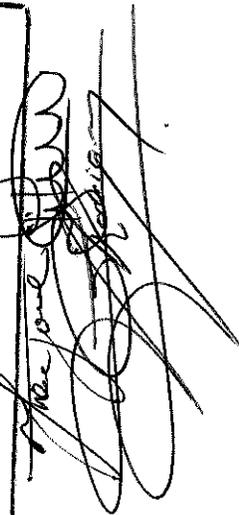




CAPACIDADE REGENERATIVA AXONAL EM DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS ISOGENICOS

ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e aprovada pela Comissão Julgadora. 23/2/96



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Campinas
Estado de São Paulo
1996



960415/60

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	OL4c
V.	Ex.
TOMBO BC	27029
PROC.	66796
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	7/03/96
N.º CPD	M.00085354-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

OL4c

Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de
"Capacidade regenerativa axonal em diferentes linhagens de camundongos isogênicos" / Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Francesco Langone.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sistema nervoso. 2. Sistema nervoso - Regeneração. 3. Nervo ciático. 4. Nervo ciático - Transplante. 5. Camundongo. I. Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**CAPACIDADE REGENERATIVA AXONAL EM
DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS
ISOGENICOS**

ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP, como parte dos pré-requisitos
para a obtenção do título de mestre em
Biologia Celular

Campinas
Estado de São Paulo

1996

Local e Data: Campinas, 23/02/1996

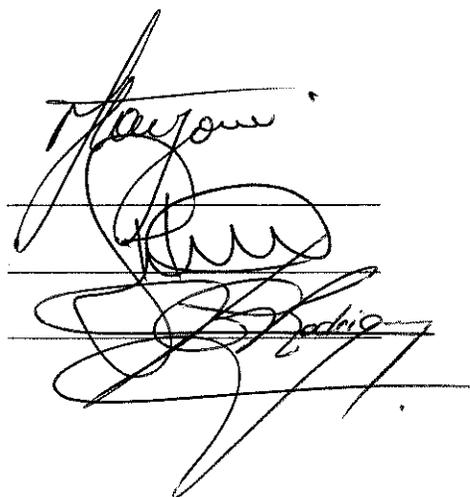
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE (Orientador)

Prof. Dr. HUMBERTO SANTO NETO

Prof. Dr. ANTONIO DE CASTRO RODRIGUES

Three handwritten signatures in black ink are written over three horizontal lines. The top signature is 'Langone', the middle one is 'Humberto Santo Neto', and the bottom one is 'Antonio de Castro Rodrigues'.

SUPLENTE

Profa. Dra. LAURECIR GOMES

APROVADA

Aos meus pais Elisabeth e Januário,
principais responsáveis pelos
objetivos já alcançados, com muito
amor, dedico.

Aos meus avós queridos, que sempre me incentivaram a seguir a carreira universitária, dedico com grande satisfação e carinho

A Célia, minha companheira e grande
amor, dedico com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francesco Langone, orientador e grande amigo, pela orientação rigorosa e consciente, além do constante incentivo à pesquisa e à vida universitária.

A Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela amizade e inestimável auxílio em diversos momentos durante todo o curso de pós-graduação, bem como pela importante participação na pré-banca deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Júlia Marques pela criteriosa análise desta tese, auxiliando grandemente para obtenção de sua forma final.

Ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz pela destacada participação na pré-banca deste trabalho, contribuindo de forma marcante para o seu aprimoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado, tornando possível a realização deste trabalho.

A Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa - FAEP, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Anatomia pela calorosa acolhida e pelo incentivo constante.

Aos técnicos e amigos, Marco e Nori, pelo grande auxílio nos serviços de rotina para microscopia eletrônica bem como processamento do material fotográfico utilizado na morfometria e documentação deste estudo.

Aos colegas e professores do Departamento de Biologia Celular , pela amizade e incentivo ao ingresso na carreira universitária.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, principalmente às técnicas Adriane e Antônia, pela confecção de grande parte dos cortes ultrafinos utilizados neste estudo.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia Patológica, principalmente às técnicas Fátima, Cidinha e Geralda, pela utilização do microscópio eletrônico, possibilitando a obtenção do material necessário para a análise morfométrica e morfológica deste trabalho.

ABREVIATURAS

1. Sistema Nervoso Central	SNC
2. Sistema Nervoso Periférico	SNP
3. Célula de Schwann	CS
4. Proteína Básica de Mielina	MBP
5. Glicoproteína Associada à Mielina	MAG
6. Complexo Principal de Histocompatibilidade	MHC
7. Células Apresentadoras de Antígenos	APC
8. Nerve Growth Factor	NGF
9. Brain-Derived Neurotrophic Factor	BDNF
10. Neurotrophin-3	NT-3
11. Neurotrophin-4	NT-4
12. Neurotrophin-5	NT-5
13. Ciliary Neurotrophic Factor	CNTF
14. Número de Axônios Mielínicos nos Nervos Normais	nAN
15. Número de Axônios Mielínicos nos Nervos Regenerados	nAR
16. Coeficiente de Regeneração	CR
17. Diâmetro das Fibras Mielínicas	DFM
18. Diâmetro dos Axônios Mielínicos	DAM
19. Espessura da Bainha de Mielina	EBM
20. Razão “g”	RZG

ÍNDICE

Resumo

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 Estrutura morfofuncional dos nervos periféricos	3
1.2.1 Bainhas conjuntivas	3
1.2.2 O axônio, a célula de Schwann e a bainha de mielina	4
1.3 Lesão nervosa periférica	7
1.3.1 Classificação	7
1.3.2 Alterações proximais	8
1.3.3 Alterações distais	8
1.4 Imunobiologia do transplante de nervos	12
1.5 Regeneração nervosa periférica	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Animais e grupos experimentais	22
2.2 Procedimento Cirúrgico	23
2.2.1 Para a pré-degeneração do enxerto	23
2.2.2 Para o transplante do enxerto	24
2.2.2.1 Preparação do enxerto	24
2.2.2.2 Transplante do enxerto	24
2.2.3 Procedimento cirúrgico para a tubulização	25
2.3 Sacrifício e processamento para microscopia eletrônica	26
2.4 Análise qualitativa e quantitativa dos resultados	27
2.5 Tratamento Estatístico	29

4. DISCUSSÃO	64
5. CONCLUSÕES	81
6.FIGURAS E TABELAS	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

Abstract

RESUMO

Atualmente é consenso que a regeneração do Sistema Nervoso Periférico pode ser determinada pelas propriedades regenerativas intrínsecas dos neurônios e/ou pelas características do microambiente do nervo, após uma lesão (Fawcett, 1992). Recentemente, Lu et al. (1990,1994), estudando as características regenerativas de várias linhagens isogênicas, observaram que a linhagem C57BL/6J apresenta uma baixa capacidade regenerativa axonal após a lesão de um nervo periférico. Não há, porém, dados conclusivos sobre os motivos intrínsecos que promovem esta resposta. Este estudo teve como objetivo principal, dar subsídios para um melhor entendimento da baixa capacidade regenerativa axonal apresentada pelos camundongos da linhagem C57BL/6J. Para isso, foram realizados quatro tipos de transplantes de segmentos de nervos pré-degenerados, utilizando-se camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6J (C), BALB/cJ (B) e A/J (A), bem como seus descendentes F1 advindos do cruzamento CxA e CxB. 1) isotransplantes utilizando os camundongos isogênicos das linhagens C (n=3), B (n=3) e A (n=3); 2) entre doadores da linhagem C (n=6) e receptores F1 CxB (n=3) e F1 CxA (n=3); 3) entre doadores da linhagem B (n=3) e receptores F1 CxB (n=3) e 4) entre doadores da linhagem A (n=6) e receptores F1 CxA (n=3). Após anestesia com pentobarbital (50mg/Kg), todos os doadores de cada linhagem (C, n=6; B, n=3; A, n=3) tiveram seu nervo ciático esquerdo transecionado ao nível do terço médio da coxa, sendo o coto proximal implantado na musculatura adjacente com vistas a evitar-se qualquer processo regenerativo. Duas semanas após a transecção, os doadores foram reoperados, sendo o coto distal dissecado e um segmento de aproximadamente 7mm retirado para o subseqüente transplante. Paralelamente, os receptores tiveram seu nervo ciático transecionado ao nível do terço médio da coxa, sendo implantado em seu coto proximal, com auxílio de um tubo de polietileno (TP) de 3mm de comprimento (d.i.=0,76mm), o enxerto do animal doador. Quatro semanas após o transplante, os animais foram perfundidos transcardiacamente com solução fixadora (Karnovsky, paraformaldeído 2%, Glutaraldeído 1%) e os nervos regenerados foram dissecados, seguindo a rotina para inclusão em resina (Araldite). Foram obtidos cortes transversais do nervo presente na região distal do TP sendo contado o número total de axônios mielínicos regenerados (NAM). Cortes transversais ultra-finos da mesma região foram obtidos, sendo quatro campos de cada espécime fotografados ao microscópio eletrônico (X2000). Os negativos foram ampliados (X3), medindo-se então, com auxílio de uma mesa digitalizadora e "software" (SigmaScan Measurement[®]), o diâmetro dos axônios mielínicos (DA) e a espessura da bainha de mielina (EBM). Os resultados mostraram não haver diferenças significativas entre os parâmetros, nos grupos de isoenxerto: NAM (C=3136±287; B=2759±170; A=2835±239); DA e EBM. Curiosamente, os resultados dos alotransplantes mostraram uma maior resposta regenerativa axonal nos grupos onde os doadores eram C57BL/6J (C para F1 CxB=4658±304; C para F1 CxA=3899±198), quando comparada àquela apresentada pelo grupo onde os doadores eram B e os receptores F1 CxB (2595±300) [p<0,05]. Foram porém estatisticamente iguais aos obtidos quando os doadores eram A e os receptores F1 CxA (3933±565). Por outro lado, os valores da EBM não variaram entre os grupos tanto de iso quanto de aloenxertos. Porém, o DA mostrou-se estatisticamente superior nos grupos de aloenxerto onde os doadores eram C57BL/6J. A partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que provavelmente o ambiente extracelular, incluindo as células não neurais, não são os maiores responsáveis pela baixa capacidade regenerativa axonal apresentada pelos animais C57BL/6J. Tal deficiência portanto, pode ser fruto de uma incapacidade dos axônios em regeneração de reconhecerem os estímulos presentes no meio extracelular. Tal incapacidade pode estar relacionada a problemas na síntese e/ou expressão de fatores de alta afinidade para neurotrofinas, tais como trkA para NGF, após uma lesão.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado que tanto os neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC) como os do Sistema Nervoso Periférico (SNP), sobreviventes a uma determinada lesão, são potencialmente capazes de formar novos neuritos e restabelecer sinapses com outros neurônios ou órgãos alvo (Aguayo et al. 1983; Fawcett & Keynes 1990). Entretanto persiste o desafio de desvendar quais fatores determinam e/ou limitam tal potencialidade.

A regeneração no Sistema Nervoso Periférico se faz através de uma sucessão de eventos que envolvem a regeneração dos axônios e a reorganização do restante do tecido do nervo. Após uma axotomia desenvolve-se, distalmente à lesão, um processo conhecido como "degeneração Walleriana", caracterizada pela invasão de macrófagos e pela multiplicação das células de Schwann (CS) (Madison & Archibald, 1994; Son & Thompson, 1995). Os macrófagos irão fagocitar os resíduos de mielina e dos axônios em degeneração. As CS por sua vez, também desenvolvem atividade fagocitária, multiplicam-se e passam a se organizar no interior de tubos de membrana basal, formando as chamadas "bandas de Büngner" (Guth, 1956). A seguir, os axônios em regeneração invadem essas estruturas, justapondo-se entre a membrana plasmática das CS e a respectiva membrana basal. À medida que se restabelece a interação entre os axônios e as CS, estas últimas passam a formar a bainha de mielina ao redor dos axônios. Concomitantemente, a reorganização do epineuro, perineuro, e vasos sanguíneos tendem a restabelecer a homeostase do nervo.

Todos estes eventos morfológicos observados durante o processo regenerativo do nervo são mediados por diversas moléculas que funcionam como sinalizadoras, ativadoras e mantenedoras do crescimento axonal e da constância do microambiente de regeneração (Fawcett & Keynes, 1990).

1.2 Estrutura morfofuncional dos nervos periféricos

1.2.1 Bainhas conjuntivas

Os nervos periféricos são formados por axônios associados a CS, envoltos por três bainhas distintas de tecido conjuntivo. A camada mais externa, a qual envolve os fascículos nervosos, é denominada epineuro. Ela é composta por fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras colágenas tipo I dispostas paralelamente em relação aos axônios.

No epineuro, os fibroblastos organizam-se em camadas concêntricas, separadas pelas fibras colágenas, dispostas longitudinalmente, promovendo um reforço estrutural. Além disso, as células epineurais possuem um perfil fusiforme, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e não apresentam lâmina basal (Peters et al., 1976). Os vasos sanguíneos que nutrem os nervos periféricos penetram o epineuro e emitem vários ramos. Aqueles de menor calibre prosseguem seu curso, entrando numa segunda bainha de tecido conjuntivo, o perineuro.

O perineuro apresenta uma organização semelhante ao epineuro, porém, as células perineurais possuem características morfofuncionais peculiares. Apresentam um perfil fusiforme e também dispõem-se em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas, porém são envoltas por uma lâmina basal. Entre as sucessivas camadas celulares são encontradas fibras de colágeno tipo I e tipo III (Peters et al., 1976; Montes et al., 1984). Além disso, as células presentes nas camadas mais profundas do perineuro exibem citoplasma levemente granuloso, algumas mitocôndrias e grupos de vesículas de diferentes tamanhos, justapostas (Carpenter, 1988).

Vários autores, ao estudarem as características morfofuncionais do perineuro, concluíram que esta bainha conjuntiva é extremamente importante na manutenção da homeostase do nervo (Oldfors & Johanson, 1979). Particularmente, Oldfors & Johansson (1979), ao estudarem as propriedades ligadas à permeabilidade do perineuro, em nervos

ciáticos de ratos, observaram que este atua como uma barreira seletiva ao trânsito de substâncias do e para o endoneuro. Verificaram que estas macromoléculas só conseguem difundir-se através do perineuro com muita lentidão e que a passagem de certas substâncias é feita com gasto de energia e através de pinocitose. Tais fatos devem-se em particular à presença de "tight junctions" entre as células perineurais, o que dificulta a passagem de substâncias de alto peso molecular.

O terceiro elemento conjuntivo é denominado endoneuro, o qual constitui-se num tecido que apresenta íntimo contato com as fibras nervosas presentes no fascículo. O endoneuro é composto por delicadas fibras de colágeno do tipo III (Montes et al., 1984), geralmente dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa, cercadas por uma substância amorfa e homogênea. Encontram-se poucos fibroblastos, destituídos de membrana basal, dispersos ao acaso e, eventualmente, mastócitos e macrófagos residentes (Junqueira et al., 1979; Carpenter, 1988; Monaco et al., 1992).

Igualmente aos capilares perineurais, aqueles do endoneuro apresentam células unidas por "tight junctions". Devido a estas características, acredita-se na existência de uma barreira hemato-nervosa, a qual seria responsável por um controle seletivo da entrada e saída de substâncias no microambiente do nervo, contribuindo pois, para a homeostase deste.

1.2.2 O axônio, a célula de Schwann e a bainha de mielina

O axônio é uma extensão longa e delgada do corpo celular do neurônio capaz de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. Origina-se de uma região especializada do protoplasma denominada cone de implantação. Desde a sua porção inicial, caracteriza-se por conter neurofilamentos e microtúbulos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, vesículas, e por não possuir retículo endoplasmático rugoso (Carpenter, 1988). Ao atingir o órgão efetor, o axônio torna-se uma estrutura

arborescente, denominada terminação axonal ou telodendro. Nesta terminação ocorre o contato entre a célula nervosa e o tecido alvo, através das sinapses.

No nervo, os axônios podem ser mielínicos ou amielínicos, dependendo de suas relações com as CS. Num axônio mielínico, que em geral possui um diâmetro maior que 1,0 micrômetro, as CS, dispostas seqüencialmente, formam ao seu redor uma estrutura tubular denominada bainha de mielina. As CS vizinhas estão separadas umas das outras por intervalos destituídos de mielina e parcialmente cobertos por digitações laterais do seu citoplasma. Estes espaços são denominados nodos de Ranvier (Landon & Hall, 1976; Peters et al., 1976).

Os axônios amielínicos apresentam um tipo especial de relação com as CS. Neste caso, uma CS, através de projeções citoplasmáticas, envolve total ou parcialmente entre 5 e 25 axônios, não havendo a formação da bainha de mielina. Como resultado, estes axônios encontram-se individualmente alocados no interior de sulcos ou canais formados pelas expansões do citoplasma das CS (Peters et al., 1976).

As relações entre os axônios e as CS são estabelecidas muito precocemente. Isto ocorre no processo de formação do próprio SNP, quando os neurônios jovens, derivados da camada ventricular do tubo neural, emitem seus axônios em direção aos respectivos órgãos efetores (Le Douarin, 1982). As CS, derivadas da crista neural migram concomitantemente aos axônios e a eles se associam. Enquanto estão em processo migratório, não possuem lâmina basal, apresentando um aspecto ovóide. Somente após sua associação com um ou mais axônios, elas passam a apresentar aspecto fusiforme e lâmina basal (Webster & Favilla, 1984).

Caso essa associação leve à formação de bainha de mielina, inicialmente ocorre o posicionamento do axônio num sulco formado por uma projeção do citoplasma da CS. Com a fusão das bordas do sulco forma-se um mesaxônio, que alonga-se e cresce em espiral, ao redor do axônio. O número de voltas determina a espessura da bainha de

mielina, sendo esta proporcional ao calibre do axônio em questão. Além disso, em secções longitudinais de axônios, observa-se determinadas estruturas em forma de cunha, denominadas incisuras de Schmidt-Lantermann. Estas representam pequenas porções de citoplasma das CS aprisionadas durante a formação da bainha de mielina.

Sabe-se que, no SNP, a indução da produção da bainha de mielina é dependente do contato axônio/CS (Aguayo et al.1977; Bray et al., 1987). Lemke & Chao (1983) e mais recentemente Gupta et al. (1993), investigando os eventos envolvidos nesta indução, concluíram que o cAMP atua como um mensageiro intermediário entre o axônio e a CS, promovendo assim a ativação dos genes responsáveis pela síntese de proteínas componentes da bainha de mielina, particularmente P0 e MBP (proteína básica de mielina).

Concomitantemente aos processos já descritos, ocorre o desenvolvimento de uma membrana basal, produzida pelas CS, que reveste externamente tanto os conjuntos amielínicos quanto os axônios mielínicos. Esta é contínua, não sendo interrompida nem mesmo nos nodos de Ranvier. A membrana basal é uma matriz extracelular muito complexa, composta por colágenos (tipos IV e V), glicoproteínas e proteoglicanos. Pode ser dividida em três camadas distintas: a primeira é a lâmina lúcida, que constitui-se numa região mais clara quando observada ao microscópio eletrônico, possuindo de 20 a 40 nanômetros de espessura. A segunda é a lâmina densa (ou basal), localizada numa posição intermediária (entre a lâmina lúcida e a lâmina reticular). Possui uma espessura de 20 a 100 nanômetros, é elétron-densa e contém uma complexa malha de filamentos. A terceira é a lâmina reticular (ou lúcida interna), que igualmente à lâmina lúcida, apresenta-se brilhante ao microscópio eletrônico. Sua espessura é variável, localizando-se entre a lâmina densa e o endoneuro (Martin & Webster,1973).

A membrana basal também constitui uma importante barreira seletiva na troca de substâncias entre as fibras nervosas e o seu meio externo (Oldfors & Johanson , 1979).

Além disso, durante o processo regenerativo axonal, serve de orientação para os axônios em crescimento (Gorio, 1984).

1.3 A lesão nervosa periférica

1.3.1 Classificação

Seddon (1943), classificou a lesão nervosa periférica segundo três graus: O primeiro tipo de lesão é aquela onde há um bloqueio localizado da condução do impulso nervoso causada pela compressão do nervo, sendo denominada **Neuropraxia**. O segundo tipo de lesão é aquele em que ocorre uma interrupção acentuada da condução nervosa, provocada pelo esmagamento do nervo, sendo denominada **Axotomia**. O terceiro tipo de lesão, a chamada **Neurotomia**, é a mais severa, consistindo na transecção total do nervo, o que leva à interrupção da transmissão de impulsos elétricos em todos os axônios.

Na neuropraxia a probabilidade de retomada total da funcionalidade é alta. Isto porque, em geral, os axônios não são essencialmente atingidos, não ocorrendo assim sua degeneração. Na axotomia, a possibilidade de regeneração também é relativamente grande, porém o tempo para que isto ocorra é maior, já que nesta lesão há transecção de axônios e conseqüentemente desenvolvimento da degeneração Walleriana. Neste caso, logo após a lesão, a região atingida caracteriza-se por apresentar vários aglomerados densos de fibras de colágeno, pouco material protoplasmático e membranas basais (Haftek & Thomas, 1968). Sabe-se que a preservação tanto das membranas basais quanto do perineuro, após a lesão, é fundamental para a regeneração axonal, pois estes servem de guia para os neuritos em crescimento (Ide, 1983). Finalmente, após uma neurotomia, a probabilidade de regeneração, sem a utilização de algum tipo de tratamento cirúrgico, é muito pequena. Isto deve-se à severidade da lesão decorrente da total desconexão entre o coto proximal e o coto distal, o que provoca o rompimento da continuidade da membrana basal (essencial para uma plena regeneração nervosa), dos vasos sanguíneos e demais elementos estruturais do nervo.

1.3.2 Alterações proximais

Após uma lesão do nervo, o corpo celular dos neurônios comprometidos apresenta uma série de modificações morfofuncionais, caracterizadas pela cromatólise. Esta corresponde à desintegração da substância de Nissl, causada pela dispersão dos ribossomos pelo citoplasma e retículo endoplasmático rugoso e ao aumento da basofilia (Torvik, 1976). Além disso, há um aumento do volume do núcleo e nucléolo, acompanhado pela migração do primeiro para a periferia celular. Embora o significado funcional destas alterações sejam ainda pouco compreendidas, estas têm sido atribuídas a eventos fisiológicos celulares ligados à síntese protéica e ao transporte axoplasmático, cujo resultado final pode levar à regeneração ou à morte neuronal (Fawcett & Keynes, 1990).

A região do nervo adjacente à transecção, inicialmente fica intumescida devido ao trauma. Na extremidade do coto proximal os axônios transeccionados apresentam um vazamento de material axoplasmático imediatamente após a lesão. Este, por sua vez, cessa após alguns minutos com a reorganização da membrana plasmática dos axônios. Alterações degenerativas retrógradas podem atingir os axônios, ficando este fenômeno, em geral, restrito apenas à porção mais próxima à lesão (Waller, 1850). Numa segunda etapa, cada axônio poderá iniciar seu processo de regeneração, emitindo dezenas de ramificações que tenderão a invadir o coto distal (Cajal, 1959).

1.3.3 Alterações distais

No coto distal, os axônios transeccionados, desconectados de seu centro trófico, entram em processo autolítico. Estudos ultra-estruturais do nervo ciático demonstraram que a primeira alteração degenerativa é um acúmulo de mitocôndrias no axoplasma dos nodos de Ranvier. Tal fato foi observado por Donat & Wisniewski (1973), estudando a degeneração Walleriana em nervos ciáticos de coelhos e gatos. Após transecção, os nodos

de Ranvier apresentavam agregados granulares, vindo da região paranodal e do axoplasma internodal adjacente, correspondendo a mitocôndrias e corpos densos (Carpenter, 1988).

Em seguida, ocorre retração da bainha de mielina, segmentação do axoplasma e rompimento das mitocôndrias. Aproximadamente doze horas após a lesão, o axônio está inchado e deformado, apresentando um aumento das incisuras de Schmidt-Lanterman, afrouxamento das lamelas de mielina e retração das bainhas de mielina em direção aos nodos de Ranvier. Dentro de três a sete dias a bainha de mielina e os axônios estarão totalmente fragmentados em segmentos elipsóides (Carpenter, 1988).

Ainda não foram encontradas evidências conclusivas sobre o padrão da degeneração Walleriana, isto é, se ela progride de maneira centrífuga ou centrípeta à lesão (Cajal, 1959; Donat & Wisnieski, 1973; Sunderland, 1978, Lunn et al., 1990). Contudo, Donat & Wisnieski (1973) propuseram que a degeneração Walleriana não pode ser vista como um processo uniforme, possuindo direção definida. De acordo com esses autores, tal processo é irregular, não apresentando pois, um padrão rigoroso de propagação.

Uma importante característica da degeneração Walleriana, é a mudança de comportamento das CS. Seu citoplasma hipertrofia, novas organelas são produzidas e os movimentos citoplasmáticos aumentam. Estudos ultraestruturais dessas CS ativadas por algum tipo de lesão, revelaram que a camada adaxonal hipertrofiada da CS invade o axônio contribuindo efetivamente para sua degradação (Lubinska, 1982). De acordo com Singer & Steinberg (1972), estas potencialidades citolíticas são reprimidas, em fibras intactas, por um fator trófico sintetizado no pericário neuronal, de onde é distribuído por todo o comprimento do axônio. Enquanto liberado pelo axônio, mantém quiescentes as CS, garantindo assim a morfologia normal do nervo.

Lubinska (1977) concluiu que os efeitos degenerativos de uma neurotomia dependem da altura onde esta foi realizada. Isto significa que uma lesão feita próxima à medula, refletiria numa degeneração mais lenta, uma vez que a quantidade de fator trófico

inibidor da motilidade das CS seria relativamente alto quando comparado com uma região distante dos corpos celulares. Já uma lesão próxima ao órgão efector promoveria uma reação degenerativa intensa em tempo muito menor.

Estudos mais recentes porém, têm enfatizado a importância das interações celulares entre axônios e CS como reguladores da manutenção deste equilíbrio, tanto no microambiente do nervo íntegro quanto naquele em regeneração. Sabe-se que o restabelecimento do contato axônio-CS em nervos previamente transeccionados, promove um acentuado aumento na síntese das proteínas Po e MBP, enquanto que nas CS ainda desconectadas de axônios, estes elementos mostram-se em níveis muito reduzidos (Lemke & Chao, 1988; Gupta et al., 1993)

Juntamente com as CS, e certamente de modo muito mais intenso, os macrófagos também participam do processo de autólise, fagocitando a bainha de mielina e os demais fragmentos resultantes da degeneração Walleriana. Inicialmente, o processo fagocítico é intenso mas, à medida que a remoção dos resíduos vai sendo completada, os macrófagos começam a retornar aos capilares sanguíneos (Stoll et al., 1989).

Vários estudos têm comprovado a importância dos macrófagos no desenvolvimento da degeneração Walleriana. Em um importante estudo experimental, Beuche & Friede (1984), observaram que segmentos de nervo colocados em recipientes de milipore, implantados intraperitonealmente, não desenvolviam normalmente a degeneração Walleriana, apresentando axônios e bainha de mielina praticamente intactos após vários dias. Tal processo degenerativo apenas transcorria normalmente se os poros dos recipientes de millipore fossem suficientemente grandes para permitir o influxo de macrófagos.

Os resultados obtidos por Beuche & Friede (1984), foram posteriormente confirmados por White et al., 1989 e mais recentemente por Dahlin (1995). Este, através de experimentos onde o influxo dessas células no microambiente nervoso lesionado foi

impedido, também ressaltou a importância dos macrófagos no processo de degeneração Walleriana e sua influência num subsequente processo regenerativo axonal. Para isso, segmentos de nervos ciáticos foram introduzidos em recipientes de milipore com $0,22\mu\text{m}$ de diâmetro de poros, sendo implantados subcutâneamente. Passados três dias ou duas semanas, estes segmentos foram recuperados e implantados no nervo ciático contra-lateral dos mesmos animais. Os resultados obtidos mostraram haver um menor crescimento axonal nesses nervos, comparativamente àqueles que receberam enxertos onde a degeneração Walleriana transcorreu normalmente.

Ao final da degeneração Walleriana, as CS se alongam e se justapõem através de seus processos citoplasmáticos, formando no interior dos tubos de membrana basal algo semelhante a uma corrente. Tais estruturas, no interior do coto distal, formam os denominados cordões de Büngner ou bandas neurilemais. Estudos subsequentes comprovaram que os axônios em regeneração crescem ao longo dessas bandas, sejam eles mielínicos ou amielínicos (Ide, 1983; Ide et al., 1983; Ide et al., 1990; Son & Thompson, 1995).

1.4 Imunobiologia do Transplante de Nervos

O estudo de transplantes experimentais de nervos periféricos têm sido de grande valia para um melhor entendimento dos fatores promotores e limitantes da regeneração do SNP, assim como do papel relativo dos componentes celulares neural e não neural neste processo (Glass et al., 1993; Evans et al., 1994).

Basicamente existem quatro tipos de transplantes de tecidos ou órgãos, classificados de acordo com a procedência do enxerto e do receptor: denomina-se **autoenxerto**, o procedimento onde o doador e o receptor são o mesmo indivíduo; **isoenxerto**, quando o doador e o receptor pertencem a linhagens isogênicas ou são irmãos univitelinos; **aloenxerto**, quando o doador e o receptor apenas pertencem a mesma espécie e **xenoenxerto**, quando o doador e o receptor são de espécies distintas (Roitt et al., 1993).

Sob o ponto de vista clínico e experimental, a maior barreira a ser superada no emprego dos alo e xenoenxertos é a resposta imunológica do receptor, a qual desencadeia uma série de reações que levam à rejeição e subsequente necrose do enxerto. Através de estudos baseados em alotransplantes de pele, ficou claro que o mecanismo pelo qual o tecido estranho é eliminado envolve uma reação ativa do sistema imunológico do receptor, exibindo tanto especificidade quanto memória (Medawar, 1944; Barker & Billingham, 1971). Subsequentemente à detecção do aloantígeno pelo sistema imunológico do receptor, o enxerto pode ser destruído por células inflamatórias ativadas, por oclusão vascular causada por infiltrados inflamatórios e/ou por fatores citolíticos secretados por células inflamatórias ativadas (Rosemberg & Singer, 1992). De fato, as bases imunológicas para o reconhecimento do aloantígeno foram melhor entendidas com a identificação dos genes responsáveis pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade, assim como da natureza de seus produtos (Takahata et al., 1993).

Na tentativa de minimizar tal processo, também presente nos transplantes de nervos do SNP, foram propostos diversos pré-tratamentos do enxerto, tais como, pré-denervação,

conservação do enxerto em meio de cultura, irradiação e congelamento-descongelamento (Evans et al., 1994).

A partir de estudos experimentais com linhagens de animais isogênicos, observou-se que a resposta imunológica associada ao reconhecimento de enxertos como próprios ou não-próprios, modificava-se de acordo com tipo de transplante realizado (Roitt et al., 1993). Assim puderam ser postuladas as seguintes leis fundamentais do transplante: 1) Quando células ou órgãos são transplantados entre indivíduos da mesma linhagem isogênica não há rejeição; 2) Quando células ou órgãos são transplantados entre indivíduos de linhagens isogênicas diferentes, sempre observava-se rejeição; 3) ao utilizar-se como receptores, animais F1, não há rejeição dos enxertos advindos das linhagens isogênicas parentais e 4) quando são utilizados como doadores animais F1, e receptores, animais parentais, os enxertos são sempre rejeitados.

Atualmente, entende-se que a rejeição de um enxerto é promovida principalmente por disparidades entre o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e/ou II e eventualmente também de alguns complexos de histocompatibilidade secundários do tecido doador comparado ao do receptor (Barcker & Billingham, 1971). Singh et al. (1977a, b, 1981) ao estudar a raça de cães beagle (não isogênicos), observou que diferenças no MHC levavam à rejeição de aloenxertos de nervos. Em ratos isogênicos apresentando apenas diferenças nos complexos de histocompatibilidade secundários, os axônios de neurônios sensitivos transplantados sobreviviam ou eram rejeitados muito tardiamente (Zalewski & Silvers, 1977). Por outro lado, aqueles transplantados entre animais com MHC distintos eram prontamente rejeitados (Zalewsky, 1971; Zalewski & Gulati, 1980).

O processo de resposta do sistema imunológico do receptor ao aloenxerto pode ser basicamente dividido em duas fases; inicialmente o aloreconhecimento, seguido de uma resposta efetora resultante, a qual geralmente leva à eliminação do enxerto. Acredita-se que os linfócitos T desempenhem um papel crucial no processo de rejeição de um enxerto,

o qual pode ocorrer de maneira direta ou indireta. A primeira refere-se ao reconhecimento do enxerto como não próprio pelas células T do receptor, via MHC. O reconhecimento indireto, recentemente proposto como uma importante via para o processo de rejeição, refere-se ao reconhecimento e processamento do peptídeo do MHC do doador, o qual passa a ser apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (APC) (Kahan, 1991). Dois subgrupos de células T, T helper ($CD4^+$) e T citotóxica ($CD8^+$), preferencialmente interagem com o antígeno associado ao MHC classe I ou II, respectivamente. Adicionalmente ao reconhecimento do alopeptídeo, a ativação das células T requer sinais auxiliares. A interação da célula T helper com a APC apropriada leva à sua ativação; uma vez ativada, passa a secretar uma série de citocinas (eg, IL-2) as quais irão estimular uma cascata molecular e celular promovendo um progressivo infiltrado de células imunocompetentes no enxerto (Bach & Sachs, 1987; Hayry et al., 1989).

Muitos dos primeiros trabalhos sobre transplantes de nervos presentes na literatura precederam os conhecimentos básicos da imunologia dos transplantes. Devido a esse fato, foram utilizados animais não isogênicos ou pertencentes a pequenas colônias com alto grau de cosanguinidade, o que comprometeu a correta interpretação dos resultados obtidos, uma vez que sucessos obtidos com aloenxertos poderiam ter sido resultado de histocompatibilidade devido ao alto grau de parentesco (Evans et al., 1994). A importância da escolha correta dos modelos experimentais, levando em conta o grau de parentesco e isogenicidade, ocorreu inicialmente em experimentos de transplantes de pele, sendo seguidos por órgãos sólidos e posteriormente empregados no sistema nervoso, em transplantes de nervos (Barker & Billingham, 1971; Pollard & McLeod, 1980; Glass et al, 1993).

1.5. Regeneração nervosa periférica

Os neurônios do Sistema Nervoso Periférico são células potencialmente capazes de iniciar a regeneração de seus axônios poucas horas após uma axotomia. Os primeiros brotamentos axonais do coto proximal advêm dos nodos de Ranvier mais próximos do local lesionado, através do espaço deixado por uma retração parcial das CS. Cada brotamento axonal emite a partir de sua extremidade, diversas projeções promovendo a formação de uma estrutura denominada pela primeira vez por Cajal, em 1890, como sendo "cone de crescimento" (Cajal, 1890 apud Fawcett & Keynes, 1990).

O "cone de crescimento" é dotado de motilidade e a ele tem sido atribuída a função de detecção dos sinais físicos e bioquímicos necessários à orientação e ao crescimento do axônio em direção ao alvo periférico (Lockerbie, 1987; Dodd & Jessel, 1988). A sua superfície é ainda capaz de sequestrar e internalizar substâncias do meio circundante que poderão ser transportadas retrogradamente (Bunge, 1977). Conforme já citado, é importante destacar que os axônios em regeneração crescem através dos tubos endoneurais, no espaço compreendido entre as CS e suas respectivas membranas basais (Nathaniel & Paese, 1963; Haftek & Thomas, 1968).

Para a ocorrência dos fenômenos acima descritos, além de outros pré-requisitos, há necessidade de um microambiente propício para receber e sustentar o processo regenerativo (Fawcett & Keynes, 1990). Neste microambiente do sistema nervoso periférico, através do qual os axônios são capazes de regenerar, estão presentes as CS e suas respectivas membranas basais, fibroblastos, fibras de colágeno e outros elementos da matriz extracelular. Além disso, no início do processo regenerativo estão presentes no microambiente restos de mielina, axônios em degeneração e células fagocíticas (Fawcett & Keynes, 1990). Os elementos celulares não neurais, principalmente as CS, são responsáveis pela produção de uma gama de moléculas denominadas fatores tróficos e fatores promotores de neuritos, tais como NGF, BDNF, NT-3, NT-4, etc. (Funakoshi et al, 1993).

Dos elementos acima citados, as CS são fundamentais, já que os fibroblastos, as células perineurais e as membranas basais isoladas, parecem incapazes de sustentar adequadamente a regeneração axonal. Tal fato foi comprovado por diversos autores, através de transplantes de segmentos de nervo tratados por congelamento, com vistas a eliminar os elementos celulares (Gulati, 1988; Hall, 1986; Ide et al., 1983). Estes estudos mostraram que, após o transplante, ocorria a regeneração dos axônios, porém apenas quando acompanhadas por CS provenientes do receptor. Particularmente, Hall (1986) mostrou que, caso esse processo migratório fosse impedido por tratamento com agentes citotóxicos, a regeneração axonal não ocorria.

Recentemente, Abernethy et al. (1994) e Madison & Archibald (1994), utilizando o modelo experimental da tubulização, comprovaram que as CS são capazes de responder a estímulos presentes no microambiente do nervo em degeneração, migrando em direção à região lesionada, participando efetivamente na preparação deste microambiente para um eventual processo regenerativo.

Um papel também muito importante das CS na regeneração nervosa periférica foi comprovado pela observação de que no nervo normal, os níveis de NGF (Nerve Growth Factor), seus receptores e respectivos RNA mensageiros apresentavam-se em pequenas quantidades, ao passo que aumentavam vigorosamente após processos lesivos que provocavam axotomia (Heumann et al., 1987; Raivich & Kreutzberg, 1987). Além disso, Taniuchi et al. (1988) demonstraram que a expressão do receptor de baixa afinidade para NGF pela CS parece ser controlada pelo contato axonal; após a lesão do nervo, o número desses receptores, nas CS, aumenta significativamente com a degeneração das fibras, reduzindo-se posteriormente quando o contato axonal é restabelecido.

Concomitantemente ao aumento da produção de NGF após uma axotomia, Funakoshi et al. (1993) observaram alterações substanciais nas quantidades de outros fatores neurotróficos no nervo, distalmente à lesão, bem como de seus receptores de alta afinidade nos axônios em regeneração. De fato, o estudo da produção e secreção de outras

moléculas neurotróficas pelas CS, que parecem ter uma atuação expressiva na regeneração axonal, tais como o BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (Neurotrophin 3) e CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), vem sendo um importante e ativo campo de pesquisa nos últimos anos (Beck, 1994).

Paralelamente a todas as alterações celulares desencadeadas por uma lesão a um nervo periférico, ocorre uma extensa produção e rearranjo de diversos componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina, ácido hialurônico e proteoglicanos. Particularmente a laminina constitui-se numa molécula comprovadamente importante nos eventos subsequentes a axotomia, estando presente na composição das membranas basais das bandas de Büngner e das CS (Salonen et al, 1987; Tona et al, 1993).

Atualmente é consenso que importantes fatores responsáveis pela regeneração dos axônios periféricos residem principalmente na matriz extracelular do nervo, nos macrófagos e nas CS (Varon 1985; Perry et al. 1987; Bunge et al. 1989; Sanes 1989; Fawcett & Keynes 1990). Para o estabelecimento deste consenso foram particularmente importantes os experimentos realizados no início da última década, mostrando que os neurônios do sistema nervoso central são capazes de regenerar seus axônios e estendê-los por distâncias relativamente longas no interior de nervos, embora não o sejam no interior do tecido nervoso central (Richardson et al. 1980; Weinberg & Reine 1980; Wendt et al. 1981; David & Aguayo, 1981; Benfey & Aguayo 1982).

Por outro lado, grande ênfase vem sendo dada também às propriedades regenerativas intrínsecas dos neurônios, as quais podem ser determinantes da potencialidade do crescimento axonal (Fawcett, 1992). Um exemplo marcante pode ser encontrado em anfíbios, onde os axônios do nervo e trato óptico são capazes de regenerar e organizar substancialmente a projeção retinotectal, enquanto outros axônios do sistema nervoso central apresentam um potencial apenas pouco superior àquele dos mamíferos.

Neste sentido, são descritas na literatura algumas linhagens de camundongos isogênicos que, em decorrência de determinadas mutações, apresentam deficiências neurológicas periféricas (Sidman et al. 1965). A linhagem de camundongos BALB/c Trembler, por exemplo, descrita por Ayers & Anderson (1973), apresenta uma neuropatia hipertrófica de caráter hereditário dominante. Low (1976 a,b) concluiu, a partir de estudos histopatológicos, que essa neuropatia nos camundongos Trembler era causada por um defeito primário das CS. Através de elegantes experimentos, Aguayo et al. (1977) e Pollard & McLeod (1980) comprovaram essa hipótese. Particularmente, Pollard & McLeod (1980) mostraram que no interior de segmentos de nervo ciático de camundongos BALB/c normais transplantados em camundongos BALB/c Trembler os axônios em regeneração recebiam uma bainha de mielina normal, entretanto, ao atingirem o coto distal estes voltavam a apresentar as características patológicas próprias da linhagem.

Uma outra linhagem de grande valia para o entendimento da biologia da degeneração e regeneração nervosa periférica, denominada C57BL6J/Wld^s (C57BL6J/Ola), foi descrita recentemente por Lun et al. (1989). Estes camundongos isogênicos apresentam após uma lesão axonal, seja no SNC ou no SNP, um desenvolvimento extremamente lento da degeneração Walleriana. Inicialmente, acreditou-se que tal característica pudesse ser resultado de uma deficiência no recrutamento de macrófagos no microambiente do nervo, retardando assim, o processo de degradação dos axônios e das bainhas de mielina.

Em estudo subsequente, Perry et al. (1990), através de experimentos utilizando o protocolo de transplante de medula óssea, obtiveram interessantes resultados. Foram realizados transplantes entre animais C57BL6J/Wld^s e C57BL/6J (degeneração Walleriana rápida), visando observar o comportamento do processo degenerativo axonal após transecção do nervo ciático. Observou-se que os camundongos C57BL6J/Wld^s que receberam células fagocíticas de C57BL/6J continuavam apresentando uma degeneração neuronal lenta, enquanto que os camundongos C57BL/6J que haviam recebido células de C57BL6J/Wld^s mantiveram uma degeneração Walleriana rápida após a lesão. Ainda

observou-se que os animais de ambas as linhagens apresentavam resposta semelhante após infecção intraperitoneal. A partir desses resultados, foi aventada a hipótese que a degeneração nervosa lenta apresentada pelos camundongos da linhagem C57BL6J/Wld^s seria resultante de propriedades intrínsecas dos próprios componentes celulares de seu SNP.

Recentemente, através de experimentos baseados em aloenxertos utilizando animais C57BL6J/Wld^s e C57BL/6J, Glass et al. (1993), puderam comprovar que realmente a lentidão da degeneração Walleriana na linhagem C57BL6J/Wld^s é resultante de características intrínsecas dos componentes celulares do SNP, mais especificamente dos axônios, os quais são capazes de sobreviver por um grande período de tempo após sua desconexão com o corpo celular do neurônio. Esta lentidão todavia, não impede a regeneração das fibras nervosas, porém torna este processo mais lento, sendo as fibras sensitivas as mais prejudicadas (Brown et al., 1994).

Estudos recentes sobre a regeneração nervosa periférica em diversas linhagens de camundongos isogênicos neurologicamente normais, são particularmente interessantes, (Lu et al. 1990). Verificou-se que após o esmagamento do nervo fibular, o potencial regenerativo variava entre eles, sendo mais baixo nos animais da linhagem C57BL/6J. Estes dados foram confirmados por Da-Silva et al. (1991) e Lainetti et al. (1995), estudando a regeneração nervosa periférica nas mesmas linhagens, fazendo uso da técnica de reparo de nervos por tubulização.

A razão primeira que levou Lu et al. (1990) a analisarem o potencial regenerativo de nervos nas diferentes linhagens, foi o fato das mesmas apresentarem diferenças no recrutamento de macrófagos. Considerando que tais diferenças são geneticamente determinadas e o importante papel destas células na regeneração nervosa periférica, formularam a hipótese da existência de uma correlação entre tais fatos. Contudo, os resultados obtidos não permitiram confirmá-la. Recentemente, os mesmos autores (Lu et al., 1994), propuseram que a deficiência regenerativa axonal da linhagem C57BL/6J

poderia estar relacionada a fatores genéticos, associados principalmente aos neurônios sensitivos.

Continua porém em aberto a questão da origem do déficit regenerativo axonal presente nos camundongos da linhagem C57BL/6J. Este pode, portanto, ser consequência de defeitos nas CS, nos próprios axônios e mesmo na natureza da matriz extracelular do nervo. Assim sendo, o emprego de linhagens de animais isogênicos neurologicamente normais, que apresentam diferentes capacidades regenerativas do sistema nervoso periférico, tem sido postulado como interessante modelo para o estudo da importância relativa dos axônios, células não neurais e elementos da matriz extracelular no processo da regeneração nervosa (Lu et al. 1990; Lu et al. 1994).

Este trabalho tem como objetivo principal, a investigação dos fatores que determinam a menor capacidade regenerativa axonal apresentada pela linhagem C57BL/6J, comparativamente às linhagens A/J e BALB/c. Para isso, postulamos o emprego de um modelo experimental que se vale das vantagens da técnica de transplantes de nervos, utilizando-se como animais receptores, híbridos advindos do cruzamento das respectivas linhagens isogênicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho baseou-se na realização de transplantes e tubulização do nervo ciático dos animais das linhagens *C57BL/6J*, *BALB/cJ* e *A/J* e dos respectivos descendentes F1 dos cruzamentos *C57BL/6J* x *A/J* e *C57BL/6J* x *BALB/cJ*. Nestes cruzamentos, sempre foram utilizados machos da linhagem *C57BL/6J*. A capacidade regenerativa axonal foi quantificada através dos dados morfométricos e morfológicos obtidos a partir de observações à microscopia óptica e eletrônica.

2.1 Animais e grupos experimentais

Neste trabalho foram utilizados 15 camundongos da linhagem *C57BL/6J*, 12 da linhagem *BALB/cJ*, 12 da linhagem *A/J*, 09 F1 descendentes do cruzamento de *C57BL/6J* x *BALB/cJ* [**F1 CxB**] e 09 F1 descendentes do cruzamento de *C57BL/6J* x *A/J* [**F1 CxA**]. Todos os animais eram machos com idade variando entre 8 e 10 semanas. Os animais empregados no protocolo que previa o transplante de nervos foram distribuídos em 7 grupos, como mostra a tabela que segue.

GRUPO	DOADOR (n)	RECEPTOR (n)
1	<i>C57BL/6J</i> (3)	F1 (<i>C57BL/6J</i> x <i>A/J</i>) (3)
2	<i>A/J</i> (3)	F1 (<i>C57BL/6J</i> x <i>A/J</i>) (3)
3	<i>C57BL/6J</i> (3)	F1 (<i>C57BL/6J</i> x <i>BALB/cJ</i>) (3)
4	<i>BALB/cJ</i> (3)	F1 (<i>C57BL/6J</i> x <i>BALB/cJ</i>) (3)
5	<i>C57BL/6J</i> (3)	<i>C57BL/6J</i> (3)
6	<i>A/J</i> (3)	<i>A/J</i> (3)
7	<i>BALB/cJ</i> (3)	<i>BALB/cJ</i> (3)

Quatorze dias previamente ao transplante, os animais doadores foram submetidos a uma cirurgia para transecção do nervo ciático esquerdo (pré-degeneração). Após o transplante, os receptores foram mantidos em biotério por um período de 4 semanas.

Paralelamente ao protocolo dos transplantes, grupos de 3 animais de cada linhagem isogênica tiveram seu nervo ciático transecionado, sendo sacrificados após um período de quatorze dias. Estes tiveram o segmento distal de seu nervo ciático pré-degenerado preparado para estudo de suas características morfológicas.

Outros dois grupos experimentais foram compostos por 3 animais [F1 CxB] e 3 animais [F1 CxA] respectivamente. Estes animais tiveram seu nervo ciático esquerdo tubulizado.

2.2 Procedimento Cirúrgico

2.2.1 Para a pré- degeneração do enxerto

Após anestesia com pentobarbital (50mg/Kg, i.p.), os animais foram submetidos a tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (DF-Vasconcelos, mod. MC-M9). A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, procedeu-se a exposição do nervo ciático, o qual foi amarrado com um fio de seda 7-0, na altura do trocânter maior do fêmur, sendo seccionado distalmente à ligadura. O coto distal foi deixado livre em seu leito e o coto proximal foi afastado para impedir uma eventual reinervação. Concluída a cirurgia, o plano muscular foi fechado por meio de um ponto cirúrgico com fio de seda 7-0 e a pele com 2 ou 3 grampos de metal. Os

animais foram mantidos em biotério por um período de 14 dias recebendo ração e água *ad libitum*.

2.2.2 Para o transplante do enxerto

2.2.2.1 Preparação do enxerto (Figura 1A)

Após 14 dias da cirurgia para a pré-degeneração, os doadores foram novamente anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg, i.p.). Após tricotomia da coxa esquerda, o nervo ciático foi exposto e o seu coto distal liberado de suas aderências à musculatura. Um segmento inicial do mesmo, com aproximadamente 1,0mm, foi removido e desprezado, por representar uma região cicatricial que poderia dificultar sua reinervação. A extremidade proximal do coto distal foi então introduzida num tubo de polietileno de 3,0mm de comprimento (Clay Adams, diâmetro interno=0,76mm e diâmetro externo=1,22mm), sendo fixada através de um ponto de sutura (fio mononylon10-0). Em seguida, o coto distal foi seccionado em sua porção mais distal, próximo à fossa poplíteia e, após total liberação do mesmo, obteve-se um enxerto com aproximadamente 7,0 mm de comprimento. A seguir os animais doadores foram sacrificados.

2.2.2.2 Transplante do enxerto (Figura 1B)

Após anestesia com pentobarbital (50mg/Kg, i.p.) e tricotomia da região do campo cirúrgico, o nervo ciático esquerdo foi exposto e seccionado na altura do seu terço proximal, na região da coxa. O enxerto, já previamente preparado, foi transferido para o receptor. A extremidade do coto proximal do nervo ciático do receptor foi introduzida na

extremidade livre do tubo e fixada através de um ponto de sutura (fio mononylon 10-0) à parede do mesmo. Entre as extremidades do coto proximal e do enxerto, no interior do tubo, foi deixada uma distância de aproximadamente 1,0 mm. O coto distal do receptor ficou livre em seu leito, posicionado paralelamente ao enxerto. Em seguida, a musculatura foi suturada com fio de seda 7-0 e a pele fechada com 2 ou 3 grampos de metal. Os animais foram mantidos em biotério por um período de 4 semanas recebendo ração e água *ad libitum*.

2.2.3 Procedimento cirúrgico para a tubulização

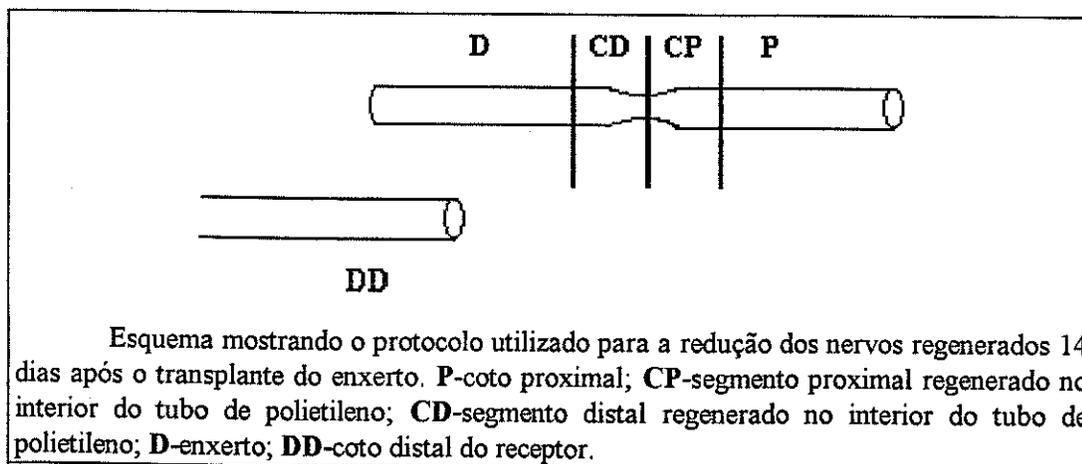
Após anestesia com pentobarbital (50mg/Kg, i.p.), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, procedeu-se a exposição do nervo ciático. O nervo foi transecionado e, após a retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados, com um ponto cirúrgico (fio mononylon 10-0, Ethicon), no interior de um tubo de polietileno (Clay Adams, comprimento=6,00mm, diâmetro interno=0,76mm e diâmetro externo=1,22mm), deixando-se um espaço de 4,0mm entre eles.

Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele fechada com 2 ou 3 grampos cirúrgicos. Os animais foram mantidos em biotério por um período de 6 semanas, recebendo ração e água *ad libitum*.

2.3 Sacrifício e Processamento para Microscopia Eletrônica

Passados 28 dias, os animais que receberam os enxertos, foram sacrificados. Após anestesia com Hidrato de Cloral 10% (0,1 ml/20g, i.p.) foram submetidos a toracotomia e a seguir perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando a lavagem total dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 80ml de uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 150ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Após fixação, o conjunto contendo a porção proximal do nervo ciático do receptor, a porção regenerada no interior do tubo e a porção do enxerto, bem como o coto distal do nervo ciático do receptor e seu respectivo nervo ciático contralateral (CL), foram dissecados e imersos na mesma solução fixadora por 24 horas, mantidos a uma temperatura de 4°C.

Passado esse período, os elementos do conjunto acima citados, assim como o segmento do nervo contra-lateral (CL) foram reduzidos sob lupa, de acordo com o esquema abaixo.



A seguir, os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Seguindo-se a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e corados com acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa de sacarose, por 12 horas. Após a passagem pelo acetato de uranila, os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Araldite F (CY-205), Uegama).

2.4 Análise qualitativa e quantitativa dos resultados

Após a polimerização da resina, os blocos correspondentes aos segmentos do nervo regenerado no interior do tubo (CD) e do nervo contra-lateral (CL) foram aparados com auxílio de lupa. A seguir, foram levados a um ultramicrotomo (LKB, Bromma 8800) equipado com navalha de vidro, para a confecção dos cortes transversais semi-finos com 0,5 μ m de espessura. Estes foram corados com Azul de Toluidina 0,5%, sendo utilizados para análise ao microscópio óptico. Os mesmos blocos foram então reaparados para a confecção de cortes transversais ultrafinos (500 Å) que, colocados sobre telas de cobre de 200 mesh, foram observados e fotografados ao microscópio eletrônico Zeiss EM-9 (operando a 60Kv) para posterior análise qualitativa e quantitativa.

Para análise quantitativa, foram considerados os seguintes parâmetros: número de axônios mielínicos nos nervos normais (CL) [nAN], número de axônios mielínicos regenerados [nAR], coeficiente de regeneração [CR] ($CR = nAN/nAR$), diâmetro das fibras mielínicas [DFM], diâmetro dos axônios mielínicos [DAM], espessura da bainha de mielina [EBM] e razão "g" [RZG] ($RZG = DAM/DFM$).

Para a obtenção do número de axônios mielínicos, os cortes transversais semi-finos foram fotografados na sua totalidade ao microscópio óptico. Apartir das fotos ampliadas em papel fotográfico, os cortes transversais dos nervos foram reconstruídos e os axônios mielínicos contados com auxílio de um contador eletrônico digital semi automático, idealizado em nosso laboratório.

As medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielínicos foram obtidas a partir dos valores dos respectivos perímetros (P), aplicando-se a fórmula $D=P/\pi$. Para a obtenção da espessura da bainha de mielina, esta foi considerada como sendo igual ao valor da altura de um trapézio regular, cujas bases maior e menor correspondiam aos perímetros da fibra e do axônio, respectivamente (modificado de Ferriere et al., 1985)

As medidas foram realizadas a partir de fotos obtidas ao microscópio eletrônico, com um aumento final de 6000X, ampliadas em papel fotográfico (Kodak, F3) (Figura 2). Foram mensuradas as fibras nervosas presentes em quatro campos do corte transversal de cada nervo regenerado e seis campos do corte transversal de cada nervo contra-lateral. Para isso, empregou-se um sistema computadorizado de morfometria, composto por microcomputador 386 sx, 33Mhz, monitor de vídeo super VGA, mesa digitalizadora (SummaSketch® II Professional) e software "SigmaScan Measurement™" versão 3.90, Jandel Scientific, 1988).

No sentido de obter-se resultados com um maior grau de fidelidade, foram utilizados apenas as fibras nervosas cuja relação $4\pi.A/P^2$ apresentou-se superior a 0,75 ($\pi=3,1416$; A=área medida; P=perímetro). O emprego deste procedimento excluiu as

fibras nervosas seccionadas obliquamente, ou afetadas por algum artefato de técnica (Glasby et al., 1985).

2.5 Tratamento Estatístico

A partir dos resultados numéricos da contagem dos axônios mielínicos regenerados e dos axônios mielínicos presentes nos nervos contra-laterais, assim como os dados morfométricos, foram calculadas média e desvio-padrão. Estes parâmetros foram então estudados pelo método da análise da variância. As diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram estudadas fazendo-se uso do teste de Newman Keuls, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

3. RESULTADOS

3.1 Dados Qualitativos

3.1.1 Análise Morfológica dos Enxertos Pré-Degenerados

Duas semanas após sua transecção, os nervos ciáticos dos animais doadores das diferentes linhagens, apresentaram-se macroscopicamente semelhantes. Observou-se retração de ambos os cotos, sendo que o proximal apresentava em sua extremidade, um tecido tipicamente cicatricial, com aspecto e textura condizentes com um neuroma. O coto distal apresentava, em sua extremidade, aspecto fibrótico semelhante ao proximal. Distalmente à fibrose, o diâmetro do coto distal era superior ao de um nervo normal. Em nenhum dos casos observou-se qualquer tecido de ligação entre os cotos após a transecção do nervo.

A região cicatricial do coto distal, vizinha ao local da transecção, observada em cortes transversais ao microscópio óptico, mostrou-se rica em fibroblastos com perfil e núcleo alongados, dispondo-se de forma a circundar grupos de CS relacionadas a axônios em degeneração. Foi também observado espessamento do tecido perineural, sendo evidentes diversas camadas de células perineurais com características morfológicas semelhantes às dos fibroblastos. Vasos sanguíneos com variados calibres eram abundantes.

Cortes transversais abaixo da região cicatricial do enxerto, correspondente à extremidade introduzida no tubo, foram analisados ao microscópio óptico e eletrônico. Pôde-se notar um grande número de axônios mielínicos em degeneração, geralmente organizados em pequenos grupos, envolvidos por prolongamentos citoplasmáticos de CS.

Apresentavam uma bainha de mielina descompactada, assim como neurofilamentos e microtúbulos aglutinados, originando, no interior do axoplasma, porções eletrondensas (Figura 3).

Eram abundantes as CS, cujo número deve ter aumentado, provavelmente devido ao processo mitótico ocorrido nos primeiros dias subseqüentes à transecção do nervo. Estas apresentavam muitos prolongamentos citoplasmáticos, nos quais foi possível observar-se ribossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Externamente, tais prolongamentos sempre mostravam-se revestidos por membrana basal. O citoplasma das CS possuía contorno arredondado, contendo vacúolos digestivos, vesículas lisossomais, grande quantidade de ribossomos, bem como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. O núcleo possuía forma aproximadamente circular, apresentando uma estreita faixa de cromatina condensada, sendo seu maior volume ocupado por cromatina descondensada (Figura 3).

Observou-se também nesta região, um espessamento do perineuro, bem como um aumento do espaço endoneural, o qual continha uma grande quantidade de fibras colágenas dispostas paralelamente ao sentido longitudinal do nervo, contribuindo para o incremento de sua dimensão transversal (Figuras 1 e 3).

3.1.2 Análise morfológica dos enxertos 4 semanas após o transplante

3.1.2.1 Aspectos gerais

Quatro semanas após o transplante, formou-se uma estrutura cilíndrica com aproximadamente 1,5 mm interligando os cotos no interior do tubo de polietileno. Tal estrutura possuía um diâmetro menor que o coto proximal e o enxerto, sendo sua região central ligeiramente menos calibrosa que as extremidades.

Com o auxílio de microscópio cirúrgico, foi possível separar o enxerto de suas aderências com a musculatura adjacente. O segmento transplantado, que no ato cirúrgico do implante, possuía aproximadamente 7,0 mm de extensão, apresentou, após 4 semanas, uma diminuição em torno de 50 % de seu comprimento. Apresentava numerosos vasos sanguíneos, que eram contínuos com o coto proximal, pouco tecido fibrótico, sendo sua aparência e textura semelhantes à dos cotos proximal e distal do receptor. Macroscopicamente, não se observaram indícios de rejeição aos enxertos em nenhum dos grupos.

3.1.2.2 Características morfológicas do grupo 1 (Figura 4)

doador: C57BL/6J

receptor: F1 (C57BL/6J X A/J)

Nos cortes transversais da porção CD do enxerto, pôde-se observar, ao microscópio óptico, a presença de um epineuro ligeiramente espessado, sendo possível identificar-se pelo menos quatro camadas de células epineurais, as quais apresentavam núcleos e perfis alongados. Havia vasos sanguíneos de diversos calibres no interior do endoneuro. As fibras nervosas regeneradas apresentavam-se dispostas no interior de minifascículos delimitados por expansões citoplasmáticas de células perineurais. Estes conjuntos apresentavam-se constituídos por aproximadamente 10 axônios caracterizando o desenvolvimento do processo de compartimentalização. Os axônios regenerados estavam relacionados com as CS e geralmente apresentavam forma circular. Figuras evidenciando processos degenerativos das fibras nervosas não foram observadas nesse grupo.

Ao microscópio eletrônico os minifascículos apresentavam-se claramente delimitados por projeções de células perineurais, acompanhadas pela sua membrana basal. Estas projeções continham em seu citoplasma numerosas mitocôndrias e vesículas eletrtransparentes. Os espaços entre as várias camadas de células perineurais estavam preenchidos por grupos de fibras colágenas dispostas paralelamente ao longo do eixo longitudinal do nervo. As células perineurais apresentavam núcleo geralmente com secção circular ou elíptica, apresentando pequena quantidade de cromatina condensada.

No interior dos minifascículos observou-se tanto axônios mielínicos quanto amielínicos. Os mielínicos possuíam maiores dimensões, sempre apresentando-se

relacionados a uma única CS. O axoplasma continha microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias dispersos sem organização aparente.

Os axônios amielínicos apresentavam-se organizados em pequenos grupos, sempre compartilhando projeções de uma mesma CS. Estes axônios continham em seu citoplasma microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias dispostos de maneira mais condensada comparativamente aos mielínicos.

3.1.2.3 Características morfológicas do grupo 2 (Figura 5)

doador: A/J

receptor: F1 (C57BL/6J X A/J)

Nos cortes transversais da porção CD do enxerto, observados ao microscópio óptico, foi constatada a presença de dois grandes fascículos na porção regenerada. Estes estavam delimitados por um epineuro claramente espessado e tortuoso, onde haviam vasos sanguíneos e polimorfonucleados localizados na periferia do nervo. No interior de ambos os fascículos encontravam-se numerosos minifascículos, não sendo contudo, possível evidenciar seu exato estágio de compartimentalização.

Os axônios regenerados em processo de mielinização encontrados no interior dos minifascículos apresentavam um diâmetro reduzido e semelhante entre si. Também foram observadas diversas fibras mielínicas em degeneração, geralmente formando pequenos grupos. Vasos endoneurais, distribuídos por todo o nervo, apresentavam diâmetros semelhantes entre si.

Ao nível de microscopia eletrônica observaram-se poucas projeções de células perineurais delimitando grupos de axônios regenerados. Estas células possuíam núcleo alongado, apresentando cromatina condensada difusa, intercalada por cromatina descondensada.

Os axônios mielínicos possuíam diâmetro reduzido e forma circular, estando presentes, em suas adjacências, uma grande quantidade de fibras colágenas endoneurais. Raramente detectou-se fibroblastos no endoneuro. As fibras mielínicas estavam relacionadas a projeções de uma única CS, a qual apresentava mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso abundante.

Os axônios amielínicos freqüentemente apresentavam-se isolados ou em pequenos grupos de no máximo 4 a 5 fibras. Este possuíam diâmetro inferior aos mielínicos, sendo seu citoplasma rico em neurofilamentos e microtúbulos; ocasionalmente observaram-se mitocôndrias.

3.1.2.4 Características morfológicas do grupo 3 (Figura 6)

doador: C57BL/6J

receptor: F1 (C57BL/6J X BALB/cJ)

Os cortes transversais da porção CD do enxerto caracterizaram-se por apresentar epineuro pouco organizado. Este era tênue e muitas vezes continha pequenos grupos de axônios em regeneração. Vasos de calibre reduzido puderam ser observados.

As fibras nervosas mielínicas em processo regenerativo apresentavam diâmetros variados, organizando-se em pequenos minifascículos, na região periférica do enxerto. Já na porção central do nervo regenerado, as fibras apareciam menos compactas, sendo mais difícil a visualização dos limites dos minifascículos. Nesta porção, observou-se a presença de algumas fibras em processo degenerativo bem como algumas figuras de mielinização anômala. Os vasos endoneurais apresentavam diferentes calibres, sendo detectada a presença de pequenos infiltrados inflamatórios nos animais estudados.

Ao nível de microscopia eletrônica foi possível confirmar a presença de projeções citoplasmáticas das células perineurais, revestidas por membrana basal, envolvendo os minifascículos de axônios regenerados, na porção central do nervo regenerado. Estas células continham diversas mitocôndrias e vesículas intracitoplasmáticas e, entre suas várias projeções organizavam-se grupos de fibras colágenas com diâmetro semelhante àquele presente no ambiente endoneural. Apresentavam núcleo alongado, contendo cromatina descondensada na porção central e cromatina condensada em sua periferia.

No interior dos minifascículos, os axônios mielínicos sempre estavam relacionados a uma única CS, cujo citoplasma, como nos demais grupos experimentais, mostrou-se rico em organelas, destacando-se a presença de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi. Nos casos onde foi possível observar o núcleo da CS, este possuía forma aproximadamente circular, contendo eucromatina em sua periferia e heterocromatina em sua porção central.

Os axônios mielínicos apresentavam forma muitas vezes irregular porém, sempre tendendo à circularidade; continham mitocôndrias, microtúbulos e neurofilamentos,

aparentemente dispostos de forma aleatória. Os axônios amielínicos por sua vez, sempre possuíam dimensões inferiores aos mielínicos, estando isolados ou formando pequenos grupos que, neste caso, compartilhavam projeções citoplasmáticas de uma mesma CS. Seu axoplasma continha microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias dispostos de maneira mais compacta em relação aos mielínicos.

O espaço endoneural mostrou-se frouxo, contendo projeções citoplasmáticas de fibroblastos, sendo observados numerosos grupos de fibras colágenas dispostos tanto entre os axônios mielínicos quanto entre os grupos de axônios amielínicos.

3.1.2.5 Características morfológicas do grupo 4 (Figura 7)

doador: BALB/cJ

receptor: F1 (C57BL/6J X BALB/cJ)

Nos cortes transversais da porção CD do enxerto, o epineuro nos animais deste grupo apresentou-se pouco organizado sendo difícil identificar seus limites com o peri e endoneuro, observando-se diversos vasos sanguíneos em ambas as bainhas conjuntivas.

Os axônios mielínicos em processo regenerativo apresentaram diâmetros variados, estando organizados em minifascículos de vários tamanhos. Ficou clara a presença das CS, estando cada uma delas relacionadas com apenas um axônio mielínico, assim como das células perineurais delimitando os diversos minifascículos.

Ao microscópio eletrônico pôde-se visualizar projeções de células perineurais ricas em vesículas pinocíticas e mitocôndrias, delimitando os grupos de axônios mielínicos e amielínicos, no interior dos minifascículos. Algumas dessas células porém, possuíam projeções citoplasmáticas colaterais, as quais circundavam apenas uma ou duas fibras mielínicas ou algumas fibras amielínicas, individualizando-as. O espaço existente entre as camadas de células do perineuro estava preenchido por feixes de fibras colágenas dispostos paralelamente ao eixo longitudinal da porção regenerada.

Os axônios mielínicos presentes nos minifascículos apresentavam uma morfologia semelhante àquela observada nos nervos não operados. Estas fibras sempre foram observadas em contato com uma única CS, contendo em seu axoplasma, mitocôndrias, microtúbulos e neurofilamentos. As fibras amielínicas estavam presentes em pequena quantidade, mostrando-se agrupadas em no máximo 4 a 5 fibras.

O ambiente endoneural mostrou-se pouco compactado, havendo em determinadas regiões grandes agrupamentos de fibras colágenas, com diâmetro semelhante ao observado no perineuro, envolvidos por projeções de fibroblastos. Também foram reconhecidos macrófagos fagocitando fibras mielínicas em degeneração.

3.1.2.6 Características morfológicas do grupo 5 (Figura 8)

doador: C57BL/6J

receptor: C57BL/6J

Os casos estudados neste grupo apresentaram um epineuro pouco organizado, formado por algumas camadas celulares, sendo possível observar-se em algumas regiões, a presença de minifascículos de dimensões variadas, bem como vasos sanguíneos.

Os axônios regenerados na porção central do nervo possuíam diversos diâmetros, não sendo contudo possível definir claramente, à microscopia óptica, os limites dos minifascículos. O espaço endoneural mostrou-se dilatado, havendo alguns grupos de axônios mielínicos em degeneração.

Ao nível de microscopia eletrônica, observou-se minifascículos delimitados por tênues projeções citoplasmáticas provenientes de um número reduzido de células perineurais. Estas possuíam núcleo geralmente com secção elíptica, apresentando cromatina condensada principalmente em sua periferia, intercalada por cromatina frouxa. Seu citoplasma, na porção dos prolongamentos citoplasmáticos, continha mitocôndrias e, em algumas regiões, vesículas pouco eletrondensas.

Os axônios mielínicos e amielínicos apresentaram características morfológicas semelhantes, contendo mitocôndrias, microtúbulos e neurofilamentos no axoplasma; entretanto, aqueles presentes na região central pareciam possuir diâmetro ligeiramente superior.

O ambiente endoneural apresentou-se rico em fibras colágenas dispostas paralelamente ao longo do eixo longitudinal do nervo, interpostas aos axônios, células perineurais e fibroblastos.

3.1.2.7 Características morfológicas do grupo 6 (Figura 9)

doador: BALB/cJ

receptor: BALB/cJ

Nos cortes transversais da porção CD do enxerto, observados ao microscópio óptico, o epineuro mostrou-se bem organizado, sendo possível identificar-se pelo menos cinco camadas de células perineurais com a presença de diversos vasos sanguíneos localizados na sua face interna.

O endoneuro apresentou grau de compactação de seus elementos análogo ao observado nos demais grupos. Os axônios mielínicos em processo regenerativo apresentavam uma distribuição homogênea da periferia ao centro dos nervos estudados. Estes organizavam-se em minifascículos delimitados por prolongamentos de células perineurais e fibroblastos. Estavam também presentes alguns vasos sanguíneos no espaço endoneural.

Ao microscópio eletrônico os minifascículos, com dimensões variadas, estavam sempre delimitados por prolongamentos de células perineurais, dispostas em várias camadas concêntricas interpostas por grupamentos de fibras colágenas. Aqueles de maior

tamanho, mostraram-se subdivididos por finas projeções citoplasmáticas provenientes de células perineurais.

No interior dos minifascículos os axônios mielínicos e amielínicos, apresentaram-se morfológicamente normais, sem qualquer evidência de axonopatia. Havia porém, uma grande quantidade de axônios amielínicos com dimensões semelhantes àquelas apresentadas por alguns axônios mielínicos. Estes apareciam formando pequenos grupos de até três fibras ou isolados, neste caso indicando terem sido segregados pelas CS previamente à sua possível mielinização.

Algumas células fagocíticas foram identificadas no ambiente endoneural apresentando morfologia compatível à de macrófagos. O espaço endoneural existente entre os axônios regenerados era reduzido e continha numerosos grupamentos de fibras colágenas com dimensões semelhantes àquelas observadas no perineuro, refletindo um maior grau de compactação dessas fibras.

3.1.2.8 Características morfológicas do grupo 7 (Figura 10)

doador: A/J

receptor: A/J

Os cortes transversais da porção CD do enxerto, observados ao microscópio óptico, apresentavam epineuro espessado, possuindo diversos vasos sanguíneos com calibre pouco variável entre si. A transição epi-endoneural em algumas regiões de nervo era de

difícil visualização, havendo pequenos grupos de axônios com diâmetro reduzido nesta interface.

As fibras mielínicas mostraram-se muito compactadas no interior de minifascículos, os quais eram delimitados por prolongamentos de células perineurais. Aqueles minifascículos localizados na periferia do enxerto, possuíam em geral fibras mielínicas de menor diâmetro, comparativamente aos presentes na região central. Poucos vasos endoneurais foram notados, sendo estes de pequeno tamanho .

Ao microscópio eletrônico observou-se minifascículos delimitados por camadas concêntricas de células perineurais, contendo axônios mielínicos e amielínicos. Os mielínicos apresentaram dimensões variadas, contendo em seu axoplasma neurofilamentos, microtúbulos e, eventualmente, mitocôndrias. Algumas fibras apresentaram indícios de degeneração, contendo organelas agrupadas de maneira anormal, assim como bainha de mielina descompactada em algumas porções. Os axônios amielínicos possuíam dimensões reduzidas e estavam organizados em pequenos grupos, compartilhando projeções de uma mesma CS. Em seu axoplasma era possível observar mitocôndrias, microtúbulos e neurofilamentos.

O ambiente endoneural mostrou-se pouco compactado, havendo grandes quantidades de fibras colágenas entre as fibras nervosas. O mesmo fato foi observado nos espaços entre os vários minifascículos, assim como naqueles existentes entre as camadas de células perineurais.

3.1.2.9 Características morfológicas do nervo normal (figura 11)

As características morfológicas dos nervos normais foram semelhantes em todas as linhagens estudadas. Na região onde foram obtidos os cortes transversais dos nervos contra-laterais das diferentes linhagens, a maioria destes apresentou-se dividido em até quatro fascículos. Estes, mais distalmente davam origem respectivamente aos nervos tibial, fibular, sural e cutâneo.

Neste ponto, observados ao microscópio óptico, os fascículos mostravam-se envolvidos pela bainha epineural. A bainha perineural, por sua vez, estava constituída por células achatadas (células perineurais) com perfil fusiforme e membrana basal contínua em toda a sua superfície. Seus prolongamentos, ricos em mitocôndrias e vesículas eletrondensas, envolviam cada fascículo nervoso de forma contínua e concêntrica. Observaram-se entre as várias camadas celulares (aproximadamente quatro), feixes de fibras colágenas dispostas longitudinalmente em relação aos axônios. Os vasos sanguíneos distribuídos pelo perineuro possuíam diâmetro variado.

Ao microscópio eletrônico, pôde-se observar que no interior de cada fascículo, tanto os axônios mielínicos quanto os conjuntos de axônios amielínicos, encontravam-se bastante compactados, existindo entre eles, um reduzido espaço extracelular. Este era preenchido predominantemente por fibras colágenas dispostas paralelamente entre si e ao eixo longitudinal do nervo; fibroblastos e, eventualmente, macrófagos residentes, organizando assim o ambiente endoneural. Os axônios mielínicos apresentavam axoplasma rico em neurofilamentos e microtúbulos, contendo algumas mitocôndrias;

sempre estando relacionados a apenas uma única CS. Esta última apresentava membrana basal contínua, a qual envolvia completamente o axônio a ela relacionado.

Os axônios amielínicos encontravam-se organizados em conjuntos, compartilhando diversos prolongamentos citoplasmáticos de uma mesma CS. A maioria desses grupamentos era formado por dezenas de axônios, existindo apenas raramente, alguns grupos constituídos por uma menor quantidade de fibras amielínicas.

3.2 Dados Quantitativos

3.2.1 Contagem dos axônios mielínicos - Transplantes

A tabela I apresenta o número total de axônios mielínicos regenerados, obtidos ao nível da porção CD do enxerto que se encontrava no interior dos tubos de polietileno, implantados nos animais dos 7 grupos experimentais. Nesta tabela estão incluídos também os valores obtidos nos nervos contra-laterais (CL), não operados, de cada animal. Estes dados estão graficamente representados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Comparando-se os resultados obtidos nos grupos dos aloenxertos, observa-se que o grupo onde o doador era C57BL/6J e o receptor F1[CxB] foi aquele que apresentou o maior número de axônios mielínicos regenerados. Por outro lado, os animais F1[CxB] que receberam enxerto de BALB/cJ, apresentaram o menor número de axônios mielínicos regenerados (Tabela III). Adicionalmente, observa-se que os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de C57BL/6J, e os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de A/J, quando comparados entre si, não apresentaram diferenças significativas no que diz respeito ao número de axônios mielínicos regenerados. Já os animais F1 [CxB] que receberam enxertos de C57BL/6J apresentaram um número médio de axônios mielínicos regenerados estatisticamente superior àquele obtido no grupo onde os receptores eram F1 [CxB] e os doadores BALB/cJ.

Analizando-se o número de axônios mielínicos regenerados nos grupos que receberam isoenxertos, observa-se que estes não foram estatisticamente diferentes entre si no que diz respeito ao número de axônios mielínicos regenerados (Tabela III).

O número médio de axônios mielínicos computados nos nervos contra-laterais (CL) das linhagens isogênicas assim como dos descendentes F1[CxA] e F1[CxB], mostrou haver diferenças estatísticas entre os grupos, como mostra a tabela III.

A figura 14 apresenta graficamente os valores do CR obtidos nos 7 grupos experimentais. Analisando-se os valores do CR nos grupos de aloenxertos, observa-se não haver diferenças significativas entre as médias apresentadas pelos grupo onde C57BL/6J e A/J eram doadores, sendo estas porém superiores à média obtida no grupo onde BALB/cJ era doador. Quanto ao grupo dos isoenxertos, o CR mostrou-se estatisticamente semelhante em todos os grupos (Tabela IV).

3.2.2 - Contagem dos axônios mielínicos - Tubulizações

A tabela II apresenta o número de axônios mielínicos regenerados no interior de tubos de polietileno, após um período de seis semanas.

A Figura 15 representa as médias e os respectivos desvios-padrão do número de axônios obtidos nos animais provenientes do cruzamento de C57BL/6J com A/J e BALB/cJ. Observa-se que as duas médias não diferem estatisticamente entre si.

3.2.3 - Parâmetros Morfométricos

No estudo morfométrico dos nervos regenerados, assim como dos nervos normais, foram considerados os seguintes parâmetros: Diâmetro das Fibras Mielínicas (DFM), o qual corresponde ao axônio e sua bainha de mielina; Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM), correspondendo ao axônio sem sua bainha de mielina; Espessura da Bainha de Mielina (EBM) e Razão "g" (RZG), a qual foi obtida a partir do quociente DAM/DFM.

O estudo das distribuições de frequência dos parâmetros acima mencionados, suas médias e respectivos desvios-padrão foram obtidos a partir dos dados amostrados em cada grupo.

3.2.3.1 - Diâmetro das Fibras Mielínicas nos Grupos Experimentais

(Figuras 16 e 17, Tabela V)

Os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de C57BL/6J apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,03 a 6,68 μ m e média $2,92 \pm 1,03\mu$ m. As maiores percentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 2,01 a 3,00 μ m e 3,01 a 4,00 μ m, correspondendo a 41,0% e 24,8% do total, respectivamente. As demais fibras mielínicas, que representam os 34,2% restantes, estavam distribuídas nas demais classes, sendo que 18,3% possuíam diâmetro entre 1,01 e 2,00 μ m, 11,4% entre 4,01 e 5,00 μ m e 4,5% acima de 5,01 μ m.

Os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de A/J apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 0,76 a 5,83 μ m e média $2,85 \pm 1,05\mu$ m. Esta não foi estatisticamente diferente do grupo onde o receptor era F1 [CxA] e o doador C57BL/6J. Igualmente a este último, as maiores porcentagens de fibras foram observadas nos intervalos de 2,01 a 3,00 μ m e 3,01 a 4,00 μ m, correspondendo a 49,2% e 20,1% do total, respectivamente. Os 30,7% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 16,3% apresentaram diâmetro no intervalo de 1,01 e 2,00 μ m e 14,4% apresentavam diâmetro acima de 5,01 μ m.

Os animais F1 [CxB] que receberam enxertos de C57BL/6J, apresentaram fibras mielínicas regeneradas com diâmetros variando de 0,76 a 6,72 μ m e uma média de $2,85 \pm 1,05\mu$ m. Aproximadamente a metade (49,2%) das fibras regeneradas possuíam diâmetro entre 2,01 a 3,00 μ m. As restantes encontravam-se distribuídas nas demais classes, sendo que 20,1% apresentaram-se entre 3,01 e 4,00 μ m, 16,3% entre 1,01 e 2,00 μ m e 9,1% entre 4,01 e 5,00 μ m. Apenas 4,9% do total apresentou diâmetro superior a 5,01 μ m.

Quando os F1 [CxB] tiveram como doadores animais de linhagem BALB/cJ, as fibras mielínicas regeneradas apresentaram diâmetros variando entre 0,81 e 6,49 μ m, com média de $2,73 \pm 1,01\mu$ m. Esta não diferiu significativamente em relação à média do grupo onde os receptores eram F1 [CxB] e os doadores C57BL/6J. De forma semelhante a este último, a maior porcentagem de fibras regeneradas estava no intervalo entre 2,01 e 3,00 μ m, correspondendo a 41,3% do total. Das 58,7% restantes, 26,3% estavam no intervalo entre 1,01 e 2,00 μ m, 19,9% entre 3,01 e 4,00 μ m e 8,3% entre 4,01 e 5,00 μ m. Foi observado um número fibras com diâmetro superior a 5,01 μ m correspondente a 3,9% do total.

Os grupos que receberam isoenxertos de C57BL/6J, A/J e BALB/cJ não apresentaram diferenças significativas entre si no que diz respeito ao valor médio do DFM, sendo estas respectivamente $2,63 \pm 0,89\mu\text{m}$, $2,63 \pm 1,01\mu\text{m}$ e $2,51 \pm 0,93\mu\text{m}$. Além disso, o perfil de distribuição de frequência do DFM foi muito semelhante entre elas.

O grupo onde foram utilizados isoenxertos de C57BL/6J, apresentou axônios variando de 1,04 a $5,25\mu\text{m}$ e uma média $2,63 \pm 0,89\mu\text{m}$. O intervalo entre 2,01 e $3,00\mu\text{m}$ foi o mais frequente, correspondendo a 44,1% do total, seguido pelo intervalo entre 1,01 e $2,00\mu\text{m}$, onde estavam presentes 26,4% das fibras amostradas. Os 29,5% restantes, encontraram-se distribuídos nas demais classes, sendo 19,2% entre 3,01 e $4,00\mu\text{m}$, 9,2% entre 4,01 e 5,00 e 0,9% superiores a $5,01\mu\text{m}$.

Os animais que receberam isoenxertos de A/J apresentaram fibras regeneradas com diâmetros distribuídos entre 0,87 e $7,26\mu\text{m}$ e média igual a $2,63 \pm 1,01$. O intervalo entre 1,01 e $2,00\mu\text{m}$ foi o mais frequente, correspondendo a 52,6% do total de fibras amostradas. Dos 47,4% restantes, 7,6% possuíam diâmetro inferior a $1,00\mu\text{m}$, 28,2% entre 2,01 e $3,00\mu\text{m}$, 9,0% entre 3,01 e $4,00\mu\text{m}$ e 1,7% entre 4,01 e $5,00\mu\text{m}$. Apenas 0,87% das fibras amostradas possuíam diâmetro superior a $5,01\mu\text{m}$.

Os animais que receberam isoenxertos de BALB/cJ apresentaram fibras regeneradas com diâmetros distribuídos entre 0,97 e $5,61\mu\text{m}$ e média $2,51 \pm 0,93\mu\text{m}$. Os intervalos 2,01 a $3,00\mu\text{m}$ e 1,01 a $2,00\mu\text{m}$ foram os mais frequentes correspondendo a 40,8% e 32,9% do total, respectivamente. Os 26,3% restantes estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 0,78% dessas fibras possuíam diâmetro inferior a $1,00\mu\text{m}$,

16,1% apresentaram dimensões entre 3,01 e 4,00 μm e 8,6% entre 4,00 e 5,00 μm . Foram observadas fibras com diâmetro superior a 5,01 μm , correspondendo a 0,78% do total.

3.2.3.2 Diâmetro das Fibras Mielínicas nos Nervos não Operados

(Figura 18, Tabela V)

O estudo morfométrico dos nervos normais mostrou haver diferenças significativas entre as médias dos DFM nos animais F1 provenientes dos dois tipos de cruzamento, ou seja, CxA e CxB. Porém, entre as linhagens isogênicas parentais, não foram observadas diferenças significativas nas médias do DFM.

Os nervos não operados (CL) dos animais F1 [CxA] apresentaram fibras mielínicas variando de 1,01 a 10,19 μm , com média $4,60 \pm 1,66\mu\text{m}$. Destas, 78,1% apresentaram diâmetro num intervalo de 2,01 a 6,00 μm , sendo a classe entre 3,01 e 4,00 μm , aquela que apresentou maior frequência de fibras, correspondendo a 24% do total amostrado. Os 54,1% restantes estavam distribuídos nos seguintes intervalos: 19,9% entre 4,01 e 5,00 μm , 18,0% entre 5,01 e 6,00 μm e 16,2% entre 2,01 e 3,00 μm . Ainda foram observadas 1,9% de fibras entre 1,01 e 2,00 μm e 20,9% de fibras com diâmetro superior a 6,00 μm . Estas últimas, estavam distribuídas em percentagens decrescentes nos intervalos restantes.

Os nervos não operados (CL) dos animais F1 [CxB] apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando de 1,35 a 10,94 μm e média $5,17 \pm 2,19\mu\text{m}$. Igualmente ao grupo

anterior, observou-se que grande percentagem das fibras mielínicas (66,9%) apresentaram diâmetro num intervalo de 2,01 a 6,00 μ m. Desta percentagem, 23,3% das fibras possuíam dimensões variando entre 3,01 e 4,00 μ m, 15,6% entre 4,01 e 5,00 μ m, 14,2% entre 2,01 e 3,00 μ m e 13,9% entre 5,01 e 6,00 μ m. Das fibras amostradas, 31,7% apresentaram diâmetro superior a 6,01 μ m, estando distribuídas em percentagens decrescentes nos intervalos subsequentes. Apenas 1,4% do total de fibras amostradas possuíam diâmetro entre 1,01 e 2,00 μ m.

A distribuição de frequência do DFM nos nervos não operados (CL) na linhagem C57BL/6J variou de 1,74 a 10,58 μ m apresentando uma média de $4,71 \pm 1,77\mu$ m. Neste grupo, os intervalos de 2,01 a 7,00 μ m correspondem a 88,9% do total das fibras mielínicas amostradas, sendo suas percentagens as seguintes: 17,2% entre 2,01 e 3,00 μ m, 22,4% entre 3,01 e 4,00 μ m, 17,7% entre 4,01 e 5,00 μ m, 19,1% entre 5,01 e 6,00 μ m e 12,5% entre 6,01 e 7,00 μ m. As fibras com diâmetro superior a 7,01 μ m apresentaram-se distribuídas de forma decrescente nas demais classes. Apenas 1,11% das fibras mielínicas possuíam dimensões entre 1,01 e 2,00 μ m.

As fibras mielínicas dos nervos não operados da linhagem A/J apresentaram diâmetros variando de 1,86 a 11,4 μ m e uma média de $5,01 \pm 2,16\mu$ m. A maior quantidade de fibras foi observada nos intervalos de 2,01 a 6,00 μ m, correspondendo a 69,8% do total amostrado. Destes, 19,1% encontravam-se entre 2,01 e 3,00 μ m, 20,9% entre 3,01 e 4,00 μ m, 14,5% entre 4,01 e 5,00 μ m e 15,1% entre 5,01 e 6,00 μ m. As fibras com diâmetros superiores a 6,01 μ m (29,4%) apresentaram-se distribuídas em percentagens decrescentes nas demais classes, como mostra o histograma, Apenas 0,9% das fibras mielínicas possuíam diâmetros entre 1,01 e 2,00 μ m.

Os nervos não operados dos animais da linhagem BALB/cJ apresentaram DFM variando de 1,71 a 11,09 μ m e média $4,85 \pm 1,90\mu$ m. De forma semelhante às demais linhagens isogênicas estudadas, as fibras mielínicas dos nervos não operados da linhagem BALB/cJ apresentaram uma maior frequência nas classes compreendidas entre 2,01 e 6,00 μ m, correspondendo a 74,0% do total amostrado. Destes 15,6% encontravam-se entre 2,01 e 3,00 μ m, 18,9% entre 3,01 e 4,00 μ m, 22,3% entre 4,01 e 5,00 μ m e 17,2% entre 5,01 e 6,00 μ m. As fibras com diâmetros superiores a 6,01 μ m (23,9%) apresentaram-se distribuídas em percentagens decrescentes nas demais classes. Apenas 2,1% das fibras mielínicas possuíam diâmetros entre 1,01 e 2,00 μ m.

3.2.3.3 - Diâmetro dos Axônios Mielínicos nos Grupos Experimentais

(Figuras 19 e 20, Tabela VI)

Os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de C57BL/6J apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,41 μ m e 5,40 μ m e uma média $2,30 \pm 0,88\mu$ m. As maiores percentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 1,01 μ m e 2,00 μ m e entre 2,01 μ m e 3,00 μ m, correspondendo a 35% e 42,3% do total, respectivamente. Os demais axônios, que representaram os 22,7% restantes, estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 4,1% possuíam diâmetros até 1,00 μ m, 14,6% entre 3,01 e 4,00 μ m, 2,8% entre 4,01 μ m e 5,00 μ m e apenas 1,2% diâmetros eram maiores do que 5,00 μ m.

Já os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de A/J apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,38 μ m e 4,8 μ m e uma média $2,09 \pm 0,86\mu$ m significativamente inferior àquela do grupo onde o doador era C57BL/6J e o receptor F1 [CxA]. Por outro

lado, igualmente a este último, as maiores percentagens de axônios foram observadas nos intervalos entre 1,01 μ m e 2,00 μ m e entre 2,01 μ m e 3,00 μ m, porém agora, correspondendo a 48,6% e 32,2% do total, respectivamente. Os 19,2% de axônios restantes estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 4,7% possuíam diâmetros até 1,00 μ m, 10,2% entre 3,01 μ m e 4,00 μ m, 4,3% entre 4,01 μ m e 5,00 μ m. Neste grupo não foram observados axônios regenerados com diâmetros maiores do que 5,00 μ m.

Os animais F1 [CxB] que receberam enxertos de C57BL/6J apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,46 μ m e 5,8 μ m e média $2,24 \pm 0,92\mu$ m. O intervalo formado pelos axônios que possuíam diâmetro entre 1,01 μ m e 2,00 μ m foi o que apresentou maior percentagem, correspondendo a 41,7% do total. Este foi seguido pelo intervalo entre 2,01 μ m e 3,00 μ m com 36%. As demais classes corresponderam aos 22,3% restantes, sendo 3,8% dos axônios apresentando diâmetro inferior a 1,00 μ m, 13,3% estando no intervalo de 3,01 a 4,00 μ m e 4,2% correspondendo ao grupo de 4,01 a 5,00 μ m. Apenas 1,1% dos axônios amostrados apresentou dimensões maiores que 5,01 μ m.

Os animais F1 [CxB] que receberam enxertos de BALB/cJ apresentaram axônios com diâmetros variando entre 0,43 μ m e 5,41 μ m. Comparativamente ao grupo onde o doador era C57BL/6J e o receptor F1 [CxB], este apresentou uma média estatisticamente inferior ($2,05 \pm 0,86\mu$ m). Contudo, da mesma forma que este último, a percentagem menor de axônios estava contida no intervalo de 2,01 a 3,00 μ m (26,9%), possuindo um maior número de axônios no intervalo de 1,01 a 2,00 μ m (52,9%). Os axônios com diâmetro inferior a 1,00 μ m, totalizaram 5,5%. O intervalo entre 3,01 e 4,00 correspondeu,

neste grupo, a 10,9% do total, sendo que o intervalo entre 4,01 e 5,00 μ m correspondeu a 3,5%. Por fim, apenas 0,3% dos axônios possuíam dimensões superiores a 5,00 μ m.

Os grupos que receberam isoenxertos de C57BL/6J, A/J e BALB/cJ não apresentaram diferenças significativas no que diz respeito ao DAM, sendo suas médias respectivamente $2,00 \pm 0,76\mu\text{m}$, $1,98 \pm 0,86\mu\text{m}$ e $1,87 \pm 0,81\mu\text{m}$.

O grupo onde foram utilizados isoenxertos de C57BL/6J, apresentou axônios variando de 0,36 a 4,20 μ m. Destes, 4,4% apresentaram diâmetro menor que 1,00 μ m, 50,7% entre 1,01 e 2,00 μ m, 33,6% entre 2,01 e 3,00 μ m, 9,2% entre 3,0 e 4,0 μ m e apenas 2,2% do total possuíam diâmetro entre 4,01 e 5,00 μ m. Não foram encontrados axônios mielínicos regenerados com diâmetro acima de 5,00 μ m.

Os axônios regenerados no grupo que recebeu isoenxertos de A/J variou de 0,45 a 5,94 μ m. Destes, 7,6% apresentaram diâmetro inferior a 1,00 μ m, 52,6% entre 1,01 e 2,00 μ m, 28,2% entre 2,01 e 3,00 μ m, 9,9% entre 3,01 e 4,00 μ m e apenas 1,7% do total possuíam diâmetro entre 4,01 e 5,00 μ m. Foram ainda observados, 0,87% de axônios apresentando diâmetro superior a 5,00 μ m.

No grupo onde os isoenxertos eram de BALB/cJ, o DAM variou de 0,41 a 4,63 μ m. Do total observado, 8,2% possuíam diâmetro inferior a 1,00 μ m, 60,0% entre 1,01 e 2,00 μ m, 19,6% entre 2,01 e 3,00 μ m e 10,6% entre 3,01 e 4,00 μ m. Os maiores axônios observados neste grupo, apresentaram-se entre 4,01 e 5,00 μ m.

3.2.3.4 - Diâmetro dos Axônios Mielínicos dos Nervos Não Operados

(Figura 21, Tabela VI)

A morfometria dos axônios mielínicos dos nervos não operados, mostrou haver diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos DAM nos grupos estudados. As médias do DAM nas linhagens C57BL/6J e BALB/cJ não apresentaram diferenças significativas, sendo elas respectivamente $3,21 \pm 1,21\mu\text{m}$ e $3,27 \pm 1,45\mu\text{m}$. Estas porém, foram inferiores àquela obtida na linhagem A/J ($3,55 \pm 1,60\mu\text{m}$).

Os F1 [CxB] apresentaram média de $3,65 \pm 1,60\mu\text{m}$ estatisticamente superior àquelas das linhagens parentais. Já os F1 [CxA] apresentaram média de $3,21 \pm 1,21\mu\text{m}$ que, comparada às médias das linhagens parentais, apresentou-se igual à de C57BL/6J, porém inferior à de A/J.

A distribuição de frequência do DAM na linhagem C57BL/6J variou de 1,04 a $7,76\mu\text{m}$. Neste grupo, 15,2% dos axônios mielínicos apresentaram diâmetro entre 1,01 e $2,00\mu\text{m}$, 32,4% entre 2,01 e $3,00\mu\text{m}$, 26,9% entre 3,01 e $4,00\mu\text{m}$ e 15,2% entre 4,01 e $5,00\mu\text{m}$. Os 10,3% restantes, apresentaram diâmetros superiores a $5,01\mu\text{m}$, estando distribuídos em percentagens decrescentes conforme o histograma.

Os axônios mielínicos dos nervos não operados da linhagem A/J apresentaram diâmetros variando de 1,07 a $8,96\mu\text{m}$. Destes 16,28% possuíam dimensões variando de 1,01 a $2,00\mu\text{m}$, 27,9% de 2,01 a $3,00\mu\text{m}$, 21,8% de 3,01 a $4,00\mu\text{m}$ e 17,4% de 4,01 a $5,00\mu\text{m}$. Os axônios com diâmetro acima de $5,01\mu\text{m}$ totalizaram 16,6% do total, estando distribuídos nos intervalos restantes.

Os nervos não operados da linhagem BALB/cJ, apresentaram DAM variando de 0,90 a 8,58 μ m. Os axônios contidos no intervalo de 2,01 e 3,00 μ m corresponderam a 33,6%, sendo os mais frequentes. Dos restantes, 16,0% representaram os axônios com diâmetro entre 1,01 e 2,00 μ m, 25,6% entre 2,01 e 3,00 μ m e 13,9% entre 4,01 e 5,00 μ m. Os axônios com diâmetro acima de 5,01 μ m totalizaram 10,5%, estando distribuídos nos intervalos restantes.

Os nervos não operados dos animais F1 [CxA] apresentaram axônios mielínicos variando de 0,57 a 7,54 μ m. Destes, 14,1% estavam no intervalo de 1,01 a 2,00 μ m, 37,9% entre 2,01 e 3,00 μ m, 22,4% entre 3,01 e 4,00 μ m e 16,86% entre 4,01 e 5,00 μ m. Os axônios com diâmetro acima de 5,01 μ m totalizaram 8,5% do total, estando distribuídos em percentagens decrescentes nos intervalos restantes.

Os nervos não operados dos animais F1 [CxB] apresentaram axônios mielínicos variando de 0,93 μ m a 8,10 μ m. Destes, 11,1% estavam no intervalo de 1,01 a 2,00 μ m, 30,9% entre 2,01 e 3,00 μ m, 22,1% entre 3,01 e 4,00 μ m e 16,7% entre 4,01 e 5,00 μ m. Os axônios com diâmetro acima de 5,01 μ m totalizaram 19,0% do total, estando distribuídos em percentagens decrescentes nos intervalos restantes.

3.2.3.5 - Espessura da Bainha de Mielina e Razão "g" nos Grupos Experimentais

(Figuras 22 e 23, TabelaVII)

O estudo morfométrico da **EBM** nos grupos experimentais mostrou não haver diferenças significativas entre os grupos que receberam isoenxertos. Da mesma forma, naqueles grupos cujos animais receptores eram F1 [CxA], não foram observadas diferenças significativas no que diz respeito à **EBM**. Porém, quando comparados os grupos onde os receptores eram F1 [CxB], constatou-se que suas médias eram estatisticamente distintas, sendo maior aquela do grupo onde o doador era BALB/cJ. De modo geral, observou-se que os perfis das distribuições de frequência da **EBM** apresentaram-se semelhantes em todos os grupos, sendo clara uma maior quantidade de axônios miélinicos com espessura de bainha entre 0,21 e 0,30 μ m.

Os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de C57BL/6J apresentaram valores de **EBM** distribuídos entre 0,08 e 0,67 μ m e média igual a 0,29 \pm 0,10 μ m. Destes, o intervalo que apresentou maior frequência, correspondendo a 40,7%, foi aquele entre 0,21 a 0,30 μ m, sendo seguido pelo intervalo entre 0,31 e 0,40 μ m, que representou 27,6% do total amostrado. Dois outros pequenos contingentes de axônios miélinicos, representando 17,5% e 11,8%, apresentavam bainha de mielina com espessura entre 0,11 e 0,20 μ m e entre 0,41 e 0,50 μ m, respectivamente. Somente 2,0% das espessuras amostradas apresentaram-se superiores a 0,51 μ m e apenas 0,41% inferiores a 0,10 μ m. A razão "g" neste grupo apresentou valores entre 0,39 e 0,94 e média de 0,78 \pm 0,07, mostrando-se estatisticamente superior à de qualquer outro grupo, exceto quando comparada ao grupo onde os receptores eram F1 [CxB] e os doadores C57BL/6J.

Os animais F1 [CxA] que receberam enxertos de A/J apresentaram uma resposta muito semelhante ao grupo onde os doadores eram C57BL/6J, sendo que suas fibras mielínicas possuíam uma **EBM** variando entre 0,12 e 0,69 μ m, com uma média de $0,30 \pm 0,09\mu$ m. A distribuição de frequência destes resultados mostrou que 43,1% dos axônios medidos apresentaram uma **EBM** variando num intervalo de 0,21 a 0,30 μ m. Os 56,9% restantes estavam distribuídos nas demais classes, sendo que 11,4% encontravam-se no intervalo de 0,11 a 0,20 μ m, 29,0% entre 0,31 e 0,40 μ m e 14,5% entre 0,41 e 0,50 μ m de espessura. Apenas 1,6% dos axônios medidos possuíam bainha de mielina com espessura superior a 0,51 μ m. A razão "g" neste grupo experimental variou de 0,48 a 0,91, possuindo uma média igual a $0,75 \pm 0,07$.

A distribuição de frequência da **EBM** no grupo onde os doadores eram F1 [CxB] e os receptores C57BL/6J, variou de 0,11 a 0,54 μ m, com média de $0,29 \pm 0,09\mu$ m. Os axônios mielínicos apresentaram predominantemente uma espessura de bainha variando entre 0,21 e 0,40 μ m, correspondendo a 72,8% do total amostrado, sendo que 42,1% estavam no intervalo de 0,21 a 0,30 μ m e 30,7% entre 0,31 e 0,40 μ m. As três classes restantes apresentaram-se distribuídas em percentagens decrescentes, correspondendo respectivamente a 15,2% (de 0,11 a 0,20 μ m), 9,9% (de 0,41 a 0,50 μ m) e 2,3% (superior a 0,51 μ m). Os valores da razão "g" estavam entre 0,40 e 0,89 com média de $0,78 \pm 0,07$.

Os animais F1 [CxB] que receberam enxertos de BALB/cJ apresentaram axônios mielínicos regenerados com uma **EBM** variando de 0,15 a 0,60 μ m, com média igual a $0,32 \pm 0,09\mu$ m. Esta foi significativamente superior à média obtida no grupo anterior, onde os doadores eram da linhagem C57BL/6J. Tal resultado é comprovado no histograma de frequência correspondente, onde observa-se dois intervalos com valores

próximos que totalizam 71,2%. O primeiro corresponde à classe de espessuras entre 0,21 a 0,30 μm , equivalendo a 37,8% do total e o segundo àquela entre 0,31 e 0,40 μm , equivalendo a 33,3% dos axônios amostrados. Ainda foram observadas espessuras distribuídas em mais três intervalos, os quais corresponderam respectivamente a 17,6% (0,41 a 0,50 μm), 8,0% (0,11 a 0,20 μm) e 3,2% (superior a 0,51 μm). Os valores da razão "g" apresentaram-se num intervalo de 0,37 a 0,88, com média de $0,74 \pm 0,07$. Esta foi significativamente inferior à observada no grupo anterior, denotando um maior índice de mielinização.

Os grupos compostos por animais que receberam isoenxertos de C57BL/6J, A/J e BALB/cJ não apresentaram diferenças significativas no que diz respeito à **EBM**, sendo suas médias respectivamente $0,30 \pm 0,08\mu\text{m}$, $0,31 \pm 0,10\mu\text{m}$ e $0,30 \pm 0,08\mu\text{m}$.

O grupo onde foram utilizados isoenxertos de C57BL/6J apresentou axônios mielínicos com **EBM** variando de 0,14 a 0,64 μm , estando distribuídos em seis classes. A mais frequente (47,6%) continha bainhas com espessura variando entre 0,21 e 0,30 μm , sendo seguida pela classe delimitada entre 0,31 e 0,40 μm que correspondeu a 31,0% do total. Apenas 13,1% das fibras regeneradas possuíam bainha de mielina com espessura superior a 0,41 μm e 8,3% eram inferiores a 0,20 μm . A razão "g" obtida neste grupo variou de 0,35 a 0,90, com média de $0,75 \pm 0,06$, sendo estatisticamente superior àquela obtida no grupo onde os isoenxertos eram de A/J.

Os animais que receberam isoenxertos de A/J apresentaram axônios mielínicos regenerados com **EBM** entre 0,01 e 0,70 μm , distribuídos em sete classes, onde 45,1% do total encontravam-se num intervalo de 0,21 a 0,30 μm . Dos 54,9% restantes, 28,8%

possuíam **EBM** entre 0,31 e 0,40 μ m, 9,3% eram inferiores a 0,20 μ m e 16,8% eram superiores a 0,41 μ m.

Nos animais que receberam isoenxertos de BALB/cJ os valores obtidos para **EBM** variaram de 0,14 a 0,54 μ m. Novamente uma maior percentagem de axônios com **EBM** no intervalo de 0,21 a 0,30 μ m foi observada (45,1%). Ainda neste grupo, 33,0% das fibras amostradas apresentaram bainha com espessura entre 0,31 e 0,40 μ m. Dos 21,5% restantes, 6,3% continha **EBM** inferior a 0,20 μ m e 15,3% superior a 0,41 μ m.

3.2.3.6 - Espessura da Bainha de Mielina e Razão "g" nos Nervos não

Operados

(Figura 24, Tabela VII)

A morfometria dos axônios mielínicos dos nervos não operados mostrou haver diferenças significativas entre as médias da EBM nos grupos estudados. As médias da EBM obtidas nas linhagens C57BL/6J e BALB/cJ apresentaram-se estatisticamente diferentes, sendo elas $0,70 \pm 0,29\mu\text{m}$ e $0,67 \pm 0,26\mu\text{m}$, respectivamente. Estas porém, não foram diferentes da média da EBM dos animais A/J ($0,68 \pm 0,26\mu\text{m}$).

Os F1[CxA] apresentaram média de $0,66 \pm 0,25\mu\text{m}$, estatisticamente a mesma das linhagens parentais. Já os animais F1[CxB] apresentaram média igual a $0,72 \pm 0,30\mu\text{m}$, que comparada às médias das linhagens parentais apresentou-se estatisticamente semelhante. Porém, observou-se que os animais F1[CxB], apresentaram axônios com uma EBM superior aos F1[CxA]. No que diz respeito a razão "g", os cinco grupos controle não apresentaram diferenças significativas entre suas médias.

A distribuição de frequência da EBM dos animais F1[CxA] variou de 0,17 a 1,27 μ m. Neste grupo, os intervalos compreendidos entre 0,31 e 1,00 μ m corresponderam a 86,1% do total. Dos 13,8% restantes, 5,1% possuíam espessura inferior a 0,30 μ m, enquanto que 8,8% foram superiores a 1,00 μ m. Os valores da RZG neste grupo estavam entre 0,50 e 0,87, com média de $0,70 \pm 0,05$.

Os axônios mielínicos presentes nos nervos não operados dos animais F1[CxB], apresentaram EBM variando entre 0,19 e 1,60 μ m. Deste total, 60,1% possuíam espessura variando de 0,31 a 0,80 μ m e 33,4% de 0,81 a 1,30 μ m. Os axônios com EBM acima de 1,30 μ m totalizaram 2,27% e aqueles abaixo de 0,30 μ m, 4,25%. A RZG variou de 0,57 a 0,83, com média de $0,70 \pm 0,04$.

Os nervos não operados pertencentes aos animais da linhagem A/J, apresentaram axônios com uma EBM variando de 0,24 a 1,58 μ m, com média igual a $0,70 \pm 0,29\mu$ m. Dois intervalos foram os mais frequentes, computando 95,7% do total amostrado. O primeiro corresponde àquele entre 0,31 e 0,90 μ m, representando 73,3%, sendo o segundo entre 0,91 e 1,30 μ m, totalizando 22,4%. Dos 4,3% restantes, 1,7% correspondiam a axônios com EBM inferior a 0,30 μ m e 2,6% com EBM superior a 1,30 μ m. A RZG neste grupo variou de 0,54 a 0,81, com média igual a $0,70 \pm 0,05$.

A distribuição de frequência da EBM no grupo de animais da linhagem C57BL/6J variou de 0,16 a 1,33 μ m, com média de $0,67 \pm 0,26\mu$ m. Os axônios mielínicos apresentaram-se predominantemente em dois intervalos, os quais corresponderam a 91,4% do total amostrado. O primeiro representando 54,3%, continha axônios com EBM de 0,30

a $0,70\mu\text{m}$ e o segundo, com 32,1% do total, possuía axônios com EBM entre $0,70$ e $1,10\mu\text{m}$. Os 8,6% restantes estavam presentes em dois outros intervalos, correspondendo respectivamente a 2,2% (inferior a $0,30\mu\text{m}$) e 6,4% (superior a $1,10\mu\text{m}$). Os valores da RZG estavam entre 0,47 e 0,86, com média $0,69 \pm 0,06$.

Os animais da linhagem BALB/cJ apresentaram axônios mielínicos com EBM variando entre $0,25$ e $1,34\mu\text{m}$, com média de $0,67 \pm 0,26\mu\text{m}$. Dois intervalos foram os mais frequentes, correspondendo a 95,2% do total amostrado. O primeiro corresponde àquele entre $0,30$ e $0,80\mu\text{m}$, representando 67,0%, e o segundo entre $0,80$ e $1,22$, totalizando 28,2%. Dos 4,8% restantes, 2,9% possuíam EBM inferior a $0,30\mu\text{m}$ e 1,9% possuíam EBM superior a $1,20\mu\text{m}$. Os valores da RZG estavam entre 0,49 e 0,79 com média $0,70 \pm 0,05$.

4. DISCUSSÃO

A regeneração do SNP depende basicamente da capacidade das células não neurais do nervo em reorganizar a região lesionada em tempo hábil, proporcionando um microambiente adequado para o subsequente crescimento axonal e da capacidade intrínseca dos neurônios para desenvolver a resposta regenerativa após uma lesão (Fawcett & Keynes, 1990; Fawcett, 1992). Desta forma, o delineamento do modelo experimental empregado neste trabalho baseou-se nos dados ora existentes sobre a participação e a importância relativa dos elementos neurais e não neurais no processo da regeneração nervosa periférica.

Nos últimos anos, têm-se dado grande ênfase ao estudo das modificações que ocorrem, a curto e longo prazo, no comportamento das células não neurais e no microambiente do nervo em resposta a uma determinada lesão. Neste sentido, muitas evidências experimentais comprovaram que os primeiros eventos subsequentes à axotomia, envolvendo as CS (Ide et al., 1983; Gulati, 1988; Hall, 1986) e os macrófagos (Dahlin, 1995), são determinantes para o sucesso da regeneração axonal futura.

Particularmente, Dahlin (1995), estudando a importância da invasão do nervo em degeneração pelos macrófagos, mostrou que se esta for impedida, há uma significativa diminuição no crescimento axonal de fibras sensitivas, durante o processo regenerativo subsequente. Neste experimento, segmentos de nervo ciático de ratos, inseridos em compartimentos construídos com filtros de celulose (millipore), que impediam a invasão de qualquer tipo celular em seu interior, foram implantados subcutaneamente. Após 3 ou 14 dias, os mesmos segmentos de nervo foram enxertados no nervo ciático contra-lateral dos mesmos animais. A regeneração axonal sensitiva foi monitorada empregando-se o chamado "pinch reflex test". Os resultados mostraram que nos enxertos onde impediu-se a

invasão de macrófagos, a regeneração axonal, após 6 dias, foi significativamente inferior àquela obtida nos grupos onde a degeneração Walleriana transcorreu normalmente. Estes resultados foram compatíveis com os obtidos por Beuche & Friede (1984), utilizando protocolo experimental semelhante, e por Stoll et al. (1989), empregando técnicas imunohistoquímicas para o estudo de nervos transecionados e regenerados por períodos variando de 1 a 28 dias.

Os macrófagos são comprovadamente células efectoras da remoção dos fragmentos axonais e da bainha de mielina durante a degeneração Walleriana. Além disso, recentemente, Bruck et al. (1995), baseando-se em experimentos *in vivo* e *in vitro* com camundongos C57BL/Ola e C57BL, propuseram que a invasão destas células no microambiente neural é influenciada e modulada pela quebra da homeostase do nervo, resultante principalmente da fragmentação dos axônios e da bainha de mielina. Por outro lado, Lu et al. (1990) obtiveram evidências que, apesar dos camundongos da linhagem C57BL/6J apresentarem deficiências no recrutamento de macrófagos, esta não seria a causa principal de sua baixa capacidade regenerativa axonal em resposta a uma lesão.

Nossas observações qualitativas dos nervos pré-degenerados provenientes das três linhagens estudadas, mostraram, após duas semanas da lesão, uma morfologia condizente com as descrições presentes na literatura (Cajal, 1928; Gibson, 1979; Stoll et al., 1989). Tal morfologia caracterizava-se pela presença de um ambiente endoneural dilatado, muito rico em fibras colágenas, contendo ainda um pequeno número de fibras nervosas em franco processo degenerativo (Figura 3). Ao microscópio eletrônico, pudemos identificar diversos macrófagos presentes no microambiente do nervo em degeneração. Estes apresentavam fagossomos eletrondensos, preenchidos por lipídeos provavelmente

provenientes das bainhas de mielina. Em alguns casos ainda, observamos axônios inteiros em degeneração, apresentando em seu axoplasma, microtúbulos e microfilamentos agregados de maneira a formar corpos eletrondensos (Figura 3), semelhantes aos descritos por Beuche & Friede (1984). Assim, nossos resultados sugerem que o processo de degeneração Walleriana transcorreu de forma semelhante nas três linhagens de camundongos isogênicos utilizadas, promovendo uma organização do microambiente nervoso para um subsequente repovoamento axonal, previamente aos procedimentos de transplante do enxerto para o animal receptor.

Outro importante tipo celular comprometido no processo da degeneração Walleriana são as células de Schwann (CS). Sabe-se que após a transecção do nervo, as CS entram em processo mitótico acelerado, desenvolvendo atividade fagocítica e, juntamente com os macrófagos, participam da retirada dos resíduos de axônios e fragmentos de bainha de mielina (Morris et al. 1972; Nathaniel & Pease, 1963).

Estudando a importância das CS no processo da degeneração nervosa, Beuche & Friede (1984), fazendo uso de tubos de milipore, cujas paredes impediam o trânsito celular, isolaram segmentos de nervos frênico e ciático de camundongos, implantando-os no espaço intraperitoneal desses animais. Observaram, a partir deste modelo experimental, que as CS apenas rejeitavam suas bainhas de mielina, não proliferando e não demonstrando capacidade fagocítica. Stoll et al. (1989) e White et al. (1989), porém, empregando técnicas imunohistoquímicas, utilizando anticorpos específicos para proteína básica de mielina, obtiveram resultados comprobatórios da participação ativa das CS em tal processo. Estes autores observaram imunomarcagem positiva do conteúdo de

fagossomos presentes no interior do citoplasma das CS, demonstrando a presença de lipídeos componentes da bainha de mielina.

Em nosso estudo qualitativo, observamos a ocorrência de uma grande proliferação das CS no microambiente dos nervos transecionados, nas três linhagens estudadas. Não foram observadas porém, diferenças morfológicas entre elas, sugerindo uma resposta semelhante das CS nos camundongos C57BL/6J, A/J e BALB/c. Tal fato pode ser reforçado pela análise dos resultados quantitativos relacionados aos parâmetros morfométricos de espessura da bainha de mielina e razão "g", que serão discutidos adiante.

A degeneração Walleriana tem sido amplamente estudada por constituir-se num importante evento que precede a regeneração nervosa, podendo, em alguns casos, ser empregada no sentido de intensificá-la. De fato, Kerns et al. (1993), através de transplantes de nervo ciático, demonstraram que, em ratos, após um período de uma semana de pré-degeneração, os autoenxertos promoviam uma regeneração significativamente superior àquela promovida pelos nervos frescos, 10 dias após o transplante.

Utilizando um protocolo semelhante ao de Kerns et al. (1993), Danielsen et al. (1994) observaram que autoenxertos de nervos pré-degenerados por um período de 1 a 28 dias, promoviam uma aceleração do processo regenerativo quando comparados aos enxertos frescos. Estes resultados foram obtidos pela análise da taxa de crescimento axonal (mm/dia) e do período (dias) entre a lesão e o início da regeneração axonal no enxerto. Baseados nestes parâmetros, os enxertos pré-degenerados por um período de 14

dias, mostraram-se capazes de acelerar a resposta regenerativa axonal. Estes resultados sustentam nossa hipótese que o período de 14 dias de pré-degeneração empregado em nosso modelo experimental, foi suficiente para aumentar o número de CS e promover a organização do microambiente do enxerto para a regeneração axonal.

É importante ressaltar que o tipo de lesão empregada por Danielsen et al. (1994) foi o esmagamento do nervo, enquanto que em nosso estudo, a pré-degeneração do doador foi realizada por meio de transecção do nervo ciático. É amplamente conhecido que a transecção corresponde a uma lesão mais intensa que o esmagamento, promovendo uma degeneração Walleriana mais pronunciada (Seddon, 1943). Isto porque no esmagamento, os cotos permanecem conectados por meio das bainhas conjuntivas, sem rompimento dos tubos de membrana basal. Por outro lado, na transecção os cotos proximal e distal são separados. Além disso, sabe-se que, duas semanas após a transecção, os níveis de NGF no coto distal atingem valores cinco vezes superiores aos observados no nervo normal. Paralelamente, até três semanas após axotomia, nesta mesma região, os níveis de mRNA^{NGF} permanecem dez a quinze vezes superiores aos observados em nervos normais (Heumann et al., 1987).

Portanto, confrontando os dados reportados na literatura com os nossos achados morfológicos, acreditamos que os enxertos pré-degenerados empregados neste estudo, contendo pequeno número de axônios em degeneração, poucos fragmentos de bainha de mielina e grande número de CS, sustentaram e mesmo aceleraram o crescimento axonal (Figura 3).

Tal hipótese ainda pode ser reforçada pelo fato de que, empregando-se a transecção e não se permitindo que ocorra a subsequente reinervação do coto distal,

mantêm-se relativamente altos os níveis de fatores neurotróficos no microambiente do enxerto (Heumann et al., 1987). Adicionalmente, as CS, já organizadas nas bandas de Bungner permanecem expressando grande quantidade de receptores de baixa afinidade para neurotrofinas (Tainiushi et al., 1988; Funakoshi et al., 1993). No caso de pré-degeneração por esmagamento, haveria o crescimento axonal no interior da porção do nervo a ser transplantada (Dahlin, 1995), dificultando a regeneração axonal no animal receptor.

No presente trabalho, propusemos um modelo experimental baseado no emprego de transplantes homólogos de nervos ciáticos pré-degenerados. Com isto, buscamos obter dados para o melhor entendimento da baixa capacidade regenerativa axonal apresentada pela linhagem C57BL/6J. Consideramos que, com este protocolo seria possível oferecer o microambiente de regeneração do nervo desta linhagem a uma de maior capacidade e vice-versa.

Contudo, o protocolo de transplante entre as linhagens isogênicas incorreria na rejeição dos enxertos, uma vez que estas apresentam complexo principal de histocompatibilidade diferentes. Sabe-se que a linhagem C57BL/6J possui um haplótipo H-2 do tipo b, enquanto que as linhagens BALB/c e A/J apresentam haplótipo do tipo a do tipo d respectivamente. De fato, recentemente, Levi & Bunge (1994) demonstraram, através de técnicas imunohistoquímicas que, CS humanas transplantadas em nervos regenerados de ratos imunodeficientes eram preservadas e mantinham suas propriedades funcionais. Porém, quando este procedimento foi realizado utilizando-se como receptores animais imunocompetentes da linhagem BALB/c, a maioria das CS transplantadas foi

eliminada por um profuso infiltrado inflamatório. Além disso, grande porcentagem das CS remanescentes foi incapaz de produzir bainha de mielina.

Assim, procurando evitar a rejeição dos enxertos, utilizamos como receptores, animais híbridos advindos do cruzamento de C57BL/6J com A/J e BALB/c, obedecendo-se assim a terceira lei fundamental dos transplantes (Roitt et al., 1993). Por outro lado, ao empregarmos este protocolo, houve a necessidade de quantificarmos a capacidade regenerativa axonal dos animais F1[CxA] e F1[CxB]. Para isso, utilizamos como parâmetro, a contagem do número total de axônios mielínicos regenerados após seis semanas da tubulização do nervo ciático desses animais. Este procedimento foi empregado pois, na literatura, há estudos comparativos da regeneração axonal entre as linhagens C57BL/6J, A/J e BALB/cJ (Da-Silva et al., 1990; Lainetti et al., 1995), os quais nos serviram como base para avaliar nossos resultados.

Os resultados obtidos com este modelo, demonstraram não haver diferença entre o número de axônios mielínicos regenerados entre os F1[CxA] e F1[CxB]. Da mesma forma, comparando-se esses resultados com aqueles obtidos por Lainetti et al. (1995), observou-se que os animais F1[CxA] e F1[CxB] apresentaram um número de axônios mielínicos semelhante ao das linhagens BALB/c e A/J. Assim, enquanto camundongos da linhagem C57BL/6J apresentaram 1024 ± 178 axônios mielínicos regenerados, A/J 1788 ± 95 axônios e BALB/cJ 1618 ± 64 axônios (Lainetti et al., 1995), os animais F1[CxA] apresentaram 1617 ± 228 axônios e F1[CxB] 1788 ± 425 axônios (Figura 15, Tabela II).

Estas observações foram importantes para a validação do nosso modelo experimental, uma vez que os dois grupos de animais F1 apresentaram características

regenerativas semelhantes. Desta forma, a contagem dos axônios mielínicos regenerados e os dados morfométricos obtidos nos experimentos de transplantes puderam ser comparados entre si, evitando-se a rejeição dos enxertos, uma vez que havia histocompatibilidade entre os animais doadores e receptores.

A análise da morfologia dos nervos regenerados após 4 semanas do transplante, mostrou ser esta muito semelhante em todos os grupos (Figuras 3 a 11). Observou-se que uma CS sempre estava relacionada a apenas uma fibra mielínica, enquanto que vários axônios amielínicos compartilhavam prolongamentos de uma única CS. Os nervos regenerados apresentaram fibras mielínicas e amielínicas tipicamente organizadas em minifascículos. Eles eram delimitados por prolongamentos de células perineurais apresentando membrana basal ao seu redor, condizendo com as descrições presentes na literatura (Cajal, 1928; Gibson, 1979; Stoll et al., 1989).

Tal padrão de minifasciculação foi descrito por diversos autores que utilizaram a técnica de tubulização (Scaravilli, 1984; Da-Silva, 1987; Le Beau et al., 1988), assim como por outros pesquisadores, utilizando técnicas diferentes de reparo cirúrgico de nervos periféricos, tais como neurorrafia (Sunderland, 1978). Este quadro também descrito por Morris et al. (1972), ao nível de microscopia eletrônica, parece constituir-se num processo de compartimentalização que visa o restabelecimento da homeostase no ambiente de regeneração do nervo.

Em nosso caso, a ocorrência da minifasciculação pode ser explicada considerando-se a seqüência de eventos citológicos que ocorrem quando são implantadas próteses tubulares vazias. Nesta situação, decorridas aproximadamente 24 horas do implante, o

espaço entre os cotos é inicialmente preenchido por um fluido de composição semelhante ao plasma sanguíneo que, a seguir, dá lugar à formação de uma matriz de fibrina (Longo et al., 1983; Williams et al., 1983). Esta primeira estrutura sólida que interliga os dois cotos, serve como substrato para a migração de células não neurais provenientes dos mesmos. As primeiras células a migrarem para o interior do tubo são os fibroblastos, seguidas pelas CS (Lundborg, 1980; Longo et al., 1983; LeBeau et al., 1988). Com relação a estas últimas, embora tenha havido certa controvérsia, é consenso atualmente que sua migração independe do crescimento dos brotamentos axonais (Aguayo et al., 1973; Keynes, 1987; LeBeau et al., 1988; Williams et al., 1993; Abernethy et al., 1994).

Neste contexto, acreditamos que o processo de regeneração nervosa, subsequente ao transplante dos enxertos, transcorreu de maneira semelhante em todos os grupos experimentais. Considerando ainda os nossos resultados morfológicos, verifica-se que os enxertos provenientes das linhagens isogênicas não foram rejeitados e promoveram um suporte adequado à regeneração axonal nos animais F1 receptores. É razoável portanto supor que isto foi possível principalmente devido à sobrevivência das CS nos enxertos. Assim, acreditamos ter obtido evidências que validam a utilização deste protocolo experimental para avaliar o desempenho das CS no ambiente do nervo em regeneração.

Os resultados quantitativos, pertinentes ao número total dos axônios mielínicos regenerados, foram divididos em dois conjuntos considerando-se o tipo de transplante realizado. O primeiro conjunto constituiu-se dos grupos **1** (D:C57BL/6J; R:F1[CxA]), **2** (D:A/J; R: F1[CxA]), **3** (D:C57BL/6J; R:F1[CxB]) e **4**(D:BALB/cJ; R:F1[CxB]) (**aloenxertos**). O segundo conjunto constituiu-se dos grupos **5** (D:C57BL/6J; R: C57BL/6J); **6** (D:A/J; R:A/J) e **7** (D:BALB/cJ; R:BALB/cJ) (**isoenxertos**).

Os transplantes referentes ao primeiro conjunto de grupos tiveram como objetivo principal comparar a resposta regenerativa axonal promovida pelos enxertos de C57BL/6J, A/J e BALB/c nos receptores F1[CxA] e F1[CxB]. Este procedimento visou investigar se a baixa capacidade regenerativa axonal apresentada pela linhagem C57BL/6J é fruto de uma incapacidade das células não neurais do nervo, de reorganizarem seu microambiente após a lesão.

Observamos que o número de axônios mielínicos regenerados nos animais que receberam enxerto de C57BL/6J foi, em termos absolutos, inferior ao obtido quando o enxerto era de A/J, sendo porém superior ao de BALB/cJ (Figura 12, Tabelas I e III). Por outro lado, analisando-se o número de axônios mielínicos existentes nos nervos contralaterais dos animais receptores, observou-se haver diferenças significativas entre eles. Estes resultados tornaram necessário o cálculo de um valor relativo que levasse em conta o número inicial de axônios mielínicos presentes no nervo ciático do animal receptor (nAN), bem como o número final de axônios regenerados (nAR). Calculou-se então uma relação entre o nAR e o nAN, obtendo-se assim um valor que denominamos coeficiente regeneração axonal (CR). A partir dos valores de CR calculados, observou-se não haver diferenças estatísticas entre o número de axônios mielínicos regenerados nos grupos onde os enxertos eram provenientes de C57BL/6J ou de A/J, isto é, grupos 1, 2 e 3 (Figura 14, Tabela IV). Estes porém mantiveram-se superiores aos observados no grupo 4, onde o enxerto era proveniente de camundongos BALB/cJ.

Os transplantes realizados no segundo conjunto de grupos tiveram como objetivo principal servir de controle dos grupos de aloenxerto no que diz respeito a eventuais

processos de rejeição, uma vez que nos isoenxertos não há incompatibilidade de MHC. Estes grupos tiveram como finalidade adicional, estudar também do ponto de vista quantitativo, a influência da pré-degeneração do enxerto na regeneração axonal. Para isso foram comparados o número e os parâmetros morfométricos dos axônios regenerados observados nos isoenxertos de C57BL/6J, A/J e BALB/c.

Os resultados obtidos nestes grupos mostraram não haver diferenças significativas do número de axônios mielínicos regenerados nos três grupos de isoenxertos, tanto em valores absolutos quanto relativos (CR). Por outro lado, é interessante observar que ao se oferecer um isoenxerto pré-degenerado aos animais C57BL/6J, estes apresentaram um aumento da resposta regenerativa axonal, igualando-se àquela apresentada pelos camundongos A/J e BALB/cJ (Lu et al., 1990; Da-Silva et al., 1991; Lainetti et al., 1995). Assim, este fato nos leva a crer que nos camundongos C57BL/6J exista, após uma lesão nervosa, uma possível dissincronia entre os eventos da degeneração Walleriana e o início da regeneração axonal. Provavelmente, empregando-se a pré-degeneração do enxerto previamente ao transplante, tenha-se minimizado esta deficiência, o que resultou numa maior regeneração axonal.

Nossas observações são reforçadas pelos achados presentes na literatura, onde também há outros indícios mostrando que a menor capacidade regenerativa axonal apresentada pela linhagem C57BL/6J seja resultado de problemas neuronais surgidos subsequentemente a lesão. Lu et al. (1994), utilizando linhagens recombinantes de C57BL/6J e A/J comprovaram, em estudo preliminar, que a baixa regeneração axonal apresentada pelos camundongos C57BL/6J deve-se a características genéticas associadas a múltiplos loci, sendo os neurônios sensitivos aparentemente os mais prejudicados.

Recentemente, Lainetti et al. (1995), fazendo uso da técnica de tubulização do nervo ciático associada à marcação dos neurônios sensitivos e motores com HRP (peroxidase do rábano silvestre), concluíram que há uma extensa morte dos neurônios sensitivos nos camundongos C57BL/6J, o que poderia justificar o baixo número de axônios regenerados.

Com o objetivo de testar a hipótese de que o ambiente não neural dos camundongos C57BL/6J não apresenta diferenças comparativamente àqueles das linhagens A/J e BALB/cJ, nosso estudo quantitativo baseou-se na análise morfométrica do DFM, do DAM, da EBM e da RZG. O estudo do comportamento das CS em particular, foi realizado a partir dos valores da EBM e da RZG, enquanto que a resposta regenerativa axonal foi considerando-se os resultados de DFM e DAM.

A EBM é um parâmetro morfológico que ilustra diretamente o nível de atividade fisiológica das CS durante a regeneração, estando também relacionada à recuperação funcional do nervo, tendo sido utilizada na avaliação da evolução do processo regenerativo axonal por diversos autores (Lundborg, 1982; Levi & Bunge, 1994; Langone, 1991; Pollard & McLeod, 1980). A RZG, que corresponde ao quociente entre DAM e DFM, é um parâmetro morfométrico que expressa a relação que se estabelece entre a CS e o axônio durante a regeneração funcional do nervo (Rushton, 1951; Smith & Koles, 1970; Waxman, 1980).

Nossos resultados morfométricos mostraram que a EBM dos axônios regenerados nos animais F1[CxA] e F1[CxB], que receberam enxertos de C57BL/6J, A/J ou BALB/c, foi estatisticamente igual. Da mesma forma, nos grupos onde foram realizados isoenxertos, a EBM dos axônios regenerados foi estatisticamente semelhante, inclusive não

apresentando diferenças em relação aos grupos dos homoenxertos (Tabela VII). A partir desses resultados, parece-nos lícito concluir que as CS presentes nos enxertos de C57BL/6J, A/J e BALB/cJ devem apresentar características metabólicas semelhantes. Assim, estes dados contribuem para a consolidação da hipótese de que a menor capacidade regenerativa axonal dos camundongos C57BL/6J não seria promovida por deficiências no microambiente não neural, particularmente pelas CS.

Analisando-se os resultados da RZG, observa-se que os grupos de aloenxertos que receberam transplantes de C57BL/6J apresentaram valores estatisticamente superiores aos demais grupos, que por sua vez, não diferiram entre si (Tabela VIII). Isto possa talvez ser justificado pelo fato dos axônios mielínicos regenerados, amostrados nestes grupos, apresentarem dimensões (DFM e DAM) estatisticamente superiores aos demais grupos.

Ainda a este respeito, os valores do DFM bem como do DAM podem ser ilustrativos para um melhor entendimento das características regenerativas intrínsecas do microambiente de nervo nos camundongos C57BL/6J. Curiosamente, os camundongos receptores F1[CxA] e F1[CxB] que receberam enxertos de C57BL/6J apresentaram DFM e DAM estatisticamente superiores aos grupos onde os enxertos foram de A/J ou de BALB/cJ, bem como nos grupos dos isoenxertos (Figuras 16 e 17, Tabelas V e VI). Estes resultados nos levam a propor a hipótese de que o microambiente do nervo dos camundongos C57BL/6J apresenta características intrínsecas capazes de promover e sustentar o processo regenerativo axonal de forma igual, ou mesmo mais eficiente que as linhagens A/J ou BALB/cJ. Além disso, a baixa capacidade regenerativa axonal da linhagem C57BL/6J poderia ser consequência de uma dissincronia espaço-temporal entre os axônios em regeneração e os estímulos presentes no microambiente do nervo. Isto

justificaria o resultado positivo da regeneração axonal, no que diz respeito ao DFM e DAM, ao transplantar-se um segmento de nervo de C57BL/6J num animal F1 com características regenerativas semelhantes às outras linhagens empregadas neste estudo.

De fato, Waegh et al. (1992) e, mais recentemente, Snipes & Suter (1994) ressaltaram a importância da relação entre o axônio e CS. Estes autores propuseram que o diâmetro axonal poderia ser de alguma forma modulado pelas CS que influenciariam a quantidade de neurofilamentos polimerizados no axoplasma. Provavelmente, um dos mecanismos envolvendo as glicoproteínas associadas à mielina (MAGs) promoveria a ativação ou desativação de fosforilases, levando à polimerização ou despolimerização de neurofilamentos no axoplasma. Quando esta relação não se processa normalmente, como por exemplo nos camundongos mutantes BALB/c Trembler, ocorre tanto uma redução da taxa de mielinização quanto uma diminuição do diâmetro axonal, diretamente relacionadas à baixa taxa de polimerização dos neurofilamentos no axoplasma (Waegh et al., 1992).

Diversos pesquisadores, nos últimos anos, também têm reforçado a importância da interação axonal com fatores neurotróficos presentes no microambiente do nervo durante o processo regenerativo (para revisão vide Beck et al., 1994). Inúmeros estudos têm demonstrado que após uma axotomia, desencadeia-se uma série de alterações à nível de síntese de fatores de crescimento e neurotrofinas, assim como expressão de seus receptores de baixa e alta afinidade (Beck et al., 1994; Tainiuchi et al., 1988; Rorsching, 1993; Derby et al., 1993; Sendtner et al., 1992; Funakoshi et al., 1993). É amplamente conhecido que todas as neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5) ligam-se a um receptor de baixa afinidade (p75^{NGFR}), havendo também para cada uma delas, receptores

de alta afinidade (TrK-Receptores Tirosina Kinase dependentes), denominados TrKA (NGF), TrKB (BDNF e NT4) e TrKC (NT3) (Meakin & Shooter, 1992).

Em um estudo minucioso, Funakoshi et al. (1993) observaram que no nervo ciático normal, os níveis de NGF, BDNF e NT-4/5 são baixos, enquanto que os níveis de NT-3 mostram-se relativamente altos. Paralelamente, os receptores de alta afinidade para as neurotrofinas acompanham o padrão de expressão de seus ligantes específicos, ou seja, trkA e trkB (NGF, BDNF e NT-4/5, respectivamente) apresentam-se em pequenas quantidades enquanto que trkC (NT-3) é abundante. Embora as CS presentes no nervo ciático normal apresentem baixos níveis de mRNA para os receptores trkB, elas contêm altos níveis desses receptores truncados, necessitando apenas o domínio tirosino-kinase intracelular para tornarem-se ativos. Após a transecção do nervo, os níveis de NGF e BDNF aumentam rapidamente nas CS presentes no coto distal, e os níveis de NT3 e NT4 declinam. Neste período, a expressão de todos os receptores de alta afinidade é amplamente reduzida no coto distal, enquanto que os níveis do receptor de baixa afinidade (p75^{NGFR}) aumentam grandemente até que a relação CS/axônio seja restabelecida.

Assim, conjugando os resultados obtidos no presente estudo com o que se conhece atualmente sobre a neurobiologia da linhagem C57BL/6J, bem como sobre a dinâmica da expressão das neurotrofinas e seus receptores durante a regeneração nervosa periférica, propomos que a baixa capacidade regenerativa axonal apresentada por esta linhagem possa ser decorrente de uma defasagem espaço-temporal na produção e expressão das neurotrofinas e seus receptores pelas CS e axônios após a lesão do nervo. Em outras palavras, tal deficiência resultaria da baixa estimulação do coto proximal para emitir brotamentos axonais, devido a uma possível expressão reduzida de receptores de alta

afinidade para moléculas neurotróficas, pela célula nervosa, nos estágios mais precoces do processo regenerativo do axônio.

Esta hipótese entretanto, necessita de ampla comprovação. A investigação da mesma deve ser feita ao nível molecular, através de experimentos que permitam quantificar a produção e expressão dos fatores neurotróficos, bem como de seus receptores específicos, durante a regeneração nervosa periférica nestes animais.

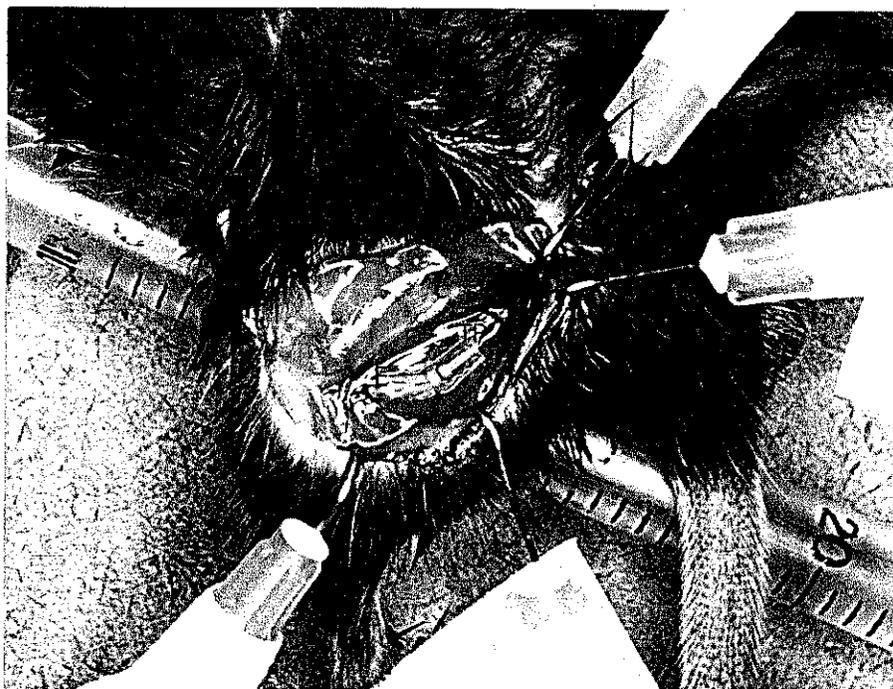
5. CONCLUSÕES

- 1) Os nervos pré-degenerados provenientes das três linhagens estudadas mostraram, duas semanas após a transecção, uma morfologia condizente com as descrições da literatura, não sendo observadas diferenças entre eles.
- 2) As células de Schwann presentes nos nervos pré-degenerados das três linhagens estudadas mostraram-se ultraestruturalmente semelhantes.
- 3) O prazo de duas semanas de pré-degeneração mostrou-se eficiente para obter-se um enxerto contendo um grande número de células de Schwann, bem como poucos axônios em processo degenerativo.
- 4) O modelo experimental de transplante de nervos pré-degenerados, proposto neste trabalho, mostrou-se eficiente para o estudo dos fatores que promovem e/ou limitam a regeneração do Sistema Nervoso Periférico.
- 5) A utilização de animais híbridos F1 como receptores de aloenxertos de nervo, foi eficiente na prevenção da rejeição dos mesmos.
- 6) Os animais F1[CxA] e F1[CxB] não apresentaram diferenças significativas do número de axônios mielínicos regenerados, seis semanas após tubulização do nervo ciático.
- 7) Os nervos regenerados, quatro semanas após o transplante, mostraram-se morfológicamente semelhantes, estando as fibras nervosas organizadas em minifascículos delimitados por camadas concêntricas de células perineurais.

- 8) Os resultados evidenciaram que o microambiente do nervo dos camundongos C57BL/6J foi capaz de dar um suporte adequado ao processo de regeneração axonal.
- 9) Os resultados quantitativos evidenciaram que a pré-degeneração dos enxertos foi capaz de igualar a resposta regenerativa axonal nas três linhagens estudadas.
- 10) Os resultados morfométricos referentes à espessura da bainha de mielina e à razão “g” mostraram que as células de Schwann mielinizaram os axônios regenerados de forma semelhante nas três linhagens estudadas.
- 11) A baixa capacidade regenerativa axonal apresentada pelos camundongos da linhagem isogênica C57BL/6J provavelmente está relacionada a uma dissincronia temporal e espacial entre os eventos regenerativos subsequentes à lesão do nervo.

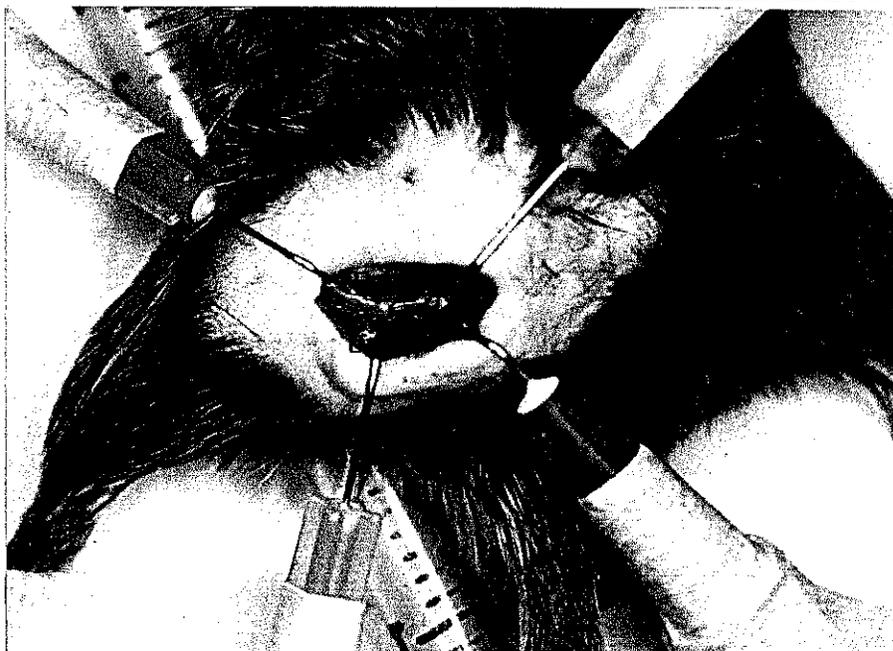
6. FIGURAS E TABELAS

A.



6,0 mm

B.

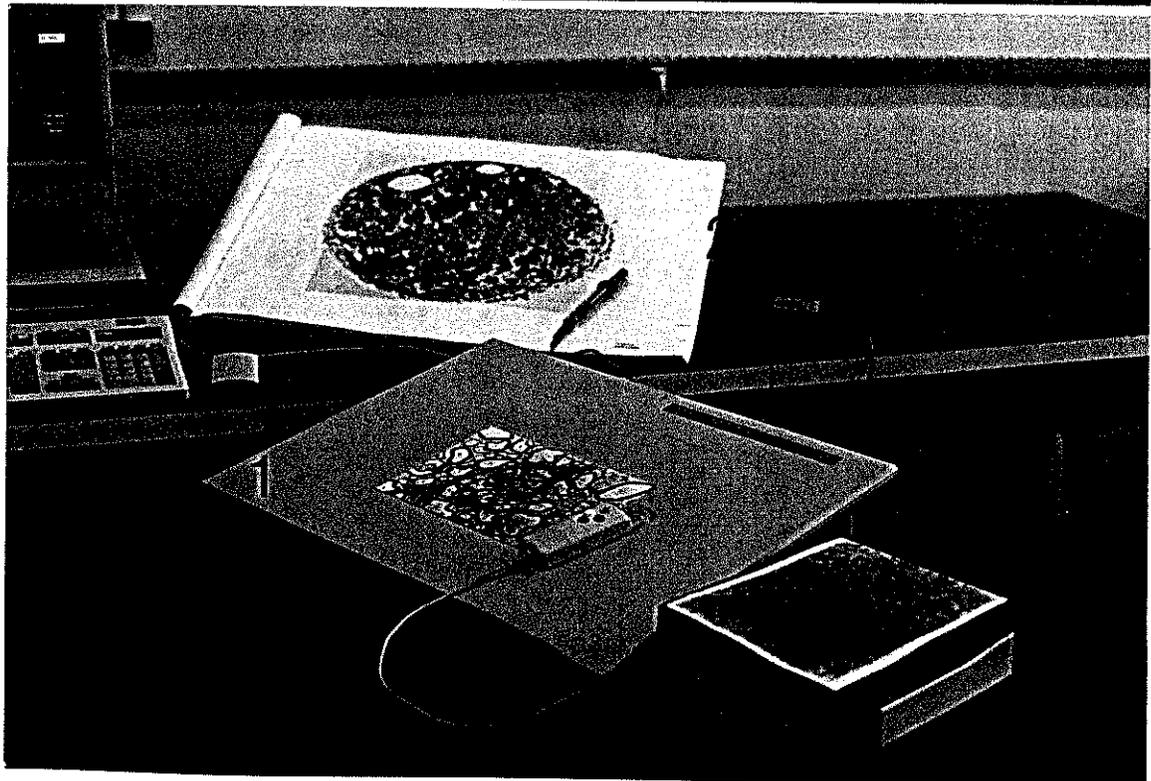


8,0 mm

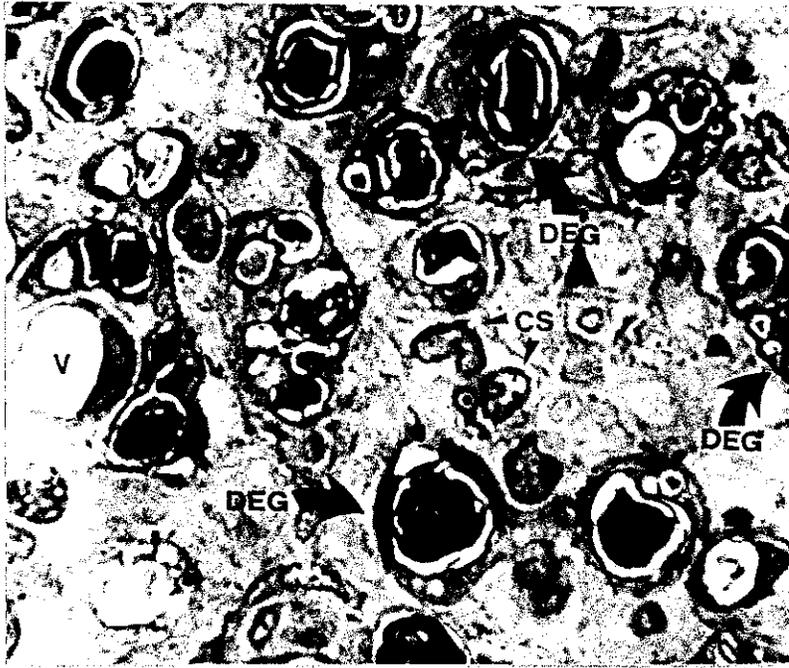
A.



B.

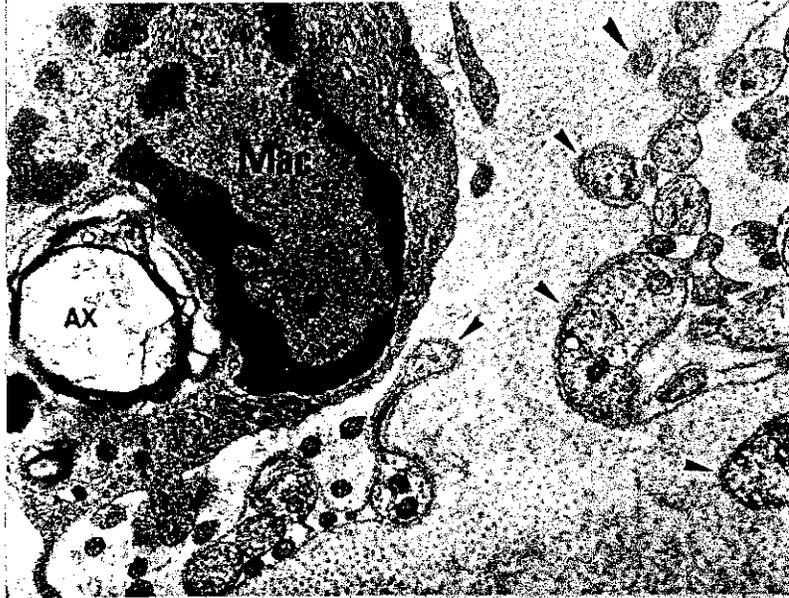


A.



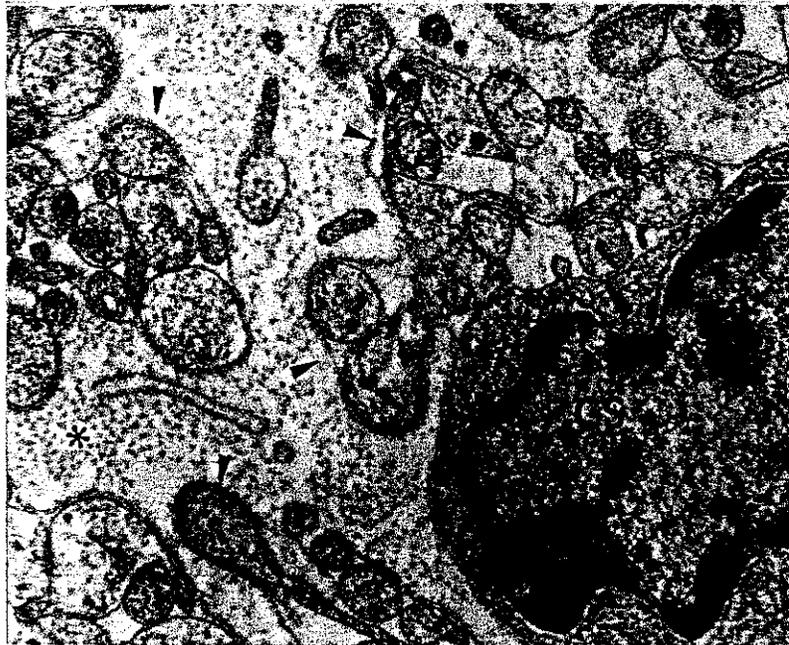
10 μ m

B.



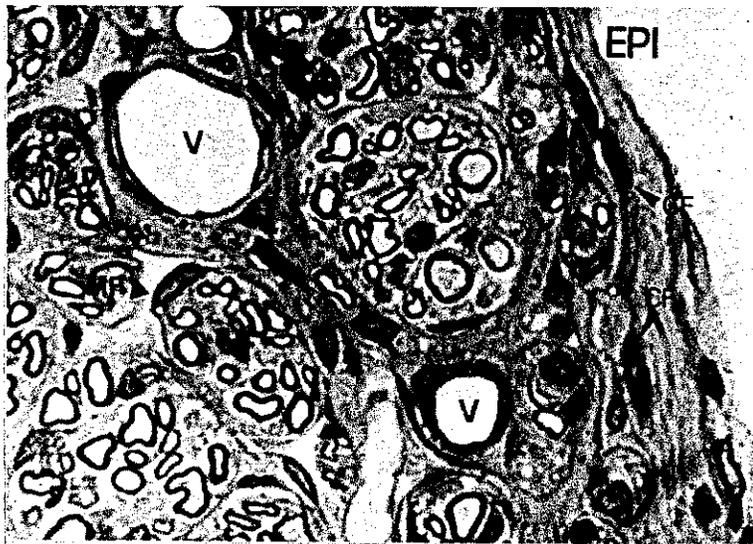
1 μ m

C.



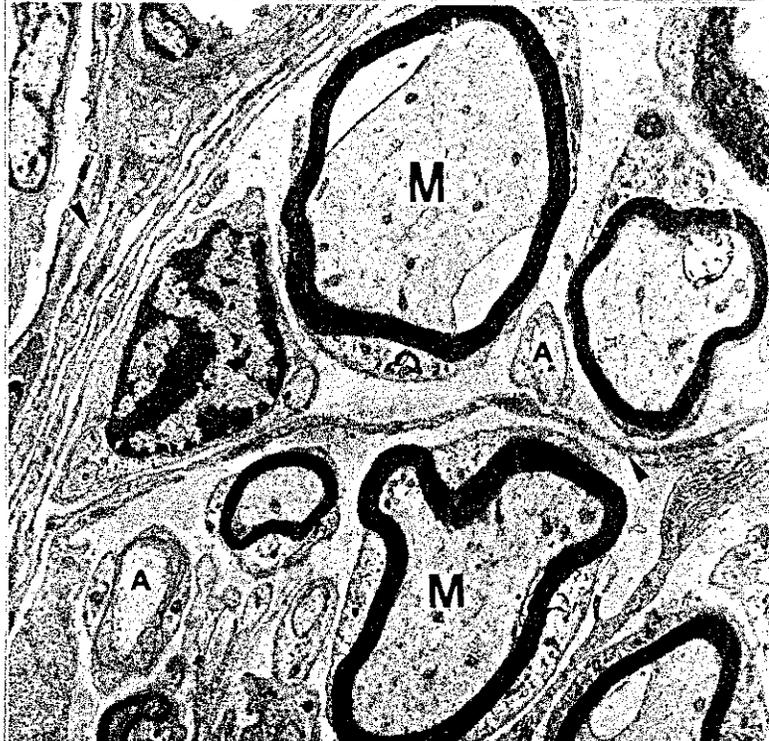
1 μ m

A.



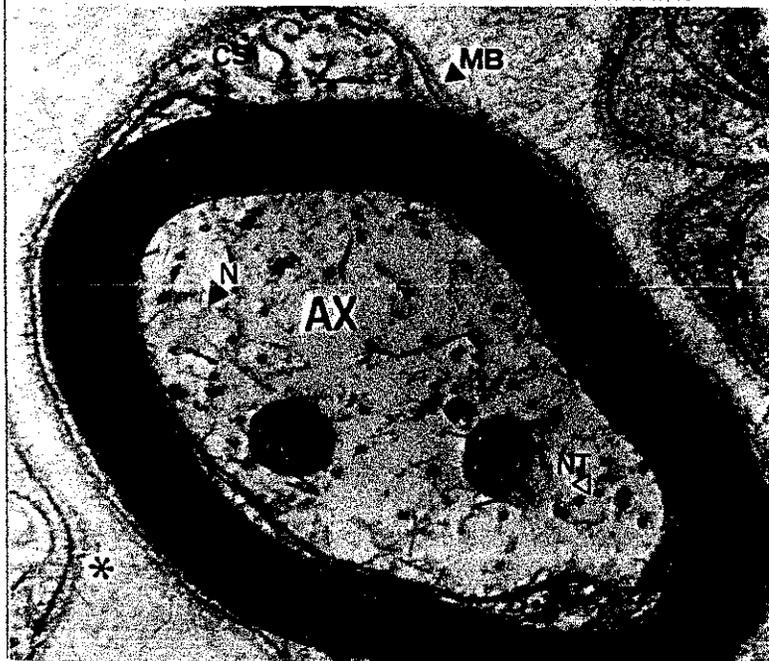
12,5 μm

B.



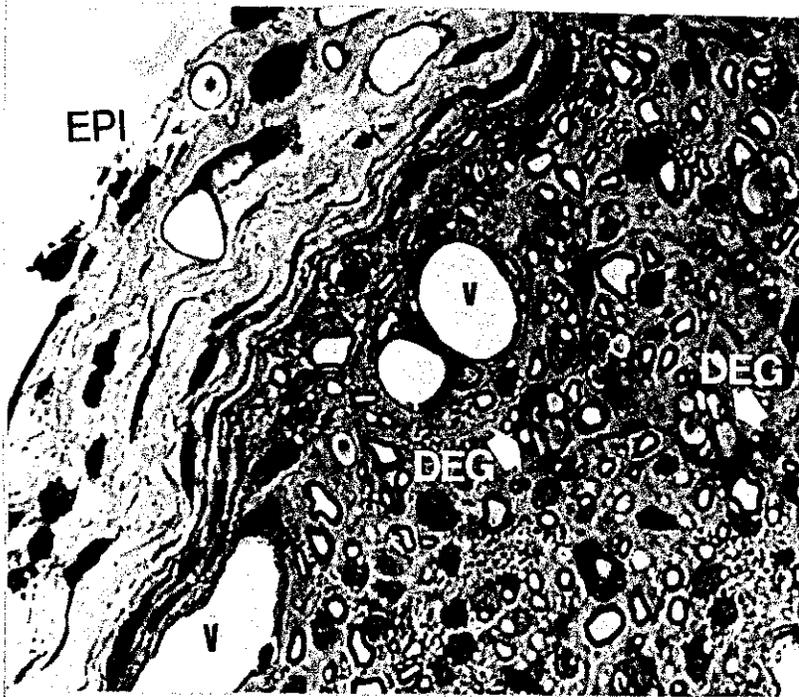
2 μm

C.



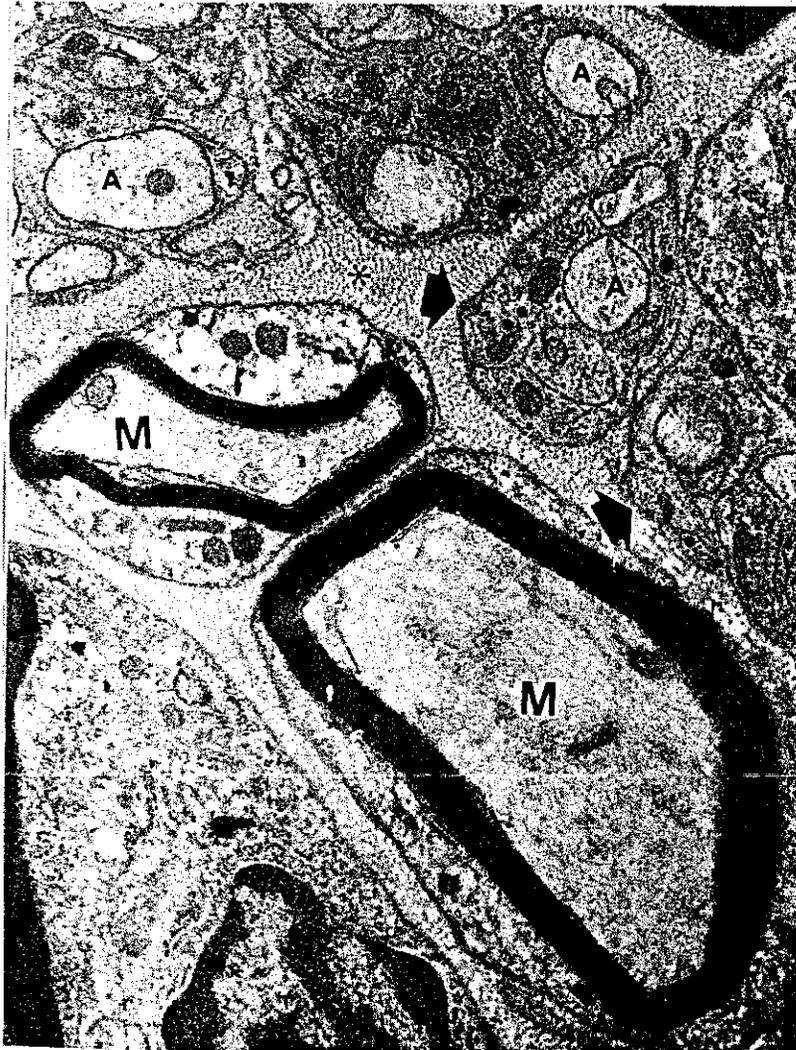
0,5 μm

A.



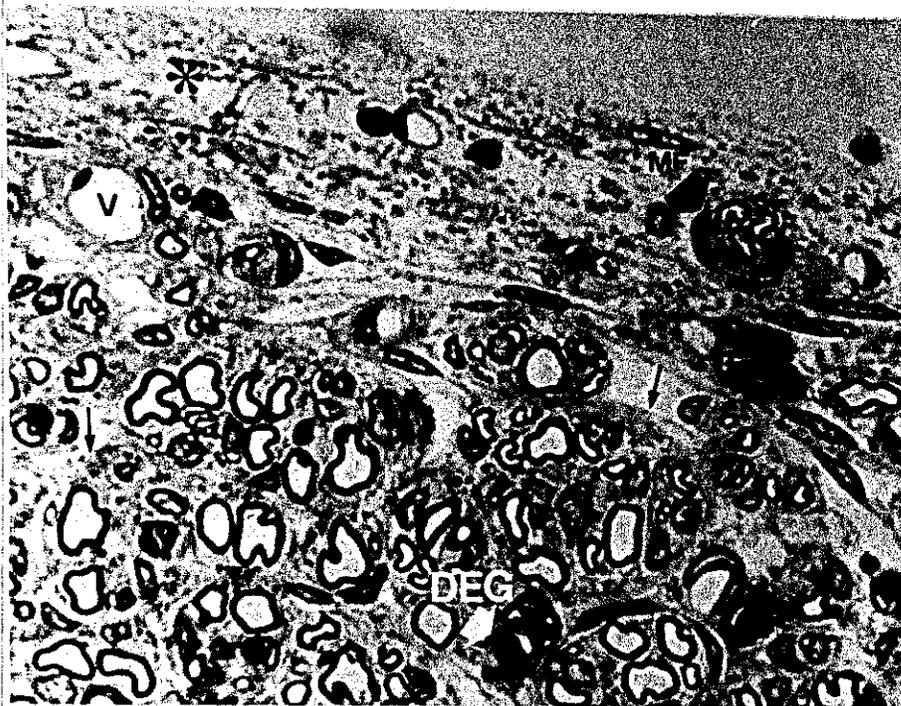
12,5 μ m

B.



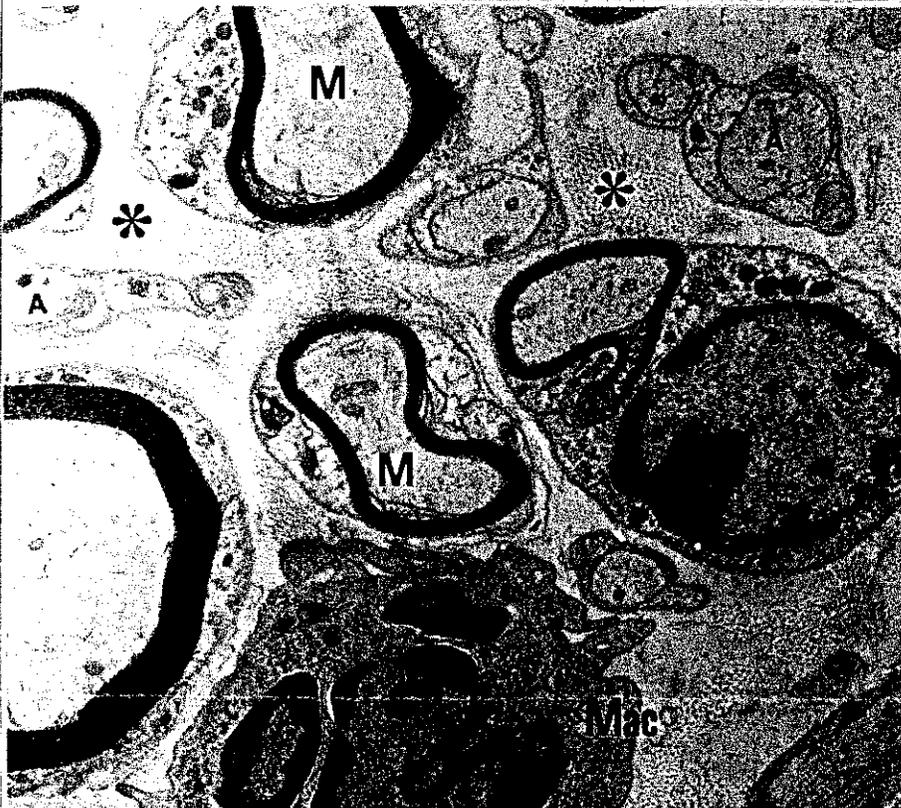
1 μ m

A.



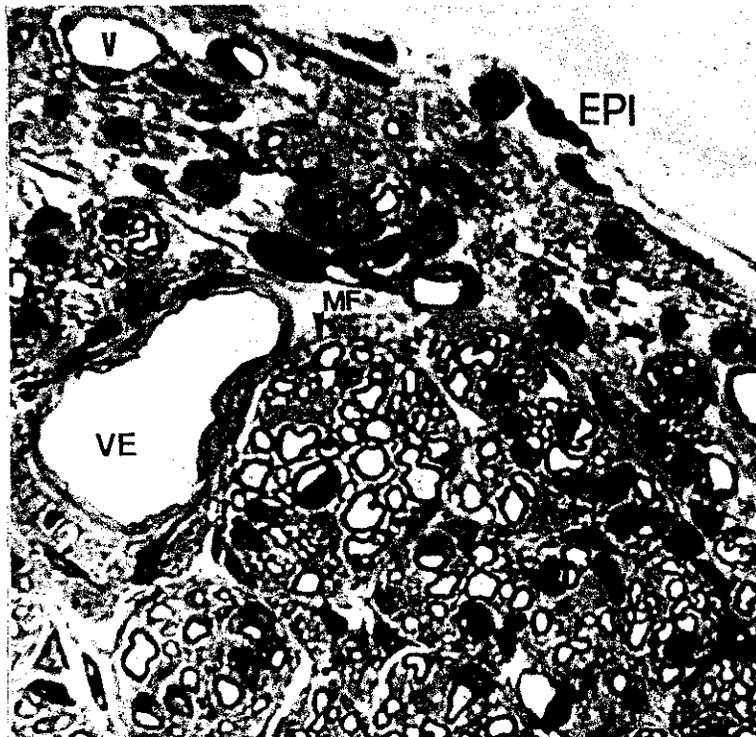
12,5 μm

B.



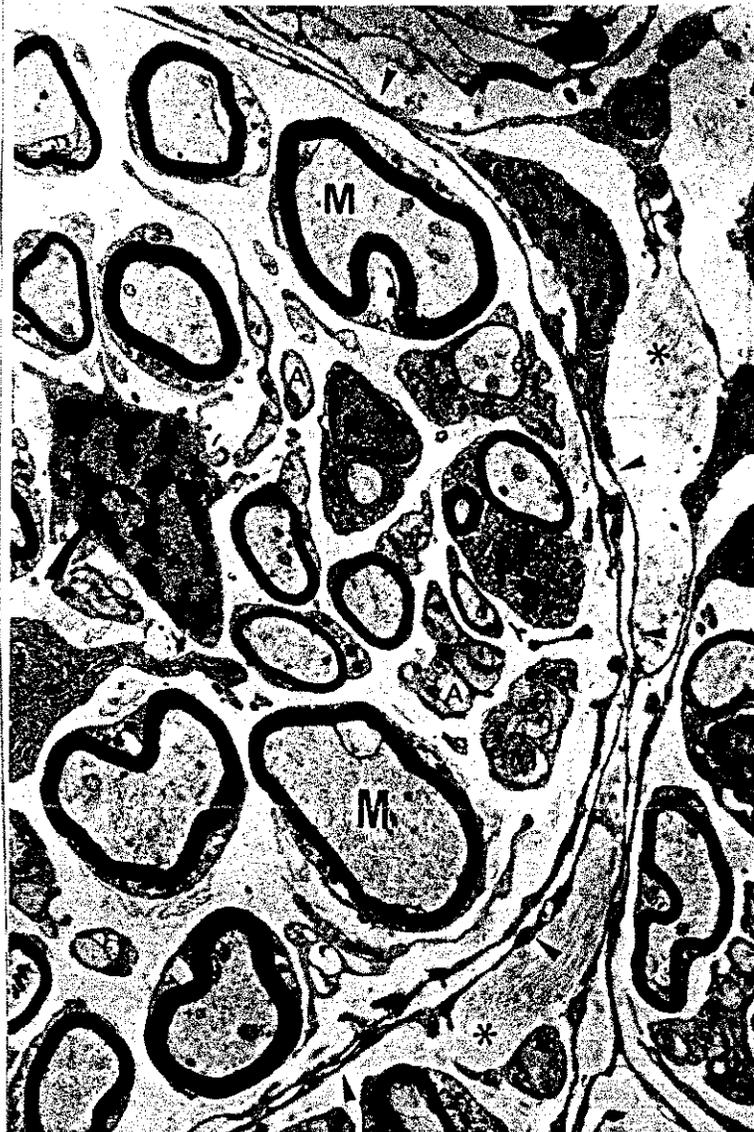
1 μm

A.

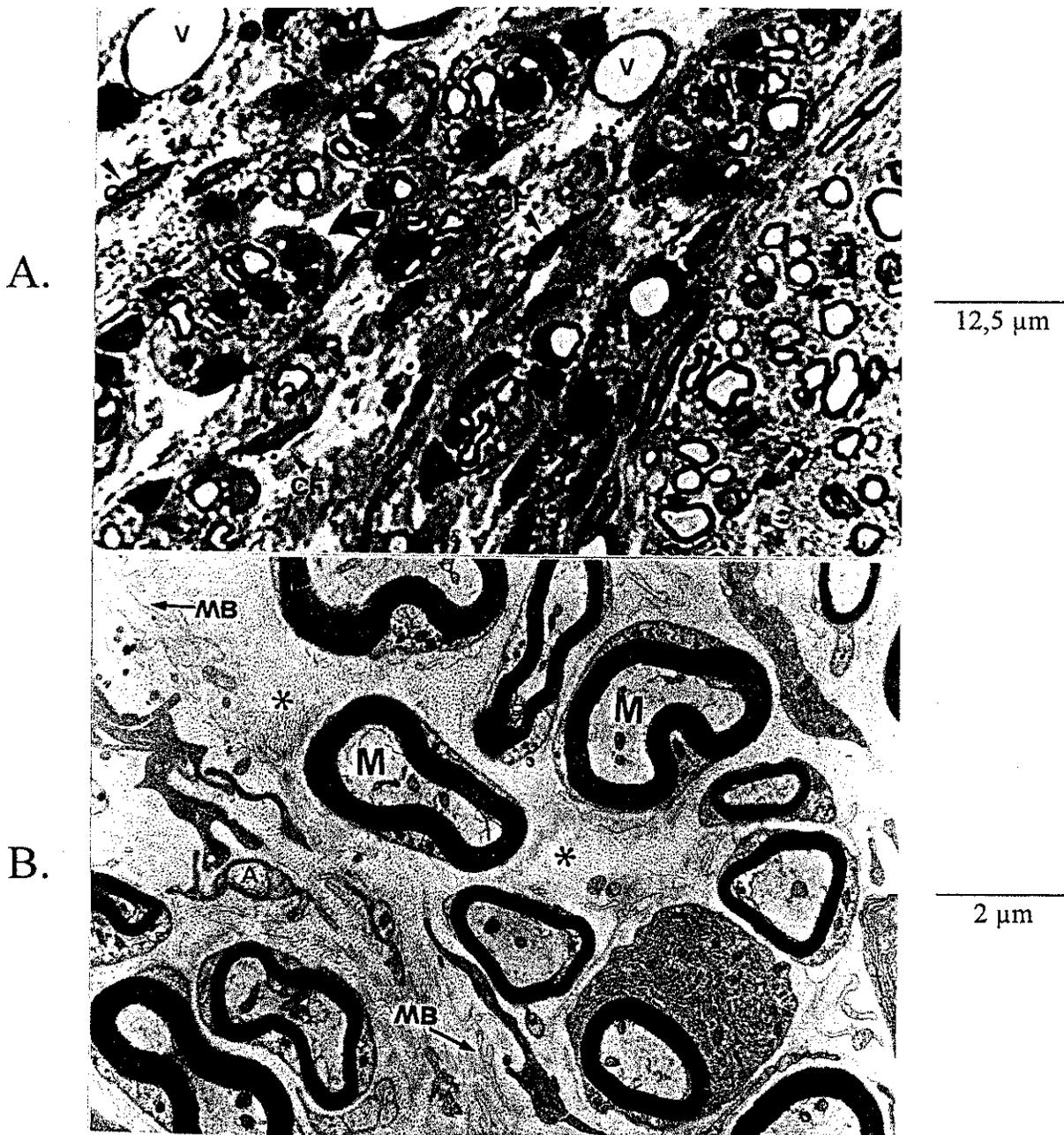


12,5 μ m

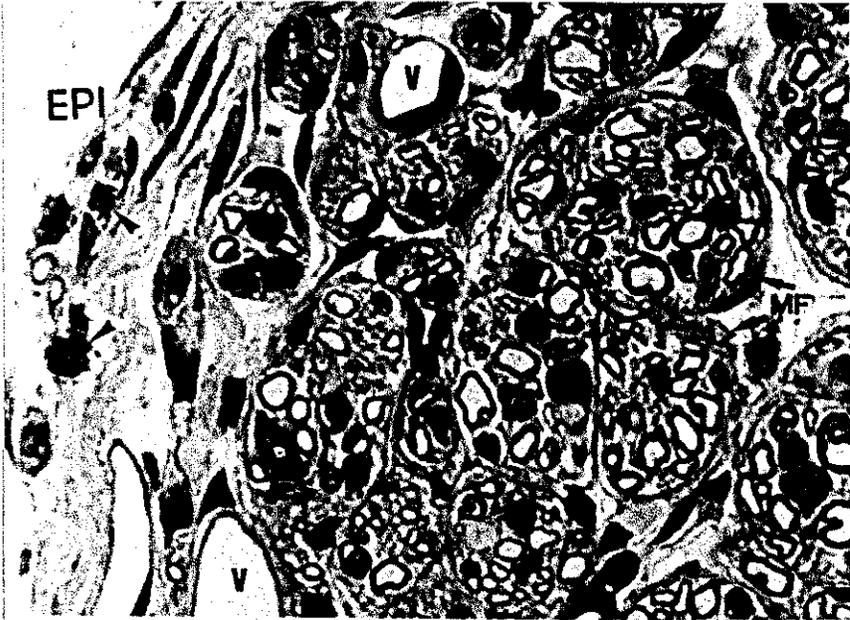
B.



2 μ m

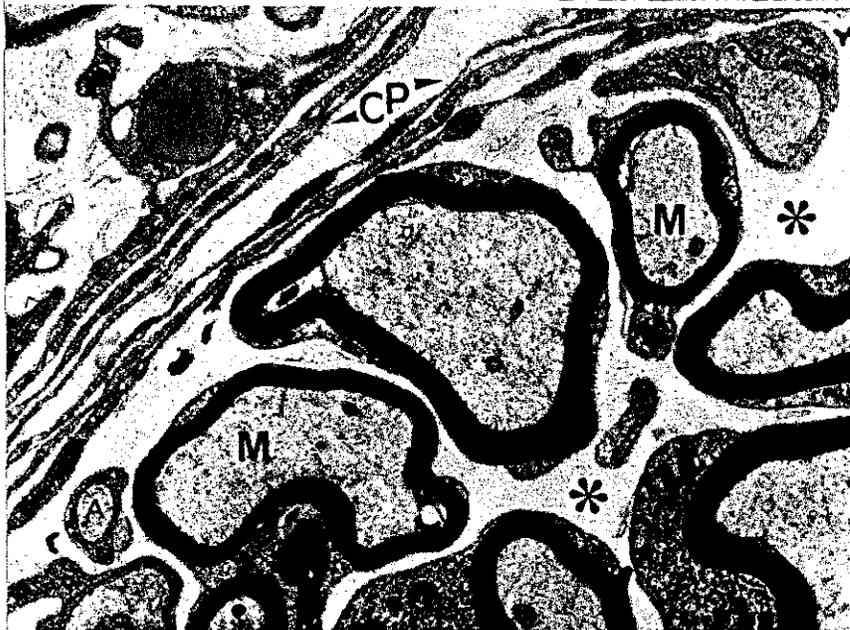


A.



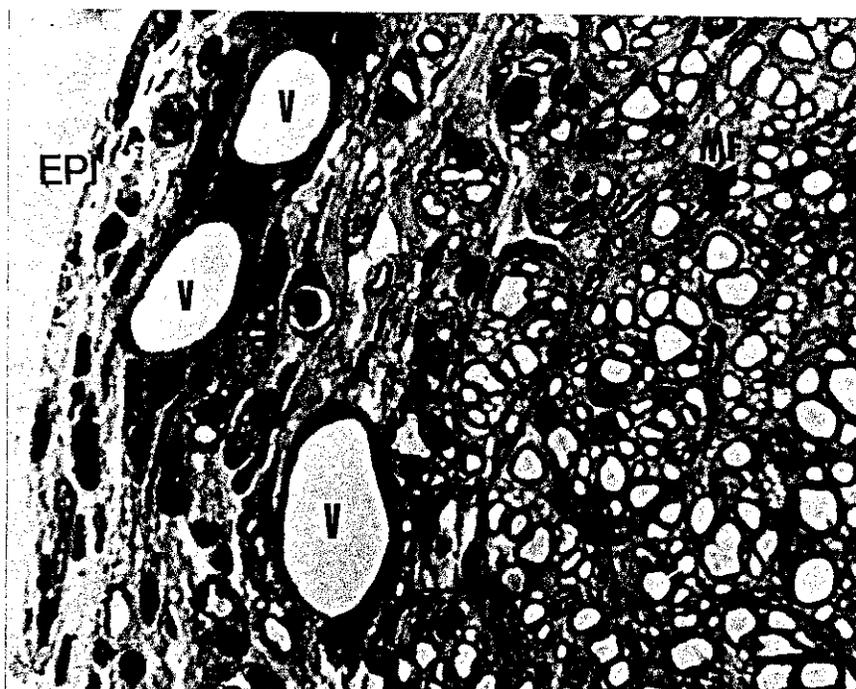
12,5 μm

B.



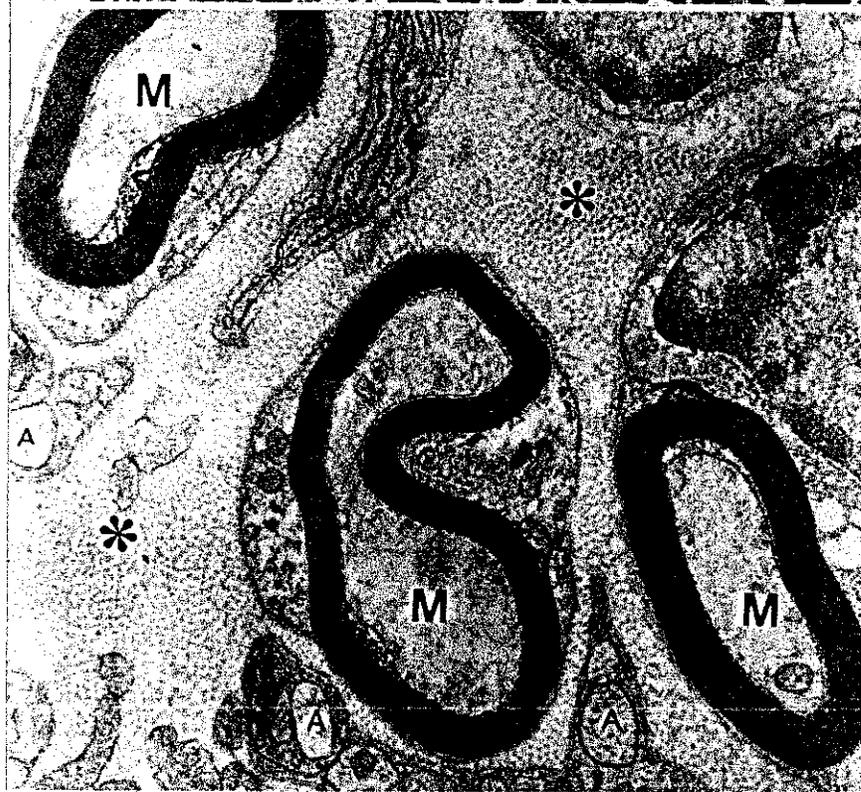
1 μm

A.



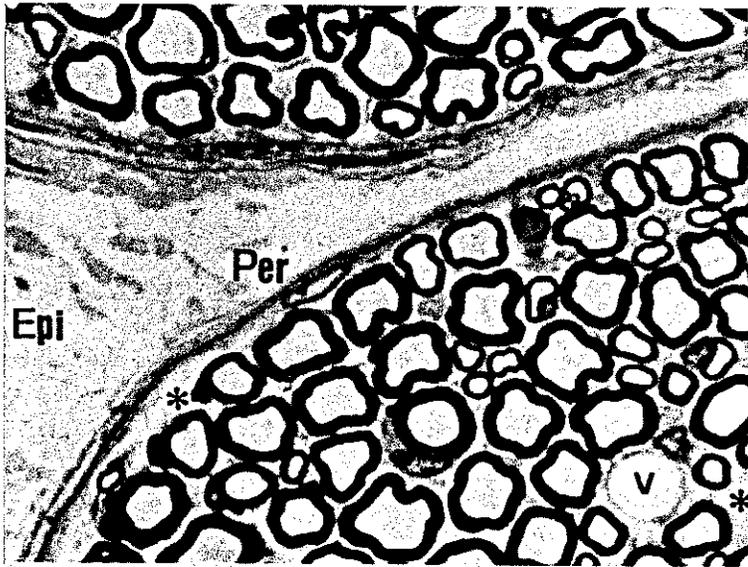
12,5 μ m

B.



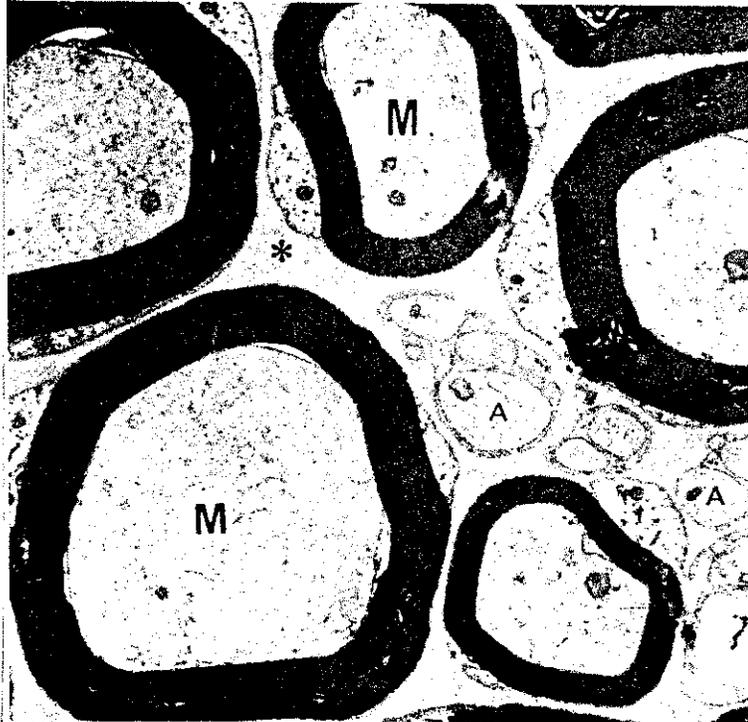
1 μ m

A.



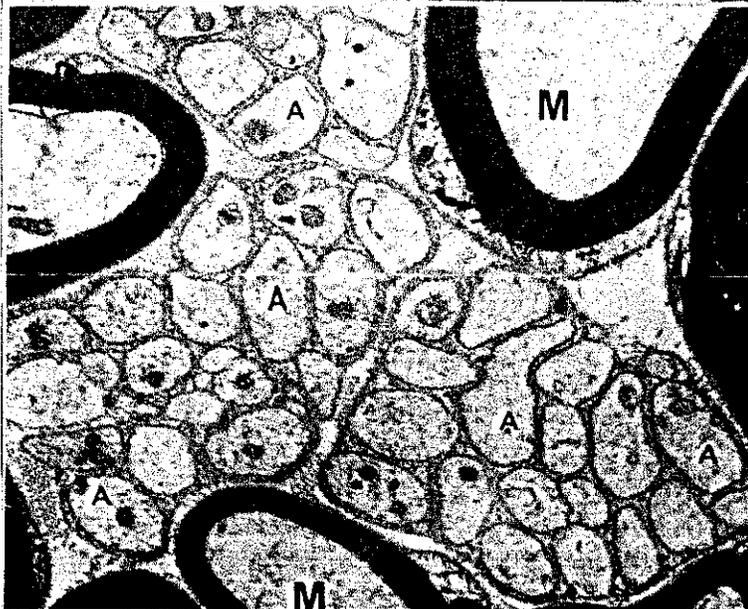
12,5 μm

B.



1 μm

C.



1 μm

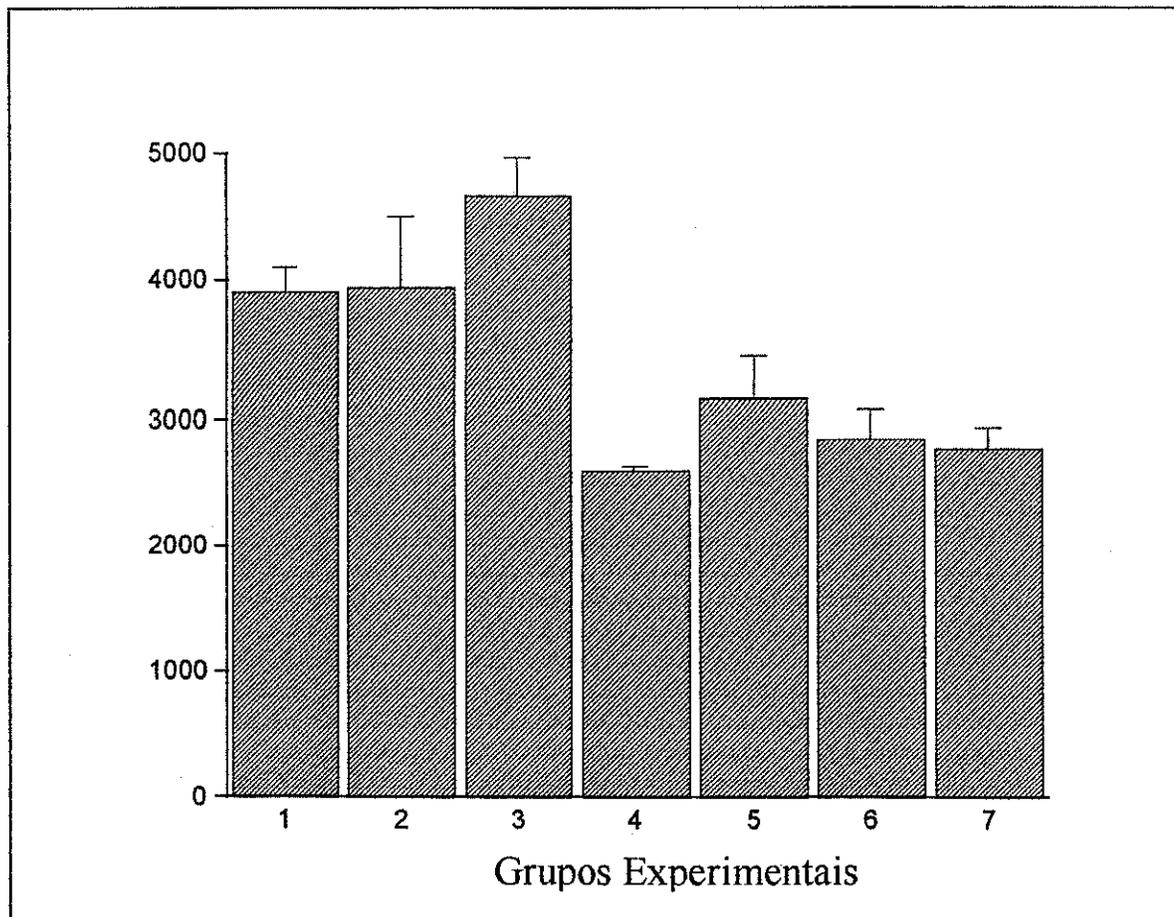


Figura 12 - Gráfico mostrando o **NÚMERO DE AXÔNIOS MIELÍNICOS REGENERADOS** (média e desvio padrão) obtido na porção média do nervo regenerado (nAR), entre o coto proximal e o enxerto. **Grupo 1** \Rightarrow D:C57BL/6J, R: F1[CxA]; **Grupo 2** \Rightarrow D:A/J, R: F1[CxA]; **Grupo 3** \Rightarrow D:C57BL/6J, R: F1[CxB]; **Grupo 4** \Rightarrow D:BALB/c, R: F1[CxB]; **Grupo 5** \Rightarrow D:C57BL/6J, R: C57BL/6J; **Grupo 6** \Rightarrow D:A/J, R: A/J; **Grupo 7** \Rightarrow D:BALB/c, R: BALB/c. (para cada grupo, n=3)

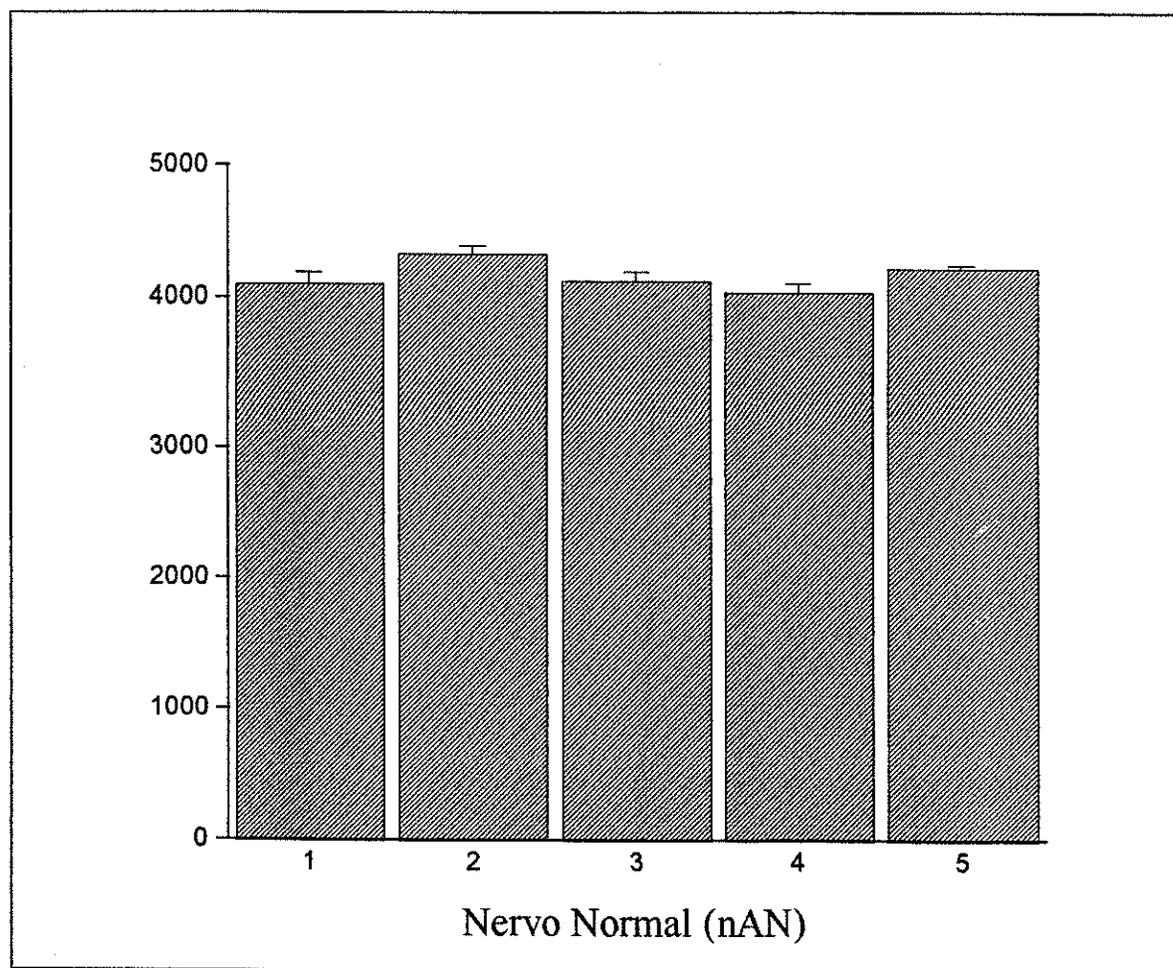


Figura 13 - Gráfico mostrando o **NÚMERO DE AXÔNIOS MIELÍNICOS** (média e desvio padrão) obtido nos nervos contra-laterais (CL). Grupo 1 = F1 (C57BL/6J X A/J); Grupo 2 = F1 (C57BL/6J X BALB/c); Grupo 3 = A/J; Grupo 4 = C57BL/6J; Grupo5=BALB/c. (para cada grupo, n=3)

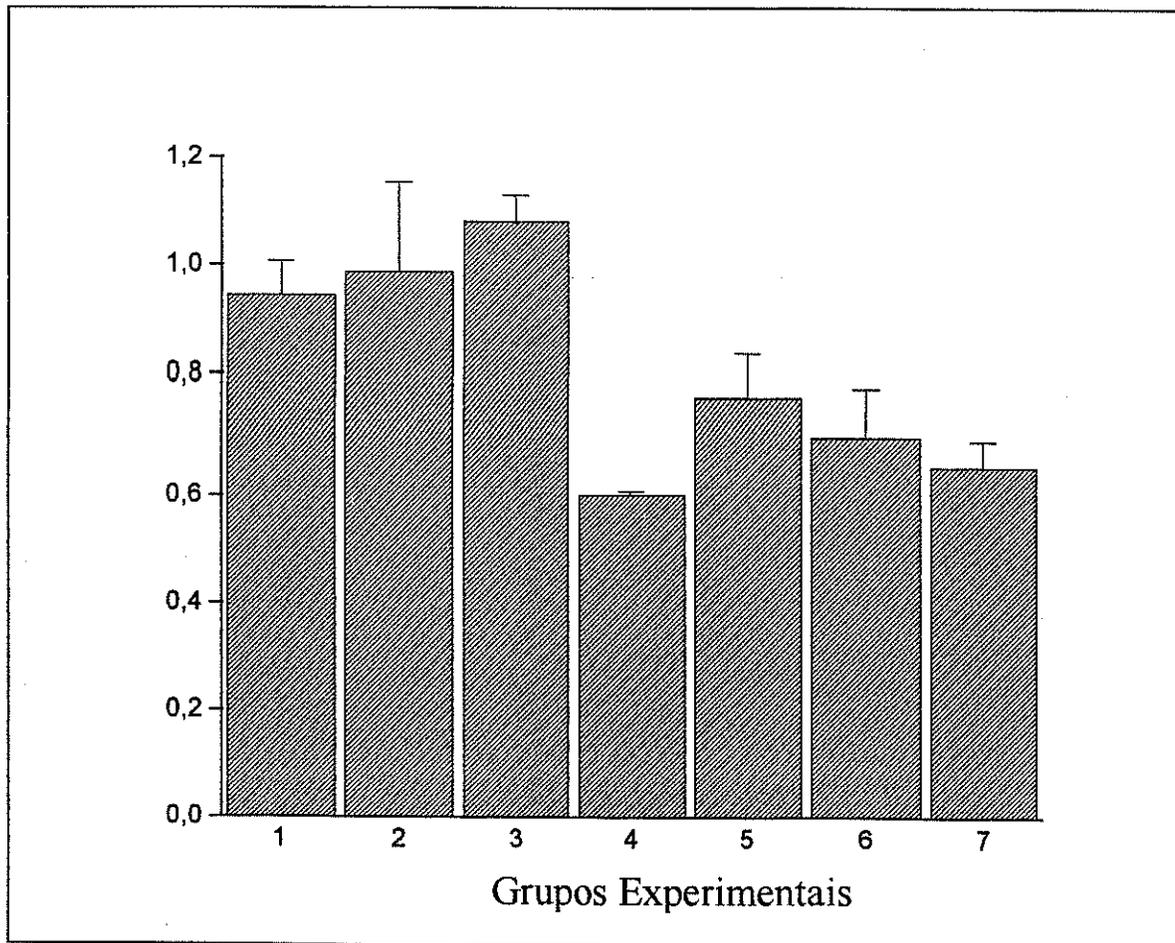


Figura 14 - Gráfico mostrando o **COEFICIENTE DE REGENERAÇÃO**, obtido através da razão entre nAR e nAN. **Grupo 1** \Rightarrow D:C57BL/6J, R: F1[CxA]; **Grupo 2** \Rightarrow D:A/J, R: F1[CxA]; **Grupo 3** \Rightarrow D:C57BL/6J, R: F1[CxB]; **Grupo 4** \Rightarrow D:BALB/c, R: F1[CxB]; **Grupo 5** \Rightarrow D:C57BL/6J, R: C57BL/6J; **Grupo 6** \Rightarrow D:A/J, R: A/J; **Grupo 7** \Rightarrow D:BALB/c, R: BALB/c. (para cada grupo, n=3)

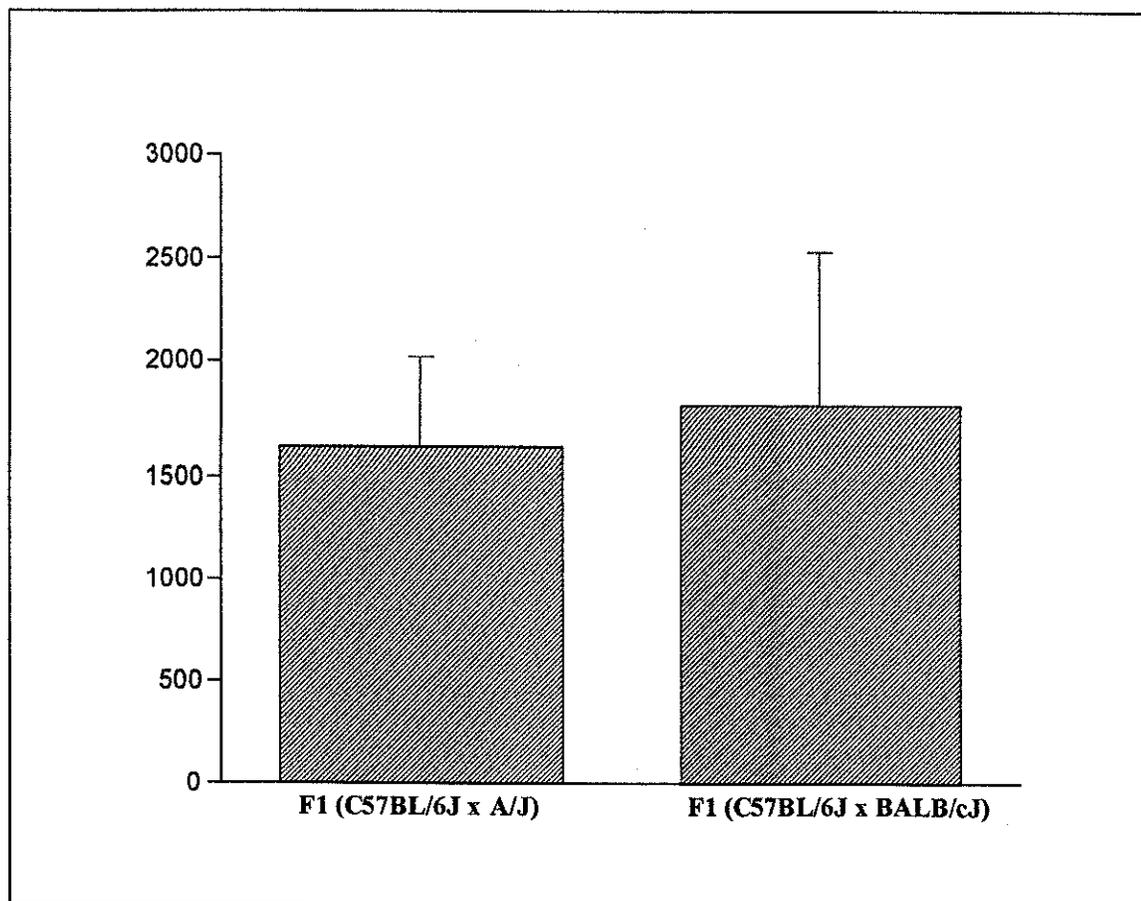


Figura 15 - Gráfico mostrando o NÚMERO DE AXÔNIOS MIELÍNICOS (média e desvio padrão) obtido na porção média do nervo, entre o coto proximal e o coto distal, no interior do tubo. (para cada grupo, n=3)

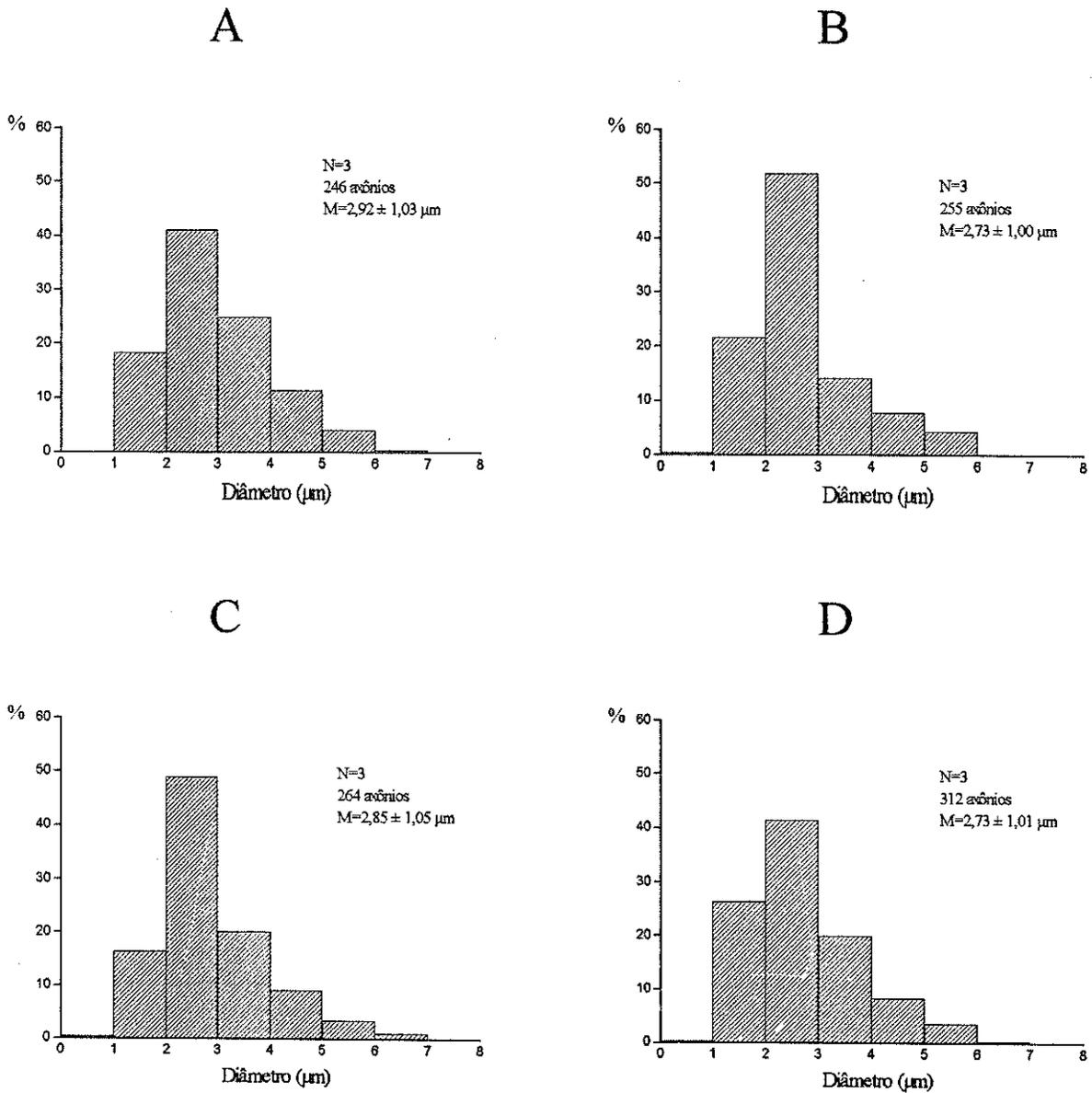
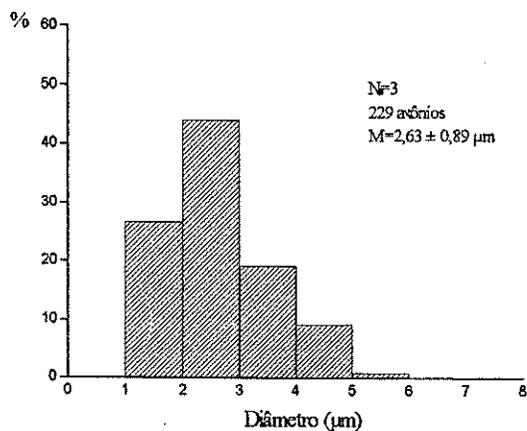
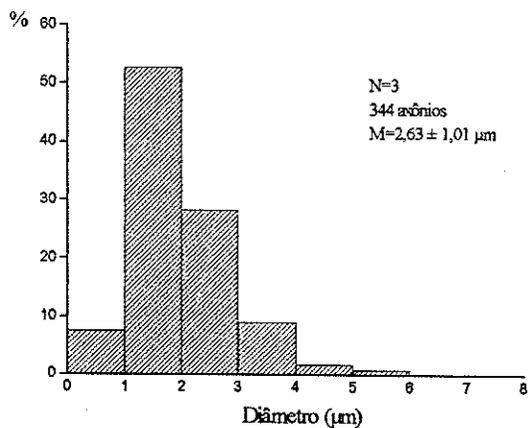


Figura 16 - Distribuição de frequência do DIÂMETRO DAS FIBRAS MIELÍNICAS REGENERADAS, amostradas na porção média do nervo regenerado entre o coto proximal e o enxerto. **A.** Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; **B.** Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; **C.** Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; **D.** Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]. N= número de animais; M= média e desvio padrão.

A



B



C

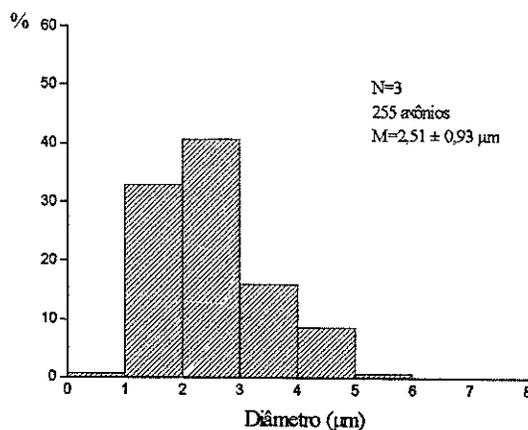
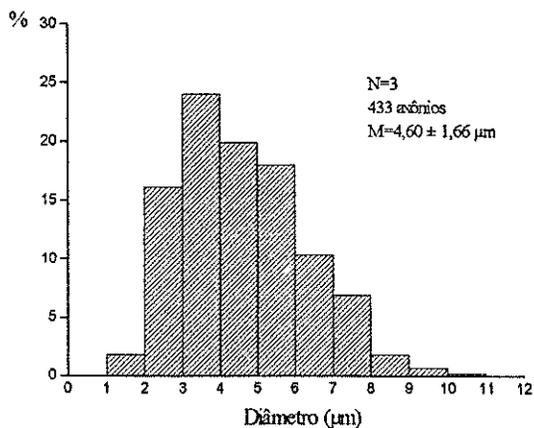
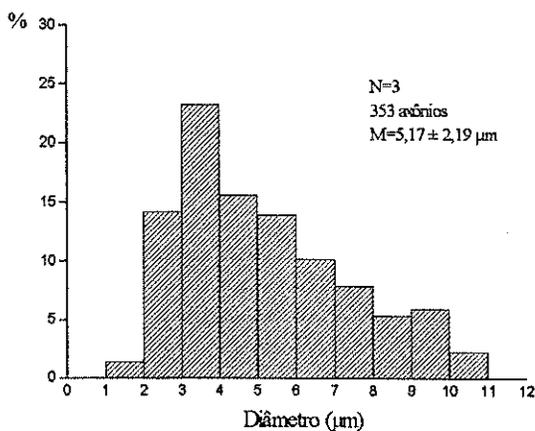


Figura 17 - Distribuição de frequência do DIÂMETRO DAS FIBRAS MIELÍNICAS REGENERADAS, amostradas na porção média do nervo regenerado entre o coto proximal e o enxerto. A. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; B. Doador: A/J, Receptor: A/J; C. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c. N=número de animais; M= média e desvio padrão.

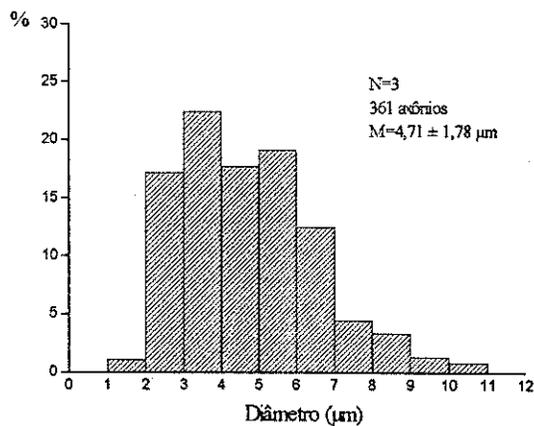
A



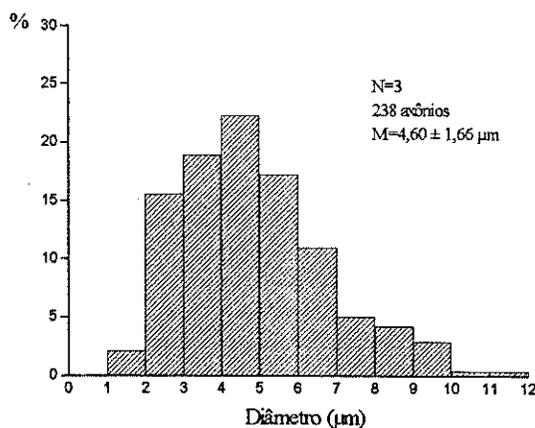
B



C



D



E

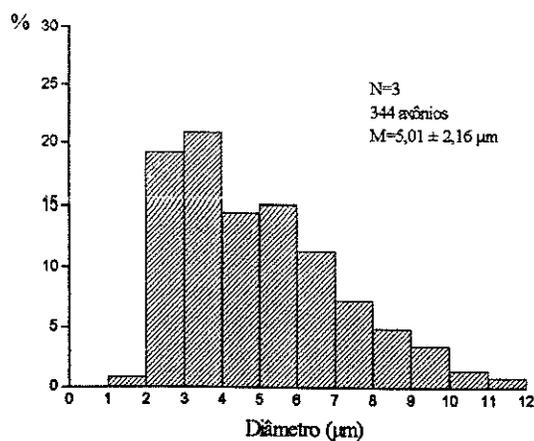


Figura 18 - Distribuição de frequência do DIÂMETRO DAS FIBRAS MIELÍNICAS, amostradas nos nervos normais contra-laterais. A. F1 [CxA]; B. F1 [CxB]; C. C57BL/6J; D. BALB/c; E. A/J. N= número de animais; M=média e desvio padrão.

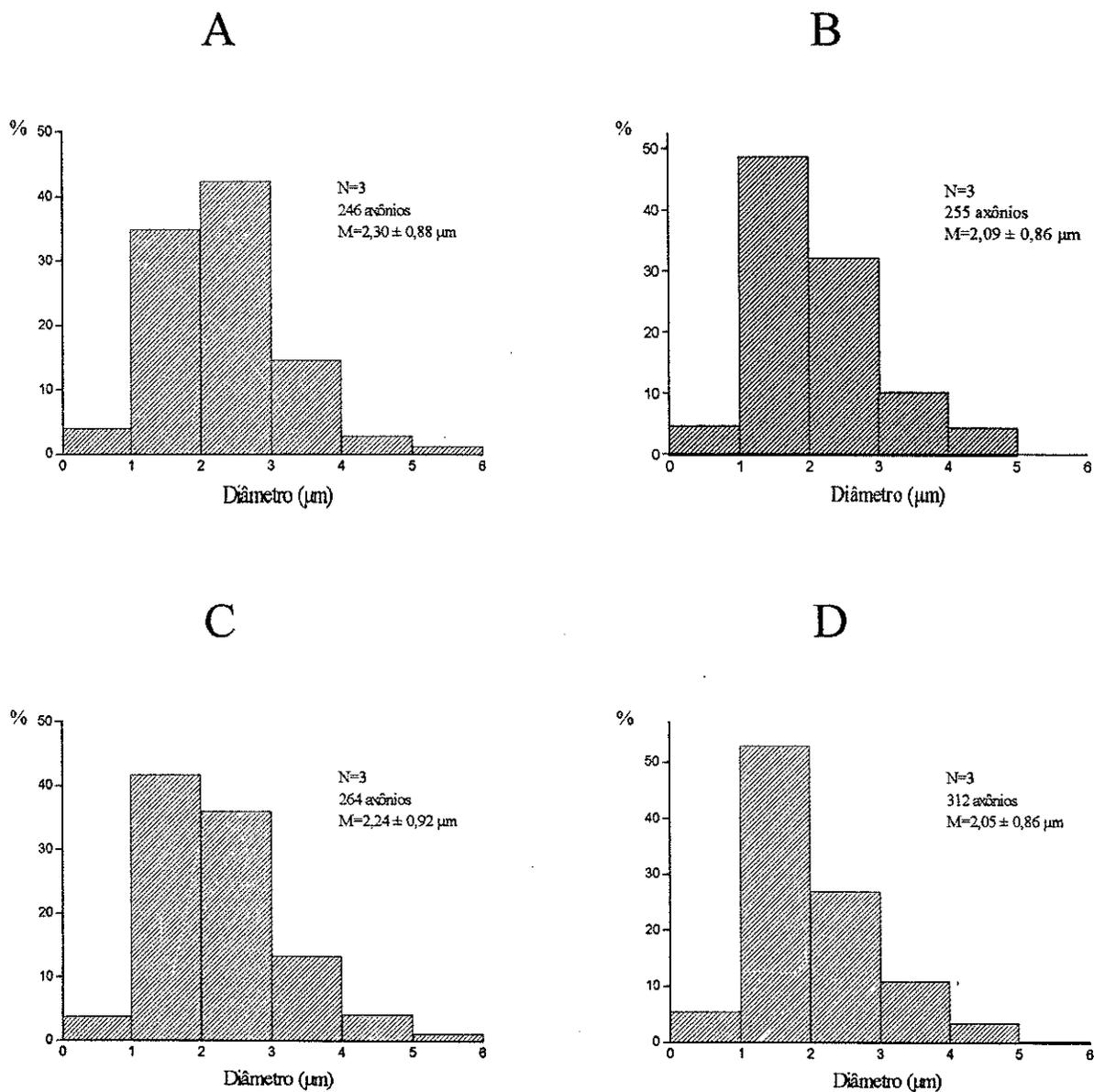


Figura 19 - Distribuição de frequência do DIÂMETRO DOS AXÔNIOS MIELÍNICOS REGENERADOS, amostrados na porção média do nervo regenerado entre o coto proximal e o enxerto. **A.** Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; **B.** Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; **C.** Doador: C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; **D.** Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]. N= número de animais; M= média e desvio padrão.

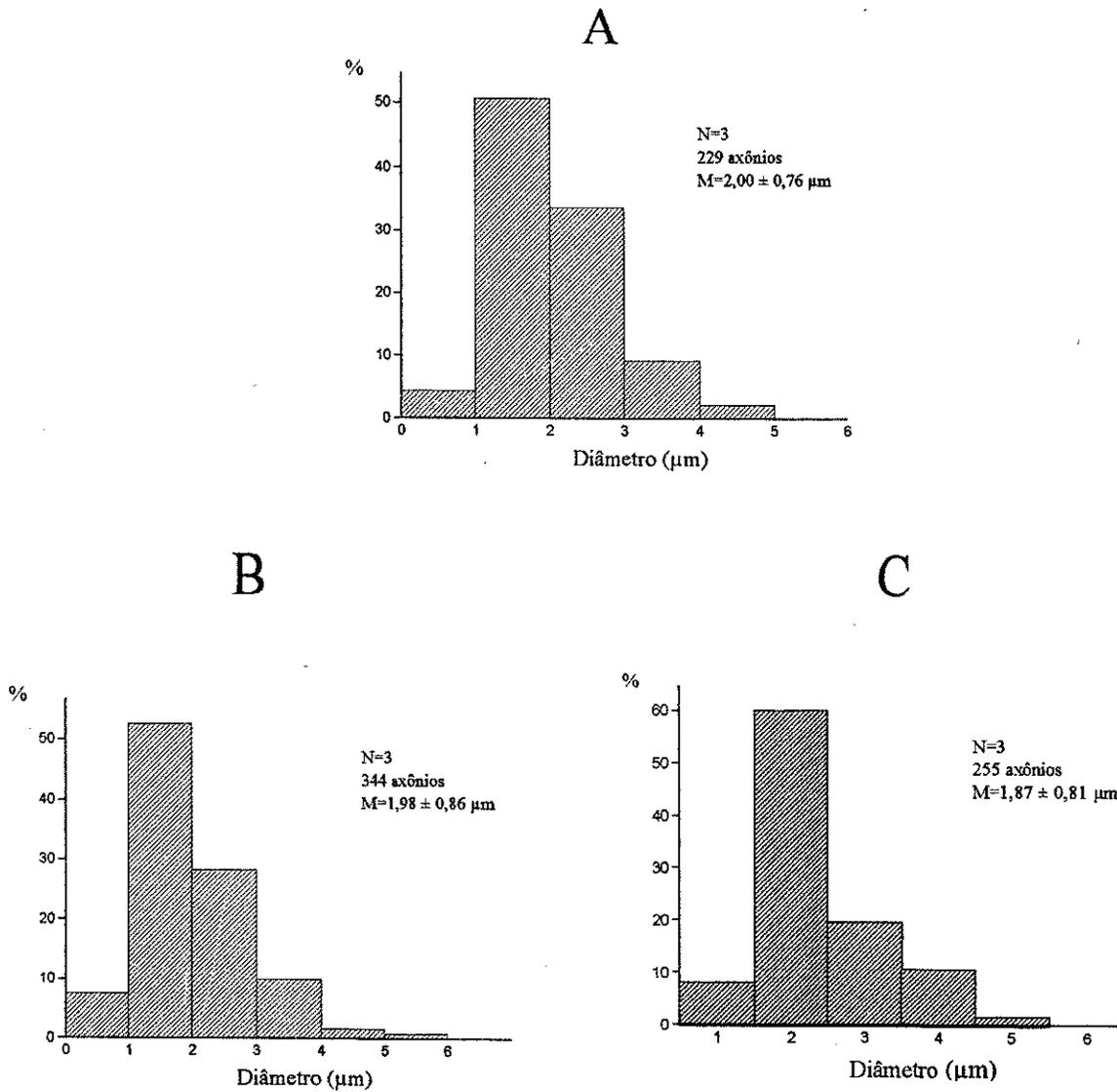
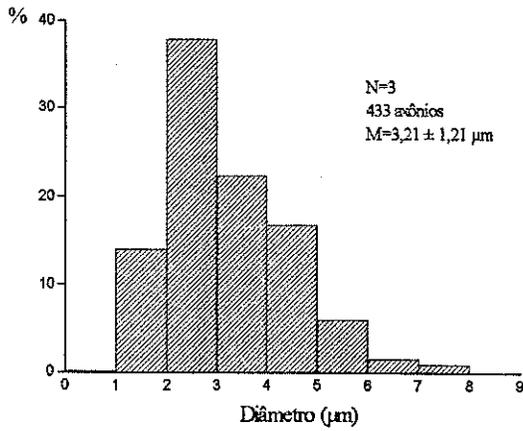
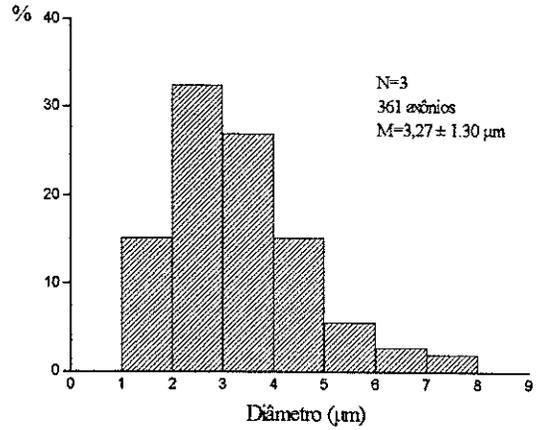


Figura 20 - Distribuição de frequência do DIÂMETRO DOS AXÔNIOS MIELÍNICOS REGENERADOS, amostrados na porção média do nervo regenerado entre o coto proximal e o enxerto. **A.** Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; **B.** Doador: A/J, Receptor: A/J; **C.** Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c. N=número de animais; M= média e desvio padrão.

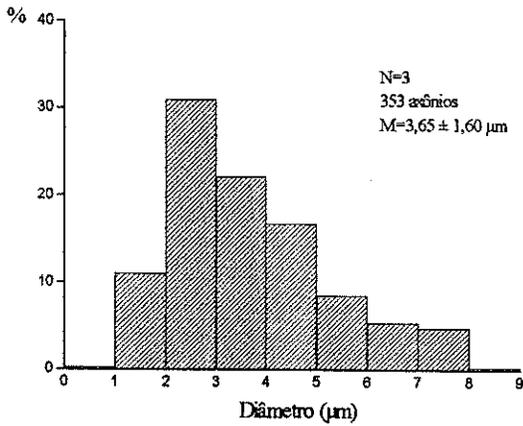
A



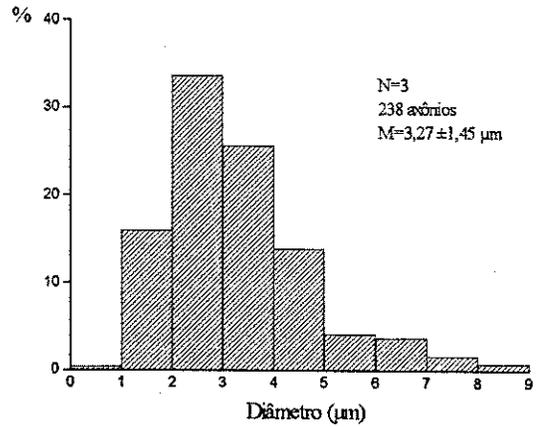
B



C



D



E

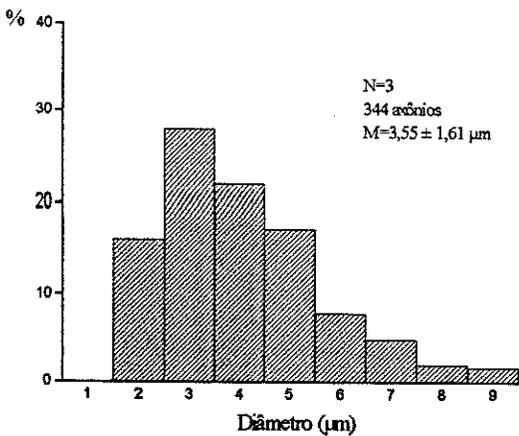


Figura 21 - Distribuição de frequência do DIÂMETRO DOS AXÔNIOS MIELÍNICOS, amostrados nos nervos normais contra-laterais. **A.** F1 [CxA]; **B.** F1 [CxB]; **C.** C57BL/6J; **D.** BALB/c; **E.** A/J. N= número de animais; M=média e desvio padrão.

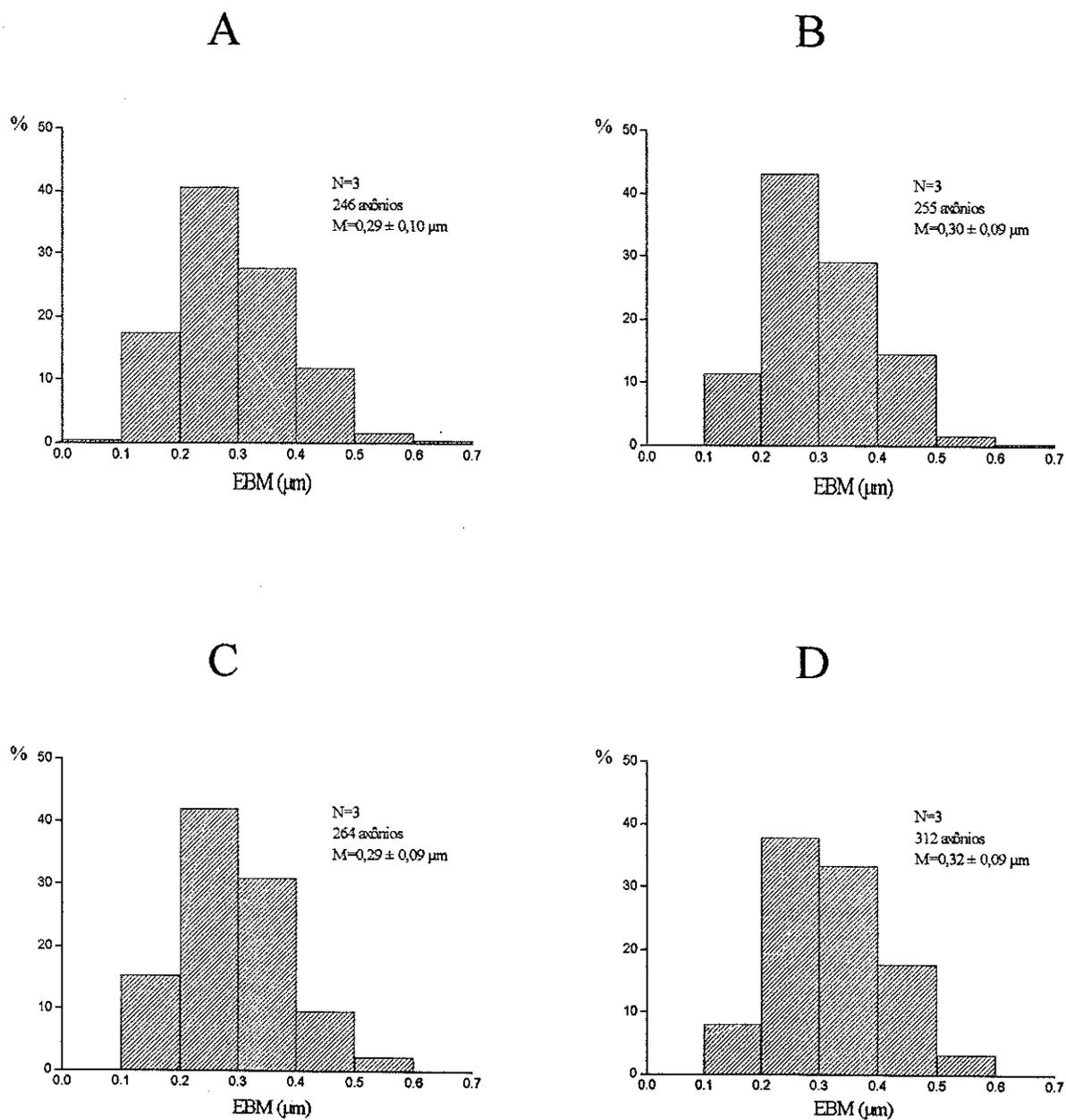


Figura 22 - Distribuição de frequência da ESPESSURA DAS BAINHAS DE MIELINA (EBM), amostradas na porção média do nervo regenerado entre o coto proximal e o enxerto. **A.** Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; **B.** Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; **C.** Doador: C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; **D.** Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; N=número de animais; M= média e desvio padrão.

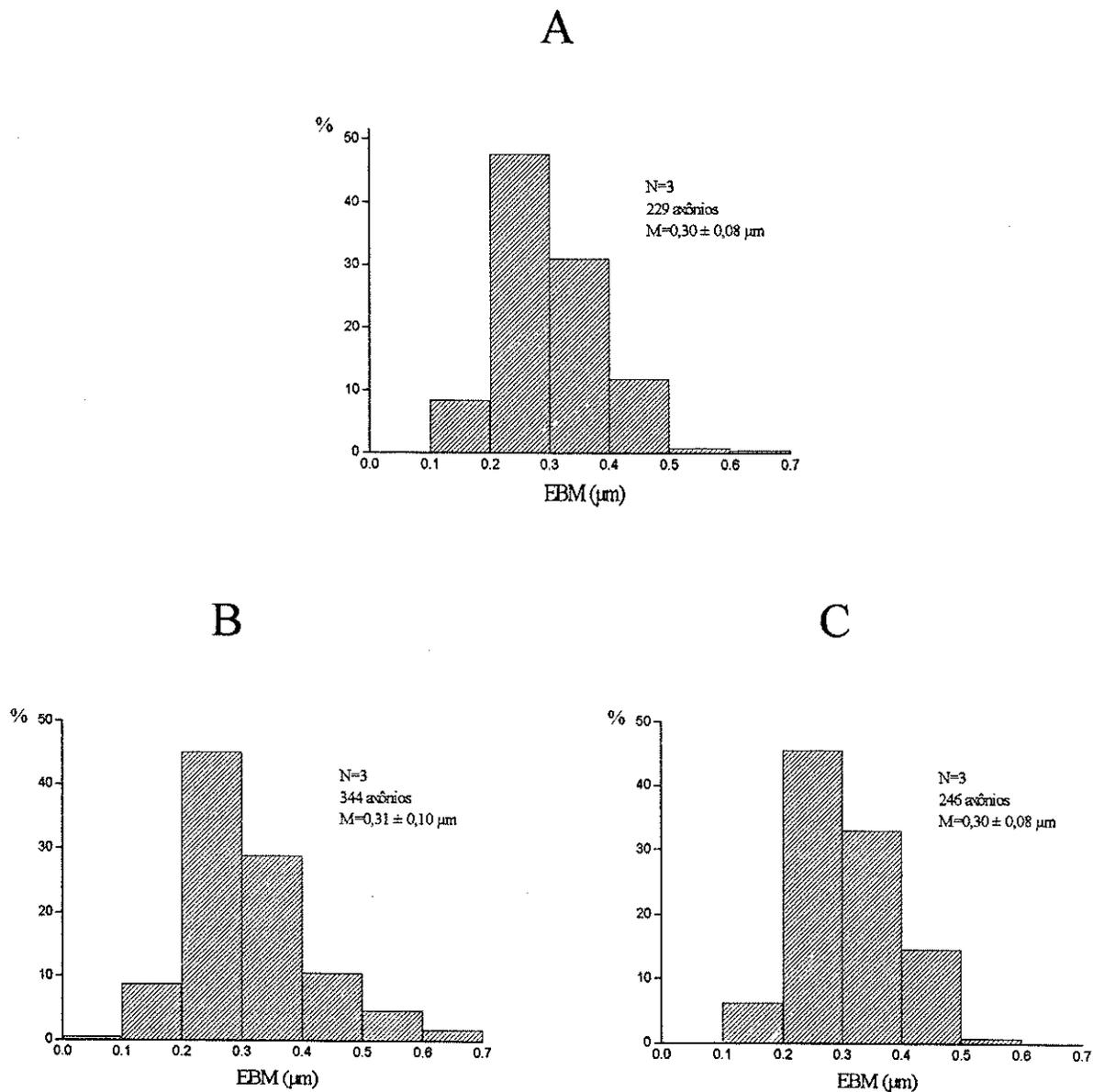
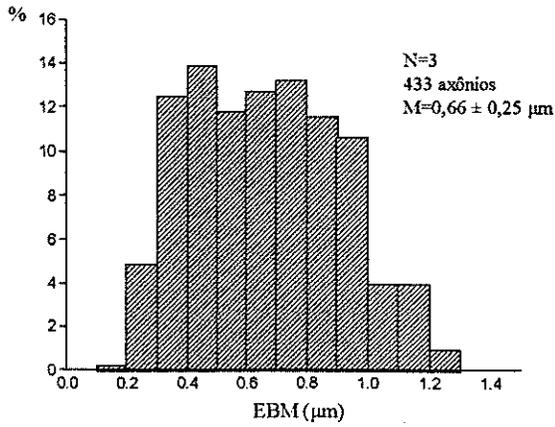
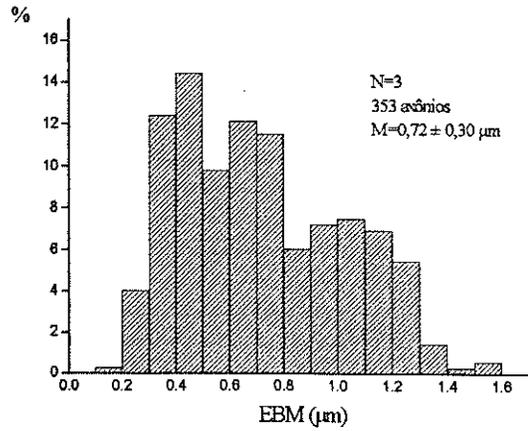


Figura 23 - Distribuição de frequência da ESPESSURA DAS BAINHAS DE MIELINA (EBM), amostradas na porção média do nervo regenerado entre o coto proximal e o enxerto. **A.**Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; **B.** Doador: A/J, Receptor: A/J; **C.**Doador: BALB/c, Receptor: BALB/c. N=número de animais; M= média e desvio padrão.

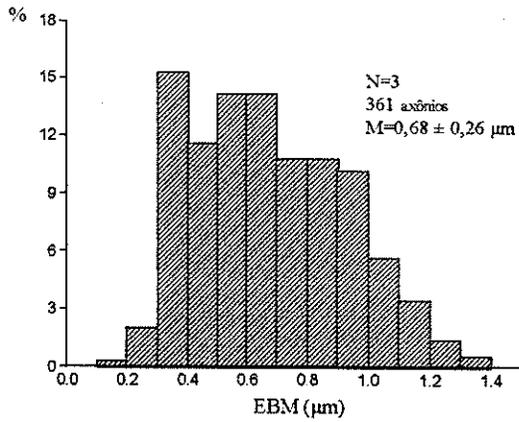
A



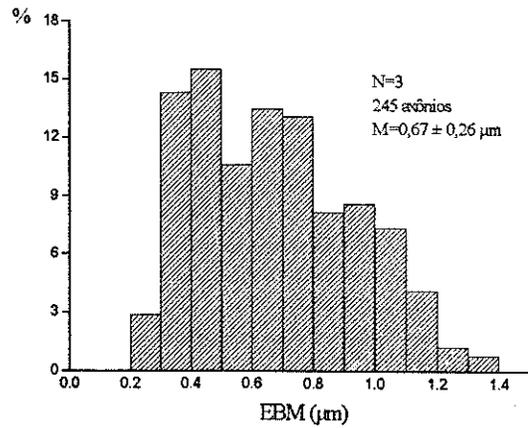
B



C



D



E

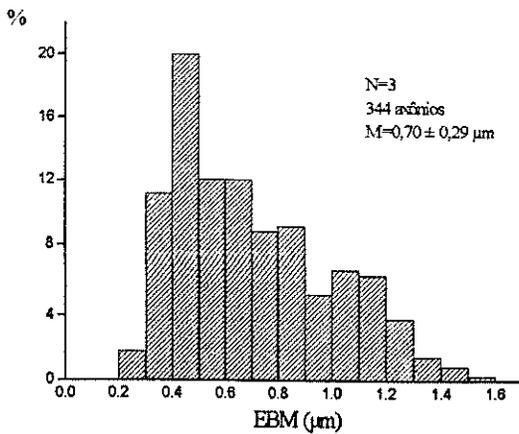


Figura 24 - Distribuição de frequência da ESPESSURA DAS BAINHAS DE MIELINA (EBM), amostradas nos nervos normais contra-laterais (CL). A. F1 [CxA]; B. F1 [CxB]; C. C57BL/6J; D. BALB/c; E. A/J. N=número de animais; M= média e desvio padrão.

TABELA I - Número de axônios mielínicos regenerados (nAR) obtidos na porção média do nervo, entre o coto proximal e o enxerto, nos animais receptores dos 7 grupos experimentais. São apresentados os valores obtidos nos nervos normais contra-laterais (nAN) e o coeficiente de regeneração (CR). Grupo 1 ⇒ D:C57BL/6J, R: F1[CxA]; Grupo 2 ⇒ D:A/J, R: F1[CxA]; Grupo 3 ⇒ D:C57BL/6J, R: F1[CxB]; Grupo 4 ⇒ D:BALB/c, R: F1[CxB]; Grupo 5 ⇒ D:C57BL/6J, R: C57BL/6J; Grupo 6 ⇒ D:A/J, R: A/J; Grupo 7 ⇒ D:BALB/c, R: BALB/c.

GRUPO	nAR	nAN	CR
1	4108	4135	0,9935
	3714	4240	0,8759
	3875	4032	0,9611
	<u>3899±198,09</u>	<u>4135,67±104</u>	<u>0,9435±0,061</u>
2	3522	4007	0,8790
	3700	4111	0,9000
	4758	4039	1,1780
	<u>3933,33±565,35</u>	<u>4052,33±53,27</u>	<u>0,9857±0,167</u>
3	4442	4291	1,0352
	4527	4231	1,0700
	5006	4422	1,1321
	<u>4658,33±304,07</u>	<u>4314,47±97,67</u>	<u>1,0791±0,049</u>
4	2614	4381	0,5967
	2611	4300	0,6072
	2560	4301	0,5952
	<u>2595±30,35</u>	<u>4327,33±46,48</u>	<u>0,5997±0,007</u>
5	2567	4120	0,6231
	2910	4005	0,7266
	3027	3980	0,7606
	<u>2834,67±239,07</u>	<u>4035±74,67</u>	<u>0,7034±0,072</u>
6	3259	4185	0,7787
	2808	4135	0,6791
	3341	4042	0,8266
	<u>3136±287</u>	<u>4120,67±72,57</u>	<u>0,7615±0,075</u>
7	2951	4206	0,7016
	2696	4215	0,6396
	2630	4329	0,6075
	<u>2759±169,52</u>	<u>4250±68,56</u>	<u>0,6496±0,0478</u>

TABELA II - Número de axônios miélinicos obtidos na porção média, entre o coto proximal e o coto distal, dos nervos regenerados no interior dos tubos de polietileno (6,0mm de comprimento). Grupo 1 = F1 [CxA]; Grupo 2 = F1 [CxB].

GRUPO	CD
1	1324
	1460
	2069
	1617,67±396,74
2	1518
	1225
	2623
	1788,67±737,26

TABELA III - Comparação entre as médias do Número de Axônios Miélnicos Regenerados (nAR), computados na porção média do nervo regenerado, entre o coto proximal e o enxerto, nos diferentes grupos experimentais. Os valores controle correspondem às médias do número dos axônios miélnicos obtidas nos nervos normais contra- laterais (nAN). Abaixo de cada média, as letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias obtidas nos 7 grupos experimentais; as letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias de cada grupo experimental e seu controle. As médias que apresentam letras iguais não são estatisticamente diferentes dentro de um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls. 1. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; 2. Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; 3. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; 4. Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; 5. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; 6. Doador: A/J, Receptor: A/J; 7. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c.

Número de Axônios		
Grupos	Regenerados (nAR)	Controle (nAN)
1	3899 Aa	4136 d
2	3933 Aa	4052 d
3	4658 Bb	4314 e
4	2595 Cc	4327 e
5	2835 Cc	4035 d
6	3136 Aa	4120 d
7	2759 Cc	4250 d

TABELA IV - Comparação entre as médias do **Coefficiente de Regeneração Axonal (CR)**, o qual corresponde ao quociente do número de axônios mielínicos regenerados (nAR) pelo número de axônios presentes nos nervos normais contra-laterais (nAN), nos diferentes grupos experimentais. Abaixo de cada média, as letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias do CR obtidas nos 7 grupos experimentais. As médias que apresentam letras iguais não são estatisticamente diferentes dentro de um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls. 1. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; 2. Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; 3. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; 4. Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; 5. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; 6. Doador: A/J, Receptor: A/J; 7. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c.

Grupo	Coefficiente de Regeneração
1	0,94 A
2	0,99 A
3	1,08 A
4	0,60 B
5	0,70 B
6	0,76 B
7	0,65 B

TABELA V - Comparação entre as médias do **Diâmetro das Fibras Mielínicas** (micrômetros), computadas na porção média do nervo regenerado, entre o coto proximal e o enxerto, nos diferentes grupos experimentais. Os valores controle correspondem às médias do diâmetro das fibras mielínicas obtidas nos nervos normais contra- laterais (CL). Abaixo de cada média, as letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias obtidas nos 7 grupos experimentais; as letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias de cada grupo experimental e seu controle. As médias que apresentam letras iguais não são estatisticamente diferentes dentro de um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls. 1. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; 2. Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; 3. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; 4. Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; 5. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; 6. Doador: A/J, Receptor: A/J; 7. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c.

Diâmetro das Fibras Mielínicas		
Grupos	Regeneradas	Controle (CL)
1	2,92 Aa	4,60 c
2	2,73 Bb	4,60 c
3	2,85 Aa	5,17 d
4	2,72 Bb	5,17 d
5	2,63 Bb	5,01 d
6	2,63 Bb	4,71 c
7	2,51 Bb	4,85 c

TABELA VI - Comparação entre as médias do **Diâmetro dos Axônios Mielínicos** (micrômetros), computadas na porção média do nervo regenerado, entre o coto proximal e o enxerto, nos diferentes grupos experimentais. Os valores controle correspondem às médias do diâmetro dos axônios mielínicos obtidas nos nervos normais contra- laterais (CL). Abaixo de cada média, as letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias obtidas nos 7 grupos experimentais; as letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias de cada grupo experimental e seu controle. As médias que apresentam letras iguais não são estatisticamente diferentes dentro de um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls. 1. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; 2. Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; 3. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; 4. Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; 5. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; 6. Doador: A/J, Receptor: A/J; 7. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c.

Diâmetro dos Axônios Mielínicos		
Grupos	Regenerados	Controle (CL)
1	2,30 Aa	3,21 c
2	2,09 Bb	3,21 c
3	2,24 Aa	3,65 d
4	2,05 Bb	3,65 d
5	1,98 Bb	3,55 d
6	2,00 Bb	3,27 c
7	1,87 Bb	3,27 c

TABELA VII - Comparação entre as médias da Espessura da Bainha de Mielina (micrômetros), computados na porção média do nervo regenerado, entre o coto proximal e o enxerto, nos diferentes grupos experimentais. Os valores controle correspondem às médias da espessura da bainha de mielina obtidas nos nervos normais contra- laterais (CL). Abaixo de cada média, as letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias obtidas nos 7 grupos experimentais; as letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias de cada grupo experimental e seu controle. As médias que apresentam letras iguais não são estatisticamente diferentes dentro de um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls. 1. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; 2. Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; 3. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; 4. Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; 5. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; 6. Doador: A/J, Receptor: A/J; 7. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c.

Espessura da Bainha de Mielina		
Grupos	Regenerada	Controle (CL)
1	0,29 Aa	0,66 b
2	0,30 Aa	0,66 b
3	0,29 Aa	0,72 c
4	0,31 Aa	0,72 c
5	0,31 Aa	0,70 c
6	0,30 Aa	0,68 b
7	0,30 Aa	0,67 b

TABELA VIII - Comparação entre as médias da Razão "g" apresentadas pelos axônios mielínicos, computados na porção média do nervo regenerado, entre o coto proximal e o enxerto, nos diferentes grupos experimentais. Os valores controle correspondem às médias da razão "g" apresentadas pelos axônios mielínicos obtidas nos nervos normais contra-laterais (CL). Abaixo de cada média, as letras maiúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias obtidas nos 7 grupos experimentais; as letras minúsculas correspondem ao significado da comparação entre as médias de cada grupo experimental e seu controle. As médias que apresentam letras iguais não são estatisticamente diferentes dentro de um nível de significância de 0,05 adotado no teste de Newman-Keuls. 1. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxA]; 2. Doador : A/J, Receptor: F1 [CxA]; 3. Doador : C57BL/6J, Receptor: F1 [CxB]; 4. Doador : BALB/c, Receptor: F1 [CxB]; 5. Doador : C57BL/6J, Receptor: C57BL/6J; 6. Doador: A/J, Receptor: A/J; 7. Doador : BALB/c, Receptor: BALB/c.

Razão "g"		
Grupos	Regeneradas	Controle (CL)
1	0,78 Aa	0,70 c
2	0,75 Bb	0,70 c
3	0,78 Aa	0,70 c
4	0,74 Bb	0,70 c
5	0,74 Bb	0,70 c
6	0,75 Bb	0,69 c
7	0,73 Bb	0,70 c

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERNETHY, D. A.; THOMAS, P.K.; RUD, A. and KING, R. H. M. Mutual attraction between emigrant cells from transected denervated nerve. *J. Anat.*, **184**: 239-249, 1994.
- AGUAYO, A.J.; BENFEY, M.; DAVID, S. A potencial for axonal regeneration in neurons of adult mammalian nervous system. In: BIRTH defects. Eds. B. Haber, J.r. Perez-Polo, G.A. Hashimet, A.M.G. Stella. New York, Alan R. Liss, 1983. (Original article series, v.19). p. 327-340.
- AGUAYO,A.J.; AHIWELL, M.; TRECARTEN, J.; PERKINS, S.; BRAY, G.M. Abnormal myelinization in transplanted Trembler mouse Schwann cells. *Nature (Lond.)*, **265**: 73-83, 1977.
- AYERS, M.M. & ANDERSON, R. McD. A model of hypertrophicinterstitial neuropathy (Dejerine-Sottas) in man. *Acta Neuropath. (Berl.)*, **25**: 54-57, 1973.
- BACH, F.H. & SACHS, D.H. Transplantation immunology. *New Eng. J. Med.*, **317**: 489-492, 1987.
- BARKER, C.F. & BILLINGHAM, R.E. Histocompatibility requirements of heart and skin grafts in rats. *Trans. Proc.*, **3**: 172-175, 1971.
- BECK, K. D. Functions of brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Prog. Neurobiol.*, **44**: 497-516, 1994.
- BENFEY, M. & AGUAYO, A.J. Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nervous grafts. *Nature, (London)*, **296**: 150-152, 1982.
- BEUCHE, W. and FRIEDE, R. L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.*, **13**: 767-796, 1984.
- BRAY, D. Growth cones: do they pull or are they pushed? *Trends Neurosci.*, **10**: 431-438, 1987.
- BROWN, M.C.; PERRY, V.H.; HUNT, S.P.; LAPPER, S.R. Further studies on motor and sensory nerve regeneration in mice with delayed Wallerian degeneration. *Eur. J. Neurosci.*, **6**: 420-428, 1994.

- BRUCK, W.; BRUCK, Y.; MARUSCHAK, B.; FRIEDE, R.L. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol.*, 89: 363-367, 1995.
- BUNGE, M.B. Initial endocytosis of peroxidase or ferritin by growth cones of cultured nerve cells. *J. Neurocytol.*, 6: 407-439, 1977.
- BUNGE, M.B.; BUNGE, R.P.; KLEITMAN, N.; DEAN, A.C. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev. Neurosci.*, 11: 348-360, 1989.
- CAJAL, S. R. Degeneration and Regeneration of the nervous system. New York, Hafner, 1959. 459p.
- CARPENTER, M. B. Human Neuroanatomy, Interamericana, 7a edição, 1988. 700p.
- DA-SILVA, C.F. Estudo experimental da regeneração de nervos no interior de próteses tubulares. São Paulo, 1987. 58p. Tese Livre-Docente - Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- DA-SILVA, C.F.; PEREIRA, F.C. Differences in axon regeneration among strains of mice after nerve transection and entubulization repair. Third IBRO World Congress of Neuroscience, Montreal, Abstract, pág. 27, 1991.
- DAHLIN, L. B. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. *Brain Res.*, 679: 274-280, 1995.
- DANIELSEN, N.; KERNS, J. M.; HOLMQUIST, B.; ZHAO, Q.; LUNDBORG, G. and KANJE, M. Pre-degenerated nerve grafts enhance regeneration by shortening the initial delay period. *Brain Res.*, 666: 250-254, 1994.
- DAVID, S. & AGUAYO, A.J. Axonal elongation into Peripheral Nervous System "bridges" after Central Nervous System injury in adult rats. *Science*, 214: 931-933, 1981.
- DERBY, A.; ENGLEMANM V. W.; FRIERDICH, G. E.; NEISES, G.; RAPP, S.R. and ROUFA, D. Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve. *Exp. Neurol.*, 119: 176-191, 1993.

- DODD, J. & JESSEL, T.M. Axon guidance and patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science*, **242**: 641-799, 1988.
- DONAT, J. R. & WISNIEWSKI, H. M. The spatio temporal pattern of wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. *Brain res.*, **53**: 41-53, 1973.
- EVANS, P.J.; MIDHA, R.; MACKINNON, E. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Prog, Neurobiol.*, **43**: 187-233, 1994.
- FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. *Ann. Rev. Neurosci.*, **13**: 43-60, 1990.
- FAWCETT, J.W. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *TINS*, **15** (1): 5-8, 1992.
- FERRIERE, G.; DENEFF, J.-F.; RODRIGUEZ, J.; GUZZETA, F. Morphometric studies of normal sural nerves in children. *Muscle Nerve*, **8**: 697-704, 1985.
- FUNAKOSHI, H.; FRISÉN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSK, T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V. M. K. and PERSSON, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J. Cell Biol.*, **123**(2): 455-465, 1993.
- GIBSON, J.D. The origin of the neural macrophage: a quantitative ultrastructural study of cell population changes during Wallerian degeneration. *J. Anatomy*, **129**: 1-19, 1979.
- GLASBY, M.A.; GILMOUR, J.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; HEMS, T.E.J.; MYLES, L.M. The repair of large peripheral nerves using skeletal muscle autografts: a comparison with cable grafts in the sheep femoral nerve. *Br. J. Plast. Surg.*, **43**: 169-178, 1985.
- GLASS, J.D.; BRUSHART, T.M.; GEORGE, E.B.; GRIFFIN, J.W. Prolonged survival of transected nerve fibers in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *J. Neurocytol.*, **22**: 311-321, 1993.
- GORIO, A. Sprouting and regeneration of peripheral nerve. In: *The Node of Ranvier*. Eds. J.C. Zagoren, S. Fedoroff. New York, Academic Press, 1984. p. 353-358.

- GULATI, A.K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. **J. Neurosur.**, **68**: 117-123, 1988.
- GUPTA, S.K.; PRINGLE, J.; PODULSO, J.F.; MEZEI, C. Induction of myelin during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. **J. Neurosci. Res.**, **34**: 14-23, 1993.
- GUTH, L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. **Physiol. Rev.**, **36**: 441-478, 1956.
- HAFTEK, J. & THOMAS, P. K. Electron microscope observations on the effects of localized crush injuries on the connective tissues of peripheral nerves. **J. Anat.**, **103**: 233-243, 1968.
- HALL, S.M. The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the re-inervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **12**: 401-414, 1986.
- HAYRY, P.; RENKONEN, R.; LESZCZYNSKI, D.; MATILA, P.; HALTTUNEN, J.; TURUNEN, J.-P.; PARTANEN, T.; RINTA, K. Local events in graft rejection. **Transpl. Proc.**, **21**: 3716-3720, 1989.
- HEUMANN, R.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; MEYER, M.; RADEKE, M.J.; MISKO, T.P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: role of macrophages. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **84**: 8735-8739, 1987.
- IDE, C. Nerve regeneration and schwann cell basal lamina: observations of the long term regeneration. **Arch. Histol. Jap.**, **46**(2): 243-257, 1983.
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T & ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, **288**: 61-75, 1983.
- IDE, C.; OSAWA, T. & TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogenic nerve grafts, with special reference to the role of the schwann cell basal lamina . **Prog. Neurobiol.**, **34**: 1-38, 1990.

- JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S. & KRISZTÁN, R. M. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell Tissue Res.*, 202: 453-60, 1979.
- KAHAN, B.D. Transplantation timeline. Mankind's three millennia-one maverick's three decades in the struggle against biochemical individuality. *Transplantation*, 51: 121-131, 1991.
- KERNS, J. M.; DANIELSEN, N.; HOLMQUIST, B.; KANJE, M. and LUNDBORG, G. The influence of predegeneration on regeneration through peripheral nerve grafts in the rat. *Exp. Neurol.*, 122: 28-36, 1993.
- LAINETTI, R.D.; PEREIRA, F.C.; DA-SILVA, C.F. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. *Br. J. Med. Biol. Res.*, 28: 781-785, 1995.
- LANDON, D.N. & HALL, S. The myelinated nerve fiber. In: *THE PERIPHERAL nerve*. Ed. D.N. Landon. London. Chapman and Hall, 1976. p. 1-105.
- LANGONE, F. Estudo ultraestrutural e morfométrico de nervos regenerados no interior de próteses tubulares. São Paulo, 1991. 201p. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- LE BEAU J.M.; LaCORBIERE, M.; POWELL, H.C.; ELLISMAN, M.H.; SCHUBERT, D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. *Brain Res.*, 459: 93-104, 1988.
- Le DOUARIN, N.M. The neural crest. Cambridge, Cambridge University Press, 1982.
- LEMKE, G. & CHAO, M. Axons regulate cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development*, 102: 499-504, 1988.
- LEVI, A. D. O. & BUNGE, R. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. *Exp. Neurol.*, 130: 41-52, 1994.
- LOCKERBIE, R.O. The neuronal growth cone: a review of this locomotory, navigational and target recognition capabilities. *Neuroscience*, 20: 719-729, 1987.

- LONGO, F.M.; MANTHORPE, M.; SKAPER, M.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Neuronotrophic activities accumulate *in vivo* within silicone nerve regeneration chambers. **Brain Res.**, 262: 109-116, 1983.
- LOW, P.A. Hereditary hypertrophic neuropathy in the Trembler mouse, Part 1 (Histopathological studies: light microscopy). **J. Neurol. Sci.**, 30: 327-337, 1976a.
- LOW, P.A. Hereditary hypertrophic neuropathy in the Trembler mouse, Part 2 (Histopathological studies: electron microscopy). **J. Neurol. Sci.**, 30: 343-348, 1976b.
- LU, L.; RICHARDSON, P.M.; GERVAIS, F.; SKAMENE, E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brain Res.**, 510:144-146, 1990.
- LU, X.; SKAMENE, E.; RICHARDSON, P.M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. **Brain Res.**, 652: 174-176, 1994.
- LUBINSKA, L. Early course of wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. **Brain Res.**, 130: 47-63, 1977.
- LUBINSKA, L. Patterns of wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. **Brain Res.**, 233: 227-240, 1982.
- LUNDBORG, G. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone: London, 1988.
- LUNN, E.R.; PERRY, V.H.; BROWN, M.C.; ROSEN, H.; GORDON, S. Absence of wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. **Eur. J. Neurosci.**, 1: 27-33, 1989.
- LUNN, E.R.; BROWN, M.C.; PERRY, V.H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neurosci.**, 35(1): 157-165, 1990.
- MADISON, R. D. and ARCHIBALD, S. J. Point sources of Schwann cells result in growth into a nerve entubulation repair site in the absence of axons: effects of freeze-thawing. **Exp. Neurol.**, 128: 266-275, 1994.

- POLLARD, J.D. & McLEOD, J.G. Nerve grafts in the Trembler mouse: An electrophysiological and histological study. *J. Neurol. Sci.*, **46**: 373-383, 1980.
- RAIVICH, G. & KREUTZBERG, G.W. Expression of growth factor receptors in injured nervous tissue. I. Axotomy leads to a shift in the cellular distribution of specific B-nerve growth factor binding in the injured and regenerating PNS. *J. Neurocytol.*, **16**: 689-700, 1987.
- RICHARDSON, P.M.; McGUINNESS, U.M.; AGUAYO, A.J. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature (London)*, **284**: 264-65, 1980.
- ROITT, I.; Brastoff, J.; Male, D. Transplantation and Rejection. In: IMMUNOLOGY, 3rd edition, Morby-Year Book Europe Ltd., 1993. p. 24.1-24.10.
- ROSEMBERG, A.S. & SINGER, A. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**: 333-358, 1992.
- RORSCHING, S. The neurotrophic factor concept: A reexamination. *J. Neurosci.*, **13**(7): 2739-2748, 1993.
- RUSHTON, W.A.H. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J. Physiol.*, **115**: 101-110, 1951.
- SALONEN, V.; PELTONEN, J.; ROYTTA, M.; VIRTANEN, I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J. Neurosci.*, **16**: 713-720, 1987.
- SANES, J.R. Extracellular matrix molecules that influences neural development. *Ann. Rev. Neurosci.*, **12**: 491-516, 1989.
- SCARAVILLI, F. The influence of distal environment on peripheral nerve regeneration across a gap. *J. Neurocytol.*, **13**: 1027-1041, 1984.
- SEDDON, H.J. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br. J. Surg.*, **35**: 151-167, 1947.
- SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. *Brain*, **66**: 237-288, 1943.

- SENDTNER, M.; STOCKLI, K.A.; THOENEN, H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J. Cell Biol.*, **118**(1): 139-148, 1992.
- SIDMAN, R.L.; GREEN, M.C.; APPEL, S.H. Catalog of the neurological mutants of the mouse. Harvard University Press, Cambridge, 1965.
- SINGER, M. & STEINBERG, M. C. Wallerian degeneration: A reevaluation based on transected and colchicine-poisoned nerves in the amphibian, *Triturus*. *Am. J. Anat.*, **133**: 51-84, 1972.
- SINGH, R.; MECHELSE, K.; STEFANKO, S. Role of tissue typing on preserved nerve allografts in dogs. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, **40**: 865-871, 1977a.
- SINGH, R.; VRIESENDORP, H.M.; MECHELSE, K.; STEFANKO, S. Cadaver nerve allografts in dogs. *Biomedicine*, **35**: 67-70, 1981.
- SINGH, R.; VRIESENDORP, H.M.; MECHELSE, K.; STEFANKO, S. Nerve allografts and histocompatibility in dogs. *J. Neurosurg.*, **47**: 737-743, 1977b.
- SMITH, R.S.; KOLES, Z.J. Myelinated nerve fibers - computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am. J. Physiol.*, **219**: 1256-1260, 1970.
- SNIPES, E.J. & SUTER, U. Signaling pathways mediating axon-Schwann cell interactions. *TINS*, **17**(10): 399-401, 1994.
- SON, Y. & THOMPSON, W. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, **14**: 125-132, 1995.
- STOLL, G.; GRIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.*, **18**: 671-683, 1989.
- SUNDERLAND, S. Nerves and nerves injuries. London, Churchill Livingstone, 1978.

- TAINIUCHI, M.; CLARK, H.B.; SCHWEITZER, J.B.; JOHNSON, E.M. Expression of nerve growth factor receptor by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, supression by axonal contact and binding properties. **J. Neurosci.**, **8**: 664-681, 1988.
- TAKAHATA, N.; KLEIN, J.; SATTA, Y. The mollecular descent of the major histocompatibility complex. **Annu. Rev. Immunol.**, **11**: 269-295, 1993.
- TONA, A.; PERIDES, G.; RAHEMTULIA, F.; DAHL, D. Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. **J. Histochem. Cytochem.**, **41**(4): 593-599, 1993.
- TORVIK, A. Central chromatolysis and the axon reaction: a reapraisal. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **2**: 423-4732, 1976.
- VARON, S. Factors promoting the growth of the nervous system. **Discussions Neurosci.**, **2**: 9-62, 1985.
- WAEGH, S.M.; LEE, V.M.-Y.; BRADY, S.T. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. **Cell**, **68**: 451-463, 1992.
- WALLER, A. V. Experiments on the section of glossofaryngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced therby in the structure of their primitive fibers. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, **140**: 423-9, 1850.
- WAXMAN, S. G. Structure-function relations in nerves and nerve injuries. In: **NERVE repair and regeneration: its clinical and experimental basis**. Eds. D. L. Jewett, H. R. McCarroll, Jr., St. Louis, Mosby, 1980. p. 186-198.
- WEBSTER, H. de F. & FAVILLA, J. T. Development of peripheral fibers. In: **Peripheral Neuropath**. Eds. P. J. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert, R. P. Bunge. Philadelphia, Saunders, 1984. p. 329-359.
- WEINGERG, E.L. & REINE, C.S. Reinnervation os peripheral nerve segments implanted into the rat central nervous system. **Brain Res.**, **198**: 1-11, 1980.

- WENDT, J.S., FAGG, G.E.; COTMANN, C.W. CNS regeneration in rat: Growth of Cholinergic fibers into sciatic nerve transplants after fimbria transection. *Neurology*, **31**: 91-94, 1981.
- WHITE, F.V.; TOFWS, A.D.; GOODRUM, J.F.; NOVICKI, D.I.; BOULDIN, T.W.; MORREL, P. Lipid metabolism during early stages of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J. Neurochemistry*, **52**: 1085- 1092, 1989.
- WILLIAMS, L.R.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J. Comp. Neurol.*, **218**: 460-470, 1983.
- ZALEWSKI, A.A. & GULATI, A.K. Survival of nerve and Schwann cells in allografts after cyclosporin A treatment. *Expl. Neurol.*, **70**: 219-225, 1980.
- ZALEWSKI, A.A. & SILVERS, W.K. The long-term fate of neurons in allografts of ganglia in Ag-B-compatible normal and immunologically tolerant rats, *J. Neurbiol.*, **8**: 207-215, 1977.
- ZALEWSKI, A.A. The effect of Ag-B locus compatibility and incompatibility on neuron survival in transplanted sensory ganglia in rats. *Expl. Neurol.*, **33**: 576-583, 1971.

ABSTRACT

After a peripheral nerve lesion, the axonal regeneration can be determined by the intrinsic neuronal properties and by nerve microenvironment features (Fawcett, 1992). Recently, the C57BL/6J isogenic mice strain was observed to presenting a subnormal axonal regeneration (Lu et al., 1990; 1994). The aim of this study was to investigate the peripheral axonal regeneration in adult male mice (8 to 10 weeks old) using a predegenerated nerve transplantation model. The mice were from C57BL/6J (**C**), BALB/cJ (**B**) and A/J (**A**) isogenic strains and from F1 descendents. F1 was obtained by crossing male C57BL/6J with female BALB/cJ (**CxB**) and A/J (**CxA**). Only male mice were used as donors and receptors of the nerve graft. Four types of transplants were performed: 1st) isotransplants of **C** (n=3), **B** (n=3) and **A** (N=3) strains; 2nd) between donors of **C** strain (N=6) and receptors of **CxB** (n=3) and **CxA** (n=3); 3rd) between donors of **B** strain (N=3) and receptors of **CxB** (n=3) and 4th) between donors of **A** strain (N=3) and receptors of **CxA** (n=3). Under deep anesthesia (Pentobarbital, 50 mg/Kg, i.p.), all donors of each strain (**C**, n=6; **B**, n=3; **A**, n=3) had the left sciatic nerve transected at the level of obturator tendon and the proximal nerve stump was ligated to avoid nerve regeneration. Two weeks after transection, the donor was reoperated and a 7mm-length segment of the distal nerve stump was removed for transplantation. At the same time, receptors (F1 **CxA**; F1 **CxB** [allotransplants] and isogenic strains [isotransplants]) had the left sciatic nerve transected at the level of the obturator tendon. The nerve graft was attached to the receptor nerve proximal stump by a 3mm-long polyethylene tube (PT) (i.d.=0.76mm) leaving a 1mm gap. Four weeks after transplantation, the animals were perfused transcardiacally with Karnovsky's solution (Paraformaldehyde 2%, Glutaraldehyde 1%) and the regenerated nerves were embedded in epoxy resin (Araldite). Transverse semi-thin nerve sections were obtained at the distal end of the PT and the total number of regenerated myelinated axons (*TMA*) was counted. Transverse ultra-thin sections were obtained at the same level. Four fields of each specimen were photographed at the electron microscope (X2000). The negatives were enlarged (X3) and the diameter of myelinated axons (*AD*) and myelin thickness (*MT*) were measured on a digitalizing table using SigmaScan Measurement[®] software. The results showed no significant differences between the evaluated parameters in the isograft groups: *TMA* (**C**=3136±287; **B**=2759±170; **A**=2835±239); *AD* and *MT*. Interestingly, the F1 allograft results showed a higher *TMA* in the 2nd transplant type (**C** to F1 **CxB**=4658±304; **C** to F1 **CxA**=3899±198) than in 3rd transplant type (**B** to F1 **CxB**=2595±300) [$p<0,05$], but it was similar to the 4th transplant type (**A** to F1 **CxA**=3933±565). On the other hand, *MT* was not statistically different between the allograft groups, while *AD* was higher in the groups in which **C** was donor. The main conclusion is that non-neural cells within the nerve of C57BL/6J strain probably are not the limiting factor for the myelinated axon regeneration. Also, these results support the hypothesis that C57BL/6J axons could not recognize in time the extracellular regenerating stimulus. This problem may be caused by a neuronal deficiency in the synthesis and/or expression of neurotrophin high-affinity receptors, such as trkA for NGF, after injury.