

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ADRIANA PERTILLE

REPARO NERVOSO PRIMÁRIO EM RATOS, USANDO AUTO-  
ENXERTO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO IMEDIATAMENTE APÓS  
INJEÇÃO DE LIDOCAÍNA

|                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Este exemplar corresponde à redação final<br>da tese defendida pelo(a) candidato (a)<br>ADRIANA PERTILLE<br>e aprovada pela Comissão Julgadora. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e  
Estrutural na área de Anatomia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Júlia Marques  
Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC  
 Nº CHAMADA T/ UNICAMP  
P434r  
 V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
 TOMBO BCI 50860  
 PROC 16.837102  
 C \_\_\_\_\_ DX \_\_\_\_\_  
 PREÇO R\$11,00  
 DATA 12/09/02  
 Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00173062-0

BIB ID 256981

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**P434r**

**Pertille, Adriana**

Reparo nervoso primário em ratos, usando auto-enxerto de  
 músculo esquelético imediatamente após injeção de lidocaína/  
 Adriana Pertille. --  
 Campinas, SP: [s.n.], 2002

Orientadora: Maria Júlia Marques

Co-Orientador: Humberto Santo Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual  
 de Campinas.

Instituto de Biologia

1. Regeneração nervosa. 2. Auto-enxerto de músculos. I. Marques,  
 Maria Júlia. II. Santo Neto, Humberto. III. Universidade Estadual de  
 Campinas. Instituto Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 11/07/02

**BANCA EXAMINADORA**

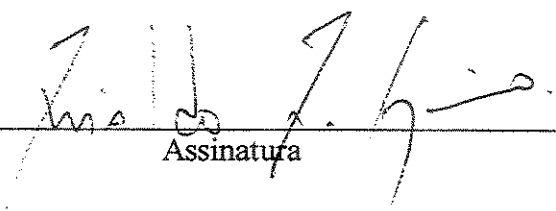
Profa. Dra. Maria Júlia Marques (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

  
Assinatura

Prof. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

  
Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## DEDICATÓRIA

**À DEUS....**

*“Agradecimentos infinitos pela sabedoria que me permitiu adquirir, pela força para conseguí-la e pelo mérito de alcançá-la”*

**AOS MEUS PAIS, ANTONIO E ALAYDE, MINHA IRMÃ SANDRA ....**

*“ Dividi, comigo, os méritos dessa conquista, porque ela vos pertence”*

## AGRADECIMENTOS

À **toda minha família** pelo incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques** pela confiança e orientação dos meus passos. Expresso meu respeito e admiração.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** pela importante colaboração durante a realização do trabalho.

À **Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder** e ao **Prof. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro** pelas considerações no exame de pré-banca e banca deste trabalho.

À **Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari** pelas considerações no exame de qualificação e pré-banca.

Ao **Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos** pelas considerações no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Marco Cesar Somazz** e à **Profa. Dra. Rosana Macher Teodori** pela amizade e incentivo.

Ao **Prof. José Merzel** do Departamento de Morfologia FOP- UNICAMP, que gentilmente permitiu o uso do analisador de imagens para análise morfométrica deste trabalho.

Às **Sras. Lilian Alves Senne Panagio, Silvia Helena Burghi Kalaf, Lourdes Pinheiro e Ana Floriana Rodrigues** pela atenção que dispensaram durante todo o mestrado.

Aos **Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula** pela disposição em ajudar a parte experimental deste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima Francisco** pela manutenção e cuidado com os animais utilizados no experimento.

À **todos os AMIGOS DA BIOLOGIA, DA FISIOTERAPIA E DA PÓS-GRADUAÇÃO** que sempre estão ao meu lado

Ao **CNPq** pela concessão de bolsa.

***“A mais bela coragem é a confiança que  
devemos ter na capacidade do nosso esforço”  
(autor desconhecido)***

## SUMÁRIO

### Resumo

### Abstract

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                       | 1  |
| 2. Objetivo .....                                        | 5  |
| 3. Revisão da Literatura                                 |    |
| 3.1 Organização estrutural do nervo espinhal .....       | 8  |
| 3.2 Degeração e regeneração do nervo espinhal .....      | 10 |
| 3.3 Auto-enxerto na reparação nervosa .....              | 12 |
| 4. Materiais e Métodos                                   |    |
| 4.1 Animais .....                                        | 20 |
| 4.2 Preparo do enxerto muscular .....                    | 20 |
| 4.2.1 Enxerto Muscular 15 minutos (EM15) .....           | 20 |
| 4.2.2 Enxerto Muscular 24 horas (EM24) .....             | 21 |
| 4.3 Implante do retalho .....                            | 21 |
| 4.4 Sacrificio dos animais e obtenção do material .....  | 22 |
| 4.4.1 Microscopia de Luz e Eletrônica .....              | 22 |
| 4.4.2 Microscopia Confocal .....                         | 23 |
| 4.5 Análise Ultra-Estrutural .....                       | 23 |
| 4.6 Análise Morfométrica .....                           | 23 |
| 4.7 Tratamento Estatístico .....                         | 25 |
| 5. Axonal regeneration in muscle basal lamina autografts |    |
| Abstract .....                                           | 28 |
| Introduction .....                                       | 29 |
| Material and Methods .....                               | 30 |
| Results .....                                            | 32 |
| Discussion.....                                          | 35 |
| Bibliography.....                                        | 38 |
| Legends.....                                             | 41 |
| Figure 1 .....                                           | 42 |
| Figure 2 .....                                           | 43 |
| Figure 3 .....                                           | 44 |
| Figure 4 .....                                           | 45 |
| Figure 5.....                                            | 46 |
| Table 1.....                                             | 47 |
| 6. Considerações Finais.....                             | 48 |
| 7. Referências Bibliográficas.....                       | 54 |

## RESUMO

No presente trabalho, avaliamos a regeneração axonal utilizando enxerto de músculo estriado esquelético imediatamente após o seu preparo com anestésico local. O nervo ciático de ratos Wistar adultos foi seccionado, obtendo uma falha de 1 cm de comprimento e seu reparo realizado através de enxerto muscular preparado com injeção de cloridrato de lidocaína 2%. O enxerto foi implantado 15 minutos ou 24 horas após o preparo e os animais foram sacrificados 60 e 120 dias pós-cirúrgico. O nervo ciático implantado foi preparado para análise através das microscopias de luz, eletrônica e confocal. A análise morfométrica mostrou diminuição no diâmetro do axônio e da fibra nervosa, como também na espessura da bainha de mielina nos dois tipos de enxerto, com diferença significativa do controle. Os valores da razão G no coto distal dos grupos 15 minutos e 24 horas não foram diferentes do nervo normal, mostrando que níveis apropriados de mielinização foram atingidos pelos axônios regenerados. A razão G foi maior na região do enxerto em ambos os grupos, sugerindo mielinização insatisfatória dos axônios. As características ultra-estruturais dos axônios regenerados e das junções neuromusculares, em todos os grupos, foram similares ao normal. Estes resultados sugerem que não existe restrição para o uso do enxerto muscular imediatamente após o seu preparo com cloridrato de lidocaína, pois este promove regeneração nervosa semelhante àquela observada quando este tipo de enxerto é utilizado 24 horas após a injeção do anestésico. A diminuição da espessura da bainha de mielina no enxerto sugere que a associação entre célula de Schwann, axônios regenerados e lâmina basal muscular pode ser melhor investigada.

## ABSTRACT

We evaluated the potential of muscle autografts to perform primary nerve repair when used immediately after their preparation with lidocaine injection. The right sciatic nerve of adult Wistar rats was sectioned and muscle grafts were used 15 minutes or 24 hours after lidocaine injection, to repair a gap 1.0 cm long. Morphometric analyses showed a decrease in axon and nerve fiber diameter, as well as in myelin thickness, which were similar for both types of grafts and significantly different from the control. G-ratio values in the distal stump for both groups were not different from the normal sciatic nerve, showing that a proper level of myelination was attained by the regenerated axons. However, within the graft, the G ratio was increased in both groups, suggesting poorer myelination in the graft region. Ultrastructural profiles of intramuscular nerve bundles and neuromuscular junctions, for both 15 minutes and 24 hours after graft implantation were similar to the normal. These results suggest that there are no restrictions to the use of a muscle graft immediately after lidocaine injection, in primary nerve repair, since the results of nerve regeneration were comparable to those observed when this type of graft is used 24 hours after being prepared. The decrease in myelin thickness in the graft suggests that the associations between Schwann cells, regenerated axons and muscle basal lamina should be further investigated to improve muscle graft nerve regeneration.

## **1. INTRODUÇÃO**

Após a lesão de um nervo, inicia-se um processo de degeneração das fibras nervosas, distalmente à lesão, como consequência da interrupção da continuidade com seu centro trófico, o corpo celular. Esta degeneração foi descrita pela primeira vez por Waller (1850) e é conhecida como degeneração Walleriana, que resulta na degradação e fagocitose dos axônios e da bainha de mielina. Durante este processo, as células de Schwann do coto distal proliferam e tornam-se alongadas. Os prolongamentos das células de Schwann vizinhas unem-se para formar uma coluna conhecida como banda de Büngner, que serve de conduto para guiar os axônios em regeneração (THOMAS, 1964).

Quando ocorre a secção total do nervo periférico, o método clássico para o reparo é a sutura epineural (MILLES, 1981; KLINE, 1990). Entretanto, quando a lesão provoca uma falha que não pode ser reparada por sutura direta dos cotos nervosos, faz-se necessário o uso de um enxerto (FAWCETT & KEYNES, 1986; NORRIS et al., 1988; SANTO NETO et al., 1998).

Se o nervo danificado for de pequeno diâmetro, a lesão pode ser reparada por auto-enxerto de nervo, geralmente um nervo cutâneo. Entretanto, quando o nervo danificado for mais calibroso, vários segmentos de um nervo cutâneo são utilizados entre os cotos nervosos. Este procedimento, conhecido como “cable graft”, traz algumas desvantagens como a perda da função do nervo doador, a diferença entre o diâmetro do nervo lesado e do nervo doado, a formação de cicatrizes pelo excesso de suturas no local do enxerto e a possibilidade do material ser insuficiente para o reparo da lesão (FAWCETT & KEYNES, 1986; NORRIS et al., 1988; GLASBY et al., 1991; CALDER & GREEN, 1995; SANTO NETO et al., 1998; BRANDT et al., 1999).

Na tentativa de suprimir essas desvantagens do auto-enxerto de nervo, alguns autores sugerem o uso de materiais alternativos (biológicos ou artificiais) destacando-se o silicone

(LUNDBORG et al., 1982; NAVARRO et al., 1996; JERREGARD et al., 2001), colágeno (KIM et al., 1993; BRANDT et al., 1999), veias autógenas (CHIU et al., 1982), tubos biodegradáveis de ácido poliglicólico (MATSUMOTO et al., 2000; WEBER et al., 2000) e o músculo estriado esquelético (GLASBY et al., 1986 a, b, 1991; FAWCET & KEYNES, 1986; NORRIS et al., 1988; GATTUSO et al., 1989; MATTAR Jr. et al., 1990; HALL & ENVER, 1994; SOMAZZ, 1994; SANTO NETO et al., 1998; HOUSTAVA et al., 1999). Outras vezes adota-se o uso conjunto de nervo e músculo esquelético (CALDER & GREEN, 1995) e veias contendo em seu interior fragmentos de músculo esquelético fresco (BATTISTON et al., 2000 a, b; GEUNA et al., 2000).

O auto-enxerto de músculo estriado esquelético tem sido largamente estudado por apresentar várias vantagens. É facilmente obtido, pode ser confeccionado no tamanho necessário para o reparo do nervo lesado e não está associado à rejeição (NORRIS et al., 1988; GLASBY, 1990; CALDER & GREEN, 1995). Outra vantagem do uso do músculo estriado esquelético é que admite-se haver semelhança química entre a lâmina basal muscular e aquela das células de Schwann. Considerando que a lâmina basal da célula de Schwann desempenha papel fundamental na regeneração axonal, a lâmina basal muscular pode substituí-la no reparo da lesão nervosa periférica (SANES et al., 1978; IDE et al., 1983; IDE, 1984; TOHYAMA & IDE, 1984; TOHYAMA, 1985; BRYAN et al., 1993).

No auto-enxerto de nervo, a obtenção de tubos de lâmina basal da célula de Schwann ocorre através do processo de degeneração Walleriana. Da mesma forma, o músculo estriado esquelético precisa sofrer um pré-tratamento para que os tubos de lâmina basal muscular tornem-se vazios. Este processo pode ser químico, mecânico ou através de choque térmico (FAWCETT & KEYNES, 1986).

Um dos métodos químicos baseia-se na ação miotóxica dos anestésicos locais (cloridrato de lidocaína), onde as fibras musculares são destruídas e a lâmina basal permanece íntegra (SANTO NETO et al., 1998). Logo nos primeiros minutos após a injeção de anestésico local, este produz uma lesão no sarcolema da fibra muscular, seguida de súbita e abundante entrada de íons cálcio extracelular para o retículo sarcoplasmático (FOSTER & CARLSON, 1980). O cálcio elevado ativa uma série de enzimas com efeitos celulares potencialmente deletérios, tais como fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases (COTRAN et al., 1999). Sendo assim, após algumas horas instala-se um quadro inflamatório e dentro de 24 horas, grande parte das fibras musculares necróticas é removida, resultando em tubos de lâmina basal vazios (NONAKA et al., 1983).

Os resultados obtidos com esta técnica mostram que o pré-tratamento do músculo esquelético com cloridrato de lidocaína e implante após 24 horas, permite o crescimento axonal através do enxerto e colonização do coto distal, com a mesma intensidade observada quando o músculo doador é submetido a repetidos processos de congelamento. Entretanto, uma possível desvantagem da técnica é que os enxertos assim obtidos só podem ser implantados 24 horas após seu preparo, impedindo seu uso nos casos de reparo imediato.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi verificar se o enxerto de músculo esquelético utilizado imediatamente após o seu preparo com injeção de cloridrato de lidocaína, permite regeneração axonal semelhante àquela observada quando o enxerto é utilizado 24 horas após a injeção do anestésico local, para reparo imediato de lesões nervosas periféricas.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO NERVO ESPINHAL

O nervo periférico é constituído por feixes de fibras nervosas sensitivas e motoras, que se agrupam em fascículos, envolvidos por tecido conjuntivo. Cada fibra nervosa consiste de um axônio e de seu envoltório de célula de Schwann. Estas são células da glia do Sistema Nervoso Periférico que participam no suprimento de metabólitos e fatores tróficos para os axônios (VARON & BUNGE, 1978), formação da bainha de mielina (ASBURY, 1967), além de desempenhar papel fundamental na regeneração axonal (CAJAL, 1928; PELLEGRINO, et al., 1980).

Na sua superfície externa, a célula de Schwann é envolvida pela lâmina basal (IDE et al., 1990) formada por colágeno tipo IV, laminina, proteoglicana de sulfato de heparina, fibronectina e nidogênio/entactina (SANES, 1982; ELDRIGDE et al., 1986; TIMPL, 1989). Dentre estas, a laminina e a fibronectina são conhecidas por promover o crescimento dos axônios no processo de regeneração (TOYOTA et al., 1990; WANG et al., 1992; BRYAN et al., 1993).

As células de Schwann originam-se da crista neural (HARRISON, 1924; WESTON, 1970) e durante o desenvolvimento migram ao longo da fibra nervosa, iniciando o processo de mielinização dos axônios. As fibras nervosas são classificadas em mielínicas e amielínicas.

A fibra mielínica é aquela na qual a célula de Schwann envolve um único axônio, formando a bainha de mielina (IDE et al., 1990). Esta bainha é um excelente isolante elétrico, que permite condução mais rápida do impulso nervoso e sua espessura é diretamente proporcional ao diâmetro do axônio (SMITH et al., 1982). Ao longo de toda a extensão da fibra, ocorre interrupção da bainha em intervalos regulares, estando as células de Schwann vizinhas separadas por uma região denominada nodo de Ranvier. Ao microscópio eletrônico a bainha de mielina é constituída por uma série de lamelas concêntricas originadas de voltas da membrana da célula de

Schwann ao redor do axônio. Em corte transversal observam-se as linhas densas maiores derivadas da fusão dos folhetos internos da membrana plasmática e facilmente identificadas pela sua elétrôn-densidade, como também as linhas intraperiódicas derivadas da aproximação das superfícies externas da membrana plasmática (MORELL, 1977).

Na fibra amielínica, cada célula de Schwann envolve vários axônios de pequeno diâmetro (0,2 – 3  $\mu\text{m}$ ). Os axônios geralmente são separados uns dos outros por pequenas projeções do citoplasma da célula de Schwann (GAMBLE & EAMES, 1964) e são caracterizados pela ausência da bainha de mielina e dos nodos de Ranvier. Sendo assim, as células de Schwann vizinhas estão dispostas de forma contínua (IDE et al., 1990).

Os nervos são reforçados e protegidos por camadas de tecido conjuntivo. O conjunto de fascículos que constitui um nervo está envolvido externamente por tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos, o epineuro, que atua como camada protetora durante os movimentos dos membros e contra traumas externos. Cada fascículo está envolvido por tecido conjuntivo denso, rico em colágeno e células epiteliais, formando o perineuro, que além de desempenhar papel de proteção mecânica (LUNDBORG, 1987), atua como barreira à passagem de macromoléculas. Dentro de cada fascículo encontram-se várias fibras nervosas envolvidas intimamente por delicadas fibrilas colágenas, constituindo o endoneuro (SUNDERLAND, 1978).

À medida que o nervo se distancia de sua origem, os fascículos o abandonam para entrarem nos músculos a serem inervados. O conjunto de axônios penetra no músculo esquelético através do feixe vasculonervoso, dividindo-se em numerosos feixes intramusculares. Quando abandonam os feixes, cada axônio motor dirige-se para algumas fibras musculares. A porção terminal desse axônio sofre delicadas arborizações denominadas de botões terminais, que se alojam em uma depressão da fibra muscular, a fenda sináptica (BOWDEN & DUCHEN, 1976; PETERS et al.,

1976). A região de “contato” do terminal nervoso motor com a fibra muscular é denominada de junção neuromuscular, que possui compartimentos pré e pós-sinápticos, separados pelo espaço extra-celular (HALL & SANES, 1993).

O compartimento pré-sináptico é formado pelo terminal nervoso recoberto por processos da célula de Schwann (SAITO & ZACKS, 1969). A característica essencial do terminal é o acúmulo de vesículas sinápticas (ENGEL & SANTA, 1971) contendo acetilcolina, trifosfato adenosina e alta concentração de íons cálcio e magnésio (VOLNANDT & ZIMMERMAN, 1986).

O compartimento pós-sináptico é composto pelo sarcolema imediatamente abaixo do terminal nervoso, que é altamente especializado e apresenta dobras juncionais. No ápice destas dobras encontram-se os receptores de acetilcolina e no fundo estão dispostos os canais de sódio responsáveis pela geração do potencial de ação (HALL & SANES, 1993).

### **3.2 DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DO NERVO ESPINHAL**

Lesões traumáticas do nervo resultam em perdas funcionais e são consequências comuns de acidentes automobilísticos, traumas por objetos perfurantes, quedas e acidentes industriais (ROBINSON, 2000).

A recuperação funcional depende do local e tipo da lesão, bem como da capacidade dos axônios lesados regenerarem e reinervarem os órgãos-alvo correspondentes (GUTMANN & SANDERS, 1943; HORCH & LISNEY, 1981; NAVARRO et al., 1994).

Na primeira semana após a lesão, macrófagos são recrutados e juntamente com as células de Schwann, promovem a lise e fagocitose da bainha de mielina (PERRY et al., 1987). Os macrófagos secretam proteases e metabólitos oxigênio-reativos, importantes para degradação de células mortas, fatores de crescimento e citocinas (NATHAN, 1987; RAPPOLEE & WERB,

1990), auxiliando assim na degeneração nervosa e contribuindo para o sucesso da regeneração (PERRY & BROWN, 1992). Neste período ocorre também a proliferação das células de Schwann, que continua por aproximadamente 2 semanas (BRADLEY & ASBURY, 1970; AGUAYO et al., 1976). Estas células tornam-se alongadas e seus prolongamentos delgados interdigitam-se com os processos das células vizinhas, formando uma coluna denominada banda de Büngner, que guiará os axônios em regeneração na direção de seus órgãos-alvo (IDE et al., 1990; HALL, 1997). A importância da degeneração Walleriana é a de criar ambiente apropriado para o sucesso da regeneração dos axônios lesados (PERRY & BROWN, 1992).

A degeneração do axônio é causada pela interrupção da continuidade deste com seu centro trófico, o corpo celular (IDE et al., 1990), que também sofre alterações estruturais e funcionais após a lesão. Ocorre aumento do seu volume, deslocamento do núcleo para a periferia e alterações na estrutura do citoplasma. Essa reação reflete a preparação metabólica do corpo celular para a regeneração axonal, ocorrendo maior concentração de RNA, aumentando assim a síntese protéica. Dentro dos primeiros dias após a lesão, os axônios do coto proximal produzem vários brotos amielínicos, que avançam distalmente. Na porção mais distal de cada broto há uma protuberância, denominada cone de crescimento, da qual originam-se vários filopódios (falsos pés), que identificam o ambiente através de movimentos constantes (LUNDBORG, 1987).

Nesta fase, as células de Schwann diminuem a regulação dos genes que expressam as proteínas que integram a bainha de mielina e aumentam a regulação dos genes responsáveis pela síntese de substâncias neurotróficas, tais como o fator de crescimento do nervo (nerve growth factor – NGF; MATSUOKA et al., 1991) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (brain derived neurotrophic factor – BDNF; MEYER et al., 1992), como também aumentam a síntese de

laminina (KUECHERER-EHRET et al., 1990) e fibronectina (MATHEWS & FRENCH-CONSTANT, 1995), moléculas que compõem a lâmina basal.

Os axônios em regeneração crescem no interior das bandas de Bünger que estão envolvidas pela lâmina basal da célula de Schwann. Esse fenômeno sugere que a lâmina basal da célula de Schwann não funciona apenas como suporte mecânico, mas também exerce papel trófico sobre os axônios em regeneração (IDE et al., 1983). A presença da laminina na superfície interna da lâmina basal da célula de Schwann reafirma seu papel trófico, sendo esta reconhecida pelos brotos axonais que invadem a lâmina basal durante o processo de regeneração (WANG et al., 1992).

Após os brotos amielínicos penetrarem nos tubos de lâmina basal, ocorre uma segunda fase de proliferação das células de Schwann. Tal proliferação é necessária para a produção e reorganização morfológica da bainha de mielina dos axônios em regeneração (PELLEGRINO & SPENCER, 1985).

### 3.3 AUTO-ENXERTO NA REPARAÇÃO NERVOSA

Nos casos de lesão nervosa por compressão, a continuidade do nervo é mantida e a regeneração ocorre sem necessidade de intervenção cirúrgica, com excelente prognóstico. Quando ocorre a secção total do nervo, os cotos proximal e distal normalmente retraem alguns milímetros. O método clássico para o reparo deste tipo de lesão é a sutura epineural (MILLES, 1981; KLINE, 1990). Entretanto, quando a distância entre os cotos é maior a sutura direta pode provocar tensão no local do reparo, levando a constrição de vasos sanguíneos e formação de fibrose, produzindo resultado funcional insatisfatório (TERZIS et al., 1975). Nesses casos, faz-se necessário o uso de enxerto (FAWCETT & KEYNES, 1986; NORRIS et al., 1988; SANTO

NETO et al., 1998), mas a probabilidade da regeneração axonal ser bem sucedida diminui à medida que aumenta o intervalo entre os cotos (HALL, 1997).

O auto-enxerto de nervo cutâneo tem sido largamente usado na reparação nervosa periférica quando a sutura epineural não é indicada, embora seu uso apresente algumas desvantagens, tais como perda do nervo doador e consequente parestesia ou anestesia do local. Além disso, quando o nervo lesado é de largo diâmetro, o enxerto nervoso pode ser inadequado, sendo então necessário o uso de vários fragmentos do nervo doador alinhados paralelamente, para construção de um “cable graft”. O excesso de linhas de sutura neste cabo leva a formação de cicatrizes que podem interferir com o crescimento dos axônios, resultando em regeneração inadequada (FAWCETT & KEYNES, 1986; NORRIS et al., 1988; GLASBY et al., 1991; CALDER & GREEN, 1995; SANTO NETO et al., 1998; BRANDT et al., 1999).

Dentre vários materiais (biológicos ou não), o músculo estriado esquelético mostra ser uma alternativa adequada para o reparo da lesão nervosa. Estudos demonstraram a semelhança química e morfológica entre a lâmina basal da célula de Schwann e a lâmina basal muscular (IDE et al., 1983; IDE, 1984; TOHYAMA & IDE, 1984; TOHYAMA, 1985). A lâmina basal muscular contém moléculas tais como a laminina e fibronectina, que suportam o crescimento axonal (CARBONETTO, 1984; PERRIS et al., 1989; DE CURTIS, 1991).

Vários métodos são empregados para o tratamento do músculo esquelético, todos baseados no fato de que a fibra muscular deve ser desnaturada, deixando vazios os tubos de lâmina basal, permitindo assim o crescimento dos axônios.

#### *- Tratamento químico do músculo esquelético seguido de compressão*

Um dos primeiros protocolos para preparação do retalho muscular foi descrito por KEYNES et al. (1984). De acordo com o método, o fragmento muscular é imerso em água

destilada e posteriormente tratado com produtos químicos na seguinte sequência  $\text{CaCl}_2$ , KCl e trietanolamina, cuja finalidade é retirar o conteúdo citoplasmático da fibra muscular. O esvaziamento final é obtido pela compressão do fragmento muscular entre duas superfícies planas. Enxertos assim preparados foram empregados no reparo primário de lesões do nervo ciático de ratos e os autores concluíram que as fibras nervosas crescem através dos tubos de lâmina basal muscular.

FAWCETT & KEYNES (1986) compararam o auto-enxerto de nervo e auto-enxerto de músculo preparado por este método, em ratos e coelhos. Depois de três meses, avaliaram os dois grupos funcional e eletrofisiologicamente e observaram que o auto-enxerto de músculo foi tão bem sucedido quanto o auto-enxerto de nervo. Os autores sugeriram então, que os enxertos de músculo preparados desta forma poderiam ser úteis no reparo de nervos em humanos. Entretanto, havia o inconveniente de que a técnica promovia o esvaziamento de apenas 50% do conteúdo sarcoplasmático, além de ser um método demorado e trabalhoso.

*- Congelamento / descongelamento do retalho muscular*

Em 1986(a), GLASBY et al. preconizaram um novo método através do congelamento do fragmento muscular em nitrogênio líquido e posterior descongelamento em água destilada, provocando um choque térmico e osmótico. Com este procedimento a fibra muscular é destruída, permanecendo íntegra a lâmina basal. Os auto-enxertos assim obtidos foram alinhados coaxialmente e implantados entre os cotos do nervo ciático de ratos. Os autores concluíram que o enxerto muscular foi promissor no reparo nervoso, uma vez que foi possível a regeneração dos axônios através deste e colonização do coto distal.

No mesmo ano, GLASBY et al. (1986b), utilizaram essa técnica com um fragmento do músculo triceps braquial de primatas. O enxerto muscular foi implantado em uma falha de 3 cm

do nervo ulnar. Após 6 meses observou-se regeneração axonal através do enxerto e no coto distal, além da recuperação funcional dos movimentos da mão. Esses resultados sugeriram que o método de congelamento/descongelamento pode ser apropriado para cirurgias rotineiras de reparo nervoso.

Trabalhos com enxerto de músculo autógeno em nervo mediano de primatas utilizando o método de congelamento/descongelamento, foram realizados por GATTUSO et al. (1988). Após 150 dias havia evidência eletrofisiológica de recuperação da condução nervosa através do enxerto, com recuperação funcional parcial do músculo flexor radial do carpo. Histologicamente, observou-se a presença de fibras nervosas e novas junções neuromusculares funcionais. Embora a reinervação do músculo tenha ocorrido, havendo nível aceitável de recuperação funcional, os autores demonstraram que os diâmetros das fibras nervosas regeneradas não retornavam aos valores normais. Observaram que a recuperação do nervo através dessa técnica foi superior àquela obtida com a técnica de “cable graft”, apontando uma vantagem potencial na utilização de auto-enxerto de músculo para o reparo de nervos em humanos.

Esta técnica foi aplicada no reparo do nervo mediano de 8 pacientes com idade entre 15 e 61 anos, usando como enxerto um fragmento do músculo peitoral maior. Observou-se excelente nível de recuperação, demonstrando ser este um método que oferece vantagens significativas em relação aos enxertos de nervo convencionais (NORRIS et al. 1988).

Outros trabalhos experimentais utilizando esse método também mostraram a eficiência do enxerto muscular na regeneração axonal (GSCHMEISSNER et al., 1990; GLASBY, 1990; MATTAR Jr. et al., 1990; GLASBY et al., 1991; LAWSON & GLASBY, 1995; CALDER & GREEN, 1995). No entanto, durante o congelamento/descongelamento, o retalho muscular pode encolher em até 50% do seu comprimento original, torna-se quebradiço, dificultando sua fixação

através de suturas (NORRIS et al., 1988; GLASBY, 1990; CALDER & NORRIS, 1993; HALL & ENVER, 1994).

*- Pré-aquecimento do retalho muscular*

Outro método para obtenção do retalho muscular foi descrito por HALL & ENVER (1994), que consiste no pré-aquecimento do fragmento muscular à 60°C e 80°C. Os enxertos musculares foram implantados no nervo ciático de ratos e constatou-se que o padrão de regeneração através de enxertos tratados por aquecimento à 60°C foi semelhante àquele observado através de enxertos tratados por congelamento/descongelamento. Nos enxertos aquecidos à 80°C, os cones de crescimento foram incapazes de penetrar nos enxertos. Foi sugerido que o aquecimento à 80°C inativaria os componentes da lâmina basal, que exercem função no crescimento axonal. A técnica de pré-aquecimento à 60°C apresenta algumas vantagens em relação à técnica de congelamento/descongelamento, como a ausência de fragmentação (facilitando a sutura) e a menor retração do enxerto, que podem ter importância no uso clínico.

*- Injeção de anestésico local no músculo esquelético*

Após os primeiros minutos da injeção do anestésico local no ventre muscular inicia-se mionecrose das fibras musculares, cuja extensão e intensidade dependem da concentração e do volume de anestésico injetado (BENOIT & BELT, 1972).

Ocorre lesão no sarcolema muscular, seguida de súbita e abundante entrada de íons cálcio extracelular para o retículo sarcoplasmático (FOSTER & CARLSON, 1980). A elevação dos níveis de  $\text{Ca}^{++}$  ativa uma série de enzimas, incluindo fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases, com efeitos celulares potencialmente deletérios (COTRAN et al., 1999).

A degeneração do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias começa dentro dos primeiros 15 minutos após a injeção do anestésico, progredindo para edema e necrose, seguido por fagocitose do material celular degradado nas próximas 24 – 48 horas (BENOIT & BELT, 1970; YAGIELA et al., 1981; FOSTER & CARLSON, 1980; KYTTA et al., 1986).

Mediante esses dados, um método baseado na ação miotóxica dos anestésicos locais foi descrito por SANTO NETO et al. (1998). Neste método, aplicou-se 0.3 ml de cloridrato de lidocaína 2% no músculo tibial anterior de ratos e, 24 horas após a aplicação, este foi implantado em uma falha de 1 cm do nervo ciático. Após 60 dias, observou-se que a técnica permitiu o crescimento axonal através do enxerto, colonização do coto distal e reinervação das junções neuromusculares. São destacadas algumas vantagens dessa técnica em relação a técnica de congelamento/descongelamento. Observa-se que 24 horas após o uso do anestésico, o esvaziamento do sarcoplasma da fibra necrótica é feito por um processo inflamatório, que leva à remoção “in vivo” do conteúdo sarcoplasmático. Assim, são obtidos tubos de lâmina basal muscular vazios, empregados para o crescimento dos axônios em regeneração. Ocorre apenas retração fisiológica do fragmento muscular, permitindo o uso de uma extensão menor do músculo para o preparo do enxerto. Além disso, o retalho muscular não apresenta-se quebradiço, facilitando a sutura entre os cotos. Uma vez que as células satélites permanecem íntegras no fragmento implantado, seria possível a ocorrência de regeneração muscular. Neste caso, a presença de fibras musculares poderia comprometer o sucesso da regeneração nervosa. Entretanto, não houve regeneração das fibras musculares na região do enxerto, sugerindo que a miotoxicidade do anestésico associado à falta de vascularização na região implantada pode ter comprometido a sobrevivência das células satélites.

Uma possível desvantagem da técnica é que os enxertos assim obtidos só podem ser implantados 24 horas após seu preparo, acarretando maior custo e tempo de internação de um paciente submetido a tal procedimento, além de dificultar seu uso nos casos de neurorrafia primária. Este fato levou-nos à realização do presente trabalho.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 ratos Wistar fêmeas com 6 a 7 semanas de idade (250 a 300 g), obtidos junto ao Biotério Central da UNICAMP.

Todos os animais sofreram neurraxia primária no nervo ciático direito, com auto-enxerto de músculo tibial anterior pré-tratado com cloridrato de lidocaína 2%. De acordo com o tempo esperado para a utilização do enxerto, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- grupo *EM15-60dias* (enxerto muscular 15 minutos): n=8, enxerto utilizado 15 minutos após o tratamento com lidocaína. O sacrifício destes animais foi realizado 60 dias após o implante.
- grupo *EM15-120dias* (enxerto muscular 15 minutos): n=8, enxerto utilizado 15 minutos após o tratamento com lidocaína. O sacrifício destes animais foi realizado 120 dias após o implante.
- grupo *EM24-60dias* (enxerto muscular 24 horas): n=8, enxerto utilizado 24 horas após o tratamento com lidocaína. O sacrifício destes animais foi realizado 60 dias após o implante.

O nervo ciático contralateral de 5 destes animais foi utilizado como controle.

## 4.2 PREPARO DO ENXERTO MUSCULAR

### 4.2.1 ENXERTO MUSCULAR 15 minutos (EM15)

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Francotar® (Ketamina) e Virbaxyl® 2% (cloridrato de xylazina – Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda) na proporção de 1:1, na dose 0,3 ml / 100 g de peso corporal.

Imediatamente após o animal mostrar sinais de anestesia geral, as regiões glútea, posterior da coxa e ântero-medial da perna direita foram depiladas. Os animais foram colocados em decúbito ventral e com auxílio de microscópio cirúrgico ZEISS, foi feita uma incisão de

aproximadamente 1,5 cm na região ântero-medial da perna direita para exposição do músculo tibial anterior. Com seringa de 1 ml e agulha de 13x4, foi injetado na porção medial do músculo 0,3 ml de cloridrato de lidocaína a 2% (Xilocaína® - sem vasoconstritor, Astra Química e Farmacêutica Ltda).

Após quinze minutos, foi retirado um bloco de aproximadamente 1 cm do músculo e a ferida cirúrgica fechada com fio de poliéster trançado 4-0 (Ethicon® - Johnson). Com auxílio de lupa o bloco foi adequado ao diâmetro do nervo ciático. O fragmento permaneceu em solução salina 0,9% até ser implantado.

#### *4.2.2 ENXERTO MUSCULAR 24 horas (EM24)*

Inicialmente os animais deste grupo foram levemente anestesiados por inalação de éter e receberam uma injeção transcutânea do anestésico local. Com seringa de 1 ml e agulha de 13x4, foi injetado na região ântero-medial da perna direita 0,3 ml de cloridrato de lidocaína a 2%. Após 24 horas os animais foram anestesiados e retirado o enxerto muscular como descrito acima.

### **4.3 IMPLANTE DO RETALHO**

Com o animal em decúbito ventral e auxílio do microscópio cirúrgico, a pele da região glútea e posterior da coxa direita foi aberta com uma incisão de aproximadamente 2 cm. Os planos musculares foram afastados, o nervo ciático exposto e seccionado com uma tesoura microcirúrgica.

Para obter uma distância de aproximadamente 1 cm entre os cotos, foi retirado um segmento do nervo ciático e imediatamente após procedeu-se ao implante do retalho muscular.

Os segmentos proximal e distal do nervo ciático foram fixados ao retalho muscular através de um ponto de sutura epineural para cada coto, feitos com fio monofilamento nylon 10-0

(Ethicon® - Johnson). Após o implante, a ferida cirúrgica foi fechada com fio de poliéster trançado 4-0 (Ethicon® - Johnson).

#### 4.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DO MATERIAL

Após os diferentes períodos de sobrevivência (60 e 120 dias), os animais foram anestesiados da mesma forma descrita anteriormente.

##### 4.4.1 MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA

Com auxílio de microscópio cirúrgico, o nervo ciático reparado foi exposto e fixado “*in situ*” com fixador KARNOVSKY (1965) modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,3. O fixador à 4°C permaneceu banhando o nervo por 10 minutos.

Após esse período, o nervo ciático foi retirado e seccionado em três segmentos iguais, que corresponderam à região do retalho, do coto proximal e do coto distal.

Os segmentos permaneceram no fixador por um período de uma a duas horas, posteriormente pós-fixados durante duas horas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3, desidratados em acetona e incluídos em resina Araldite Uegama®.

Cortes transversais semifinos de 1 µm foram obtidos com navalha de vidro em ultramicrotomo LKB 8800 ultratome III (locado no Departamento de Biologia Celular IB-UNICAMP) e corados com azul de toluidina a 1% em solução aquosa de Bórax a 1% para microscopia óptica. Para microscopia eletrônica foram obtidos cortes ultra-finos dos segmentos do nervo ciático implantado e do músculo sóleo do lado operado (para análise ultra-estrutural da junção neuromuscular), através de navalha de diamante e corados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963).

#### 4.4.2 MICROSCOPIA CONFOCAL

Três animais de cada grupo foram utilizados para avaliação da regeneração axonal através da microscopia confocal, tal como descrito previamente por REYNOLDS et al. (1994). Assim, os nervos ciáticos tratados foram fixados *in situ* com glutaraldeído 5%. Após 10 minutos, os nervos foram retirados e permaneceram por 1 semana em glutaraldeído 5%. Posteriormente, os nervos foram lavados com PBS e montados em DABCO (Sigma; meio de montagem para fluorescência), sob lâmina e lamínula. Foi utilizado o sistema confocal da BioRad (MRC 1024UV) acoplado a um microscópio invertido Zeiss, locado na Faculdade de Engenharia de Alimentos FEA-UNICAMP. Os nervos foram observados na objetiva de 63x 1.4 N.A., utilizando-se a linha de 568nm do laser Argônio-Kriptônio.

#### 4.5 ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL

A reinervação muscular foi avaliada 60 e 120 dias pós-cirúrgico, através do exame das características ultra-estruturais das junções neuromusculares do músculo sóleo. Foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão LEO 906, locado no Departamento de Microscopia Eletrônica, IB-UNICAMP.

#### 4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A contagem total do número de fibras mielínicas regeneradas nas regiões do enxerto e do coto distal foi feita nos cortes semifinos, através de um retículo de cem pontos acoplado à ocular do microscópio em objetiva de 40x, com auxílio de contador manual.

Para a medida da espessura da bainha de mielina, dos diâmetros da fibra nervosa e dos axônios mielínicos, foi utilizado um analisador de imagens Kontron Elektronik – KS 400 - 2.0, da

Zeiss, locado no Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP-UNICAMP. Após a calibração geométrica do equipamento, cada corte semifino foi focalizado em objetiva de 100x e a imagem captada pelo sistema.

Foram definidos 5 campos aleatoriamente, tanto na região do enxerto como no coto distal. Cada fibra nervosa mielinica foi contornada interna e externamente com o mouse, o que permitiu obter o diâmetro do axônio (interno) e da fibra nervosa (externo), em micrômetros. A avaliação dos dados foi feita através do programa Excel®.

A partir desses dados, obtivemos as seguintes médias de cada animal:

- *Diâmetro médio dos axônios*: através da somatória dos diâmetros internos dividido pelo número de axônios mensurados.

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

- *Diâmetro médio das fibras nervosas*: obtido através da somatória dos diâmetros externos dividido pelo número de fibras mensuradas.

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

- *Espessura da bainha de mielina*: o seu valor foi obtido ao subtrair-se o diâmetro externo do interno e dividindo-se por 2.

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

- *Espessura média das bainhas de mielina*: obtida através da somatória das espessuras, dividida pelo número de fibras mensuradas.

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

- *Razão G*: resultado da divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

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

#### 4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do software SAS (Statistics Analysis System), com nível de significância  $P < 0,05$ .

## **5. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO**

## Primary nerve repair using skeletal muscle autografts immediately after lidocaine injection

By Adriana Pertille, Rosana Macher Teodori, Marco Cesar Somazz, Humberto Santo Neto and Maria Julia Marques.

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, 13083-970.

Key words: Nerve regeneration, lidocaine-treated muscle grafts, freeze-thawed muscle grafts, muscle autografts, neuromuscular junction regeneration.

Running title: Axonal regeneration in muscle basal lamina autografts

Correspondence should be addressed to:

Prof. Maria Julia Marques,

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia,

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

CEP 13083-970.

Fax: 55-19-3289-3124

email: [marques@unicamp.br](mailto:marques@unicamp.br)

phone: 55- 19-3788-7391

Primary nerve repair using skeletal muscle autografts immediately after lidocaine injection.

## **ABSTRACT**

We evaluated the potential of muscle autografts to perform primary nerve repair when used immediately after their preparation with lidocaine injection. The right sciatic nerve of adult Wistar rats was sectioned and muscle grafts were used 15 minutes or 24 hours after lidocaine injection, to repair a gap 1.0 cm long. Morphometric analyses showed a decrease in axon and nerve fiber diameter, as well as in myelin thickness, which were similar for both types of grafts and significantly different from the control. G-ratio values in the distal stump for both groups were not different from the normal sciatic nerve, showing that a proper level of myelination was attained by the regenerated axons. However, within the graft, the G ratio was increased in both groups, suggesting poorer myelination of the axons in the graft. Ultrastructural profiles of intramuscular nerve bundles and neuromuscular junctions, for both 15 minutes and 24 hours lidocaine injected muscle grafts were similar to the normal. These results suggest that there are no restrictions to the use of a muscle graft immediately after lidocaine injection, in primary nerve repair, since the results of nerve regeneration were comparable to those observed when this type of graft is used 24 hours after being prepared. The decrease in myelin thickness in the graft suggests that the associations between Schwann cells, regenerated axons and muscle basal lamina should be further investigated to improve muscle graft nerve regeneration.

## INTRODUCTION

Skeletal muscle fibers are covered by an oriented parallel matrix of basal lamina, which is chemically similar to that of the peripheral nerve (Ide,1984; Tohyama,1985), making muscle autograft a suitable material not only for experimental studies (Glasby,1990; Hall,1997; Battiston et al., 2000a; Geuna et al., 2000) but also for human nerve repair (Pereira et al.,1991a,b; Battiston et al., 2000b).

Several methods have been employed to prepare muscle autograft and most of them are based on the fact that muscle fiber must be denatured, leaving empty basal lamina tubes. Frequently it has been prepared by freezing and thawing the donor muscle (Glasby et al.,1986; Gattuso et al., 1988; Pereira et al., 1991a,b; Bryan et al., 1993; Calder & Norris,1993; Lawson & Glasby, 1995). Heating the donor muscle (Hall & Enver, 1994) and veins filled with fresh skeletal muscle have been used as an alternative to the freeze and thawing method (Battiston et al., 2000a,b; Geuna et al., 2000). Despite the success of these methods in terms of axonal regeneration and functional recovery, they are not without technical disadvantages. For instance, with freezing and thawing the donor muscle may cause shrinkage by up to 50% of its original length and the grafts usually become brittle, with large strips that easily break, so they are difficult to use during operations (Calder & Norris, 1993). Heating donor muscle involves the risk of inactivation of basal lamina molecules (Hall & Kent, 1996) which are a substrate for axonal regeneration (Bryan et al., 1993). On the other hand, the combination of fresh muscle with a vein implies sacrifice of one of the patient's veins.

Earlier we developed a technique based on lidocaine injection into the donor muscle to obtain empty basal lamina tubes (Santo Neto et al., 1998). We and others observed that there is no shrinkage of the donor muscle and it is easy to suture. Also ultrastructural and morphometric

features of regenerated axons showed to be similar to that observed in freeze thawed muscle grafts. It has been suggested that this procedure can be a suitable alternative to prepare muscle autografts (Santo Neto et al., 1998; Houstava et al., 1999). In order to achieve complete evacuation of the necrotic muscle fibers, lidocaine injection must be performed 24 hs before nerve repair. In this scenario, lidocaine grafts could be useful only for delayed or secondary reconstructive procedures. Under a clinical point of view, however, this represents an inconvenience, since there is a general consensus that, in most causes, immediate nerve repair would be preferable. At the present, we evaluated the potential of muscle grafts to be used immediately after their preparation to perform a primary nerve reconstruction.

## **MATERIAL AND METHODS**

Twenty-four young adult Wistar rats (250-300 g) from the Animal Care Facility of the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) were used. All experiments were done in accordance to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals adopted by National Institutes of Health. All animals received a primary sciatic nerve repair and were divided into two groups according to the preparation time of the muscle graft. In one group (n=16), the muscle autograft was used 15 minutes after anaesthetic injection (MG15), while in the other group (n=8), the muscle autograft was used 24 hours after lidocaine injection (MG24). The contralateral sciatic nerve served as the control. Muscle grafts were prepared and grafted as previously described (Santo Neto et al., 1998). Briefly, the rats were lightly anaesthetized by ether inhalation and the right tibialis anterior muscle was injected transcutaneously with 0.3 ml of lidocaine hydrochloride (Xylocaine®, Astra Química). Fifteen minutes after lidocaine injection (muscle graft 15 minutes: MG15) or twenty-four hours after lidocaine injection (muscle graft 24 hours: MG24), the animals

were deeply anaesthetized with a mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (Francotar) and thiazine hydrochloride (Virbaxyl) and the muscle graft was obtained by excising a rectangular block (1.0 cm x 0.3 cm x 0.3 cm) from the right tibialis anterior muscle. The left sciatic nerve was then exposed and a segment was removed to produce a 1.0 cm long gap. The graft was then coaxially sutured to the epineurium between the proximal and distal nerve stumps with 10/0 Dermalon (Ethicon®, Johnson). The rats were subsequently housed with access to water and food *ad libitum*.

Sixty (MG15 and MG24) and 120 days (MG15) after surgery, the rats were anaesthetized with the ketamine/thiazine mixture. A section 2 cm long of the nerve was removed, cut into two segments (graft region and distal stump) and fixed *in situ* with a modified Karnovsky solution for 2 h. The tissue was washed in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, post-fixed for 2 h with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer followed by 0.5% uranyl acetate solution overnight, then dehydrated and embedded in Epon. Semi-thin (1 µm) transverse sections stained with 1% toluidine blue were analyzed using an Axioskop 50 microscope (Zeiss) at magnifications of 400X and 1000X. Using a random sampling technique, 200 nerve fibres were measured at the graft region and the distal stump. Morphometric analysis (axon diameter, fibre diameter and myelin thickness) was done using an automatic Kontron Elektronik-KS400-2.0 computerized image analysis system (Zeiss). The G-ratio, which is the ratio of axon diameter to fiber diameter, was calculated for each nerve fiber.

Some animals (n=3 from MG15 and n=3 from MG24) had a section 2 cm long of the nerve removed, teased off and prepared for confocal microscopy observation (Reynolds et al., 1994). In short, the specimens were kept in paraformaldehyde 10% for 1 to 2 weeks, at 4°C, washed with PBS and mounted on a slide with DABCO (Sigma; mounting medium for

fluorescence microscopy) covered by a coverslip. The slides were observed under a BioRad Confocal System (MRC1240) equipped with an Ar-Kr and UV lasers and an inverted Zeiss fluorescence microscope. The 568 nm line of the Ar-Kr laser was used for autofluorescence confocal observation of the nerve, with a 1.4NA water immersion 40X Zeiss objective. The software provided by the manufacturer (BioRad Acquisition and Processing) was used to get the images from several focal planes and when necessary, a stack of images was built, allowing the observation of the topography of the regenerated fibers within the graft and in the distal stump, their relationships with persisting muscle fibers and the nodes of Ranvier. Digital images were saved in optical disks and printed in Codonics printer.

Muscle fibre reinnervation was assessed in the right soleus muscle, by examining neuromuscular junction regeneration. Soleus muscles were dissected from five rats from each treated group and the middle region of the muscle belly was cut into small blocks which were processed for transmission electron microscopy as above described. Ultrathin sections (60-70 nm) were stained with 2% lead citrate, and fields containing neuromuscular junctions were photographed at a primary magnification of 10.000X and the negatives were then printed at a final magnification of 30.000X.

## **RESULTS**

### *Confocal microscopy analysis: spatial distribution of axons and muscle fibers in the graft*

Confocal microscopy allowed the observation of the parallel orientation of regenerated fibres through the proximal and distal stumps of both MG15 and MG24 (Fig.1 A,D). This parallel orientation was also present in the graft region, better seen in intermediate regions of the graft

(Fig.1C), rather than at its beginning, where regenerated fibers apparently displayed a more disorganized spatial distribution pattern (Fig.1B). In some cases, nodes of Ranvier could be seen (Fig.1A). Signs of nerve degeneration, such as disruption of myelin sheath and myelin figures were not present.

Sixty days after MG15 implantation, persistent muscle fibers of the donor muscle were seen in all of the grafts studied. These muscle fibers were distributed mainly in two regions. First, several fibers were clustered together in the graft periphery. Second, one or two isolated fibers parallel to the axons long axis were dispersed in deeper graft areas, among regenerated fibers (Figs.1C, 3A). In MG24, analysed at the same time, persistent muscle fibers were rarely seen and when present, they were fewer and distributed around the graft periphery. The persistent muscles fibers were usually very bright, striated and did not seem to block the axons growing course. No nerve fibers were seen to contact the persistent muscle fibers in the graft.

#### *Ultrastructural analysis*

After 60 days of graft implantation, the nerve fibers were organized in minifascicles of various dimensions, evident in both kinds of grafts (Fig.2). In MG15, fascicles of myelinated and unmyelinated nerve fibers were surrounded by the processes of perineurial cells (Fig.2A,C). Unmyelinated and myelinated axons showed a normal ultrastructure, for both MG15 and MG24 (Fig.2B,D). Their axons showed axoplasm with neurofilaments, microtubules and mitochondria; they were clustered and enveloped by Schwann cell processes and surrounded by a dense network of collagen fibrils (Fig.2C,D). Persistent muscle fibers seen with TEM displayed a normal architecture and fascicles of nerve fibers adjacent to muscle fibers displayed a perineurial-like envelope (Fig.3A).

No ultrastructural abnormalities were found in the distal stump at MG15-120 days and axons showed a normally organized myelin sheath, with dense lines alternated with intraperiod lines (Fig.3B). At the distal stump, the lack of minifascicles is typical (Fig.3C).

#### *Muscle fiber reinnervation*

Muscle fibers were reinnervated 60 days post-surgery in MG24 and in MG15. In the former, all the neuromuscular junctions examined (n=70) were ultrastructurally similar to normal end-plates (Fig.4A). Nerve terminals with synaptic vesicles and mitochondria, were covered by Schwann cell processes and completely occupied the synaptic cleft in direct apposition to the post-synaptic sarcolemma, which displayed regularly spaced subneural folds. In 60 day-MG15 group (Fig.4B), at most of the junctions examined (70%: 28 out of 40) there were some naked junctional folds, i.e., the nerve terminal did not completely occupy the whole post-synaptic membrane. In the 120 day-MG15 group (Fig.4C), the same observation was made in a smaller number of junctions (16 out of 40; 40%).

#### *Morphometric analysis*

The total number of myelinated axons in MG15 was not significantly different from that seen in MG24 (Table 1) and controls, which was  $4954 \pm 266$  axons. At 60 days the mean number of myelinated axons in the graft was  $6713 \pm 1.392$  for MG15 and  $6171 \pm 689$  for MG24 and for the distal stump it was  $5423 \pm 722$  (MG15) and  $5221 \pm 571$  (MG24). No differences were observed in nerve fiber population at 60 and 120 days after immediate nerve repair (Table 1).

None of the parameters used to analyze axonal maturation attained the normal values after nerve repair with MG15 and MG24, even 120 days post-grafting. By 60 days, myelin thickness

was significantly smaller in the graft region than in the distal stump, for both MG15 and MG24 (Fig.5). Myelin thickness was significantly smaller at the distal stump in MG15-60, compared to MG24. The values obtained for axon and nerve fiber diameters were not significantly different between MG15 and MG24, and between the distal stump and the graft (Fig.5). In the 120-days MG15, axon population and diameter, myelin thickness and fiber diameter were not significantly different from that observed 60 days after immediate nerve repair.

The G ratio was significantly greater in the graft than in the distal stump, for both groups (MG15 and MG24). Axons at the distal stump attained normal G ratio values (Fig.5).

## DISCUSSION

The present investigation shows that muscle grafts prepared by lidocaine injections, when used immediately after being prepared to repair a nerve lesion, allowed the growth to the distal stump of a population of axons very close to that seen when the graft is used later, 24 hours after lidocaine injection (Santo Neto et al., 1998). Thus, the number of regenerated nerve fibers in the graft and in the distal stump is not different in nerve repair by MG15 and MG24. This suggests that the time needed to evacuate the muscle fibers of the donor muscle is not a restrictive factor for the regenerating axons to reach the distal stump and consequently to establish connections with muscle fibers. In fact, we observed that muscles were reinnervated and had normal neuromuscular junctions, comparable to the normal and MG24. Interesting, in 60 day-MG15 the postsynaptic membrane was not completely covered by the nerve terminal, suggesting a slower rate of reinnervation. This finding may explain the fact that myelin thickness was smaller at the distal stump of MG15, since it is known that axonal maturation is significantly influenced by target availability (Cavanaugh, 1951; Guth, 1956).

The fact that the number of axons in the graft and distal stump did not change significantly shows that there was no axonal loss in the distal stump, confirmed by confocal and TEM observations, in that no myelin disruption or axon breakdown was detected. Thus, the presence of few persistent muscle fibers, within the graft or on its periphery, does not seem to be an obstacle for the growing axons to accomplish their regeneration. As we observed here, persistent muscle fibers were also observed in vein grafts filled with fresh muscle, after 6 months of graft implantation, and these fibers did not appear to prevent a good pattern of nerve regeneration at the distal stump (Battiston et al., 2000a).

Morphometrical analysis showed that regenerated axons in MG15 and MG24 attained the same levels of axonal maturation already after 60 days of nerve repair. As expected, fiber and axon diameters and myelin thickness did not attain the control levels, as a result of repair and regeneration, which is in agreement to other situations of nerve repair (Glasby et al., 1986; Gattuso et al., 1988; Lawson & Glasby, 1995; Houstava et al., 1999; Battiston et al., 2000b). The G-ratio was comparable to the control value only in the distal stump, suggesting that nerve fibers that crossed the graft were able to attain a level of myelination proper to their sizes, which is in agreement with the literature (Lawson & Glasby, 1995). However, the same situation was not true for the graft region. In both groups, the G-ratio was significantly higher than the control level, suggesting a poorer myelination in the graft, not compatible to axon diameter, even after 120 days of repair.

Poorer myelination in the graft had been reported to occur, after 6 months of freeze-thawed-muscle graft implantation (Glasby et al., 1986). Reasons for that are unclear but one possibility could be the persistence of muscle fibers inside or in the graft periphery. These fibers could mechanically restrict the regenerated axons, in a way similar to that described, in the

literature, for silicone tubes or other synthetic material (Le Beau et al., 1988). At the present, electron and confocal microscopy however clearly show outgrowing axons without signs of degenerative changes, which could result from compression. In addition, 120 days after repair, there were no differences in axonal maturation for both kinds of grafts, despite of the presence of muscle fibers and the G ratio was still increased in the graft region.

Another possibility to explain the delay in myelination at the graft region could be related to the fact that the harvest of the graft is made only a few minutes after lidocaine injection, a situation in which muscle fiber debris are still present and could interfere with Schwann cell migration inside the graft. Schwann cells coming from the distal nerve stump seem to be responsible for guiding regeneration of nerve fibers along the graft (Fornaro et al., 2001; Tos et al., 2000). It is known that immature Schwann cells are present along a muscle-vein combined graft at very early stages after surgery (Battiston et al., 2000a), such as 6 hours (Fornaro et al., 2001). The highest number of Schwann cells in the graft region of a microwaved muscle graft was observed by day 60 after graft implantation, when the graft contained the largest amount of immunoreactivity to S-100 (Whitworth et al., 1995). More recent studies showed that 6 days after a vein-muscle graft implantation in the sciatic nerve of rats, the Schwann cells that repopulate the graft were still immature, being GFAP-positive and S-100 negative (Fornaro et al., 2001), suggesting that these Schwann cells were not yet myelinating. Therefore, it would be possible that Schwann cells had a maturation period once they reach the graft region, and it seems that the use of MG15 did not interfere neither with Schwann cell access to the graft area, nor with the time course of this maturation program, since myelination and G ratio values were similar to those observed with MG24.

In conclusion, our results suggest that there are no restrictions to the use of lidocaine-muscle grafts immediately after their preparation, since it allowed results of nerve regeneration comparable to those observed when this type of graft is used 24 hours after being prepared. Thus, this technique is suitable to perform primary nerve repairs. In addition, the results presented here show that there is a poorer myelination in the graft region, but not in the distal stump, given the G ratio values obtained. Considering that Schwann cells play a critical role in axonal regeneration across muscle grafts (Hall and Enver, 1994), it would be important to better understand the relationships among Schwann cells and muscle basal lamina at the graft region, in order to improve axonal myelination along grafted materials.

**Acknowledgments:** This work was supported by FAPESP (95/6956-9, 96/07166-4). Humberto Santo Neto and Maria Julia Marques are the recipients of a fellowship from CNPq (301053/91-0 and 300061/99-4).

## **BIBLIOGRAPHY**

- Battiston, B, Tos, P, Geuna, S, Giacobini-Robecchi, MG, Guglielmone, R (2000a) Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery* 20:37-41
- Battiston, B, Tos, P, Cushway, TR, Geuna, S (2000b) Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical trials. *Microsurgery* 20:32-36
- Bryan DJ, Miller RA, Costas PD, Wang KK, Seckel BR (1993) Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 92: 927-940
- Calder JS, Norris RW (1993) Repair of mixed peripheral nerves using muscle autografts: a preliminary communication. *Br J Plast Surg* 46: 557-564
- Cavanaugh MW (1951) Quantitative effects of the peripheral innervation area of nerves and spinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.*, 94: 181-219.

- Fornaro M, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Battiston B (2001) Confocal imaging of Schwann cell migration along muscle-vein combined grafts used to bridge nerve defects in the rat. *Microsurgery*, 21: 153-155.
- Gattuso JM, Glasby MA, Gschmeissner SE (1988) Recovery of peripheral nerves after surgical repair with treated muscle grafts (2) morphometric assessment. *Neuro-Orthopedics* 6: 1-6
- Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R, Giacobini-Robecchi, MG (2000) Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. *Anat Embryol* 201: 475-482
- Glasby MA (1990) Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. *Clin Anat* 3: 161-182
- Glasby MA, Gschmeissner SE, Hitchcock RJ, Huang CLH (1986) Regeneration of the sciatic nerve in rats. The effect of muscle basement membrane. *J Bone Joint Surg Br* 68B: 829-833
- Guth L.(1956) Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. *Physiol. Rev* , 36: 441-478.
- Hall SM, Enver K (1994) Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts. *The Journal of Hand Surgery*, 19: 444-451.
- Hall S (1997) Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 190: 57-71
- Hall SM, Kent AP (1996) An immuno-electronmicroscopical study of the distribution of laminin within autografts of denatured muscle. *J Neurocytol* 25: 209-217
- Houstava L, Dubovy P, Haninec P, Grim M (1999) Na alternative preparation of the acellular muscle graft for reconstruction of the injured nerve-morphological and morphometric analysis. *Ann Anat* 181: 275-281.
- Ide C (1984) Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle. *Neurosci Res* 1: 379-391
- Lawson GM, Glasby MA (1995) A comparison of immediate and delayed nerve repair using autologous freeze-thawed muscle grafts in a large animal model. *J Hand Surg [Br]* 20: 663-700
- Le Beau JM, Ellisman MH, Powell HC (1988) Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol* 17: 161-172
- Pereira JH, Palande DD, Narayanakumar TS, Curtis J, Turk JL (1991a) Denatured autologous muscle graft in leprosy. *Lancet* 338: 1239-1240

Pereira JH, Bowden REM, Gattuso JM, Norris RW (1991b) Comparison of results of repair of digital nerves by denatured muscle grafts and end-to-end sutures. 1991. *J Hand Surg [Br]* 16: 519-523

Reynosds RJ, Litte GJ, Lin M, Heath JW (1994) Imaging myelinated nerve fibres by confocal fluorescence microscopy: individual fibres in whole nerve trunks traced through multiple consecutive internodos. *J. Neurocyt.*, 23: 555-564.

Santo Neto H, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ (1998) Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg* 51: 555-560

Tos P, Battiston B, Geuna S (2000) Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery*, 20: 65-71.

Tohyama K (1985) The localization of lectin-binding sites on Schwann cell basal lamina *J Neurocytol* 14: 49-61

Whitworth IH, Doré C, Hall S, Green CJ, Terenghi G (1995) Different muscle graft denaturing methods and their use for nerve repair. *Br. J. Plas. Surg.*, 48: 492-499.

## LEGENDS

Figure 1 – Confocal observation of regenerated fibers through MG15, 60 days after repair. Regenerated fibers are apparently more disorganized once they enter the graft (B), but a parallel orientation is seen at the proximal stump (A), in the middle third of the graft (C) and at the distal stump (D). Node of Ranvier (arrow). Persistent muscle fiber (star). Scale bar in microns.

Figure 2 – Ultrastructure of regenerated fibers at the graft region of MG15 (A,C) and MG24 (B,D) groups. Myelinated fibers with axoplasm containing neurofilaments and microtubules. Schwann cell (S) and unmyelinated fibers (\*). Perineurial cells (arrow) and perineurial sheath are present at the graft region, forming nerve fascicles. Abundant collagen is present (D). 9000x

Figure 3 – In the MG15, persistent muscle fibers with perineurial sheath (arrow) are seen among regenerated nerve fibers (A) 4100x. Dense lines and intraperiod lines are seen in a detail of the myelin sheath (B) 54000x. In the distal stump (C), the lack of minifascicles is typically observed. 9000x

Figure 4 – Neuromuscular junction regeneration after lidocaine muscle grafts. Nerve terminal (T) with vesicles and mitochondria were completely covering the post synaptic membrane in MG24 (A) and MG15-120 days (C). Nerve terminals partially covering the postsynaptic membrane were frequently seen in the MG15-60 days (B), leading to naked junctional folds. 30000x

Figure 5 – Morphometric data of regenerated axons obtained from muscle grafts used 15 minutes (MG15) and 24 hours (MG24) after lidocaine injection. All parameters were statistically different from control, except for the G-ratio in the distal stump. \* significantly different from the distal stump ( $P < 0,05$ ). \*\* significantly different from the MG15-60d ( $P < 0,05$ ).

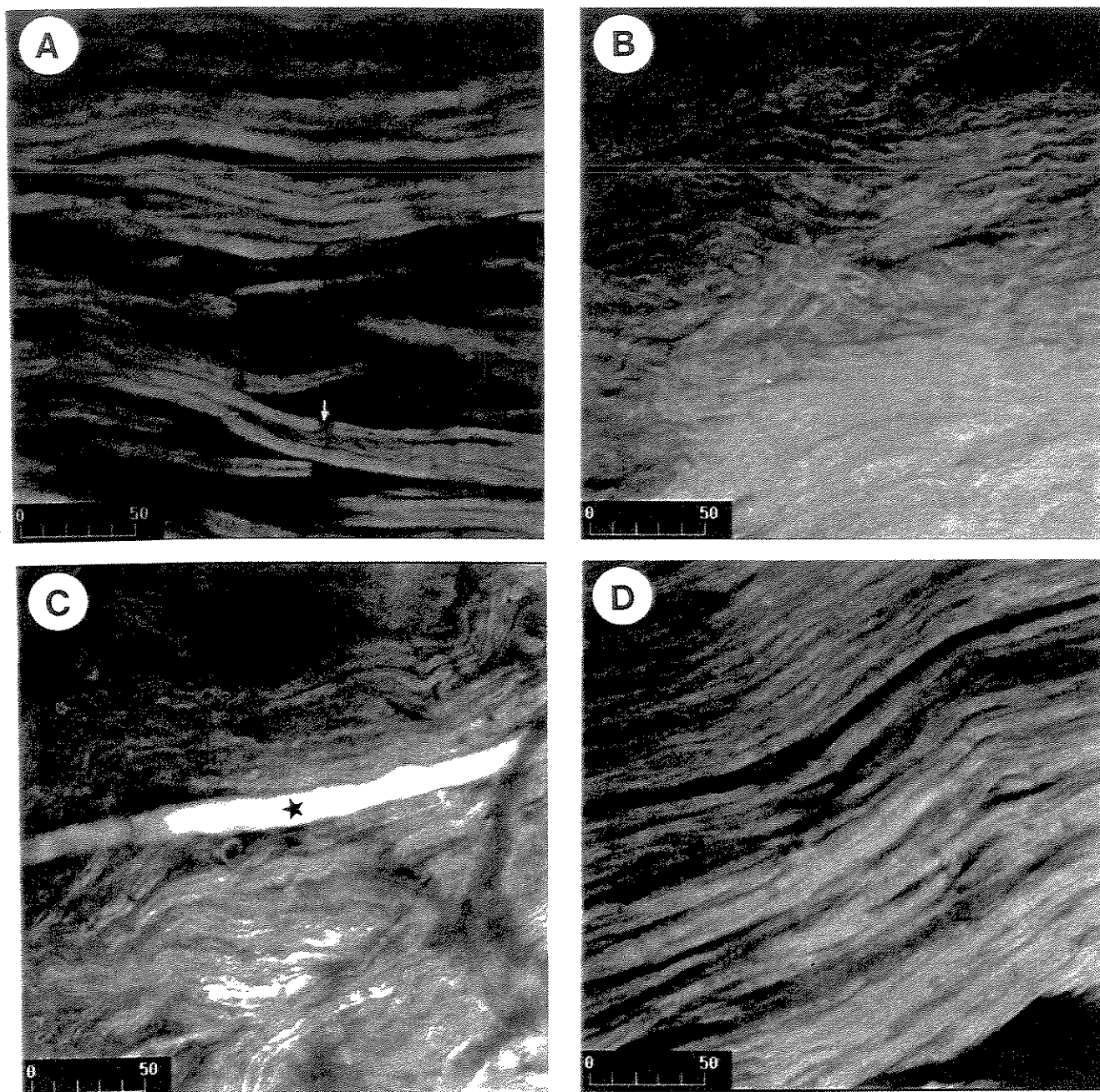


Figure 1

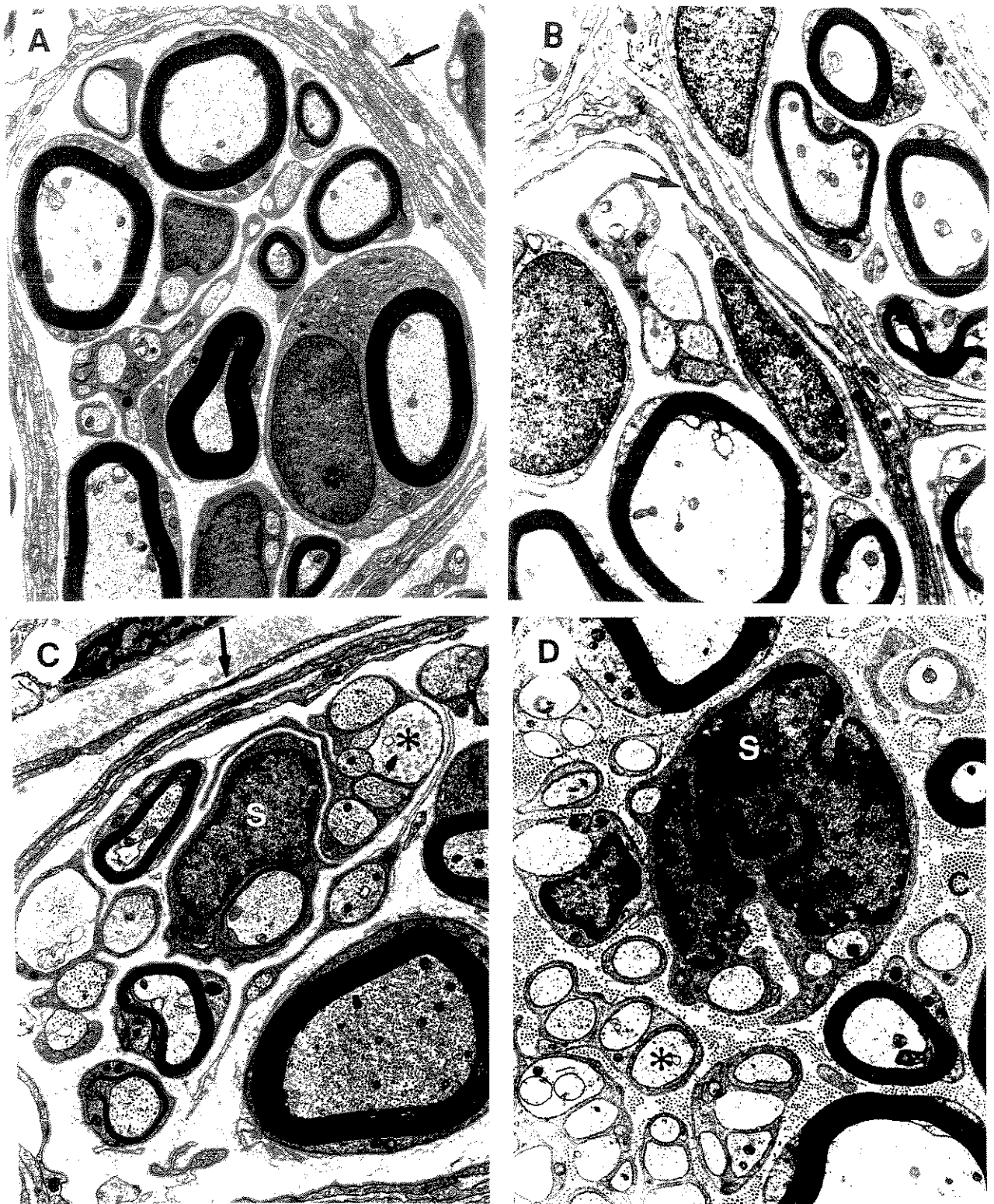


Figure 2

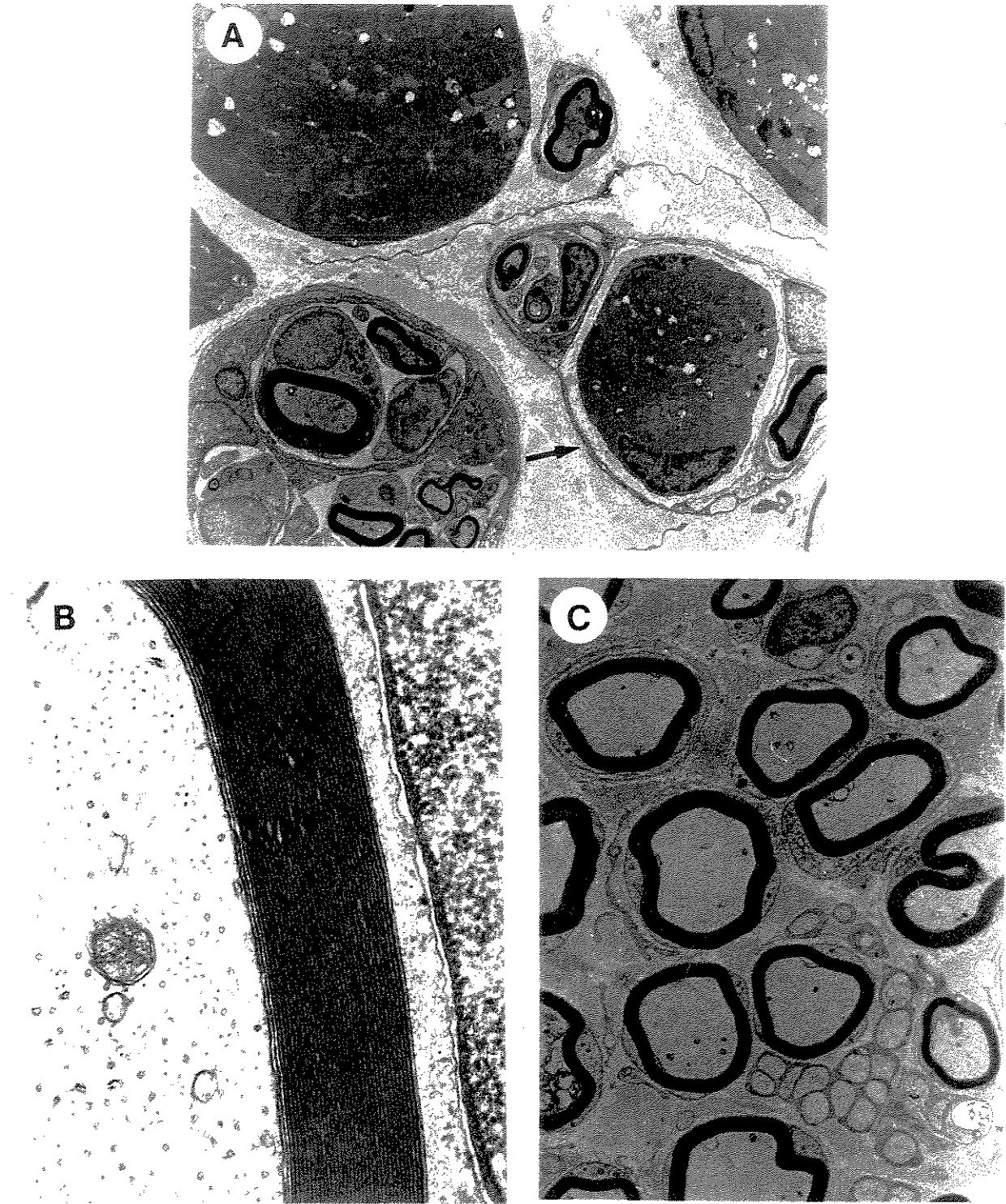


Figure 3

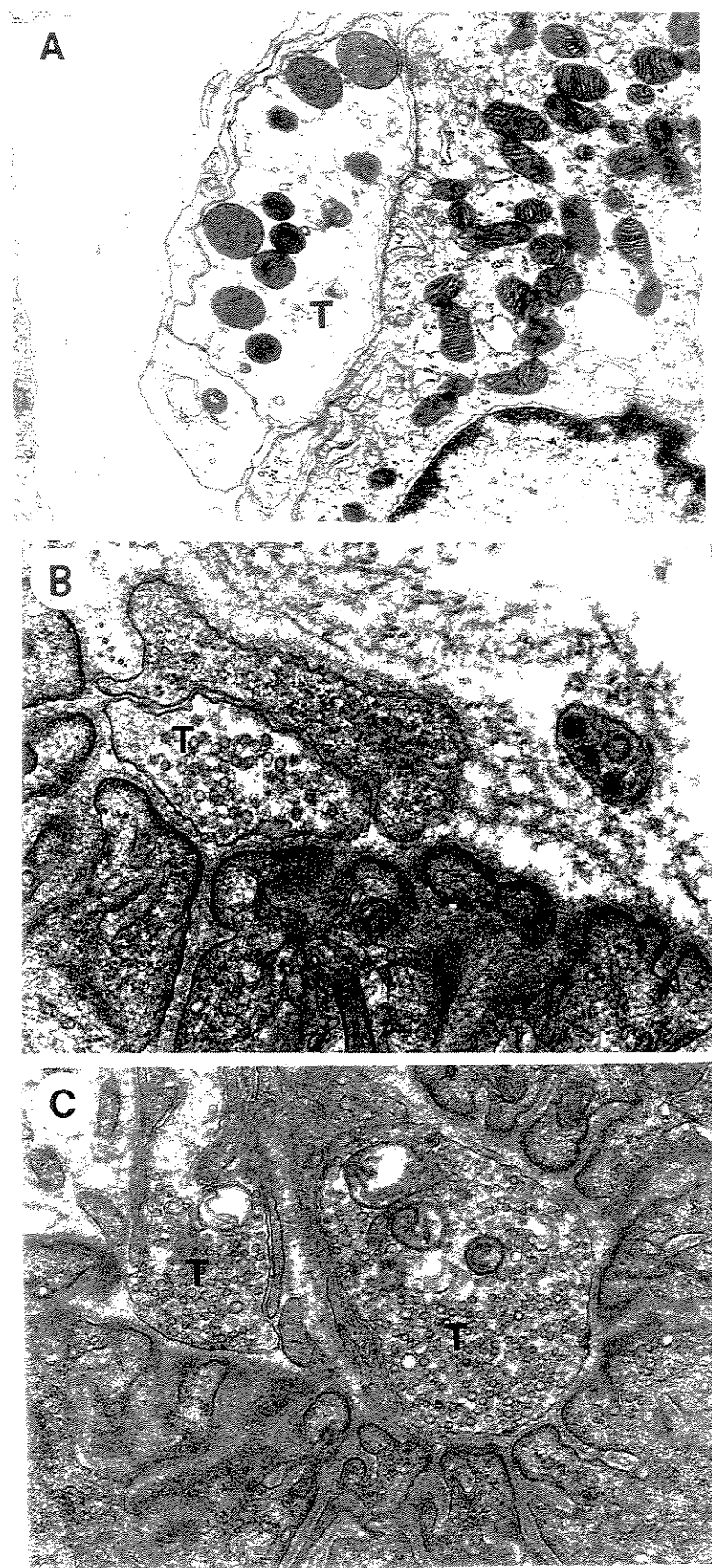


Figure 4

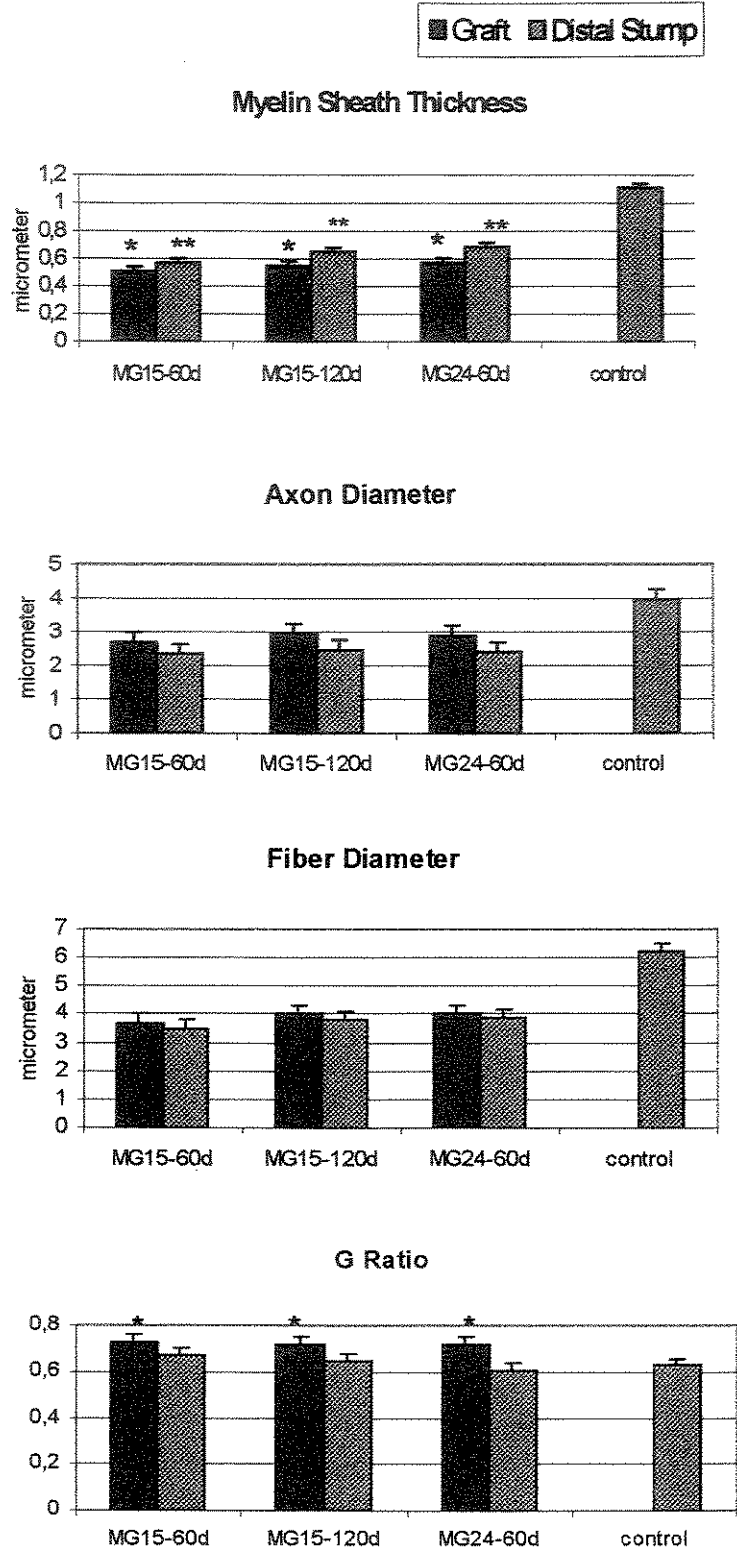


Figure 5

Table 1 – Mean numbers ( $\pm$  SD) of myelinated axons observed in the graft and in the distal stump. There were no significant differences between the groups ( $P < 0,05$ ).

|           | Graft             | Distal Stump      |
|-----------|-------------------|-------------------|
| EM15 60d  | $6.713 \pm 1.392$ | $5.423 \pm 722$   |
| EM15 120d | $6.445 \pm 1.276$ | $4.209 \pm 1.106$ |
| EM24      | $6.171 \pm 689$   | $5.221 \pm 571$   |

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O objetivo deste trabalho foi verificar se o auto-enxerto muscular tratado com cloridrato de lidocaína pode ser utilizado imediatamente após sua confecção, possibilitando a aplicação deste tipo de enxerto nos casos de neurorrafias primárias. Nesta condição, observamos que a regeneração axonal ocorreu, sendo que as fibras nervosas regeneradas atravessaram o enxerto, atingiram o coto distal e reinervaram o músculo sóleo.

A região do enxerto caracterizou-se pela presença de pequenos compartimentos, denominados minifascículos, envolvidos por células perineurais. A compartimentalização dos axônios é estimulada pela lesão ou ruptura do perineuro (GSHMEISSNER et al., 1990) e este tipo de distribuição é tipicamente encontrado no processo de reparo nervoso de qualquer tipo de enxerto (muscular ou não), para promover o rápido restabelecimento do ambiente endoneural, favorecendo a regeneração (MORRIS et al., 1972; LUNDBORG, 1987). A compartimentalização pode ser observada até 1 ano após o implante muscular, sem nenhuma evidência de retorno à arquitetura do nervo normal (GSCHMEISSNER et al., 1990).

Nos grupos EM15-60dias e EM15-120dias, fibras musculares persistentes foram encontradas principalmente na periferia do enxerto, sem apresentar sinais de mionecrose. BATTISTON et al. (2000 a, b) estudaram a regeneração axonal através de auto-enxerto de veia contendo fragmentos de músculo estriado fresco e observaram que algumas fibras musculares persistiram ao longo de todo o enxerto, até 6 meses após a cirurgia. Segundo os autores, este fato parece não ter comprometido a regeneração axonal, uma vez que a aplicação clínica deste enxerto resultou na recuperação funcional satisfatória de 85% dos pacientes tratados.

No grupo EM24-60dias, raras fibras musculares foram encontradas no enxerto, confirmando que o intervalo de 24 horas do tratamento com o anestésico é suficiente para remoção do sarcoplasma muscular da maioria das fibras. A ausência de fibras musculares no grupo 24 horas poderia ser uma vantagem para a regeneração axonal. Entretanto, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre o número de fibras mielínicas regeneradas nos enxertos 24 horas e 15 minutos, como também não houve diferença entre os intervalos de sacrifício (60 e 120 dias). Isto sugere que a presença de fibras musculares nos enxertos 15 minutos não interferiu no processo de regeneração axonal.

No coto distal notou-se a ausência da compartimentalização. As fibras nervosas reorganizaram-se em fascículos, envolvidos pela bainha perineural, caracterizando a disposição semelhante ao nervo normal. Em relação ao número de fibras regeneradas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (15 minutos e 24 horas) e entre os tratamentos e o controle.

À microscopia eletrônica e confocal, as fibras nervosas regeneradas no enxerto e coto distal mostraram padrão morfológico similar ao de uma fibra nervosa típica, sugerindo que os grupos EM15-60dias, EM15-120dias e EM24-60dias apresentaram processo regenerativo semelhante. Entretanto, em todos os grupos constatou-se a redução do calibre axonal e da espessura da bainha de mielina quando comparados ao controle.

Após transecção do nervo, o diâmetro axonal e a espessura da bainha de mielina não atingem os valores normais (GLASBY et al., 1986b; GATTUSO et al., 1988; LAWSON & GLASBY, 1995; HOUSTAVA et al., 1999; BATTISTON et al., 2000b). A redução do calibre axonal é um fenômeno observado em todos os casos de regeneração nervosa.

Acredita-se que a privação de conexões terminais durante a regeneração (GUTMANN & SANDERS, 1943; SANDERS & YOUNG, 1946), o aumento do colágeno e a retração endoneural (BOWE et al., 1989) possam interferir neste processo. A redução do calibre axonal é confirmada no presente trabalho, onde o diâmetro dos axônios regenerados no coto distal atingiu em média 60% do diâmetro normal e 71% na região do enxerto.

A espessura da bainha de mielina é menor na região do enxerto do que no coto distal em todos os grupos tratados, atingindo em média 62% da espessura normal no coto distal. Estes dados são compatíveis aos achados de GLASBY et al. (1986 a,b), que observaram um retardo da mielinização dos axônios 6 meses após a implantação de enxertos musculares submetidos ao método de congelamento/descongelamento em ratos e primatas.

Comparando os enxertos entre si, notou-se que o grupo EM15-60dias apresentou precária mielinização em relação aos outros grupos. Uma possível explicação seria a presença das fibras musculares que poderiam restringir mecanicamente a regeneração axonal, como observado nos enxertos com tubos de silicone e outros materiais sintéticos (LE BEAU et al., 1988). Na análise morfométrica não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre a espessura da bainha de mielina no enxerto de todos os grupos tratados, sugerindo que as fibras musculares persistentes não interferiram na mielinização. Além disso, não foi observado na microscopia eletrônica e confocal sinais de degeneração das fibras nervosas regeneradas.

Outra explicação é o fato que a mielinização no enxerto depende da migração das células de Schwann dos cotos nervosos (TOS et al., 2000; FORNARO et al., 2001). Implantes imediatos realizados em nervo ciático de ratos com enxertos de veia contendo músculo fresco demonstraram que 6 horas após a implantação, células de Schwann

migraram do coto distal para o enxerto. Progressivamente, o enxerto foi invadido pelas células originadas tanto do coto distal como do proximal e 140 horas após a implantação, o enxerto estava completamente ocupado pelas células de Schwann ainda imaturas, pois neste período estas células não mostraram sinais de mielinização (FORNARO et al., 2001).

Os axônios do coto distal apresentaram mielinização semelhante nos grupos EM24-60dias e EM15-120dias atingindo, respectivamente, 62% e 58% da espessura da bainha de mielina de um nervo normal. Quando esses grupos foram comparados ao grupo EM15-60dias, que atingiu 51,2% da espessura do nervo normal, notou-se diferença estatisticamente significativa. Observou-se também no grupo EM15-60dias que na maioria das junções neuromusculares (70%), o terminal nervoso recobre parcialmente as dobras do sarcolema juncional, diferente do grupo EM24-60dias onde todas as junções apresentam o terminal nervoso recobrindo totalmente as dobras juncionais e do grupo EM15-120dias onde 60% das junções apresenta o terminal nervoso recobrindo totalmente o sarcolema juncional.

Os dados morfométricos da espessura da bainha de mielina, associados à análise ultra-estrutural das junções neuromusculares, sugerem que os axônios em regeneração do grupo 15 minutos levaram um tempo maior para atravessar o enxerto, devido a incompleta fagocitose das fibras musculares e, conseqüentemente, demoraram para atingir o músculo e reinervá-lo.

Quando os axônios em regeneração do coto distal atingem o músculo e ocorre a reinervação muscular, inicia-se um segundo estágio da regeneração nervosa, a maturação axonal (CAVANAUGH, 1951; GUTH, 1956). A demora na reinervação muscular pode explicar a menor mielinização dos axônios regenerados no grupo 15 minutos.

Apesar de não termos realizado análise eletrofisiológica, os valores obtidos da razão G nos permitem uma avaliação, embora teórica, da velocidade de condução dos impulsos nervosos. O valor da razão G reflete a velocidade de condução ideal e encontra-se entre 0,6 – 0,7, sendo que valores acima deste indicam axônios fracamente mielinizados (ANSSELIN et al., 1997). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores da razão G no coto distal dos grupos EM24-60dias (0,61), EM15-60 dias (0,67), EM15-120 dias (0,65) e grupo controle (0,62), sugerindo que ambos os grupos, 24 horas e 15 minutos, permitem que o nervo apresente velocidade de condução adequada dos impulsos nervosos e que a espessura da bainha de mielina do grupo EM15-60dias, mesmo sendo mais delgada, foi compatível ao diâmetro do axônio.

Por outro lado, na região do enxerto a razão G foi em média 0,72 para todos os grupos, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparada ao coto distal e ao controle, sugerindo que a espera pela migração das células de Schwann retardou o processo de mielinização em todos os grupos estudados.

Com os resultados deste trabalho conclui-se que o reparo de lesão nervosa periférica através de enxerto muscular preparado com cloridrato de lidocaína 2%, implantado imediatamente após seu preparo, promove regeneração axonal e reinervação muscular satisfatórias. Os dados morfométricos sugerem que os axônios regenerados neste tipo de enxerto possuem capacidade de condução do impulso nervoso semelhante ao nervo normal e ao enxerto obtido 24 horas após a aplicação do anestésico, viabilizando portanto sua utilização nos casos de neurografia primária.

## **7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA\***

- AGUAYO, A.J.; CHARRON, L.; BRAY, G.M. Potential of Schwann cells from unmyelinated nerves to produce myelin: a quantitative ultrastructural and radiographic study. *J. Neurocyt.*, v.5, p.565-573, 1976.
- ANSSELIN, A.D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, v.23, n.5, p. 387-398, 1997.
- ASBURY, A.K. Schwann cell proliferation in developing peripheral nerve. *J. Cell Biol.*, v.34, p.735-743, 1967.
- BATTISTON, B.; TOS, P.; CUSHWAY, T.R.; GEUNA, S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery*, v.20, p.32-36, 2000a.
- BATTISTON, B.; TOS, P.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G.; GUGLIELMONE, R. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery*, v.20, p.37-41, 2000b.
- BENOIT, P.W.; BELT, D. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J. Anatomy*, v.107, p.547-556, 1970.
- BENOIT, P.W.; BELT, W.D. Some effects of local anesthetic agents on skeletal muscle. *Exp. Neurol.*, v.34, p.264-278, 1972.
- BOWE, C.M.; HILDEBRAND, C.; KOCSIS, J.D.; WAXMAN, S.G. Morphological and physiological properties of neurons after long-term axonal regeneration: observations on chronic and delayed sequelae of peripheral nerve injury. *J. Neurol. Sciences*, v.91, p.259-292, 1989.
- BRADLEY, W.G.; ASBURY, A.K. Duration of synthesis phase in neurolemma cells in mouse sciatic nerve during degeneration. *Exp. Neurol.*, v.26, p.275-282, 1970.
- BOWDEN, R.E.M.; DUCHEN, L.W. The anatomy and pathology of neuromuscular junction. In: The neuromuscular junction. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Ed. E. Zaimis, Berlin, Springer-Verlag, v.42, p.23-93, 1976.

BRANDT, J.; DAHLIN, L.B.; KANJE, M.; LUNDBORG, G. Spatiotemporal progress of nerve regeneration in a tendon autograft used for bridging a peripheral nerve defect. *Experimental Neurology*, v.160, p.386-393, 1999.

BRYAN, D.J.; MILLER, R.A.; COSTAS, P.D.; WANG, K.K.; SECKEL, B.R. Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.92, n.5, p.927-940, 1993.

CAJAL, S.R. Degeneration and regeneration of the nervous system, vol 1, Ed. Oxford University Press, London, 1928.

CALDER, J.S.; GREEN, C.J. Nerve-muscle sandwich grafts: the importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. *The Journal of Hand Surgery*, v.20B, n.4, p.423-428, 1995.

CALDER, J.S.; NORRIS, R.W. Repair of mixed peripheral nerves using muscle autografts: a preliminary communication. *Brain J. Plast. Surg.*, v.46, n.7, p.557-564, 1993.

CARBONETTO, S. The extracellular matrix of the nervous system. *Trends in Neurosciences*, v.7, p.382-387, 1984.

CAVANAUGH, M.W. Quantitative effects of the peripheral innervation area of nerves and spinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.*, v.94, p.181-219, 1951.

CHIU, D.T.W.; JANECKA, I.; KRIZEK, T.J.; WOLFF, M.; LOVELACE, R.E. Antogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*, v.91, p.226-233, 1982.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*, Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

DE CURTIS, I. Neurons interactions with the extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, v.3, p.824-831, 1991.

ELDRIDGE, C.F.; SANES, J.R.; CHIU, A.Y.; BUNGE, R.P.; CORNBROOKS, C.J. Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: Characterisation and localisation using monoclonal antibodies. *J. of Neurocytology*, v.15, p.37-51, 1986.

ENGEL, A.G., SANTA, T. Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junctions in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome. *Ann. NY Acad. Science*, v.183, p.46-51, 1971

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.*, v.65, p.354-363, 1986.

FORNARO, M.; TOS, P.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G.; BATTISTON, B. Confocal imaging of Schwann cell migration along muscle-vein combined grafts used to bridge nerve defects in the rat. *Microsurgery*, v.21, p.153-155, 2001.

FOSTER, A.H.; CARLSON, B.M. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesthesia and Analgesia*, v.59, n.10, p.727-736, 1980.

GAMBLE, H.J.; EAMES, R.A. An electron microscope study of the connective tissue of human peripheral nerve. *J. Anatomy*, v.98, p.655-663, 1964.

GATTUSO, J.M.; GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E. Recovery of peripheral nerves after surgical repair with treated muscle grafts (2) Morphometric assessment. *Neuro-Orthopedics*, v.6, p.1-6, 1988.

GATTUSO, J.M.; GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER S.E.; NORRIS, R.W. A comparison of immediate and delayed repair of peripheral nerves using freeze-thawed autologous skeletal muscle grafts in the rat. *British Journal of Plastic Surgery*, v.42, p.306-313, 1989.

GEUNA, S.; TOS, P.; BATTISTON, B.; GUGLIELMONE, R.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. *Anat. Embryol.*, v.201, p.475-482, 2000.

GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. *Clinical Anatomy*, v.3, p.161-182, 1990.

GLASBY, M.A.; DAVIES, A.H.; GATTUSO, J.M.; HEYWOOD, A.J. Specificity for homonymous pathways following repair of peripheral nerves with treated skeletal muscle autografts in the primate. *British Journal of Plastic Surgery*, v.44, p.135-141, 1991.

GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.G.; HITCHCOCK, R.J.I.; HUANG, C.L-H. The dependence of nerve regeneration through muscle grafts in the rat on the availability and orientation of basement membrane. *Journal of Neurocytology*, v.15, p.497-510, 1986a.

GLASBY, M.A.; GSCHMEISSNER, S.E.; HUANG, C.L-H.; SOUZA, B.A. Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repair in primates. *The Journal of Hand Surgery*, v.11-B, n.3, p.347-351, 1986b.

GSCHMEISSNER, S.E.; GATTUSO, J.M.; GLASBY, M.A. Morphology of nerve fibers regenerating through freeze-thawed autogenous skeletal muscle grafts in rats. *Clinical Anatomy*, v.3, p.107-119, 1990.

GUTH L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. *Physiol. Rev*, v.36, p.441-478, 1956.

GUTMANN, E.; SANDERS, F.K. Recovery of fiber numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J. Physiol.*, v.101, p.489-518, 1943.

HALL, S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J. Anatomy*, v.190, p.57-71, 1997.

HALL, S.M.; ENVER, K. Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts. *The Journal of Hand Surgery*, v.19-B, n.4, p.444-451, 1994.

HALL, Z.W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell, 72/ Neuron*, v.10 (suppl), p.99-121, 1993.

HARRISON, R.G. Neuroblast versus sheath cell in the development of peripheral nerves. *J. Comp. Neurol.*, v.37, p.123-205, 1924.

HORCH, K.W.; LISNEY, S.J.W. On the number and nature of regenerating myelinated axons after lesions of cutaneous nerves in the cat. *J. Physiol.*, v.313, p. 375-286, 1981.

HOUSTAVA, L.; DUBOVY, P.; HANINEC, P.; GRIM, M. An alternative preparation of the acellular muscle graft for reconstruction of the injured nerve – morphological and morphometric analysis. *Annals of Anatomy*, v.181, p. 275-281, 1999.

IDE, C. Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle. *Neurosci. Res.*, v.1, p.379-391, 1984.

IDE, C.; TOYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain. Res.*, v.288, p.61-75, 1983.

IDE, C.; OSAWA, T.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Progress in Neurobiology*, v.34, p.1-38, 1990.

JERREGARD, H.; NYBERG, T.; HILDEBRAND, C. Sorting of regenerating rat sciatic nerve fibers with target-derived molecules. *Experimental Neurology*, v.169, p. 298-306, 2001.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v.27, p.137a, 1965.

KEYNES, R.J.; HOPKINS, W.G.; HUANG, C.L.H. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fiber basement membrane. *Brain Res.*, v.295, n.2, p.275-281, 1984.

KIM, D.H.; CONNOLLY, S.E.; ZHAO, S.; BEUERMAN, R.W.; VOORHIES, R.M.; KLINE, D.G. Comparison of macropore, semipermeable and nonpermeable collagen conduits for nerve repair. *J. Reconstr. Microsurg.*, v.9, p.415-420, 1993.

KLINE, D.G. Surgical repair of peripheral nerve injury. *Muscle Nerve*, v.13, p.843-852, 1990.

KUECHERER-EHRET, A.; GRAEBER, M.B.; EDGAR, D.; THOENEN, H.; KREUTZBERG, G.W. Immunoelectron microscopic localization of laminin in normal and regenerating mouse sciatic nerve. *J. Neurocyt.*, v.19, p.101-109, 1990.

KYTТА, J.; HEINON, E.; ROSENBERG, P.H.; WAHLSTROM, T.; GRIPENBERG, J.; HUOPANIEMI, T. Effects of repeated bupivacaine administration on sciatic nerve surrounding muscle tissue in rats. *Acta Anaesthes. Scand*, v.30, p.625-629, 1986.

LAWSON, G.M.; GLASBY, M.A. A comparison of immediate and delayed nerve repair using autologous freeze-thawed muscle grafts in a large animal model. *J. Hand Surgery*, v.20, n.5, p.663-700, 1995.

LE BEAU, J.M.; ELLISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol.*, v.17, p.161-172, 1988.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop. Scand.*, v.58, p.145-169, 1987.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone model chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp. Neurol.*, v.76, p.361-375, 1982.

MATHEWS, G.; FFRENCH-CONSTANT, C. Embryonic fibronectins are up-regulated following peripheral nerve injury in rat. *J. Neurobiol.*, v.26, p.171-188, 1995.

MATSUMOTO, K.; OHNISHI, K.; KIYOTANI, T.; SEKINE, T.; UEDA, H.; NAKAMURA, T.; ENDO, K.; SHIMIZU, Y. Peripheral nerve regeneration across na 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*, v.868, p. 315-328, 2000.

MATSUOKA, I.; MEYER, M.; THOENEN, H. Cell-type-specific regulation of nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells: comparasion with other cell types. *Journal of Neurosceince*, v.11, p.3165-3177, 1991.

MATTAR JR., R.; STARCK, R.; GUARNIERI, M.V.; AZZE, R.J.; MITTELDORF, C.S.; FERREIRA, M.C. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.25, n.8, p.287-292, 1990.

MEYER, M.; MATSUOKA, I.; WETMORE, C.; THOENEN, H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J. Cell Biol.*, v.119, p.45-54, 1992.

MILLES, H. Reappraisal of nerve repair. *Surg. Clin. North Am.*, v.61, p.321-340, 1981.

MORELL, P. *Myelin*, Ed. Plenum Press, New York, 1977.

MORRIS, J.H.; HUDSON, A.R.; WEDDELL, G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve. *Zellforsch*, v.124, p.165-203, 1972.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, v.79, p.319-326, 1987.

NAVARRO, X.; CALVET, S.; BUTÍ, M.; GÓMEZ, N.; CABRUJA, E.; GARRIDO, P.; VILLA, R.; VALDERRAMA, E. Peripheral nerve regeneration through microelectrode arrays based on silicon technology. *Restorative Neurology and Neuroscience*, v.9, p. 151-160, 1996.

NAVARRO, X.; VERDÚ, E.; BUTÍ, M. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Experimental Neurology*, v.129, p.217-224, 1994.

NONAKA, I.; TAKAGI, A.; ISHIURA, S.; NAKASE, H.; SUGITA, H. Pathophysiology of muscle necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathologica*, v.60, p.167-174, 1983

NORRIS, R.W.; GLASBY, M.A.; GATTUSO, J.M.; BOWDEN, R.E.M. Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.70-B, p.530-533, 1988.

PELLEGRINO, R.G.; POLITIS, M.J.; SPENCER, P.S. Axon-associated Schwann cell mitosis during peripheral nerve regeneration in vivo. *J. Cell Biol.*, v.91, p.93a, 1980.

PELLEGRINO, R.G.; SPENCER, P.S. Schwann cell mitosis in response to regenerating axons in vivo. *Brain Research*, v.341, p.16-25, 1985.

PERRIS, R.; PAULSSON, M.; BRONNER-FRASER, M. Molecular mechanisms of avian neural crest cell migration on fibronectin and laminin. *Developm. Biology*, v.136, p.222-238, 1989.

PERRY, V.H.; BROWN, M.C. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *BioEssays*, v.14, n.6, p.401-406, 1992.

PERRY, V.H.; BROWN, M.C.; GORDON, S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury: a possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.*, v.165, p.1218-1223, 1987

PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H.F. *The fine struture of the nervous system: the neurons and supporting cells*. Philapelphia, Sauders, 406p., 1976.

RAPPOLEE, D.A.; WERB, Z. mRNA phenotyping for studying gene expression in small numbers of cells. Platelet derived growth factor and other growth factors in wound derived macrophagos. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.2, p.3-10, 1990.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at light pH as na electronopaque satin in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v.17, p.208-212, 1963.

REYNOLDS, R.J.; LITTE, G.J., LIN, M.; HEATH, J.W. Imaging myelinated nerve fibres by confocal fluorescence micorscopy: individual fibres in whole nerve trunks traced through multiple consecutive internodes. *Journal of Neurocyt.*, v.23, p.555-564,1994.

ROBINSON, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*, v.23, p. 863-873, 2000.

SAITO, A.; ZACKS, S.I. Ultrastructure of Schwann and perineural sheaths at the mouse neuromuscular junction. *Anat. Rec.*, v.164, p. 379- 385, 1969

SANDERS, F.K.; YOUNG, J.Z. The influence of peripheral connections on the diameter of regenerating nerve fibre. *J. Exp. Biol.*, v.22, p.203-212, 1946.

SANES, J.R. Laminin, fibronectin and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J. Cell Biol.*, v.93, p.442-451, 1982.

SANES, J.R.; MARSHALL, L.M.; MCMAHN, U.J. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after Removal of myofibers: differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J. Cell Biol.*, v.78, p.176-198, 1978.

SANTO NETO, H.; TEODORI, R.M.; SOMAZZ, M.C.; MARQUES, M.J. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *British Journal of Plastic Surgery*, v.51, p.555-560, 1998.

SMITH, K.J. et al. Internodal myelin volume and axon surface area. A relationship determining myelin Thickness? *J Neurol Science*, v.55, p.231-239, 1982

SOMAZZ, M.C. *Reparo da lesão de nervo ciático através de autotransplante de músculo esquelético em ratos, retalho obtido com injeções intramusculares de anestésicos locais*. Piracicaba: Unicamp, 1994. 90p. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

SUNDERLAND, S. *Nerves and nerve injuries*, 2<sup>nd</sup>, Ed. Churchill Livingstone, London, 1978

TERZIS, J.; FAIBISOFF, B.; WILLIAMS, B. The nerve gap: suture under tension versus graft. *Plast. and Reconst. Surg.*, v.56, p.166-170, 1975.

THOMAS, P.K. Changes in the endoneurial sheaths of peripheral myelinated nerve fibers during Wallerian degeneration. *J. Anatomy*, v.98, n.2, p. 175-182, 1964.

TIMPL, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. Jour. Biochem.*, v. 180, p.487-502, 1989.

TOHYAMA, K. The localization of lectin-binding sites on schwann cell basal lamina. *J. Neurocytol.*, v.14, p.49-61, 1985.

TOHYAMA, K.; IDE, C. The localization of laminin and fibronectin on the Schwann cell basal lamina. *Arch Histol. Jpn.*, v.47, p.519-532, 1984.

TOS, P.; BATTISTON, B.; GEUNA, S. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery*, v.20, p.65-71, 2000

TOYOTA, B.; CARBONETTO, S.; DAVIS, S. A dual laminin/collagen receptor acts in peripheral nerve regeneration. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, v.87, p.1319-1322, 1990.

VARON, S.S.; BUNGE, R.P. Trophic mechanisms in the peripheral nervous system. *Ann. Ver. Neuroscience*, v.1, p.327-361, 1978.

VOLNANDT W.; ZIMMERMAN, H. Acetylcholine, ATP and proteoglycan are common to synaptic vesicles isolated from the electric organ of eel and electric catfish as well as from rat diaphragm. *J. Neurochem.*, v.47, p. 1449-1457, 1986.

WALLER, A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observation of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. London*, v.140, p.423-429, 1850.

WANG, G.Y.; HIRAI, K.I.; SHIMADA, H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum-treated nerve grafts. *Brain Research*, v.570, p.116-125, 1992.

WEBER, R.A.; BREIDENBACH, W.C.; BROWN, R.E.; JABALEY, M.E.; MASS, D.P. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.106, n.5, p. 1036-1048, 2000.

WESTON, J. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv. Morphol.*, v.8, p.41-114, 1970.

YAGIELA, J.A.; BENOIT, P.W.; BUONCRISTIANI, R.D.; PETERS, M.P.; FORT, N.F. Comparison of myotoxic effects of lidocaine with epinephrine in rats and humans. *Anesth. Analg.*, v.60, p.471-480, 1981.

OBS: \* De acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) 6023 Agosto/2000, atualizada em Maio/2001.