | 20 | 0.0099 | 0.0005 | 0.3948 |

Pela observação da tabela 4, nota-se que nos dois tratamentos os axônios regenerados estão dentro do valor G normal (entre 0.6 e 0.7).

FIGURAS

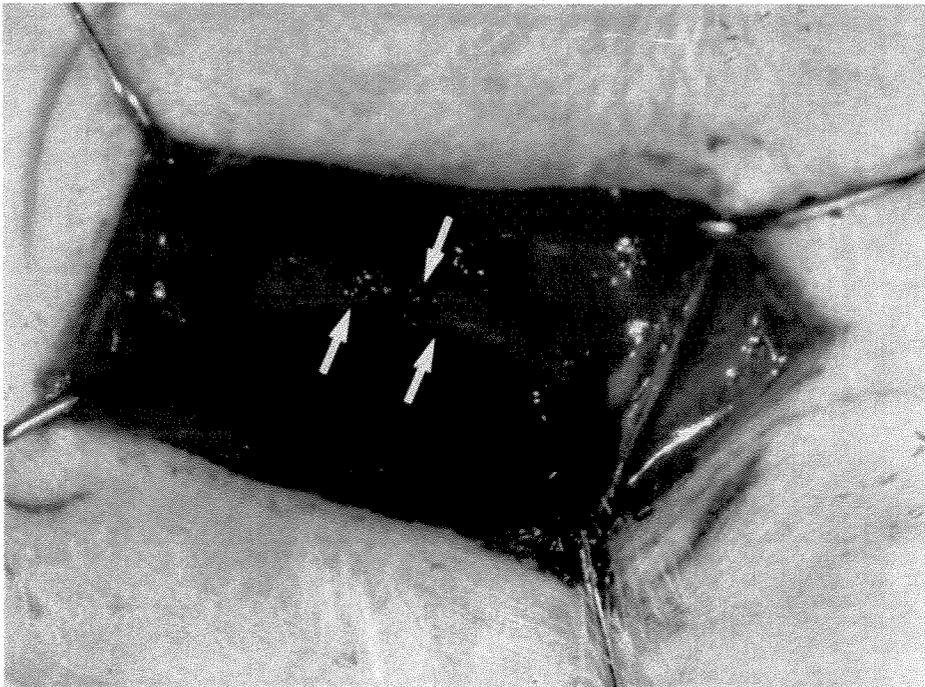


Figura 1: Aspecto pós-cirúrgico do enxerto muscular (m.sóleo) tratado com cloridrato de lidocaína a 2%. Observar os pontos de sutura (setas retas). Aumento : 15x.

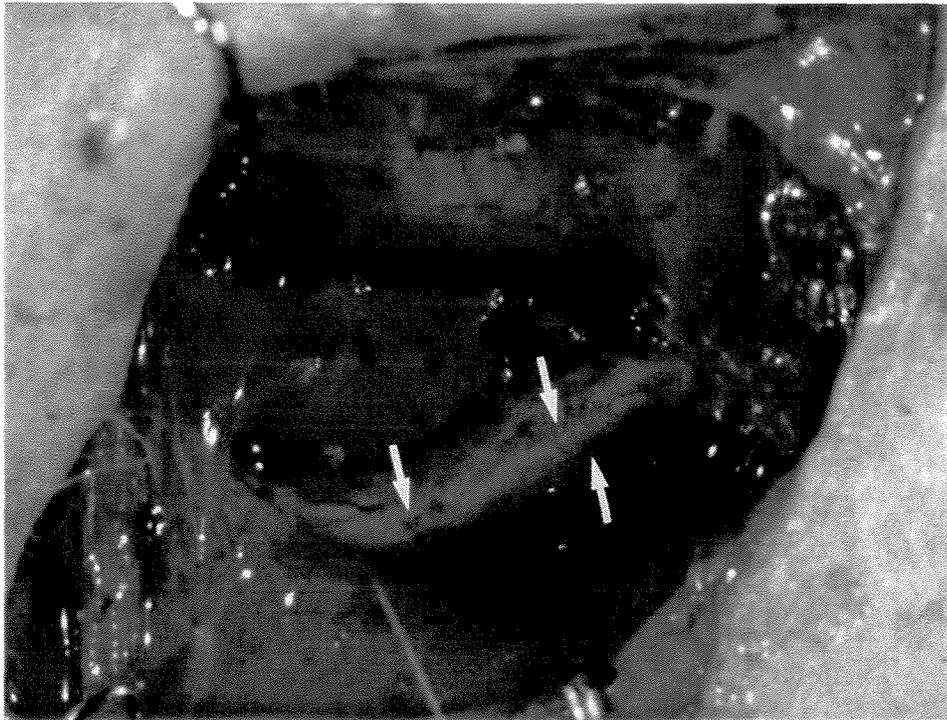


Figura 2: Aspecto do nervo isquiático regenerado após 50 dias do enxerto muscular. Observar os pontos de sutura delimitando a região do enxerto (setas) e a aderência do nervo aos tecidos vizinhos. Aumento: 15x.

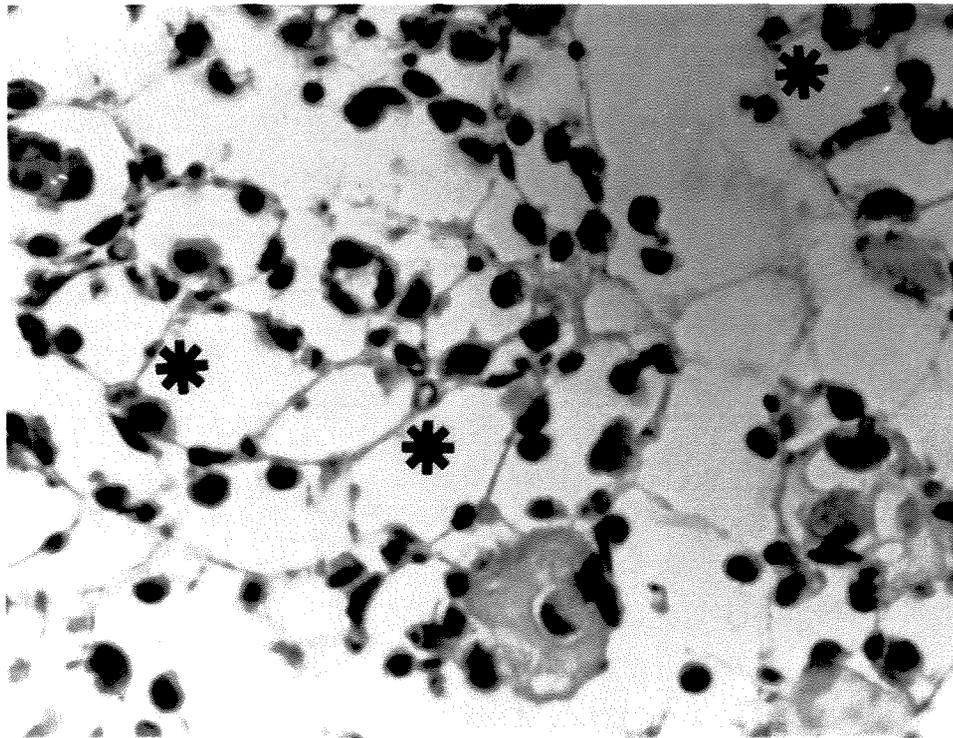


Figura 3: Característica histológica do músculo sóleo 24 horas após a injeção do anestésico, obtida a partir de microscopia de luz. Observar ausência de conteúdo sarcoplasmático na maioria das fibras (*). H.E. Aumento: 400x.

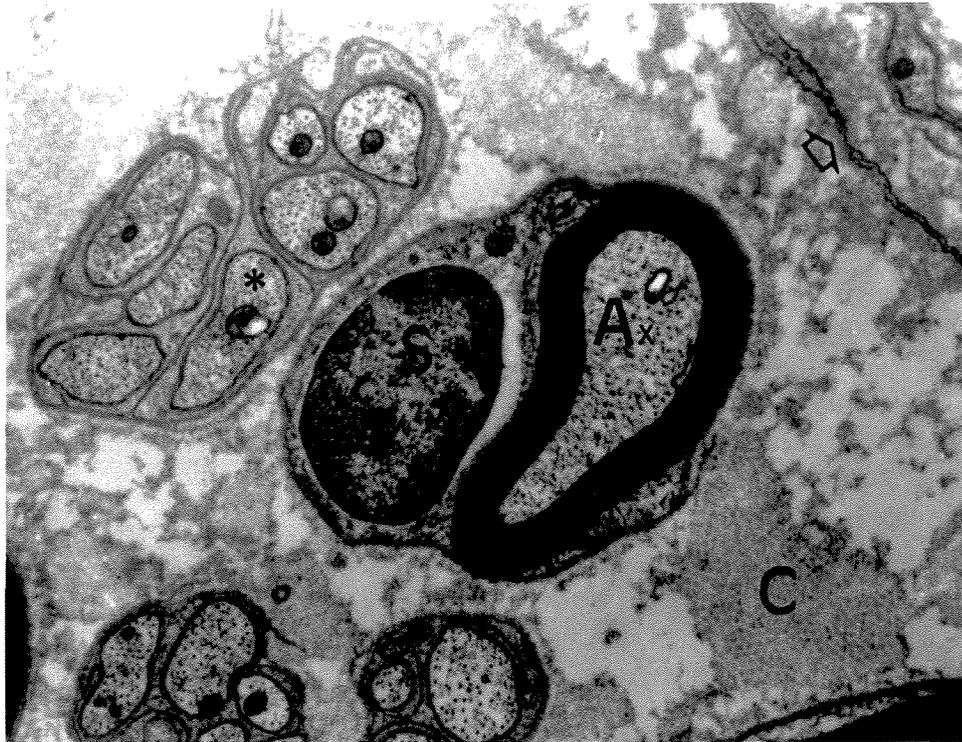


Figura 4: Micrografia eletrônica do nervo isquiático normal. Observar axônio mielínico (Ax) e o núcleo da célula de Schwann (S), grupo de axônios amielínicos (*) e colágeno (C). O perineuro também pode ser observado (seta curta). Tetróxido de ósmio. Aumento: 16.500x.



Figura 5: Micrografia eletrônica do nervo isquiático normal. Observar célula de Schwann (S) com suas projeções citoplasmáticas envolvendo vários axônios amielínicos (*). Tetróxido de ósmio. Aumento: 16.500x.

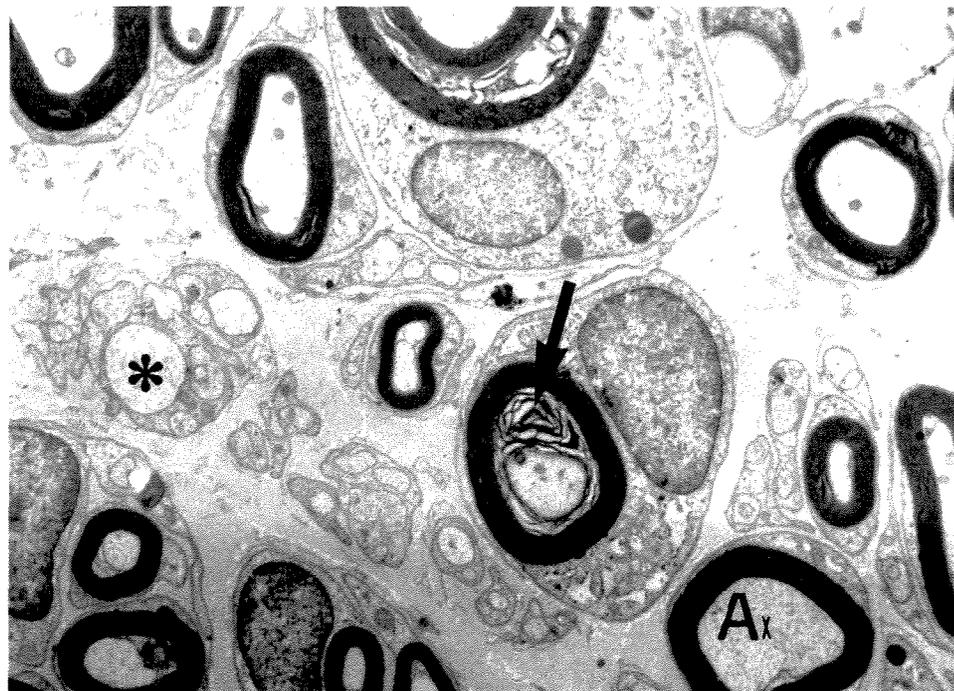


Figura 6: Micrografia eletrônica do nervo isquiático ao nível do enxerto de nervo. Observar sinais de degeneração (seta) e grupos de axônios mielínicos (Ax) e amielínicos (*). Tetróxido de ósmio. Aumento: 5.900x.

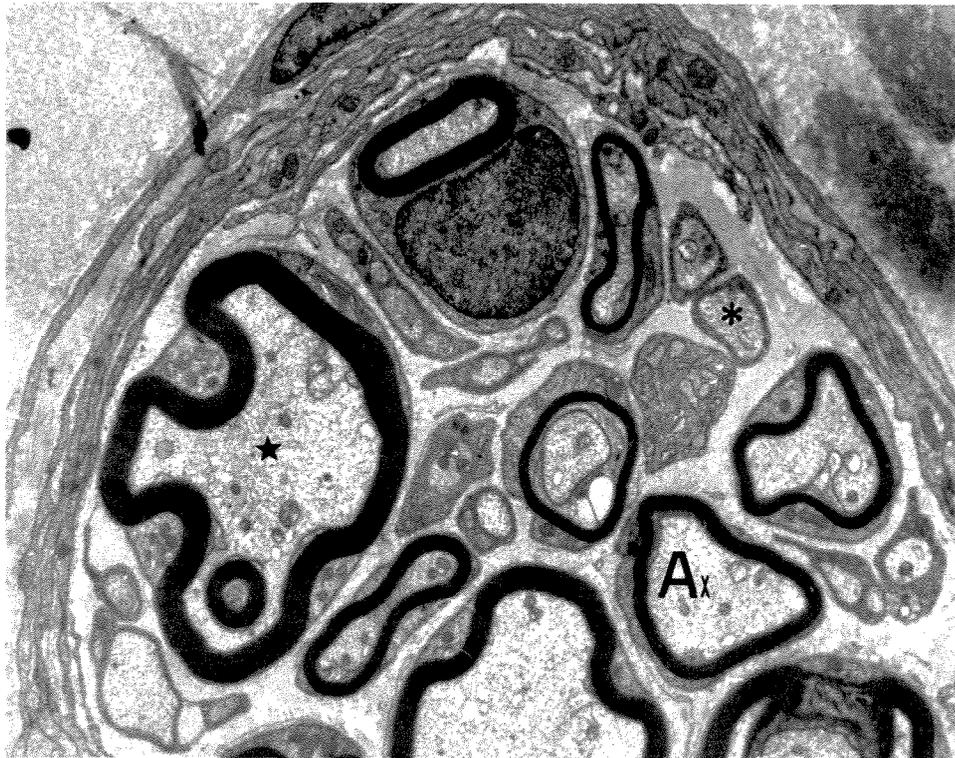


Figura 7: Micrografia eletrônica do nervo isquiático regenerado ao nível do enxerto muscular. Observar axônios mielínicos (Ax) e amielínicos (*) organizados em fascículos e axoplasma com neurofilamentos microtúbulos e mitocôndrias (★). Tetróxido de ósmio. Aumento: 7.250x.

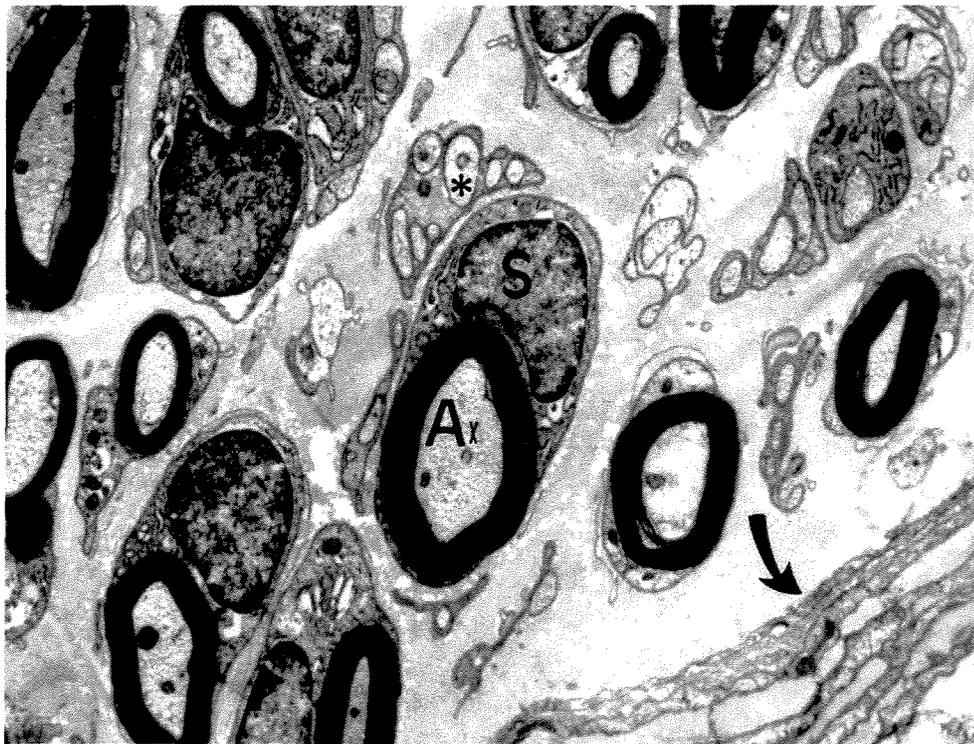


Figura 8: Micrografia eletrônica do coto distal do nervo isquiático regenerado a partir de enxerto de nervo. Observar axônios mielínicos (Ax) e núcleos de Schwann (S), grupos de axônios amielínicos (*) e o perineuro envolvendo o fascículo (seta curva). Tetróxido de ósmio. Aumento: 7.250x.

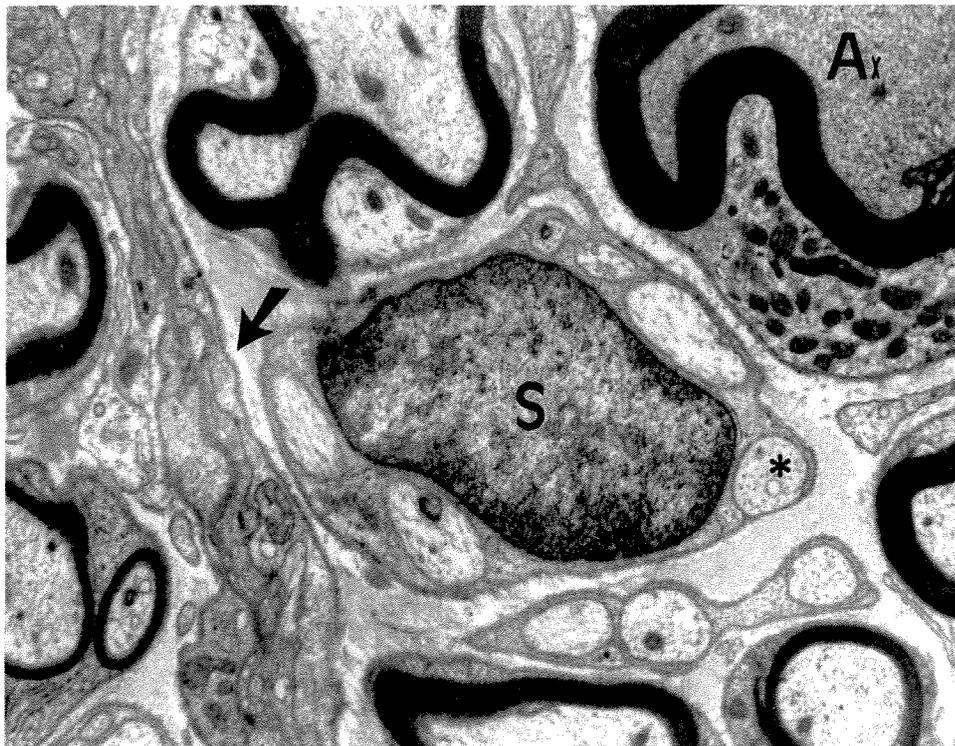


Figura 9: Micrografia eletrônica do coto distal do nervo isquiático regenerado a partir do enxerto muscular. Observar axônios mielínicos (Ax) e núcleo de Schwann (S), grupo de axônios amielínicos (*) e o perineuro envolvendo o fascículo (seta inclinada). Tetróxido de ósmio. Aumento: 11.850x.

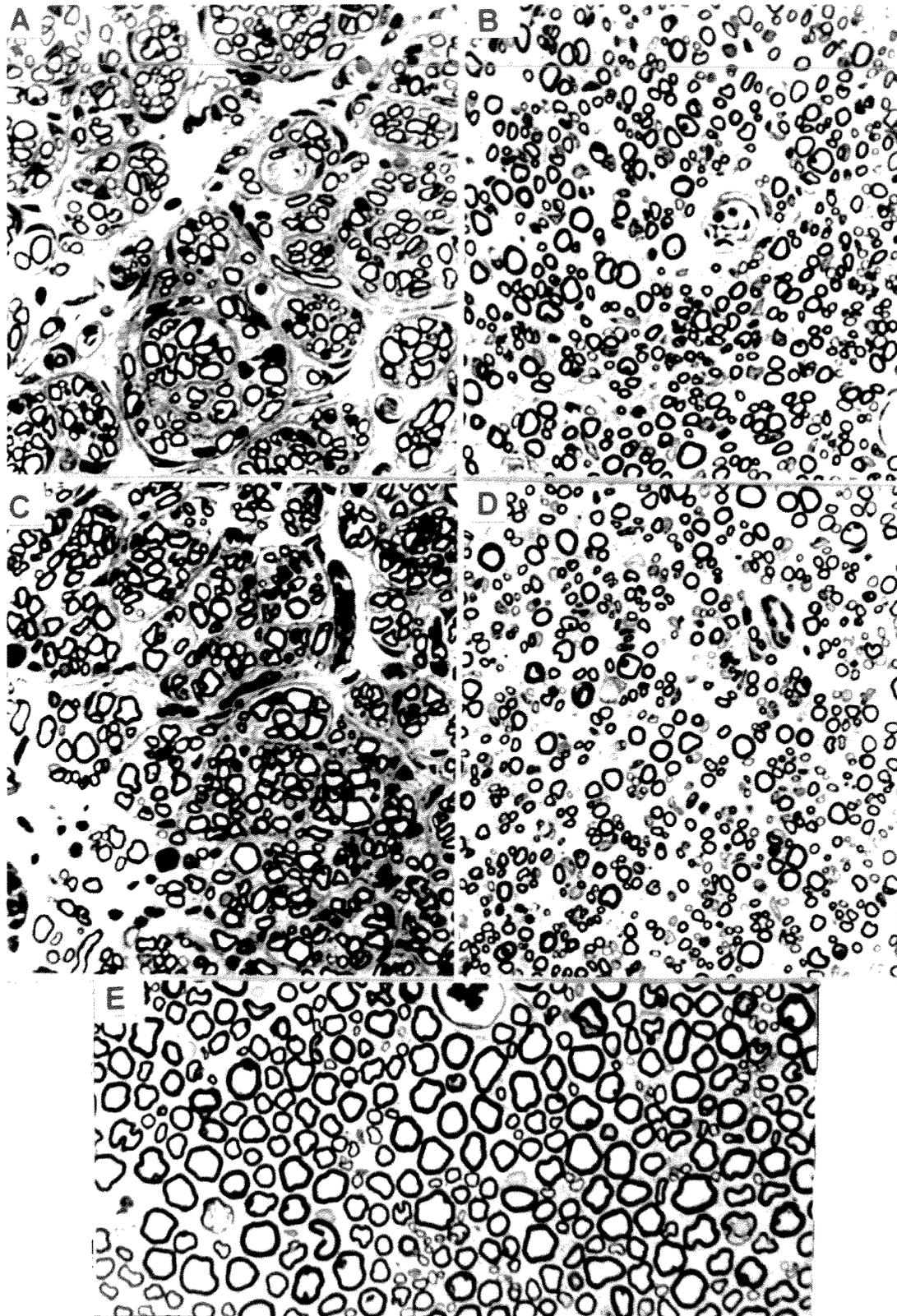


Figura 10: Aspecto histológico da região do enxerto e coto distal nos dois grupos experimentais, em relação ao grupo controle. **A:** região do enxerto de músculo; **B:** coto distal do grupo de enxerto de músculo; **C:** região do enxerto de nervo; **D:** coto distal do grupo de enxerto de nervo; **E:** nervo normal. Observar a disposição das fibras nervosas, o calibre dos axônios e espessuras das bainhas de mielina. Tetróxido de ósmio. Aumento: 179,4x.

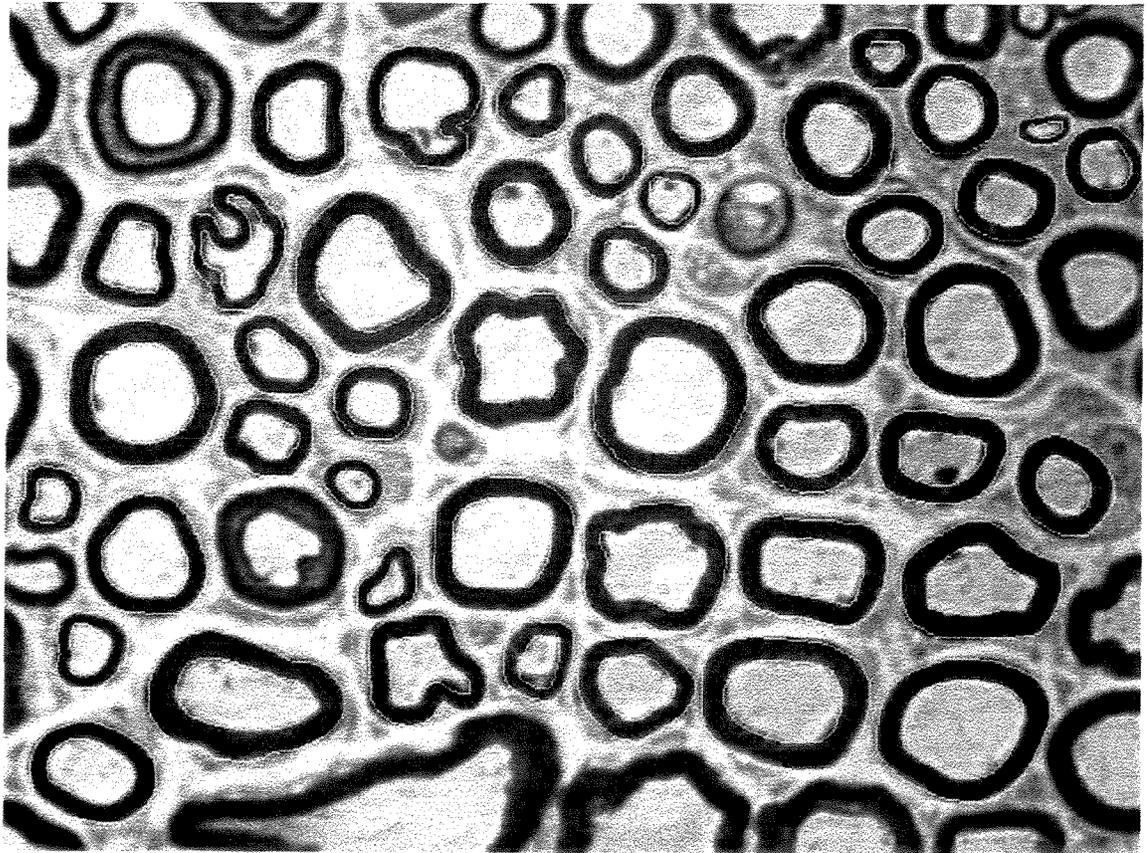


Figura 11: Corte transversal do nervo isquiático normal obtido por microscopia de luz, mostrando cada axônio contornado interna e externamente (amarelo) para a realização da análise morfológica. Tetróxido de ósmio. Aumento : 575x.

DISCUSSÃO

1. SOBRE O EMPREGO DE ENXERTOS MUSCULARES

A partir da comprovação da viabilidade do uso de autoenxerto de músculo esquelético preparado com anestésico local no trabalho de SOMAZZ (1994), estudou-se comparativamente a regeneração axonal através de autoenxerto de lâmina basal muscular e autoenxerto de nervo, em busca de dados morfométricos que permitissem comparar com maior segurança os resultados da regeneração axonal através do enxerto de músculo tratado por este método.

A literatura tem mostrado que o método mais comumente empregado é aquele preconizado por GLASBY et al. (1986a). Contudo novas técnicas vêm sendo desenvolvidas, destacando-se entre elas o aquecimento (HALL & ENVER, 1994; WHITWORTH et al., 1995; LENIHAN et al., 1998a) e o “*sandwich*” nervo-músculo (CALDER & GREEN, 1995).

O emprego de fragmentos de músculo esquelético para o reparo de lesão nervosa fundamenta-se nos trabalhos de SANES et al. (1978) e de IDE et al. (1983), os quais observaram que durante a reinervação havia um intenso brotamento axonal no músculo desnervado. Isso levou-os 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.

O método estabelecido por KEYNES et al. (1984), consiste 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 é 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 é 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 é suficiente para a remoção de todo o conteúdo sarcoplasmático. Para completar a remoção, faz-se necessária a compressão do músculo entre duas superfícies planas. Esse procedimento permitiu observar o crescimento coaxial das fibras nervosas no interior dos tubos de membrana basal muscular. Porém, o inconveniente deste método é que promove um esvaziamento de apenas 50% do mioplasma, além de ser muito trabalhoso e demorado, o que levou os próprios autores a afirmar a necessidade de aperfeiçoar a técnica de preparo do retalho.

Dois anos mais tarde, GLASBY et al. (1986a) preconizaram um novo método para a obtenção do enxerto de lâmina basal. Este método consiste 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 observar axônios na 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 realização da sutura.

Considerando estas dificuldades, SOMAZZ (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 estudou a possibilidade de se empregar o método de obtenção do enxerto através de injeções de um anestésico local (cloridrato de lidocaína). Esta idéia baseia-se na semelhança química existente entre a membrana basal da célula de Schwann e aquela das fibras musculares.

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

O método aqui 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. 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, 1982).

O processo inflamatório inicia-se algumas horas após a injeção do anestésico e segue o padrão universal das inflamações agudas, ou seja, havendo predomínio de neutrófilos e, em seguida, macrófagos. No entanto, 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 et al., 1983). Após a remoção do 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 et al. (1984) e físico de GLASBY 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, 1986).

A observação da viabilidade ou não da célula satélite é difícil de ser feita, não sendo possível concluir do presente trabalho que as mesmas estão inviabilizadas. Segundo REGER & CRAIG (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 (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. 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 ativação das mesmas. Neste trabalho, não foi investigada a necrose das células satélites, porém, os resultados são claros no sentido de que, de alguma forma, houve inibição da ação destas

células, o que foi comprovado pela ausência de regeneração muscular no local do enxerto.

SOMAZZ (1994) demonstrou 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, sendo 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 promove extensa necrose muscular, garantindo a presença dos tubos de membrana basal praticamente “vazios”. Os brotos axonais originários da porção proximal do nervo isquiático lesado puderam crescer através destes tubos e atingir a porção distal. No retalho muscular não se observou a presença de fibras musculares regeneradas, o que permitiu ao autor concluir 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, 1994). SANTO NETO et al. (1998), utilizando este método de preparação do enxerto, observaram que após 60 dias do implante muscular em nervo isquiático de ratos, todas as junções neuromusculares estudadas foram reinervadas, uma vez que seus aspectos ultraestruturais eram compatíveis com junções funcionais.

Baseados nesses resultados, obteve-se enxertos de membrana basal muscular, utilizando o cloridrato de lidocaína a 2%, por ser um método rápido, que promove o esvaziamento 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 (FIG.10 – A e C). Resultados semelhantes foram obtidos por KEYNES et al. (1984) e GLASBY 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 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 et al., 1972; GLASBY, 1990; GSHMEISSNER 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 et al. (1990) e GATTUSO et al. (1988b), 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 et al., 1988b), além de fornecer uma barreira de difusão entre os espaços extracelular e endoneural (HUXLEY & STAMPFLI, 1951; SHANTHAVEERAPPA & BOURNE, 1962, 1963, 1968).

Segundo GSHMEISSNER 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 em 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.

Em trabalho anterior, observou-se que o número de axônios regenerados através de enxerto muscular tratado com cloridrato de lidocaína a 2% foi 13.792, enquanto no enxerto nervoso foi 13.592 e no nervo normal, 8.012 (SANTO NETO et al., 1998). O resultado da análise quantitativa foi compatível com os achados de SCHMALBRUCH (1986), que obteve uma média de 7469,25 axônios em nervo isquiático de ratos Wistar normais e de OLIVEIRA (1993), que observou uma média de 7782,1 axônios em nervo isquiático de animais da mesma espécie. ANSSELIN & DAVEY (1993), também observaram um número semelhante de axônios no nervo isquiático normal de ratos ($\cong 7000$) e no coto distal do nervo regenerado ($\cong 12500$). CHAMBERLAIN et al., (1998), encontraram uma média de $\cong 6300$ axônios mielínicos no nervo normal e $\cong 13000$ axônios no coto distal, após autoenxerto de nervo. Esses dados demonstram que a eficácia da regeneração axonal observada a partir de autoenxerto muscular é da mesma ordem de amplitude daquela observada nos autotransplantes de nervo, realizados por outros autores.

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 et al., 1983; KEYNES et al., 1984; GLASBY, 1990; IDE & KATO, 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, 1986; LE BEAU 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.

No presente trabalho, avaliou-se o grau de maturação das fibras regeneradas através de análise morfométrica que apontou o diâmetro dos axônios e das fibras nervosas mielinizadas, a espessura de suas bainhas de mielina e a razão G.

4. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Os pesquisadores são unânimes em afirmar que após transecção do nervo, os diâmetros dos axônios e suas respectivas espessuras de bainha de mielina nunca são recuperados em relação aos valores normais. Neste trabalho, notou-se que o diâmetro dos axônios (4.13 μm e 4.17 μm), para enxerto de músculo e nervo, respectivamente, e a espessura das bainhas de mielina

(0.65 μm e 0.63 μm) no coto distal, também são menores em relação aos nervos controle, onde se observou diâmetro axonal médio de 7.83 μm e espessura média das bainhas de mielina de 1.12 μm .

CHAMBERLAIN et al. (1998) observaram que nervos regenerados em tubos de colágeno degradável e de silicone, apresentavam diâmetro axonal menor (2.5 μm) e bainhas de mielina mais delgadas após seis semanas do implante, apesar de não terem realizado mensuração da espessura da mielina. Valores reduzidos para o diâmetro dos axônios e das fibras também foram observados por LENIHAN et al. (1998b), em nervo fibular de coelhos submetidos a implante de tubo de vidro biodegradável e autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento. Enquanto o nervo normal apresentava diâmetro médio das fibras de 9.3 μm e dos axônios de 4.5 μm , esses valores diminuíram para 4.6 μm e 1.9 μm respectivamente, após 6 meses do autoenxerto de músculo, e 3.2 μm e 1.1 μm respectivamente, após o implante do tubo de vidro degradável. O mesmo ocorreu no trabalho de CALDER & GREEN (1995), que observaram diâmetro das fibras entre 8 e 9 μm em nervo isquiático de ratos normais, comparando aos animais que receberam autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento e *sandwich* nervo-músculo, onde os diâmetros oscilavam entre 4 e 6 μm .

Neste trabalho, o diâmetro médio das fibras nervosas nos animais controle foi 12,45 μm , sendo que nos cotos distais dos animais tratados com

autoenxerto e músculo foi de 6,74 μm e com autoenxerto de nervo foi de 6,72 μm . Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por CALDER & GREEN (1995), bem como com o trabalho de GATTUSO et al. (1988b), que submeteram nervos isquiáticos de ratos a autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento e os compararam a nervos normais, obtendo o diâmetro médio das fibras nervosas do grupo controle (7.57 μm) e do nervo distal do grupo tratado (6.27 μm), bem como a espessura da bainha de mielina no grupo controle (1.39 μm) e no nervo distal do grupo tratado (1.08 μm). Eles verificaram uma porcentagem de recuperação da ordem de 83% para o diâmetro da fibra e 78% para a espessura da bainha de mielina. Segundo os autores, estes valores são melhores, ou pelo menos semelhantes, aos resultados estabelecidos por outros autores e, provavelmente, muito superiores àqueles obtidos após “cabo de enxerto”. Neste trabalho, a porcentagem de recuperação foi de 54,00% para o diâmetro da fibra no grupo de autoenxerto de nervo e 54,12% no grupo de autoenxerto de músculo. Quanto à espessura da bainha de mielina, essa porcentagem foi de 56,85% no grupo de autoenxerto de nervo e 58,14% no grupo de autoenxerto de músculo. Para avaliar esses dados, nos reportamos ao trabalho de LE BEAU et al. (1988), que investigaram o diâmetro das fibras e a espessura das bainhas de mielina em nervo isquiático de ratos submetidos a implante de tubos de silicone aos 42, 56, 70 e 435 dias após o implante. Houve uma evolução progressiva desses valores até atingir 435 dias, ou seja, o diâmetro médio das fibras no grupo controle foi 5.13 μm , passando para 1.82 μm aos 56 dias, o que

corresponde a 35.48% do normal, e 2.39 μm aos 435 dias (46.59% do normal). Para a espessura média das bainhas de mielina houve progressão semelhante, sendo 1.55 μm no grupo controle, passando para 0.50 μm aos 56 dias (32.26% do normal) e 0.57 μm aos 435 dias (36.77% do normal).

Os resultados aqui apontados foram obtidos após 50 dias do implante de nervo e músculo. GATTUSO et al. (1988b), que também trabalharam com implante muscular, obtiveram os resultados anteriormente citados após 300 dias do implante. Esse fato permite considerar que o processo de regeneração ainda está ativo aos 50 dias e que a maturação do nervo regenerado poderia ser maior em tempos de sobrevivência maiores. Ainda considerando uma sobrevivência de 50 dias, os dados referentes ao diâmetro médio das fibras regeneradas através de enxerto muscular (54.12%) foi superior àquele obtido por LE BEAU et al. (1988), onde o diâmetro das fibras atingiu 35.48% aos 56 dias após implante de silicone.

GUTMANN & SANDERS (1943), afirmaram 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 (1964) observaram que mesmo após compressão, o diâmetro da fibra alcançava apenas 89% dos valores controle, depois de um ano, em coelhos. SCHRÖDER (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.

WATTIG et al. (1992) observaram os efeitos da administração de nucleotídeos na regeneração de nervo isquiático de ratos submetidos a lesão por compressão, após 20, 40 e 60 dias. Nos animais do grupo controle, o diâmetro médio das fibras foi de 6.3 μm , a espessura das bainhas de mielina foi de 1.34 μm e a razão G foi 0.341. Nos animais submetidos a compressão e tratamento com nucleotídeos, esses valores foram: 4.1 μm , 0.93 μm e 0.387, respectivamente. Eles concluíram que a administração de gangliosídeos provocou um significativo aumento no tamanho das fibras e na velocidade de condução nervosa após 40 e 60 dias da lesão, indicando que o uso de nucleotídeos possivelmente representa uma nova oportunidade para o tratamento de lesões traumáticas de nervos periféricos.

Os dados obtidos por WATTIG et al. (1992) são resultantes de lesão por compressão seguida de administração de gangliosídeos, substância reconhecida como facilitadora da regeneração nervosa. No entanto, tais resultados se assemelham aos obtidos neste trabalho, onde além de se ter realizado secção do nervo, não se administrou qualquer substância aceleradora do processo de regeneração, apenas os constituintes naturais da membrana basal muscular, o que reforça sua importância nesse processo.

MACKINNON et al. (1986) também apontam maior número de fibras nervosas na região do enxerto (13393) e nervo distal (11119), após enxerto de nervo em ratos, destacando o aumento do número de fibras em relação ao nervo normal (7740) e a diminuição do diâmetro das fibras ($\cong 3.5 \mu\text{m}$) quando comparado ao nervo normal ($\cong 6.4 \mu\text{m}$).

Apesar da avaliação comparativa dos resultados obtidos neste trabalho em relação àqueles verificados em diferentes formas de enxerto, ou seja, tubulização, autoenxerto de nervo, sandwich nervo-músculo e autoenxerto de músculo, o que parece mais importante aqui é a comparação com resultados de trabalhos onde se utilizou músculo esquelético como enxerto para o reparo nervoso. Nesse sentido, verificou-se que os resultados de CALDER & GREEN (1995), que utilizaram autoenxerto de músculo tratado por congelamento-descongelamento em gap de 1 cm em nervo isquiático de ratos e realizaram análise morfométrica 40 semanas após o implante, são semelhantes aos obtidos quando se utilizou autoenxerto de músculo tratado com anestésico local, 50 dias após o implante.

Parece haver consenso de que a diminuição do calibre do axônio no nervo regenerado é acompanhada da diminuição da espessura da bainha de mielina. Esse fato encontra respaldo na forte correlação entre o calibre do axônio e espessura da bainha de mielina, já comprovada cientificamente por FRIEDE &

SAMORAJSKI, 1967; WILLIAMS & WENDELL-SMITH, 1971; HILDEBRAND & HAHN, 1978; FRAHER, 1989, 1992.

FRAHER & DOCKERY (1998) afirmam que o axônio controla continuamente a espessura da bainha de mielina durante o desenvolvimento, sendo que um axônio de determinado calibre tende a ser envolvido por uma bainha de mielina com espessura específica. Porém, FRAHER, em 1989 e 1992, afirma que a relação axônio-mielina pode diferir consideravelmente entre nervos, mesmo quando estes são de tipos semelhantes; entre diferentes níveis ao longo do mesmo nervo; ou no mesmo nervo, em diferentes locais. Esta variabilidade argumenta contra uma associação quantitativa rígida e universal entre o tamanho do axônio e a espessura da bainha de mielina.

Neste trabalho, o objetivo foi comparar se a diminuição do diâmetro do axônio e da espessura da bainha de mielina observada nos nervos regenerados através do enxerto muscular era semelhante àquela vista nos nervos regenerados através de enxerto nervoso, além de reafirmar a eficácia do método empregado para o preparo do enxerto muscular.

A redução do calibre axonal é um fenômeno observado em todos os casos de regeneração axonal. Acredita-se que este fato esteja parcialmente associado à privação de conexões terminais durante o processo regenerativo (GUTMANN & SANDERS, 1943; SANDERS & YOUNG, 1946), apud ANSSELIN et

al. (1997), além de outros fatores, como a colagenização aumentada, retração endoneural e efeitos tardios sobre o corpo celular (BOWE et al., 1989).

A razão G, definida como resultado da divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro total da fibra nervosa, é um parâmetro que está estreitamente relacionado à velocidade de condução de impulsos nervosos através do nervo. Para uma velocidade de condução ideal, a maioria dos axônios mielinizados deve ter uma razão G entre 0.6 e 0.7. Valores G altos indicam que o axônio está fracamente mielinizado, enquanto valores G baixos indicam axônios densamente mielinizados (ANSSELIN et al., 1997).

Apesar de não ter sido realizada análise eletrofisiológica neste trabalho, a razão G observada nos dois grupos tratados sugere que a velocidade de condução nervosa teria sido recuperada para ambos os grupos. Esse achado reforça a idéia de que o ambiente de regeneração através do enxerto muscular foi semelhante àquele fornecido por enxertos nervosos.

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 o diâmetro dos axônios (4.13 μm / 4.17 μm), diâmetro das fibras nervosas (6.74 μm / 6.72 μm) e espessura das bainhas de mielina (0.65 μm / 0.63 μm) nos cotos distais dos grupos submetidos a autoenxerto de músculo e autoenxerto de nervo, respectivamente.

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 et al., 1983; IDE, 1984; TOHYAMA & IDE, 1984; TOHYAMA, 1985; GLASBY, 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 morfométricos obtidos neste trabalho vêm confirmar a aplicabilidade do método de tratamento do enxerto muscular a partir de injeção de

cloridrato de lidocaína a 2%, reafirmando-o como mais uma alternativa para o reparo de lesões nervosas periféricas.

CONCLUSÃO

Os parâmetros morfométricos aplicados para a avaliação da maturação axonal indicam que a utilização de autoenxerto de músculo esquelético tratado com cloridrato de lidocaína a 2% produz resultados semelhantes àqueles obtidos a partir de autoenxerto de nervo, reafirmando a eficácia deste método de tratamento do enxerto muscular para o reparo nervoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ANSSELIN, A.D., DAVEY, D.F. The regeneration of axons through normal and reversed peripheral nerve grafts. **Restor Neurol Neurosci**, n.5, p.225-240, 1993.
2. _____. et al. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Oxford, v.23, n.5, p.387-398, Oct. 1997.
3. BAILES, J.E., COZZENS, J.W., HUDSON, A.R. Laser-assisted nerve repair in primates. **J Neurosurg**, New York, v.71, n.2, p.266-272, Aug.1989.
4. 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. 27.
5. 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.
6. BOEDTS, D. A comparative experimental study on nerve repair. **Arch Otorhinolaryngol**, Chicago, v.244, n.1, p.1-6, 1987.
7. BOWE, C.M. et al. Morphological and physiological properties of neurons after long-term axonal regeneration-observations on chronic and delayed sequelae of peripheral nerve injury. **J Neurol Sci**, Amsterdam, v.91, n.3, p.259-292, July 1989.

* 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".

8. BRUSHART, T.M. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. **J Neurosci**, New York, v.13, n.6, p.2730-2738, June 1993.
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 Suppl**, Philadelphia, v.1, p.3-25, 1983.
12. CALDER, J.S., GREEN, C.J. Nerve-muscle sandwich grafts: the importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. **J Hand Surg [Br]**, Edinburgh, v.20, n.4, p.423-428, Aug. 1995.
13. _____, 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.
14. CALIARI, M.V. **Princípios de morfometria digital – KS300 para principiantes**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997.
15. CARLSON, B.M. Regeneration of entire skeletal muscles. **Fed Proc**, Baltimore, v.45, n. 5, p.1456-1460, Apr. 1986.

16. CAUSEY, G. The functional importance of the blood supply of peripheral nerve. **Ann R Coll Surg**, London, v.16, p. 367-383, 1955. *Apud* GLASBY, M.A. *Op. cit.* Ref. 38.
17. CHAMBERLAIN, L.J. et al. Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: Myofibroblasts and the cellular response. **Biomaterials**, Oxford, v.19, n.15, p.1393-1403, Aug. 1998.
18. CRAGG, B.G., THOMAS, P.K. The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres. **J Physiol**, London, v.171, p.164-175, 1964.
19. DAVIES, A.H. et al. Peripheral nerve growth through differently orientated muscle matrices. **Neuro-Orthopedics**, New York, v.4, p.62-73, 1987.
20. DE MEDINACELI, L., MERLE, M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by "cell surgery". **J Hand Surg [Br]**, Edinburgh, v.16, n.5, p.495-498, Dec. 1991.
21. DEN DUNNEN, W.F.A. et al. Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide. **Microsurgery**, New York, v.14, n.8, p.508-515, 1993.
22. FARBER, J.L. Biology of disease: Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Lab Invest**, Baltimore, v.47, n.2, p.114-123, Aug. 1982.
23. 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.

24. FAWCETT, J.W., KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **J Neurosurg**, Baltimore, v.65, n.3, p.354-363, Sept. 1986.
25. FENELEY, M.R., FAWCETT, J.W., KEYNES, R.J. The role of Schwann cells in the regeneration of peripheral nerve axons through muscle basal lamina grafts. **Exp Neurol**, Orlando, v.114, n.3, p.275-285, Dec. 1991.
26. FIELDS, R.D., ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. **Exp Neurol**, Orlando, v.92, n.1, p.61-74, Apr. 1986.
27. _____. et al. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Prog Neurobiol**, Oxford, v.33, n.2, p.87-134, 1989.
28. FOIDART, J.M. et al. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. **Lab Invest**, Baltimore, v.42, n.3, p.336-342, Mar. 1980.
29. FRAHER, J., DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. **J Anat**, London, v.193, n.2, p.195-201, Aug. 1998.
30. _____. Axon-myelin relationships in rat cranial nerves III, IV and VI. A morphometric study of large and small fibre classes. **J Comp Neurol**, New York, v.286, n.3, p.384-390, Aug. 1989.

31. FRAHER, J.P. Myelin-axon relationships in the rat phrenic nerve. Longitudinal variation and lateral asymmetry. **J Comp Neurol**, New York, v.323, n.4, p.551-557, Sept. 1992.
32. FRANCEL, P.C. et al. Enhancing nerve regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. **J Neurosurg**, Baltimore, v.87, n.6, p.887-892, Dec. 1997.
33. FRIEDE R.L., SAMORAJSKI, T. Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. **J Comp Neurol**, New York, v.130, n.3, p.223-232, July 1967.
34. 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, 1988b.
35. _____. 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.
36. _____. et al. Peripheral nerve repair using muscle autografts (1) Recovery of transmission in primates. **J Bone Joint Surg**, Boston, v.70, n.4, p.524-529, Aug. 1988a.
37. GIANNINI, C., DYCK, P.J. The fate of Schwann cell basement membranes in permanently transected nerves. **J Neuropath Exp Neurol**, Lawrence, v.49, n.6, p.550-563, Nov. 1990.

38. GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: Developing a new method of nerve repair. **Clin Anat**, New York, v.3, p.161-182, 1990.
39. _____., HITCHCOCK, R.J.I., HUANG, C.L-H. Effect of muscle basement membrane on regeneration of rat sciatic nerve. **J Bone Joint Surg**, Boston, v.68, n.5, p.829-833, Nov. 1986a.
40. _____. et al. Comparison of nerve regeneration through nerve and muscle grafts in rat sciatic nerve. **Neuro-Orthopaedics**, New York, v.2, p.21-28, 1986b.
41. _____. et.al. Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. **J Hand Surg [Am]**, Saint Louis, v.11, n.3, p.347-351, Oct. 1986c.
42. _____. 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. 1986d.
43. _____. 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.
44. GLÜCK, T. Ueber neoplastik auf dem wege der transplantation. **Arch Klin Chir**, Berlin, v.26, p.606-616, 1880.
45. GSCHMEISSNER, S.E., GATTUSO, J.M., GLASBY, M.A. Morphology of nerve fibers regenerating through freeze-thawed autogenous skeletal muscle grafts in rats. **Clin Anat**, New York, v.3, p.107-119, 1990.

46. GUTMANN, E., SANDERS, F.K. Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. **J Physiol**, London, v.101, p.489-518, 1943.
47. HALL, S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. **J Anat**, London, v.190, n.1, p.57-71, Jan. 1997.
48. _____. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Oxford, v.12, n.1, p.27-46, Jan./Feb. 1986.
49. _____, ENVER, K. Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts: An immunohistochemical and electron microscopic study. **J Hand Surg [Br]**, Edinburgh, v.19, n.4, p.444-451, Aug. 1994.
50. HENTZ, V.R. et al. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. **J Hand Surg [Am]**, Saint Louis, v.16, n.2, p.251-261, Mar. 1991.
51. HILDEBRAND, C., HAHN, R. Relation between myelin sheath thickness and axon size in spinal cord white matter of some vertebrate species. **J Neurol Sci**, Amsterdam, v.38, n.3, p.421-434, Oct. 1978.
52. HURTADO, H., KNOOPS, B., VAN DER BOSCH DE AGUILAR, P. Rat sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. **Exp Neurol**, Orlando, v.97, n.3, p.751-757, Sept. 1987.
53. HUXLEY, A.F., STAMPFLI, R. Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibers. **J Physiol**, London, v.112, p.496, 1951.

54. IDE, C. Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle. **Neurosci Res**, Limerick, v.1, p.379-391, 1984.
55. _____, KATO, S. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci Res**, Limerick, v.13, Suppl., p.157-164, 1990.
56. _____, OSAWA, T., TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. **Prog Neurobiol**, Oxford, v.34, n.1, p.1-38, Apr. 1990.
57. _____ et al. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res**, Amsterdam, v.288, n.1/2, p.61-75, Jan./Feb. 1983.
58. KANWAR, Y.S., FARQUHAR, M.C. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. **Proc Nat Acad Sci**, Washington, v.76, n.3, p.1303-1307, Mar. 1979b.
59. 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.
60. KAUPPILA, T. et al. Use of paper for treatment of a peripheral nerve trauma in the rat. **Neuroreport**, Oxford, v.8, n.14, p.3151-3155, Sept. 1997.
61. 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.

62. 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**, Amsterdam, v.295, n.2, p.275-281, Mar. 1984.
63. KORFF, M. et al. An investigation of the potential for laser nerve welding. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Saint Louis, v.106, n.4, p.345-350, Apr. 1992.
64. 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.
65. 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**, London, v.17, n.2, p.161-172, Apr. 1988.
66. LENIHAN, D.V., CARTER, A.J., GLASBY, M.A. An electrophysiological and morphological comparison of the microwave muscle graft and the freeze-thawed muscle graft. **Br J Plast Surg**, Edinburgh, v.51, n.4, p.300-306, June 1998a.
67. _____ et al. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. **J Hand Surg [Br]**, Edinburgh, v.23, n.5, p.588-593, Oct.1998b.
68. LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. **Acta Orthop Scand**, Oslo, v.58, n.2, p.145-169, Apr. 1987.

69. LUNDBORG, G. et al. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. **J Neuropathol Exp Neurol**, Lawrence, v.41, n.4, p.412-422, July 1982.
70. _____. et al. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. **Exp Neurol**, Orlando, v.76, n.2, p.361-375, May 1982.
71. 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.
72. _____, _____, HUNTER, D.A. Histological assessment of the effects of the distal nerve in determining regeneration across a nerve graft. **Microsurgery**, New York, v.9, p.46-51, 1988.
73. MADISON, R.D., 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.
74. _____. et al. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and laminin containing gel. **Expl Neurol**, Orlando, v.88, n.3, p.767-772, June 1985.
75. _____. et al. Nontoxic nerve guide tubes support neovascular growth in transected rat optic nerve. **Expl Neurol**, Orlando, v.86, n.3, p.448-461, Dec. 1984.

76. MARQUES, M.J. **Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares.** São Paulo, 1992, 139p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
77. MATTAR JUNIOR, 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.
78. MAURO, A. **Muscle regeneration.** New York: Raven Press, 1979.
79. MERLE, M. et al. Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. **Microsurgery**, New York, v.10, p.130-133, 1988.
80. MILLESI, H. Nerve grafting. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v.11, n.1, p.105-112, Jan. 1984.
81. 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, v.124, n.1, p.103-130, 1972.
82. NISHIHIRA, S., MCCAFFREY, T.V. Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Saint Louis, v.100, n.1, p.17-21, Jan. 1989.
83. NONAKA, I. et al. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). **Acta Neuropathol**, Berlin, v.60, n.3/4, p.167-174, 1983.

84. NORRIS, R.W. et al. Peripheral nerve repair, a new technique using muscle autografts. **J Bone Joint Surg**, Boston, v.70, n.4, p.530-533, Aug. 1988.
85. 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**, Berlin, v.47, n.2, p.139-143, July 1979.
86. OLIVEIRA, A.L.R. **Estudo morfológico e morfométrico do nervo isquiático de ratos antes e após transecção total**. Botucatu, 1993, 82p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.
87. OLSSON, Y., KRISTENSSON, K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. **Acta Neuropathol**, Berlin, v.23, n.2, p.105-111, Jan. 1973.
88. PEREIRA, J.H. et al. Denatured muscle grafts for nerve repair: An experimental model of nerve damage in leprosy. **J Bone Joint Surg**, Boston, v.72, n.5, p.874-880, Sept. 1990.
89. PETERS, A., PALAY, S.L., WEBSTER, H.F. In: **The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells**. Phyladelphia: Saunders, 1976. 406p.
90. PLEASURE, D. Axoplasmic transport. In: SUMMER, A. ed. **The Physiology of peripheral nerve disease**. Phyladelphia: Saunders, 1980. p.221-237.

91. 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.
92. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at light pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**, New York, v.17, p.208-212, 1963.
93. 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.
94. 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.
95. _____, PHAM, H.N., HENTZ, V.R. Fascicular tubulization: a comparison of experimental nerve repair techniques in the cat. **Ann Plast Surg**, Boston, v.22, n.6, p.467-478, June 1989.
96. 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.
97. _____ 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.

98. SANDERS, F.K., YOUNG, J.Z. The influence of peripheral connexion on the diameter of regenerating nerve fibers. **J Exp Biol**, London, v.22, p.203-212, 1946.
99. 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, July 1978.
100. SANTO NETO, H. et al. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. **Br J Plast Surg**, Edinburgh, v.51, n.7, p.555-560, Oct. 1998.
101. SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic Nerve. **Anat Rec**, Philadelphia, v.215, n.1, p.71-81, May 1986.
102. SCHRÖDER, J.M. Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. **Brain Res**, Amsterdam, v.45, n.1, p.49-65, Oct. 1972.
103. SECKEL, B.R. et al. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.74, n.2, p.173-180, Aug. 1984.
104. SEDDON, H.J., MEDAWAR, P.B. Fibrin suture of human nerves. **Lancet**, London, v.2, p.87, 1942.
105. SHANTHAVEERAPPA, T.R., BOURNE, G.H. The perineurial epithelium: a metabolically active continuous protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. **J Anat**, London, v.96, p.527, 1962.

106. SHANTHAVEERAPPA, T.R., BOURNE, G.H. The perineurial epithelium: nature and significance. **Nature**, London, v.199, p.577, 1963.
107. _____, _____. 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.
108. 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, n.6, p.691-694, 1989.
109. _____. et al. Laminin gel stimulates axonal regeneration in vivo. **Soc Neurosci Abstr**, v.10, p.85-91, 1984.
110. 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.
111. SOMAZZ, M.C. **Reparo da lesão de nervo isquiático através de autotransplante de músculo esquelético em ratos: retalho obtido com injeções intramusculares de anestésicos locais**. Campinas, 1994, 90p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
112. 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**, Lawrence, v.52, n.3, p.216-222, May 1993.

113. SPECTOR, J.G. et al. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. **Laryngoscope**, Saint Louis, v.101, p.1109-1123, Oct. 1991.
114. STENSAAS, L. et al. Snug tubular enclosures reduce extrafascicular axonal escape at peripheral nerve repair sites. **Expl Neurol**, Orlando, v.103, n.2, p.135-145, Feb. 1989.
115. SUNDERLAND, S. In: **Nerves and nerve injuries**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1978.
116. TARLOV, I.M. Autologous plasma clot suture of nerves: Its use in clinical surgery. **JAMA**, Chicago, v.126, p.741, 1944.
117. _____. In: **Plasma clot suture of peripheral nerves and nerve roots**. Springfield Field: Charles C. Thomas, 1950.
118. TERENCEHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J Anat**, London, v.194, n.1, p.1-14, Jan. 1999.
119. TERRIS, D.J., FEE, JUNIOR, W.E. Current issues in nerve repair. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Saint Louis, v.119, n.7, p.725-731, July 1993.
120. TIMPL, R. et al. Laminin-A glycoprotein from basement membrane. **J Biol Chem**, Baltimore, v.254, n.19, p.9933-9937, Oct. 1979.
121. TODD, R.B., BOWMAN, W. In: **The Physiological Anatomy and Physiology of Man**. Philadelphia: Blanchard and Lea, 1957. p.129, 523-660.

122. 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.
123. _____, IDE, C. The localization of laminin and fibronectin on Schwann cell basal lamina. **Arch Histol Jpn**, Niigata, v.47, n.5, p.519-532, Nov. 1984.
124. VON LANGENBECK. Verhandl. d. deutsch. Gesselch f. Chir. (Funfter Congress). p.111-112, 1876. *Apud* FIELDS, R.D., ELLISMAN, M.H., *Op. cit.* Ref. 26.
125. WALLIS, I., KOENIG, E., ROSE, S. The preparation of a sarcolemmal fraction from evacuated muscle slices. **Biochim biophys Acta**, Amsterdam, v.599, n.2, p.505-517, July 1980.
126. 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.
127. 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.
128. WATTIG, B. et al. Enhancement of nerve fibre regeneration by nucleotides after peripheral nerve crush damage. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v.42, n.9, p.1075-1078, Sept. 1992.

129. WEISS, P. Nerve reunion with sleeves of frozen-dried artery in rabbits, cats and monkeys. **Proc Soc Exp Biol Med**, Cambridge, v.54, p.274-277, 1943.
130. WHITWORTH, I.H. et al. Different muscle graft denaturing methods and their use for nerve repair. **Br J Plast Surg**, Edinburgh, v.48, n.7, p.492-499, Oct. 1995.
131. WILLIAMS, L.R. et al. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. **J Comp Neurol**, New York, v.218, n.4, p.460-470, Aug. 1983.
132. WILLIAMS, P.L., WENDELL-SMITH, C.P. Some additional parametric variations between peripheral nerve fibre populations. **J Anat**, London, v.109, n.3, p.505-526, Sept. 1971.
133. 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.
134. 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, June 1971.
135. YOKOTA, R., TOHYAMA, K., IDE, C. Distribution of anionic sites on the basal lamina of Schwann cells. **Neurosci Lett**, Limerick, v.41, n.1/2, p.49-54, Oct. 1983.
136. YOUNG, J.Z., MEDAWAR, P.B. Fibrin suture of peripheral nerves. **Lancet**, London, v.2, p.126-128, 1940.