

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I.B.

MARIO JOSÉ JORGE SABHA JÚNIOR

“EMPREGO DE ENXERTO MUSCULAR CRIOPRESERVADO NA REPARAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Mario José Jorge Sabha
Júnior
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.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Campinas
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Sa 13e
V	EX
TOMBO BC/	52021
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/02/03
Nº CPD	

CM00179055-0

1B 10 276357

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

Sa13e

Sabha Júnior, Mario José Jorge

Emprego de enxerto muscular criopreservado na reparação nervosa periférica/
Mario José Jorge Sabha Júnior. –
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Humberto Santo Neto

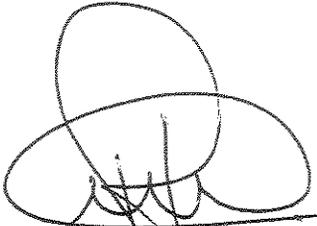
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Criopreservação. 2. Regeneração nervosa. 3. Anestésicos. I.Santo Neto, Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Data da Defesa: 22/10/2002

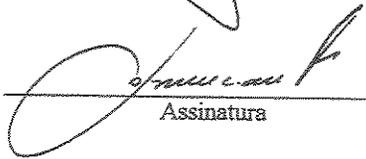
BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)



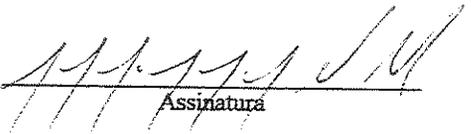
Assinatura

Prof.Dr. José Meciano Filho



Assinatura

Prof.Dr. Joffre Guazzelli Filho



Assinatura

Profa.Dra. Sarah Arana

Assinatura

200301610

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto, por ter me aceito como seu orientado, e por suas observações e sugestões sempre pertinentes.
- Ao Prof. Joffre Guazzelli Filho- UNESP, Botucatu, à Profa. Dra. Sarah Arana- Histologia- UNICAMP e ao Prof. Dr. José Meciano Filho- Anatomia- IB, UNICAMP, pelas sugestões e críticas durante a análise prévia desta tese.
- Não poderia deixar de agradecer ao Prof. Dr. Marco César Somazz, por ter me ensinado as técnicas micro-cirúrgicas, das quais me utilizei para a realização deste trabalho, além do fácil acesso à sua pessoa, atenção e paciência gratuitas.
- Aos técnicos do laboratório do Departamento de Anatomia do IB, UNICAMP, Norivaldo Celestino e Marco Aurélio R. de Paula, pelas dicas e prestação de seus serviços neste trabalho, que me foram de grande valia.
- À FOP (Faculdade de Odontologia de Piracicaba), na pessoa do Prof. Dr. José Merzel do Departamento de Morfologia, que autorizou o uso do laboratório de “Microscopia Especial” do Departamento para realização de parte do presente trabalho.
- À recém- mestre, amiga do departamento Adriana Pertille, pela grande contribuição ao meu trabalho, e pelas dicas com os equipamentos de análise morfométrica e estatística.
- A todos os professores do departamento de Anatomia do IB- UNICAMP, em especial àqueles que participaram das minhas avaliações, qualificação(Profa. Dra. Evanisi T. Palomari e Profa. Dra. Valéria Cagnon Quitete), prova de proficiência(Prof. Dr. Gerson Eduardo).
- Aos amigos Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello e Prof. Dr. Pedro Ganzeli, que sempre me incentivaram para a carreira acadêmica, oferecendo-me boa parte de seu tempo para esclarecimentos nos mais diversos aspectos.

- Agradeço a todos os alunos da Pós Graduação, especialmente aos mais antigos, que sempre me cederam parte de seu tempo para boas dicas e informações (Elaine C. Leite, Elaine Minatel, Cibele), e os mais recentes, os quais se tornaram grandes amigos: Juliana Adala, Noboro, Cândida e Ferdinando(tchê).
- À Prof. Raquel Rosa que participou de algumas das minhas atividades durante a graduação em Fisioterapia (Marília-SP), e me apresentou ao Departamento de Anatomia- IB(UNICAMP).
- Aos meus pais Mário Sabha e Dirce Bondesan Sabha, por terem me criado e me acompanhado, pacientemente em mais uma fase da minha vida.
- À minha esposa, Elaine C. Fachini Sabha, por seu carinho, amor e companhia presentes, pois soube compreender por muitas vezes os diferentes rumos deste longo caminho: as noites sem sono, feriados em frente ao computador, ou no laboratório, em prol do bom andamento deste trabalho.
- Às minhas “crianças”, Milla, Juki e Luna, que até agora, dividem e disputam minha atenção com a mamãe, e sempre nos confortam quando precisamos.
- À minha querida irmã, amiga e Profa. Maricene Sabha, que tem tantas ótimas idéias, qualidades, e sempre me proporciona seus “olhos de tigre” nos episódios e tarefas que participamos juntos.
- Ao amigo de infância Rodrigo Davis, “expert”em música e informática, que sempre ressucita meu micro de vírus e “OVNIs”, e pela amizade pura.
- Aos amigos Wanderlei Trindade e Roberta Reis que iniciaram uma grande fase de vida e também continuam a demonstrar seu carinho e amizade.
- Aos queridos Adilson e Laércio, que recentemente nos acompanham como amigos do “peito”.

- Aos tios Décio e Julieta, que sempre me oferecem uma casa de praia nas férias, pra quebrar o ritmo do trabalho excessivo- "o estresse agradece"-, e aos primos Maurício, Marcos e Sílvia, que também são ótimos, fofos e carinhosos.
- Aos Padrinhos Jarbas Dantas e Neusa que despertaram sempre em nossa família a importância da evolução como ser humano, dando diretrizes para possibilitá-la, por isso agradeço também às forças maiores que me auxiliaram neste processos de constante crescimento (Mestres Nada, Aerôn, Kutumi, e Leuviah), ao cosmo e a todo o universo.
- Aos ensinamentos de Luís Antônio Gasparetto, que continuam contribuindo para minha evolução em meus momentos de conflito.
- Aos meus pacientes do consultório, aos alunos da CREUPI e a todos aqueles que convivem comigo, proporcionando-me os conhecimentos da faculdade da vida, por isso obrigado à minha vida !!!

SUMÁRIO

	Página
ABSTRACT	x
RESUMO	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Organização Estrutural do Nervo Espinhal	8
3.2 Degeneração Axonal	10
3.3 Regeneração Axonal	13
3.4 Métodos Utilizados na Reparação Nervosa Periférica	13
3.5 Criopreservação de Enxertos Nervosos no Reparo da Lesão Nervosa Periférica	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Grupos I e II- Preparo e Implante do Enxerto Muscular	20
4.2 Grupo III- Preparo Pré- Implante	22
4.3 Retirada do Material, Local de Análise e Sacrifício dos Animais	23
4.4 Análise Histológica	24
4.5 Análise Morfométrica	24
5. RESULTADOS	26
5.1 Aspectos Histológicos	27
5.2 População Axonal	27
5.3 Morfometria	
5.3.1 Espessura da Bainha de Mielina (EBM)	27
5.3.2 Diâmetro da Fibra Mielínica (DFM)	28

5.3.3 Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM).....	29
5.3.4 Razão G (RG).....	29
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	38
8. FIGURAS E TABELAS.....	40
Figura 1(A, B).....	41
Figura 2(A, B).....	42
Figura 3(A, B).....	43
Tabela 1/ Figuras 04 e 05.....	44
Tabela 2/ Figuras 06 e 07.....	45
Figura 08.....	46
Tabela 3/ Figuras 09, 10 e 11.....	47
Tabela 4/ Figuras 12, 13 e 14.....	48
Tabela 5/ Figuras 15 e 16.....	49
Figura 17 e 18.....	50
9. REFERÊNCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ABSTRACT

In peripheral nerve regeneration it is not always possible to simply suture nerve stumps when there is loss of tissue, as this may place excessive tension on the nerve and hinder irrigation, favoring the development of scar tissue. The sural nerve has often served as auto-graft, binding the stumps of the transected nerve. As most nerves have larger diameters than the sural nerve it is necessary to join several segments in parallel for self-implantation among the stumps of the damaged nerve (autologous cable graft). This procedure has the drawback of having many suture points, promoting more local inflammation and exaggerated development of scar tissue that prevents axonal growth, inhibiting the successful nerve regeneration. Furthermore, there is loss of sensitivity in the area corresponding to the donor nerve. Several materials have been tested with the objective of replacing nerve autografts in the regeneration of peripheral nerve lesion. Among them the skeletal muscle stands out, as its basal membrane presents chemical and molecular composition characteristics that are similar to those of Schwann cells, acting as a mechanical guide for axonal growth. In the present paper, rats right soleus muscle was injected with 2% lidocaine hydrochloride (anesthetic) stored at low temperatures (- 4°C in group I and - 40°C in group II) and 3 (three) weeks later it was dissected to prepare a 1 cm long autologous graft. A control group of animals had their right soleus muscle treated with a local anesthetic 24 hours prior to self-transplant (group III). Fifty days after the self-transplant the sciatic nerve was exposed, fixated and divided into 2 parts: the graft site and the distal stump, analyzed by light microscopy. The axonal regeneration evaluation was carried out by direct counting of the number of myelinated axons (NMA) regenerated from these two parts of the sciatic nerve in the three groups, as well as the measurement of myelinated axon diameter (MAD), myelinated fiber diameter (MFD), myelinated sheath thickness (MST) and G ratio (GR). The present study shows that axonal regeneration was

similar in the three experimental groups, suggesting that cryopreservation of skeletal muscle is potentially useful, once it allows the development of a skeletal muscle autografts storage to repair the peripheral nerve injuries.

RESUMO

Na reparação da lesão nervosa periférica, nem sempre é possível a simples sutura dos cotos nervosos quando há perda de tecido, pois pode submeter o nervo a uma tensão excessiva, o que prejudica sua irrigação e favorece a formação de tecido cicatricial. O nervo sural tem sido utilizado como auto-enxerto, unindo os cotos do nervo lesado. Sendo a maioria dos nervos de diâmetro superior ao do nervo sural, há necessidade de se unir paralelamente vários segmentos do nervo, para auto-implantar entre os cotos do nervo lesado (enxerto em cabo). Este procedimento tem o inconveniente de conter muitos pontos de sutura, provocando maior inflamação local, sendo que a cicatrização exagerada impede o crescimento axonal e compromete o sucesso da reparação nervosa. Além disso, ocorre perda de sensibilidade na área correspondente do nervo doador. Diversos materiais têm sido estudados, com o objetivo de substituir os auto-enxertos de nervo no reparo da lesão nervosa periférica. Dentre eles, destaca-se o músculo esquelético, cuja membrana basal, apresenta características químicas e composição molecular semelhante às das células de Schwann, atuando como guia mecânico para o crescimento axonal. No presente trabalho, o músculo sóleo direito de ratos, foi submetido a injeção de cloridrato de lidocaína a 2% (anestésico), e em seguida, estocado em baixas temperaturas (- 4°C no grupo I e - 40°C no grupo II) e após 3(três) semanas foi dissecado para a confecção de um enxerto autólogo de 1 cm de comprimento. Utilizou-se um grupo controle de animais que teve seu músculo sóleo direito tratado com anestésico local, com 24 horas de antecedência ao auto transplante (grupo III). Após 50 dias do auto- transplante, o nervo ciático foi exposto, fixado e dividido em 2 porções: região do enxerto e coto distal, que foram analisados em microscopia de luz. A avaliação da regeneração axonal, foi realizada através da contagem direta do número de axônios mielínicos (NAM) regenerados destas duas porções do nervo ciático nos três grupos, bem como a mensuração do diâmetro dos

axônios mielínicos (DAM), diâmetro das fibras mielínicas (DFM) e espessura da bainha de mielina (EBM) e razão G (RG). O presente trabalho, mostra que a regeneração axonal foi semelhante nos três grupos experimentais, sugerindo que a criopreservação do músculo-esquelético é potencialmente útil, por permitir a criação de um banco de auto-enxertos de músculo esquelético para o reparo das lesões do nervo periférico.

1. INTRODUÇÃO

Devido a sua importância clínica, a regeneração do sistema nervoso periférico tem sido muito estudada. Está bem estabelecido que em poucos dias após uma lesão nervosa periférica, brotos axonais crescem longitudinalmente no interior do nervo lesado, em direção ao coto distal, na tentativa de reinervar o órgão alvo, embora por muitas vezes a recuperação funcional não ocorra totalmente (GLASBY, 1990; HALL, 1997).

A simples sutura dos cotos nervosos quando há uma lesão do nervo com perda de tecido nem sempre é possível, pois pode provocar uma tensão excessiva no nervo, prejudicando sua irrigação e favorecendo a formação de tecido cicatricial. Isto atuaria como um fator mecânico, que impediria o crescimento dos axônios. Nesses casos há necessidade de um auto- enxerto de nervo, sendo que comumente, o nervo sural tem servido a esse fim. Sendo a maioria dos nervos de diâmetro superior ao do nervo sural, há necessidade de se unir paralelamente vários segmentos do nervo, para auto-implantar entre os cotos do nervo lesado (enxerto em cabo). Este procedimento tem o inconveniente de conter muitos pontos de sutura, provocando maior inflamação local. Assim, a cicatrização exagerada impede o crescimento axonal e compromete o sucesso da reparação nervosa (FAWCETT & KEYNES, 1986; TERRIS & FEE, 1993).

Na tentativa de minimizar estes inconvenientes, diversos materiais têm sido testados na substituição do auto- enxerto de nervo. Entre eles, destacam-se: tubos de silicone (LUNDBORG et al., 1982; MADISON et al., 1988; SPECTOR et al., 1991), tubos de polietileno (DA SILVA & LANGONE, 1989), tubos de poliésteres (DA SILVA et al., 1984; MADISON et al., 1984,1985), veias (WEISS, 1943; RICE & BERSTEIN, 1984; WALTON et al., 1989; GEUNA et al., 2000), colágeno (ROSEN et al., 1989; MACKINNON & DELLON, 1990). Dentre os materiais biológicos utilizados

para este fim, destaca-se o músculo esquelético (KEYNES et al., 1984; GLASBY et al., 1986a,b,c; HALL & ENVER, 1994; SANTO NETO et al., 1998).

A utilização de músculo esquelético na reparação da lesão de nervos periféricos surgiu dos estudos feitos por KEYNES et al. (1984), os quais verificaram que a membrana basal muscular possuía características químicas e composição molecular semelhante às da membrana basal das células de Schwann. Então, sabendo que os axônios de um nervo lesado crescem no interior dos tubos de membrana basal das células de Schwann, começou-se a estudar a possibilidade de crescimento axonal no interior de tubos de membrana basal muscular (GLASBY et al., 1986a,b,c; FAWCET & KEYNES, 1986; NORRIS et al., 1988; GSCHMEISSNER et al., 1990; SANTO NETO et al., 1998).

O método de preparo do enxerto preconizado por KEYNES et al., (1984), consiste no tratamento químico e posterior compressão mecânica do fragmento muscular, a fim de eliminar o conteúdo sarcoplasmático e conseqüentemente criar tubos vazios de membrana basal muscular. Estes tubos atuam como guia mecânico para o crescimento axonal. No entanto, os mesmos autores notaram que além de muito trabalhosa, esta técnica promove o esvaziamento de apenas 50% do sarcoplasma.

Em seguida GLASBY et al., (1986a), modificaram o modo de preparação do retalho, o qual foi obtido por choque térmico e osmótico. Apesar dos retalhos assim obtidos permitirem uma boa regeneração axonal, eles também mostraram algumas desvantagens. Ao ser submetido ao referido tratamento, o fragmento muscular sofre retração, exigindo a retirada de um fragmento maior que o necessário para o enxerto.

Outra tentativa de melhorar a confecção do retalho muscular, foi a de submeter o músculo doador a aquecimento (HALL & ENVER, 1994). Observou-se entretanto que

com este procedimento, poderia ocorrer inativação da membrana basal muscular, cuja integridade é essencial para a regeneração axonal.

Recentemente, SOMAZZ (1994) empregou retalhos de membrana basal muscular, obtido a partir da injeção de anestésico local, para remoção do sarcoplasma. Esse agente, causa rápida necrose do tecido muscular, mas preserva a membrana basal da fibra muscular. Normalmente, 24 horas após a injeção, o sarcoplasma necrótico é removido, restando apenas os tubos de membrana basal. Esses autores observaram que o reparo da lesão nervosa, apresenta resultados satisfatórios, que não diferem significativamente em relação à regeneração axonal observada no enxerto preparado por choque térmico e osmótico.

Considerando os estudos recentes em criopreservação de aloenxertos de nervo, o presente trabalho propôs-se a estudar a criopreservação de auto-enxertos de músculo esquelético e seu emprego no reparo da lesão nervosa periférica, uma vez que não se encontra na literatura dados a respeito deste tema. Adotou-se a criopreservação de auto-enxertos de músculo esquelético, associado ao efeito de anestésico local para remoção do sarcoplasma muscular, preservando a membrana basal muscular, como preconizado por SOMAZZ (1994) e SANTO NETO et al.,(1998).

Futuramente, objetiva-se a possibilidade efetiva de utilizar aloenxerto de músculo esquelético no reparo da lesão periférica, e posteriormente, a utilização de xenoenxerto, assim que novos estudos forem desenvolvidos, monitorando a resposta auto-imune, como feito por FANSA et al., 1999; KOHAMA et al., 2001) com nervos periféricos.

2. OBJETIVOS

Examinar a viabilidade do emprego de auto- enxertos de músculo esquelético, tratados por injeção de anestésico local, e armazenados em baixas temperaturas, na reparação da lesão nervosa periférica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO NERVO ESPINHAL

Os nervos espinhais são formados por axônios associados a célula de Schwann(CS), envoltos por três bainhas de tecido conjuntivo. A mais externa delas, envolve os fascículos nervosos, é denominada epineuro. A mesma é composta por fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras colágenas do tipo I dispostas paralelamente em relação ao nervo, conferindo-lhe um reforço estrutural (MONTES et al., 1984).

As células epineurais são fusiformes, apresentando retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e não apresentam lâmina basal (PETERS et al., 1976). Os vasos sanguíneos nutrem o epineuro, emitindo vários ramos, sendo que os de menor calibre, penetram numa segunda bainha conjuntiva, o perineuro. Este apresenta organização semelhante ao epineuro, embora possua características morfofuncionais peculiares. Além de apresentar camadas concêntricas em relação às fibras nervosas, o perineuro é envolto por lâmina basal e fibras de colágeno dos tipos I e III (PETERS et al., 1976 ; MONTES et al., 1984).

A terceira bainha conjuntiva é o endoneuro, o qual mantém íntimo contato com fibras nervosas presentes, e é composto por delicadas fibras de colágeno do tipo III, dispostas longitudinalmente à fibra nervosa (MONTES et al., 1984). Poucos fibroblastos são encontrados, com ausência de lâmina basal, além de mastócitos e macrófagos residentes (CARPENTER, 1988).

O axônio é uma extensão longa e delgada do corpo celular do neurônio, capaz de transportar informações químicas e elétricas a longas distâncias. Ao atingir o órgão efetor o axônio torna-se uma estrutura arborescente, denominada terminação axonal. Através dela, ocorre o contato entre a célula nervosa e órgão alvo, por meio de sinapses.

Em um nervo, existem axônios mielínicos e amielínicos. Geralmente os axônios mielínicos possuem um diâmetro maior que 1,0 μm , com células de Schwann (CS) ao seu redor, formando uma estrutura tubular denominada bainha de mielina. Longitudinalmente, a CS é interrompida por intervalos destituídos de mielina, cobertos por digitações laterais de seu citoplasma, denominados nódulo de Ranvier (PETERS et al.,1976).

Os axônios amielínicos apresentam CS, embora sejam desprovidos de bainha de mielina. Nesses axônios, uma CS, pode envolver de 5 a 25 axônios, através de projeções citoplasmáticas, não havendo formação de bainha de mielina e de nódulos de Ranvier, portanto as CS vizinhas estão dispostas de forma contínua (LUNDBORG,1987).

As relações entre o axônio e as células de Schwann, são estabelecidas muito precocemente, desde o processo de formação do sistema nervoso periférico(SNP), quando os neurônios jovens, advindos do tubo neural, emitem seus axônios em direção aos respectivos órgãos efetores (LUNDBORG, 1987; HALL, 1997). No SNP, a produção da bainha de mielina, depende do contato entre axônio e CS, pois quando este contato se estabelece, existe uma ativação dos genes responsáveis pela síntese de proteínas componentes da bainha de mielina (HALL, 1997).

Em sua superfície externa a CS, a qual sintetiza lâmina basal, é por ela envolvida. A lâmina basal é composta por agrina, colágeno do tipos IV ($\alpha 3$ e $\alpha 4$), fibronectina, laminina A, S-laminina, acetilcolinesterase, proteoglicanos (heparan sulfato), N- acetilgalactosamina (carboidrato terminal) e protease nexina (HALL & SANES, 1993), sendo que a laminina e fibronectina promovem fatores tróficos no crescimento dos axônios, durante o processo de regeneração (WANG et al., 1992; HALL, 2001).

3.2 DEGENERAÇÃO AXONAL

Segundo ROBINSON (2000), a lesão nervosa periférica foi classificada por SEDON (1963), em três tipos principais. O primeiro é aquele onde há lesão focal suave, e bloqueio focal do impulso nervoso, com perda motora ou sensitiva, mas não apresenta sinal de degeneração Walleriana, denominado neuropraxia. No segundo, ocorre uma interrupção acentuada da condução nervosa, provocada por graus variáveis de ruptura do tecido nervoso (endoneuro, perineuro, CS) por esmagamento ou estiramento, apresentando degeneração Walleriana, denominado axotomia ou “axonotmesis”. O terceiro tipo é aquele, cuja injúria é mais severa, pois o nervo é totalmente lesado, levando à interrupção da transmissão dos impulsos elétricos em todos os axônios do nervo, denominado neurotomia (“neurotmesis”).

Para cada um desses tipos de lesão, existe um prognóstico. Na neuropraxia, a probabilidade do retorno funcional é alta, pois os axônios não estão comprometidos, o que conseqüentemente, não acarreta em degeneração, podendo haver retorno da função dentro de horas, semanas ou poucos meses.

Na axotomia, a possibilidade de regeneração é relativamente grande, embora seja mais demorado, pois neste tipo de lesão, o retorno da função dependerá da desorganização do nervo lesado, assim como a distância da lesão ao órgão alvo. A preservação da membrana basal é fundamental para que ocorra a regeneração axonal, pois serve de guia para os neuritos em crescimento (FAWCETT & KEYNES, 1986). Por fim, após uma neurotomia, a probabilidade de regeneração, sem a adoção de algum procedimento cirúrgico, é muito pequena, pois neste tipo de lesão, ocorre uma descontinuidade das membranas conjuntivas (endoneuro, perineuro e epineuro) e de vasos sanguíneos, além da retração dos cotos proximal e distal do referido nervo.

Após lesão axonal, ocorrem modificações morfofuncionais, tanto no coto proximal, quanto no coto distal ao local da lesão.

O corpo celular dos neurônios comprometidos, apresenta uma série de modificações morfofuncionais, denominada cromatólise, a qual é caracterizada basicamente pela dispersão dos ribossomos pelo citoplasma e retículo endoplasmático rugoso, e aumento da basofilia (MONTES et al., 1984). Em seguida, há um aumento do volume do núcleo e nucléolo, e migração do primeiro para a periferia celular. Estas alterações têm sido atribuídas aos eventos fisiológicos celulares ligados à síntese protéica e ao transporte axoplasmático, cujo resultado final leva à degeneração ou à morte neuronal (HALL, 2001).

A região do nervo adjacente à transecção, inicialmente fica intumescida, devido ao trauma. Os axônios seccionados, apresentam um extravasamento de material axoplasmático imediatamente após a lesão, que cessa após alguns minutos, com a reorganização plasmática dos axônios. A degeneração retrógrada pode atingir os axônios do coto proximal e numa segunda etapa, cada axônio poderá iniciar o processo de

regeneração, emitindo dezenas de ramificações que tendem a invadir o coto distal (LUNDBORG, 1987; HALL, 1997).

No coto distal à lesão, os axônios seccionados, encontram-se desconectados de seu centro trófico, e conseqüentemente entram em autólise. Foi demonstrado, através de estudos ultra-estruturais do nervo ciático, que a primeira alteração degenerativa é um acúmulo de mitocôndrias no axoplasma dos nodos de Ranvier. Em seguida, os mesmos apresentavam agregados granulares, na região paranodal e no axoplasma internodal adjacente (CARPENTER, 1988).

Aproximadamente doze horas após a lesão, o axônio está edemaciado e deformado, apresentando um afrouxamento das lamelas de mielina e retração das bainhas de mielina em direção aos nodos de Ranvier. Dentro de três a sete dias, a bainha de mielina e os axônios estarão totalmente fragmentados em segmentos elipsóides (HALL, 1997; ROBINSON, 2000).

As células de Schwann (CS) e os macrófagos, participam ativamente do processo de fagocitose dos restos da bainha de mielina e dos demais fragmentos resultantes da degeneração Walleriana. Inicialmente, o processo fagocítico é intenso, mas, à medida que a remoção dos resíduos vai sendo realizada, os macrófagos começam a retornar aos capilares sangüíneos (HALL, 2001). Uma característica importante da degeneração Walleriana, é a mudança de comportamento das células de Schwann (CS), pois seu citoplasma se hipertrofia. Estudos ultra-estruturais mostram que as CS ativadas por uma lesão, apresentam citoplasma hipertrofiado, em degradação (LUNDBORG, 1987).

Ao final da degeneração Walleriana, as CS se alongam e se justapõem através de seus processos citoplasmáticos, formando no interior dos tubos de membrana basal algo semelhante a uma corrente. Tais estruturas no interior do coto distal, formam as

denominadas bandas de Büngner ou bandas neurilemais. Estudos subseqüentes comprovaram que os axônios em regeneração, crescem ao longo dessas bandas (HALL,1997).

3.3 REGENERAÇÃO AXONAL

Os neurônios do SNP, são células potencialmente capazes de iniciar a regeneração de seus axônios, poucas horas após uma axotomia. Os primeiros brotamentos axonais do coto proximal advém dos nodos de Ranvier mais próximos do local lesado, através do espaço deixado por uma retração parcial das CS. Cada brotamento axonal emite, à partir de sua extremidade, diversas projeções, promovendo a formação de uma estrutura denominada, cone de crescimento(LUNDBORG, 1987).

Nesta etapa, concomitantemente, as células de Schwann (CS) diminuem a regulação dos genes que expressam as proteínas que integram a bainha de mielina, aumentando a regulação dos genes responsáveis pela síntese de fatores neurotróficos, como o fator de crescimento do nervo (NGF), e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), e também aumentam a síntese de laminina e fibronectina (SPECTOR et al., 1991; MEYER et al., 1992; WANG et al., 1992).

Os axônios em regeneração crescem, no sentido do coto distal, atingindo o interior das bandas de Bungner, revestidas por lâmina basal da CS, a qual atua como fator trófico, facilitando a regeneração axonal, pois apresenta laminina na superfície interna, a qual é reconhecida pelos axônios em regeneração (HALL, 1997).

3.4 MÉTODOS UTILIZADOS NA REPARAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Segundo TERRIS & FEE (1993), a utilização de enxertos nervosos em cabo, na reparação nervosa periférica, foi preconizada por SEDON (1947). Esta técnica requeria sutura paralela de vários cotos nervosos, submetendo-os a tensão excessiva. Observou-se também que tal procedimento causava reação inflamatória, em consequência da tensão nervosa. Além disso, a cicatrização decorrente da sutura, resulta em bloqueio mecânico para os axônios em crescimento, os quais são estrangulados no interior do nervo, causando constrição dos vasos intraneurais, originando uma fibrose (FAWCETT & KEYNES, 1986).

Posteriormente, outros estudos foram realizados, na tentativa de diminuir o processo cicatricial, utilizando-se material adesivo originário do plasma sangüíneo (NISHIHARA & McCAFFREY, 1989), contudo não foi diferente dos resultados obtidos com simples sutura epineural.

Logo após, foram desenvolvidos métodos de reparação com o uso de tubos que conduzissem os brotos axonais em direção ao coto distal do nervo. Estes tubos eram de natureza sintética ou biológica, como o silicone (FIELDS & ELLISMANN, 1986; SPECTOR et al., 1991), polietileno (DA SILVA & LANGONE, 1989; MARQUES, 1992), poliésteres (DEN DUNNEN et al., 1993), veias (WALTON et al., 1989; GEUNA et al., 2000), colágeno (MACKINNON & DELLON, 1990) e vidro biodegradável (LENIHAN et al., 1998b).

O método de tubulização, apresenta algumas vantagens, como: a orientação mecânica aos axônios em crescimento, e redução do tecido cicatricial, por formar uma barreira, dificultando a invasão das células do tecido conjuntivo e ao mesmo tempo oferecer substâncias tróficas no interior do tubo (SPECTOR et al., 1991; TERRIS & FEE, 1993).

Apesar da boa regeneração encontrada logo após a tubulização, TERRIS & FEE (1993), observaram que em nervos regenerados, existiam alguns axônios em degeneração, que aumentava proporcionalmente ao tempo após a tubulização, devido a presença de forças constrictivas sobre o nervo durante seu crescimento na região do implante e no coto distal.

Outras alternativas no reparo da lesão nervosa foram estudadas, e na prática clínica é usual a reparação através do autoenxerto de nervo, porém ainda apresenta alguns inconvenientes. Quando o diâmetro do nervo lesado é maior que o nervo a ser implantado, realiza-se o implante de vários cabos de nervos, alinhados paralelamente (enxertos em cabo), o que acarreta em cicatrização excessiva, prejudicando a regeneração axonal, além da perda de sensibilidade na região doadora desnervada (FAWCETT & KEYNES, 1986).

Dentre várias alternativas na substituição do enxerto nervoso, o emprego de autoenxerto de músculo esquelético tem mostrado resultados satisfatórios. Este, é baseado no fato de que a membrana basal do músculo esquelético, possui propriedades químicas e composição molecular semelhante a da célula de Schwann. Alguns autores, desenvolveram protocolo onde o músculo esquelético era tratado com uma variedade de produtos químicos, cuja finalidade era retirar o conteúdo sarcoplasmático do mesmo. Em seguida, realizava-se a compressão mecânica do fragmento muscular entre duas superfícies planas com a finalidade de completar o esvaziamento. Assim sendo, o método necessitava aperfeiçoamento, já que eliminava apenas 50% do conteúdo sarcoplasmático (KEYNES et al., 1984).

Em estudos subsequentes, foi empregado um método de preparo do enxerto muscular, o qual consiste em choque térmico e osmótico do fragmento muscular, o qual separa a membrana basal, destruindo o conteúdo sarcoplasmático (GLASBY et al,

1986a). A regeneração axonal em enxertos preparados desta forma, mostrou-se também eficiente.

Outros estudos experimentais de GLASBY et al. (1986 b,c), utilizaram o auto-enxerto muscular, tratado por congelamento e descongelamento, implantados em nervo ciático de ratos e nervo radial de sagüis. Esses resultados, mostraram-se satisfatórios, comparativamente ao autoenxerto de músculo fresco (GSCHMEISSNER et al., 1990).

Outro método de confecção do enxerto muscular, consiste no pré- aquecimento do fragmento muscular a 60°C e a 80°C (HALL & ENVER, 1994). Os resultados a 60°C eram semelhantes aos obtidos por congelamento e descongelamento do enxerto, embora a essa temperatura, não fosse possível eliminar todo o conteúdo sarcoplasmático e alguns axônios cresciam entre os tubos do sarcolema. Naqueles aquecidos a 80°C, a regeneração axonal não mostrou-se tão eficiente, comparada aos primeiros. Os autores sugerem que nesta temperatura (80°C), componentes importantes da lâmina basal, como a laminina e fibronectina, imprescindíveis para o crescimento axonal (MEYER et al., 1992; WANG et al., 1992; HALL, 2001), sejam alterados por inativação térmica.

Tem-se demonstrado que axônios em regeneração podem crescer através da lâmina basal de músculo esquelético, submetido a dose única de injeção de anestésico local, administrada 24 horas antes de ser implantado entre os cotos do nervo lesado. Isso ocorre, graças à ação miotóxica do anestésico, promovendo degeneração das fibras musculares, seguida de remoção do material necrótico após 24 horas, embora preserve a membrana basal muscular (SANTO NETO et al., 1998). O efeito miotóxico ocorre por elevação dos níveis de íons cálcio, o que acarreta em contração exacerbada das fibras musculares, ativando uma série de enzimas, incluindo proteases e ATPases, as quais causam grande efeito deletério na célula muscular (NONAKA et al., 1983; HOGAN et al., 1994).

A desvantagem da técnica é que os autoenxertos poderão ser implantados somente 24 horas após sua confecção, ou seja na reparação secundária, sendo que em uma reparação primária (acidente/ trauma), nem sempre dispõe-se de tempo suficiente para tal. Considerando este fato, a avaliação de novos métodos de reparação do nervo periférico se faz necessária.

3.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE ENXERTOS NERVOSOS NO REPARO DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Segundo EVANS et al. (1998), as primeiras tentativas de criopreservação de enxertos nervosos, foram de GUTMANN & SANDERS (1943). Aloenxertos de nervo foram estocados por 1, 2 e 3 semanas na temperatura de 2°C antes de implantá-los. O procedimento resultou em menor infiltrado linfocitário e melhor regeneração axonal, comparado ao aloenxerto fresco, sendo que histologicamente e funcionalmente, estes resultados não diferem dos autoenxertos.

Nos estudos de SANDERS & YOUNG (1954), foi demonstrado que o congelamento de aloenxerto de nervo fresco, diminui o infiltrado linfocitário,. Estes resultados foram também obtidos por outros autores, como TOHYAMA et al.(1990) e LENIHAN et al. (1998a), os quais sugeriram que a estocagem de enxertos nervosos, acarretaria em menor resposta imune do receptor.

Tem-se demonstrado que a criopreservação e congelamento do aloenxerto nervoso, não compromete estruturas importantes para a regeneração axonal, como lâmina basal das CS, distribuição de laminina e perineuro (EVANS et al., 1998; FANSA et al., 2000), contudo, a viabilidade das células do aloenxerto diminui à medida em que se aumenta o tempo de estocagem (EVANS et al., 1998).

Verificou-se a eficácia do enxerto muscular preparado através de congelamento no nervo fibular lesado, comparados a enxertos preparados através de aquecimento no microondas, para o mesmo fim. Os últimos apresentaram-se inviáveis para uso experimental ou clínico, pois a confecção do enxerto, pois o aquecimento no microondas, acarreta em desnaturação dos enxertos musculares aquecidos acima de 80°C (LENIHAN et al., 1998a).

Diversos experimentos, têm demonstrado o sucesso da criopreservação com a intenção de criar um banco de enxertos nervosos doadores (HIRASÉ et al., 1992; ZALEWSKI et al., 1993; EVANS et al., 1995; ZHANG, et al., 1998), principalmente em animais da mesma espécie (MATSUYAMA et al., 2000; MACKINNON et al., 2001; GRAND et al., 2002). No entanto, como não encontra-se dados na literatura a respeito da criopreservação de auto-enxertos de músculo-esquelético na reparação nervosa periférica, na presente obra executou-se tal investigação, na qual a criopreservação é associada ao efeito miotóxico do anestésico (cloridrato de lidocaína a 2%).

A estocagem do enxerto, facilitaria o planejamento e agendamento da cirurgia, transporte do material, se necessário, além de permitir que o paciente faça exames prévios necessários no hospital, reduzindo o custo de internação e do procedimento cirúrgico (EVANS et al., 1995; FANSA et al., 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 21 ratos machos do tipo Wistar com aproximadamente três a quatro semanas de idade, peso médio de 360 gramas, provenientes do Biotério Central da UNICAMP.

Os mesmos, foram divididos em 3 grupos:

Grupo I : Sete ratos que receberam enxerto autólogo de músculo esquelético (sóleo), submetido a dose única de cloridrato de lidocaína a 2%, cujo implante ocorreu após 3 semanas de estocagem em freezer a -4°C .

Grupo II : Sete ratos que receberam enxerto autólogo de músculo esquelético (sóleo), submetido a dose única de cloridrato de lidocaína a 2%, cujo implante ocorreu após 3 semanas de estocagem em freezer a -40°C .

Grupo III- Controle: Sete ratos que receberam enxerto autólogo de músculo esquelético (sóleo), submetido a dose única de cloridrato de lidocaína a 2%, injetando este anestésico local no músculo sóleo 24 horas anteriores ao implante do enxerto muscular.

4.1 GRUPOS I e II - Preparo e Implante do Enxerto Muscular

Para o transplante de enxerto muscular (autólogo), foram adotadas as seguintes técnicas:

Anestesia via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de Ketamina (Francotar – 50 mg/ml) e cloridrato de Xylazina (Virbaxyl -2g/100ml) 1:1, em dose de 0,2 ml/100 g de peso corporal. Após os primeiros sinais de anestesia geral, posicionou-se o animal em decúbito ventral para a tricotomia da região pósterolateral da coxa direita.

Procedeu-se a seguir a incisão da pele, a fim de expor o músculo sóleo, no qual foi injetada solução de cloridrato de lidocaína a 2% com auxílio de uma seringa de 1 ml e agulha 13 x 4. O músculo ainda permaneceu em seu leito por 10 minutos. Posteriormente seu ventre muscular foi totalmente retirado, seccionando-se suas extremidades, com auxílio de material microcirúrgico. Em seguida, suturou-se a pele do animal com 3 pontos de fio de algodão 4-0.

O músculo, que nesta etapa já tinha sido submetido ao tratamento com injeção local de cloridrato de lidocaína a 2%, foi colocado em frasco com solução salina e estocado por 3 semanas em freezer com temperaturas de -4°C para o Grupo I, e de -40°C para o Grupo II para posterior implante no nervo ciático do mesmo animal (auto enxerto).

Após 3 semanas de estocagem do músculo de cada animal, cada um dos animais dos respectivos grupos, foi novamente anestesiado, seguindo-se os mesmos passos acima descritos. O músculo doador foi retirado do freezer e deixado em temperatura ambiente, enquanto era realizada a lesão nervosa, seguida do imediato reparo secundário do nervo ciático direito. O material obtido do músculo sóleo foi dissecado sob lupa cirúrgica, a fim de se confeccionar um bloco retangular de aproximadamente 10 mm (1cm) de comprimento e espessura semelhante a do nervo ciático. Em seguida, o enxerto autólogo de músculo esquelético, já tratado com anestésico local, foi implantado, unindo os cotos do nervo ciático do respectivo animal.

Paralelamente, a cirurgia de implante na coxa direita foi realizada através de uma incisão de aproximadamente 15 mm na pele da região glútea, acompanhando o trajeto da projeção do nervo ciático na superfície. A partir daí, afastou-se os planos musculares até a observação e exposição do nervo ciático.

A uma distância padrão da borda inferior do músculo glúteo, o nervo ciático foi seccionado, utilizando-se uma tesoura microcirúrgica. Foi retirado um pequeno fragmento do nervo ciático para padronizar o tamanho da fenda em 1 cm para que o implante fosse exatamente do mesmo tamanho.

Nesse espaço, suturou-se o enxerto muscular com 2 pontos, através de sutura epineural em cada coto, utilizando fio monofilamento nylon 8-0 DERMALON, tomando-se o cuidado para que os cotos não ficassem sob tensão. Suturem-se os planos muscular e cutâneo com fio de algodão 4-0 ETHICON.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, com ração e água *ad libitum* até a próxima etapa (50 dias).

4.2 GRUPO III - Preparo Pré Implante

Os animais do Grupo III foram anestesiados da mesma forma dos grupos I e II. Realizou-se a tricotomia e assepsia do membro posterior direito do animal. Em seguida foi feita uma incisão de cerca de 10 mm de comprimento na região póstero- lateral do membro posterior do animal. Com seringa de 1 ml e agulha 13 x 4, foi injetado no músculo sóleo direito um volume de 0,1 ml de cloridrato de lidocaína (Xylocaína^R) a 2% - Merrel Lepetit. A seguir, a fenda cirúrgica foi suturada com 3 pontos de fio de algodão 4.0 ETHICON.

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

Passadas 24 horas da primeira cirurgia, foi realizado o auto-implante com enxerto de músculo esquelético. Para isso, o animal sofreu nova anestesia do mesmo modo descrito para os grupos I e II. A seguir, realizou-se a tricotomia da região posterior do membro posterior direito para exposição do músculo sóleo (já injetado com cloridrato de lidocaína a 2% há 24 horas).

Retirou-se o músculo sóleo para a confecção do enxerto autólogo para que posteriormente o mesmo fosse implantado no nervo ciático do membro posterior direito de cada animal, adotando procedimentos cirúrgicos idênticos aos descritos anteriormente (grupos I e II).

4.3 RETIRADA DO MATERIAL, LOCAL DE ANÁLISE E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Passados 50 dias da cirurgia, os animais dos grupos I, II e III foram anestesiados nas mesmas condições anteriores.

O nervo ciático direito de cada animal foi fixado *in situ* à 4°C, durante 15 minutos com fixador Karnovsky modificado, contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,3.

Os nervos ciáticos desses animais (grupos I, II e III) foram retirados e divididos em 2 porções para análise do material, sendo: 1) região do implante (IMP) e 2) região correspondente ao coto distal (CD). Tais regiões foram identificadas à partir dos pontos de sutura que permaneceram no local, desde a realização das cirurgias.

O sacrifício de cada animal foi realizado após a retirada dos fragmentos do nervo ciático através de super dosagem (overdose) da mesma anestesia. Em seguida foram encaminhados à incineração.

Os fragmentos do nervo ciático dos animais dos 3 grupos experimentais, foram mantidos em solução fixadora (Karnovsky) por 24 horas e pós fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.3, por 2 (duas) horas, imersos em uranila 5% durante 24 horas, desidratados em soluções crescentes (30% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (UEGAMA). A seguir foram levados a um ultramicrótomo (LKB, Bromma 8800), equipado com navalha de vidro, para a confecção dos cortes transversais semi- finos com 0,5 μ m de espessura. Estes foram corados com azul de toluidina a 1%, em solução aquosa de bórax a 1%, para microscopia fotônica.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A contagem do número de axônios mielínicos (NAM), foi diretamente realizada em um microscópio comum com objetiva de 40X , e com auxílio de um contador manual e de um retículo próprio compartimentado. Em seguida as lâminas foram fotografadas com auxílio de uma máquina fotográfica (NIKON) acoplada a um microscópio fotônico, em uma objetiva em imersão(100 X).

4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Foram mensuradas a espessura da bainha de mielina (EBM), diâmetro do axônio mielínico (DAM),o diâmetro da fibra mielínica (DFM). Por sua vez a “Razão G”(RG) foi calculada de acordo com a seguinte formula:

$$RG = DAM /DFM \text{ (EVANS \& MACKINONN, et al. 1999).}$$

A mensuração foi realizada com o auxílio de um microcomputador de 166 Mhz, 27 MB de RAM com monitor “KONTRON ELECTRONIK” de 16 polegadas, 32 bit, acoplado a um microscópio “AXIOLAB-ZEISS” e adaptador de câmera colorido “SONY, CMA-D₂ – Hyper Had CCD-IRIS/RGB”, conjugado ao software “KS 400, 2.0” e programa “Macro.mcr”. Este procedimento foi efetuado no departamento de Morfologia da FOP (Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP) no setor de microscopia especial. As medidas foram aferidas em imersão com uma objetiva em imersão (100X).

5. RESULTADOS

5.1 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

A microscopia óptica, mostra a estrutura morfológica preservada dos axônios regenerados dos três grupos experimentais, nas regiões referentes ao auto-implante (IMP) e coto distal (CD)- Figuras “1, 2 e 3 (A, B)”.

5.2 POPULAÇÃO AXONAL

No grupo I (- 4°C) o número médio de axônios mielínicos (NAM) na região do implante foi de 6659 axônios, enquanto no coto distal essa média foi de 8982 axônios. No grupo II (- 40°C) o NAM na região do implante foi de 8100 axônios, enquanto no coto distal essa média foi de 7250 axônios. No grupo III (Controle) o NAM na região do implante foi de 6524 axônios, enquanto no coto distal essa média foi de 6870 axônios (Tabela 1).

A população axonal média regenerada, tanto para o implante (IMP), como para o coto distal (CD), não apresentou diferença significativa entre os 3 grupos experimentais (Figuras 4 e 5).

5.3 MORFOMETRIA

5.3.1 Espessura da Bainha de Mielina

O valor médio da EBM foi: grupo I (-4°C) 0,74 μm na região do implante e de 0,92 μm no coto distal, no grupo II (- 40°C) 0,76 μm na região do implante e de 0,92 μm no coto distal, enquanto no grupo III (Controle) 0,87 μm na região do implante e de 1,00 μm no coto distal. (Tabela 2)

Estatisticamente, o valor médio da EBM na região do implante, diferiu significativamente nos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado(- 4°C e - 40°C), quando comparados ao grupo controle (não estocado), entretanto os dois primeiros não diferem significativamente entre si (Figuras 6 e 7). Contudo, no coto distal os valores da EBM não diferem significativamente entre os três grupos experimentais. (Figura 8).

5.3.2 Diâmetro da Fibra Mielínica

O valor médio dos Diâmetro das Fibras Mielínicas (DFM) nos grupos I, II e III, foi: grupo I (-4°C) na região do implante 4,41 μm , e no coto distal 4,37 μm , no grupo II (- 40°C) na região do implante foi de 4,15 μm , e no coto distal foi de 3,81 μm e, no grupo III (Controle) a média na região do implante foi de 4,68 μm , no coto distal foi de 4,50 μm (Tabela 3).

Estatisticamente, o valor médio da DFM na região do implante, não difere significativamente nos três grupos experimentais (Figura 9). Entretanto, no coto distal, nos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado a - 4°C, o DFM difere significativamente daqueles criopreservados a - 40°C, no entanto, o primeiro não difere significativamente do grupo controle (Figuras 10 e 11).

5.3.3 Diâmetro dos Axônios Mielínicos

O valor médio do Diâmetro dos Axônios Mielínicos (DAM) dos grupos I, II e III, foi: grupo I (-4°C) a média na região do implante foi de 2,93 μm e no coto distal foi de 2,51 μm , no grupo II (- 40°C) a média na região do implante foi de 2,63 μm e no coto distal foi de 1,97 μm e, no grupo III (Controle) a média na região do implante foi de 2,94 μm e no coto distal foi de 2,50 μm (Tabela 4).

Estatisticamente, o valor médio da DAM na região do implante, não difere significativamente nos três grupos experimentais (Figura 12). Entretanto, no coto distal, nos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado a - 4°C, o DAM difere significativamente daqueles criopreservados a - 40°C, no entanto, o primeiro não difere significativamente do grupo controle (Figuras 13 e 14).

5.3.4 Razão G

O valor médio da "Razão G" (RG) de cada grupo experimental foi calculado e apresentou-se da seguinte forma: grupo I (- 4°C) a média na região do implante foi de 0,66, no coto distal foi de 0,58, no grupo II (- 40°C) a média na região do implante foi de 0,63, no coto distal foi de 0,52 ,e no grupo III (Controle) a média na região do implante foi de 0,63, no coto distal foi de 0,55 (Tabela 5).

Estatisticamente, a RG na região do implante, nos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado a - 4°C, difere significativamente da RG

daqueles criopreservados a -40°C e da RG do grupo controle(não estocado), sendo que os dois últimos não diferem significativamente entre si (Figuras 15 e 16). No coto distal, o valor médio da RG, nos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado a -4°C , difere significativamente da RG daqueles criopreservados a -40°C , sendo que ambos não diferem significativamente do grupo controle (Figuras 17 e 18).

6. DISCUSSÃO

A idéia de se empregar auto-enxerto de músculo esquelético criopreservado na reparação nervosa periférica, baseia-se principalmente no sucesso dos aloenxertos de nervos criopreservados. Considerou-se também a possibilidade efetiva do uso de xenoenxertos nervosos para esse fim (FANSA, et al., 1999 ; KOHAMA, et al. 2001). Em última instância, visou-se a criação de uma fonte de músculo esquelético, que armazenado em baixas temperaturas pudesse ser empregado para esse fim. De fato, diversos experimentos e ensaios clínicos têm demonstrado o potencial do uso da criopreservação. Cite-se como exemplo os trabalhos de HIRASÉ, et al.(1992) ; ZALEWSKI, et al.(1993) ; ZHANG, et al.(1998) ; MATSUYAMA, et al. (2000) ; MACKINNON, et al. (2001) ; GRAND, et al. (2002).

O armazenamento de nervos em diferentes temperaturas, não altera morfológicamente estruturas que atuam na regeneração axonal, tais como as células de Schwann, os tubos da lâmina basal e o perineuro (EVANS et al.,1995 ; FANSA et al., 2000). No presente trabalho, não examinamos o aspecto molecular da lâmina basal do enxerto antes do seu implante, contudo os resultados histológicos e da população axonal, sugerem que a criopreservação a -4°C e a -40°C não altera a membrana basal muscular, de modo a comprometer a regeneração axonal. Tem-se observado também que a viabilidade das células do enxerto diminui à medida em que se aumenta o tempo de estocagem, e conseqüentemente o sucesso da regeneração axonal, é inversamente proporcional ao tempo de estocagem. No caso dos auto-transplantes de nervo, o período de estocagem de 3 semanas tem sido considerado satisfatório para regeneração nervosa. A partir dele, as células responsáveis pelo início da degeneração Waleriana, tais como macrófagos e neutrófilos, tornam-se gradativamente inviáveis (EVANS, et al. ,1998).

Não há na literatura, trabalhos referentes à criopreservação de auto-enxertos de músculo esquelético. Por outro lado a possibilidade de criopreservação de aloenxerto de

nervo tem sido intensamente estudada. Para efeito de comparação, adotamos o tempo de 3 semanas como tempo padrão de armazenamento, tal como sugeriram EVANS, et al. (1998). Por sua vez, a escolha da temperatura de estocagem dos auto-enxertos, deveu-se ao fato de que tais temperaturas (- 4 °C e - 40 °C), podem ser reproduzidas com relativa facilidade no ambiente hospitalar e cirúrgico.

Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa na população de axônios mielínicos regenerados, quando a reparação nervosa é feita através de músculo esquelético criopreservado a - 4°C ou a - 40°C. Também não se observou diferença entre o número de axônios regenerados através dos auto-enxertos criopreservados e do grupo controle (músculo fresco). Esses achados são relevantes sob o ponto de vista prático. Pelo menos para armazenamento por 3 semanas, a utilização de enxertos de músculo esquelético criopreservados na temperatura de - 4°C, é extremamente acessível, já que requer apenas um refrigerador doméstico.

Na presente obra, utilizamos enxerto autólogo de músculo esquelético, entretanto, nossas observações estão em desacordo com as observações de regeneração axonal em aloenxertos nervosos criopreservados (HIRASÉ et al., 1992 ; ZALEWSKI et al., 1993 ; EVANS, et al. ,1998 ; FANSA et al., 2000). Nestes, relata-se que a regeneração axonal em aloenxertos criopreservados é prejudicada quando comparada ao uso de aloenxerto de nervo fresco.

As razões para tais diferenças de nossos achados não estão claras, contudo três explicações poderiam ser usadas. A primeira, refere-se aos diferentes tempos de armazenamento. Enquanto no presente trabalho, o tempo de estocagem foi de 3 semanas, EVANS, et al. (1998) armazenaram o enxerto por um período, variando entre 1 e 26 semanas. A segunda, seria devido a baixa temperatura de estocagem. Tem-se

admitido que a criopreservação por longo tempo, inativa as células do enxerto nervoso, que são responsáveis pela remoção dos restos de mielina. Assim sendo, a permanência dos restos de mielina, ofereceria uma obstrução à passagem dos brotos axonais através do enxerto, dificultando a regeneração nervosa. A terceira e mais provável razão, seria que nos trabalhos de ZALEWSKI et al. (1993), EVANS, et al. (1998) e FANSA et al., (2000), a presença de resposta imune (aloenxerto de nervos), implicaria em prejuízo para a regeneração axonal. Fato este que certamente não ocorreu no presente trabalho, por utilizarmos auto- enxerto de músculo esquelético.

O grau de mielinização (EBM) em axônios regenerados apresenta-se menor em enxertos de nervos congelados, quando comparados aos não congelados, (EVANS, et al. 1998 ; FANSA et al. 2000). Nossos resultados, mostram que a espessura da bainha de mielina, também é menor nos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado, comparado ao grupo controle (não congelado), ao nível do implante. É possível que isso deva-se ao fato do auto-enxerto de músculo esquelético fresco, ter sido implantado 24 horas após injeção do anestésico local. Assim sendo, células do infiltrado inflamatório agudo, presentes no enxerto muscular, como: macrófagos residentes e neutrófilos, transplantadas junto ao mesmo, atuariam como fatores quimiotáticos (FAWCETT & KEYNES, 1986), favorecendo a remoção dos restos necróticos do sarcoplasma, e conseqüentemente um melhor ambiente para o crescimento axonal. Por outro lado, isso não ocorreria nos auto- enxertos criopreservados(- 4°C e - 40°C), pois após a estocagem de 3 semanas em baixas temperaturas, as células fagocitárias do auto-enxerto encontrariam-se mortas, ineficazes para a remoção de possíveis restos sarcoplasmáticos.

No que diz respeito ao coto distal, a EBM dos três grupos experimentais não apresentou diferenças significativas entre si. Este resultado, na verdade, não foi

surpreendente. Sabe-se que, após a secção nervosa, ocorre degeneração axonal e da bainha de mielina no coto distal, mas a lâmina basal das células de Schwann permanece inalterada. Considerando este fato, não haveria razões para que houvesse diferença no valor médio da EBM entre os 3 grupos experimentais no coto distal.

No que se refere ao diâmetro dos axônios mielínicos regenerados (DAM), observamos que na região do implante, não houve diferença significativa entre os três grupos experimentais. Entretanto, no coto distal, observou-se um maior DAM no grupo controle (não estocado) e nos axônios mielínicos regenerados, através de músculo esquelético criopreservado a -4°C , apresentando diferença significativa, quando comparados àquele criopreservado a -40°C . As razões para explicar o ocorrido, não estão claras. Resultados semelhantes também ocorreram no trabalho de EVANS et al., (1999), em axônios regenerados através de aloenxertos de nervo preservados a 5°C , os quais apresentaram menor DAM, e conseqüentemente um menor DFM, comparados aos axônios regenerados através de nervo não estocado. Os mesmos atribuíram o fato a um atraso na regeneração dos aloenxertos de nervo estocados, em decorrência da dificultosa revascularização destes enxertos, e ainda à falta de fatores neurotróficos, o que não seria favorável ao crescimento axonal.

Nossos resultados mostram que o DFM na região do implante não apresentou diferenças significativas entre os três grupos experimentais. No coto distal o DFM dos axônios regenerados através de músculo esquelético criopreservado a -40°C foi significativamente menor, comparados àqueles criopreservados a -4°C e grupo controle (não estocado). Os resultados do coto distal, refletem as mesmas diferenças encontradas no que se refere ao DAM e EBM do grupo II, (criopreservado a -40°C), já que o $\text{DFM} = \text{EBM} + \text{DAM}$. Conseqüentemente, a explicação do fato ocorrido, depende de estudos mais aprofundados dos fenômenos envolvidos na criopreservação a -40°C e seu efeito

sobre o músculo esquelético, investigando as hipóteses de alguns autores (EVANS et al.,1999; FANSA et al.,2000), os quais sugerem dificuldade na revascularização dos enxertos criopreservados, e ainda falta de fatores tróficos para a regeneração axonal através desses enxertos.

O quociente DAM/DFM, é denominado razão G (RG). Dentre os parâmetros morfológicos avaliados no processo regenerativo, a RG representa um parâmetro de importante significado morfofuncional, já que indica a condição da condutibilidade do impulso elétrico do nervo (KANDEL et al.,1991). Para o nervo ciático normal, sabe-se que a RG varia entre 0,6 e 0,7 (LAWSON & GLASBY, 1995; FANSA et al., 2000), os quais comparados aos grupos de enxertos congelados (entre 0,7 e 0,75), não apresentaram diferenças significativas. Segundo FAHRENKAMP & FRIEDE (1987), considera-se que as condições da transmissão do impulso nervoso são otimizadas, se o valor da RG se mantiver perto da média de 0,7 (RUSHTON, 1951 ; BRILL, et al., 1977).

No presente estudo, na região do implante a RG do grupo I (- 4°C) foi de 0,66, diferindo significativamente dos demais grupos (- 40°C e controle), os quais apresentaram RG de 0,63, e portanto, não diferem entre si. No coto distal (maior EBM), o grupo I (- 4°C) apresentou RG de 0,58, que em análise estatística difere significativamente grupo II (- 40°C), no qual a RG é de 0,52. No entanto, o grupo controle (RG = 0,55) não difere significativamente dos demais. Portanto, considerando-se que a transmissão do impulso nervoso normal requer uma RG ao redor de 0,6 e 0,7 (FANSA et al., 2000), esses resultados sugerem que a transmissão do impulso nervoso nos axônios regenerados é satisfatória nos 3 grupos experimentais.

A literatura mostra que o armazenamento de nervos pode ser uma conduta interessante, que clinicamente ainda não foi totalmente explorada (FANSA et al., 2000).

A estocagem de enxertos musculares, evitaria o sacrifício do nervo doador, além disso, facilitaria o transporte entre centros médicos, na realização de operações urgentes. A proposta do presente trabalho de estocar músculo esquelético congelado, baseou-se na idéia de se viabilizar um banco de auto-enxerto de músculo esquelético, que pudesse ser eficaz na reparação da lesão nervosa periférica, já que a retirada do músculo esquelético acarreta em menor prejuízo ao paciente, devido a sua alta capacidade de regeneração.

Considera-se também a futura possibilidade de desenvolver enxertos implantados entre seres da mesma espécie (“allografts”) ou ainda, a longo prazo, com o aperfeiçoamento dos estudos em regeneração nervosa, desenvolver enxertos que possam ser implantados em seres de espécies distintas (“xenografts”) minimizando os riscos de rejeição, ampliando os recursos disponíveis na área.

7. CONCLUSÕES

A criopreservação de enxerto autólogo de músculo- esquelético, tratado com injeção de cloridrato de lidocaína a 2 %, estocado em congelador por 3 semanas nas temperaturas de -4°C e -40°C , permite regeneração axonal no nervo ciático de ratos. Isto mostra o potencial da utilização desse tipo de enxerto, no reparo da lesão nervosa.

Os axônios regenerados dos auto-enxertos criopreservados a -40°C , mostraram resultados mais satisfatórios (RG) para a regeneração nervosa periférica, comparados àqueles dos auto-enxertos criopreservados a -4°C .

8. FIGURAS E TABELAS

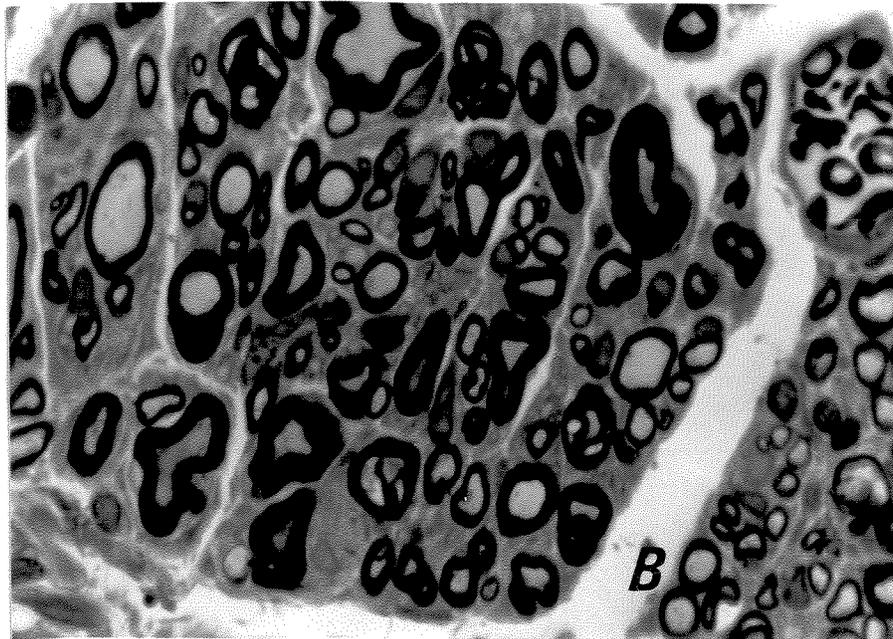
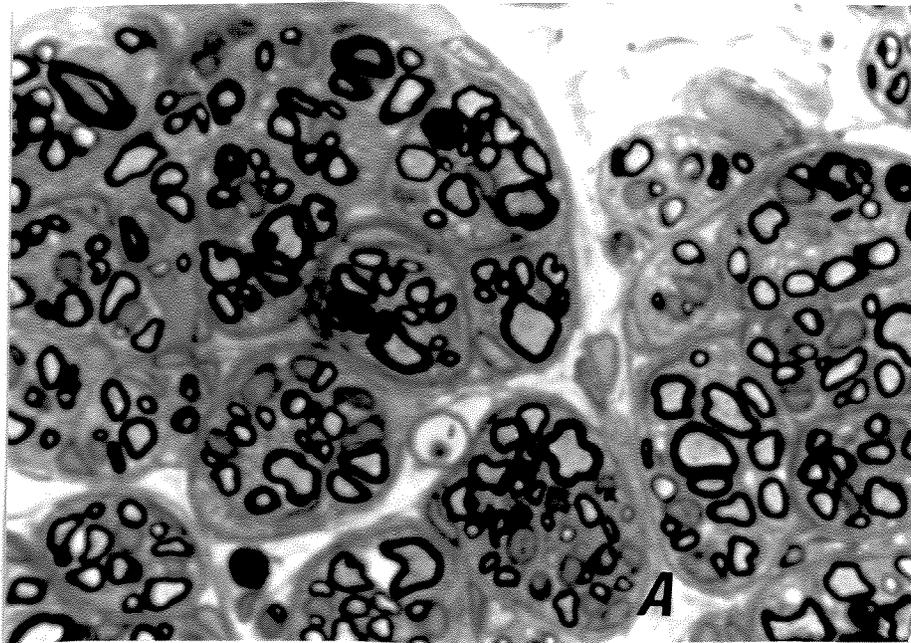


Figura 1.(A) Axônios mielínicos regenerados na região do implante do grupo I (- 4°C). (B) Axônios mielínicos regenerados no coto distal do grupo I (- 4°C). Aumento = 450X.

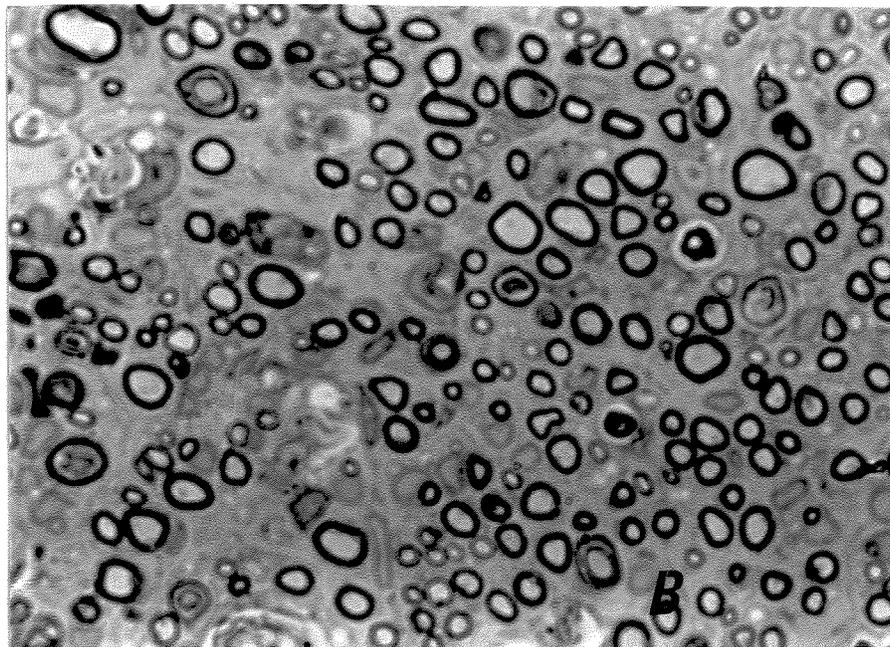
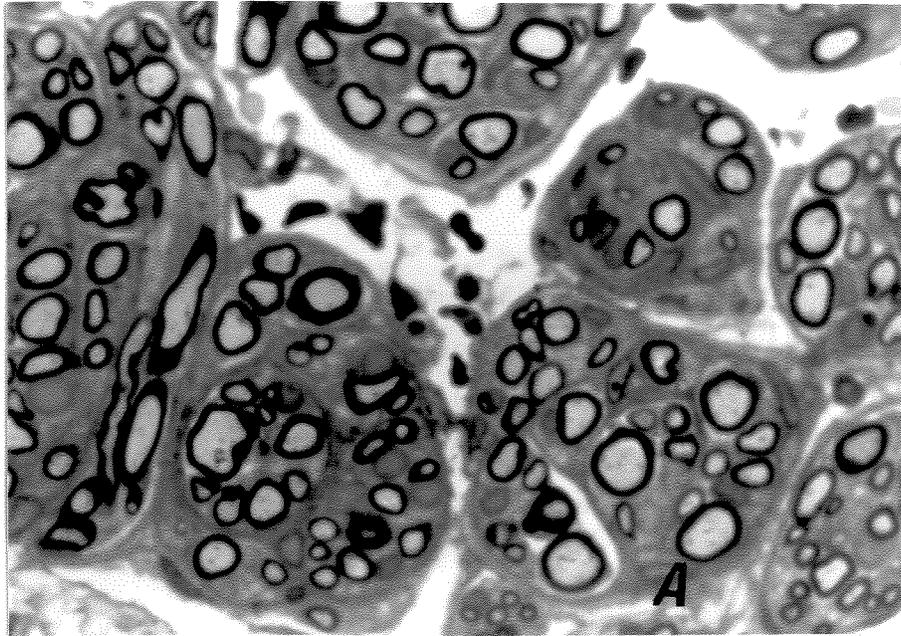


Figura 2. (A) Axônios mielínicos regenerados, na região do implante do grupo II (-40°C). (B) Axônios mielínicos regenerados no coto distal do grupo II (-40°C). Aumento = 450X.

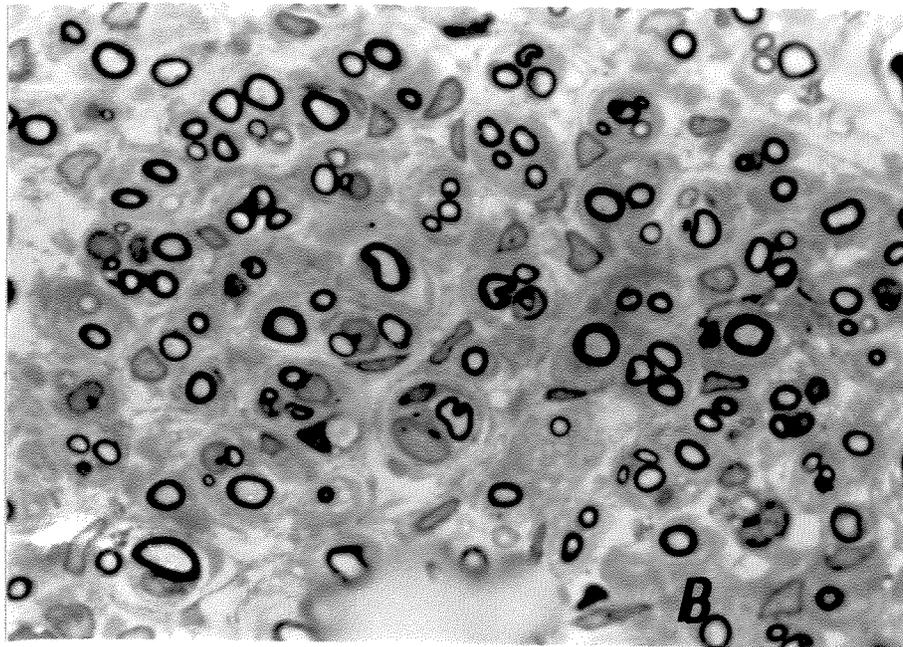
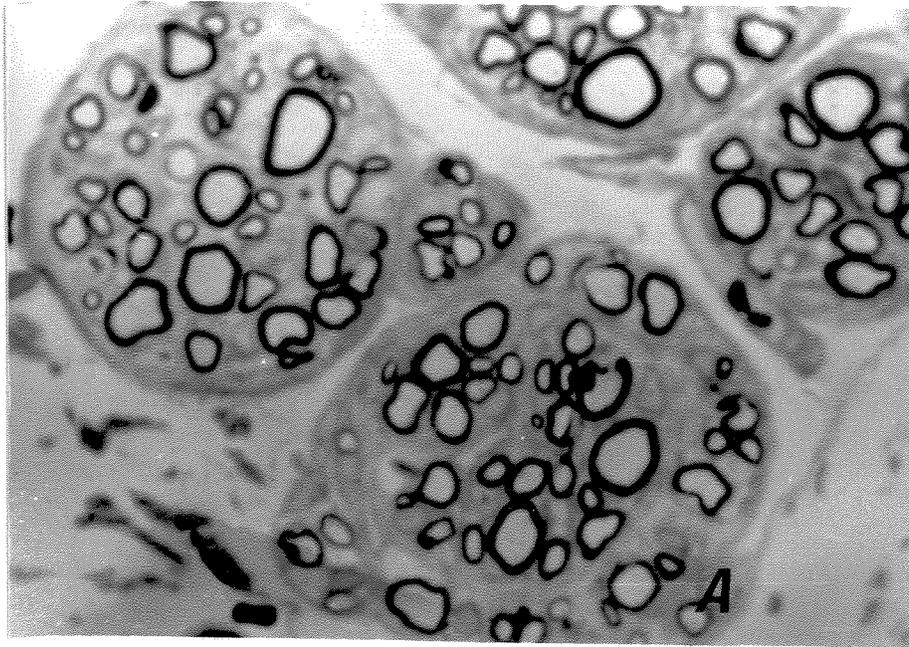


Figura 3. (A) Axônios mielínicos regenerados, na região do implante do grupo controle (não estocado). (B) Axônios mielínicos regenerados no coto distal do grupo controle (não estocado). Aumento = 450 X.

N=7	GRUPO I (-4°C, n=7)	GRUPO II (-40°C, n=7)	GRUPO III (24 hs, n=7)
IMP	6659 ± 2079	8100 ± 2079	6524 ± 2079
CD	8982 ± 1886	7250 ± 1886	6870 ± 1886

Tabela 1. Número médio de axônios mielínicos dos 3 grupos experimentais na região do implante(IMP) e coto distal(CD), após 50 dias do auto-implante de músculo esquelético.

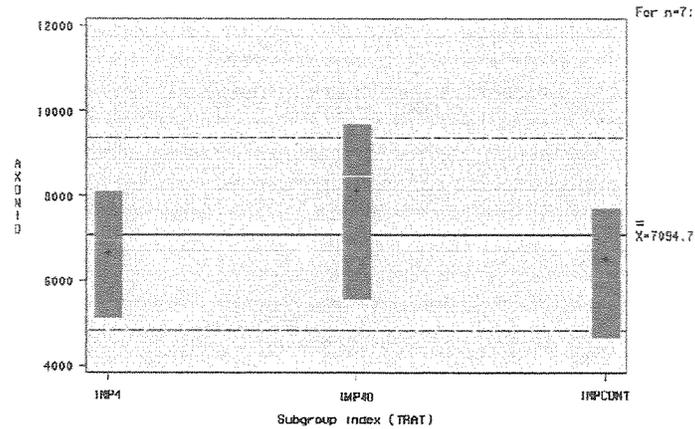


Figura 04. Número médio de axônios mielínicos no grupo I, - 4°C (IMP4) , grupo II, - 40°C (IMP40) e do grupo controle (IMPCONT), na região do implante.

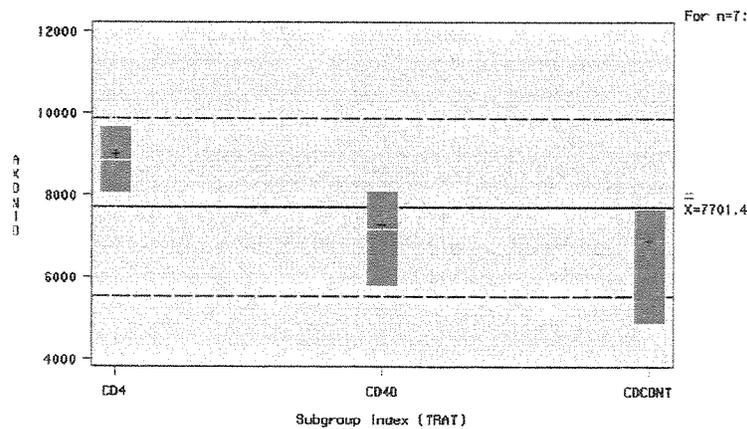


Figura 05. Número médio de axônios mielínicos no grupo I, - 4°C (CD4) , grupo II, - 40°C (CD40) e do grupo controle (CDCONT), na região do coto distal.

N=5	GRUPO I (-4°C, n=7)	GRUPO II (-40°C, n=7)	GRUPO III (24 hs, n=7)
EBM (IMP)	0,74 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,87 ± 0,03
EBM (CD)	0,92 ± 0,12	0,92 ± 0,07	1,00 ± 0,06

Tabela 2. Espessura média da bainha de mielina (EBM) nos 3 grupos experimentais.

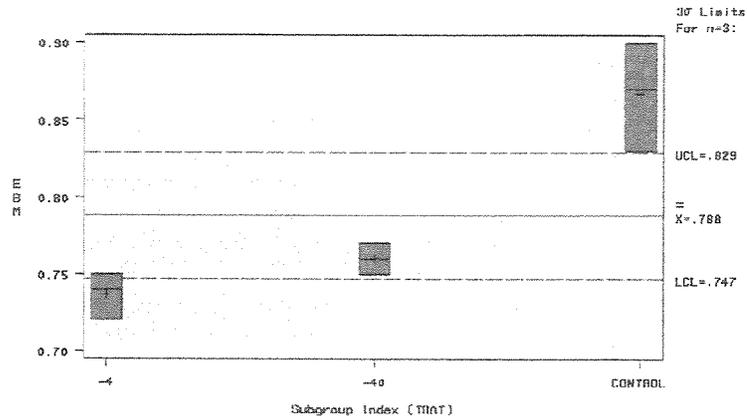


Figura 06. Espessura média da bainha de mielina (EBM), em micrômetros, no grupo I, - 4°C, n=5 , grupo II, - 40°C, n=5 e grupo III (Controle), na região do implante.

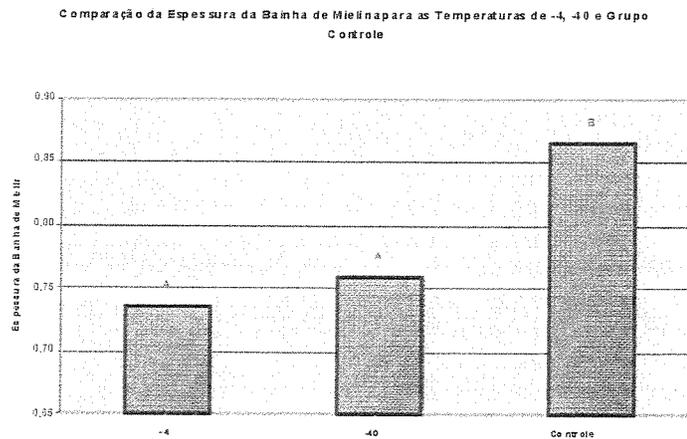


Figura 07. Espessura da bainha de mielina (EBM) dos grupos experimentais, dada em micrômetros, na região do implante. Não há diferenças significativas entre os grupos - 4°C e - 40°C, no entanto ambos diferem do grupo controle.

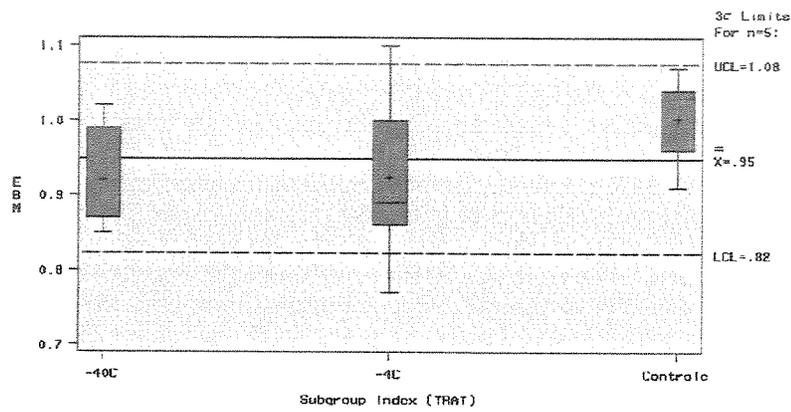


Figura 08. Espessura média da bainha de mielina(EBM), em micrômetros, no grupo I, -4°C, n=5 , grupo II, - 40°C, n=5 e grupo III (Controle), no coto distal.

N=5	GRUPO I (-4°C, n=7)	GRUPO II (-40°C, n=7)	GRUPO III (24 hs, n=7)
DFM (IMP)	4,41 ± 0,01	4,15 ± 0,04	4,68 ± 0,38
DFM (CD)	4,37 ± 0,27	3,81 ± 0,21	4,50 ± 0,36

Tabela 3. Diâmetro médio das fibras mielínicas (DFM) nos 3 grupos experimentais.

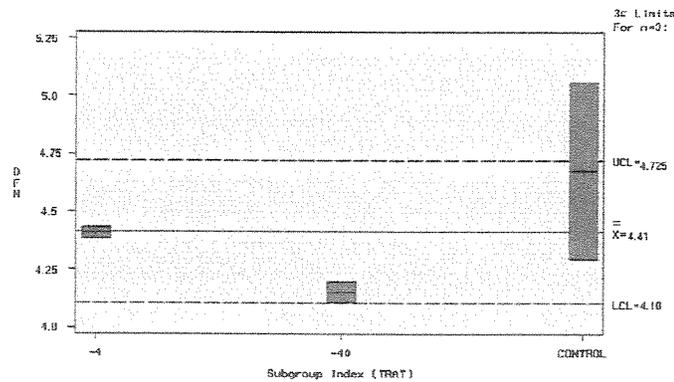


Figura 09. Diâmetro médio da fibra mielínica(DFM), em micrômetros, no grupo I, -4°C, n=5, grupo II, -40°C, n=5 e grupo III (Controle), na região do implante.

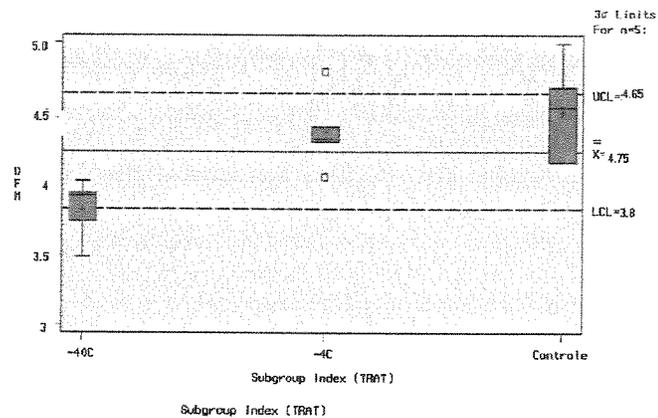


Figura 10. Diâmetro médio da fibra mielínica(DFM), em micrômetros, no grupo I, -4°C, n=5, grupo II, -40°C, n=5 e grupo III (Controle), no coto distal.

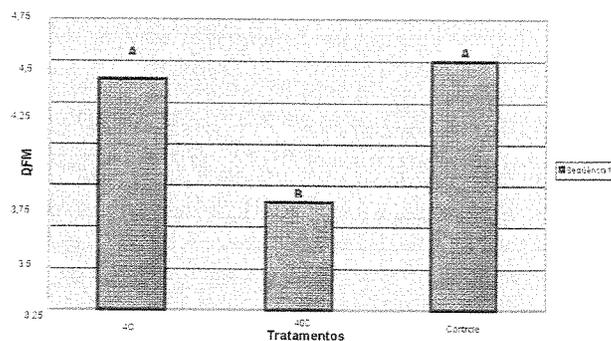


Figura 11. Diâmetro das fibras mielínicas (DFM) dos grupos experimentais, dado em micrômetros, no coto distal. Não há diferenças significativas entre os grupos -4°C(4C) e grupo Controle, no entanto ambos diferem do grupo II (40C).

N=5	GRUPO I (-4°C, n=7)	GRUPO II (-40°C, n=7)	GRUPO III (24 hs, n=7)
DAM (IMP)	2,93 ± 0,01	2,63 ± 0,02	2,94 ± 0,31
DAM (CD)	2,51 ± 0,13	1,97 ± 0,14	2,50 ± 0,23

Tabela 4. Diâmetro médio dos axônios mielínicos (DAM) nos 3 grupos experimentais.

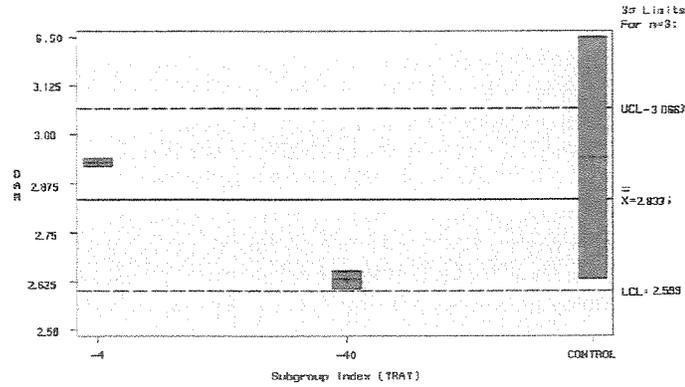


Figura 12. Diâmetro médio dos axônios mielínicos (DAM), em micrômetros, no grupo I, -4°C, n=5, grupo II, -40°C, n=5 e grupo III (Controle), na região do implante.

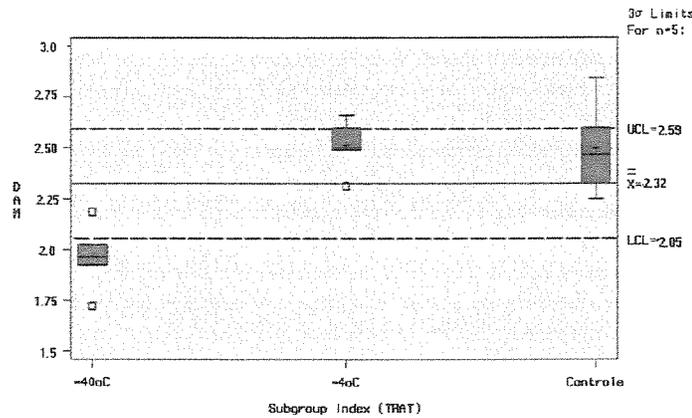


Figura 13. Diâmetro médio dos axônios mielínicos (DAM), em micrômetros, no grupo I, -4°C, n=5, grupo II, -40°C, n=5 e grupo III (Controle), no coto distal.

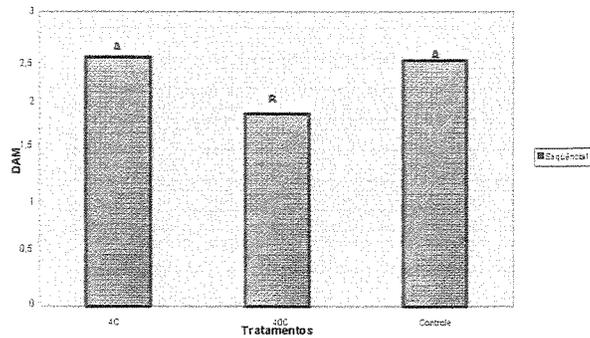


Figura 14. Diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) dos grupos experimentais, dado em micrômetros, no coto distal. Não há diferenças significativas entre os grupos I (4C) e grupo Controle, no entanto ambos diferem do grupo II (40C).

N=5	GRUPO I (-4°C, n=7)	GRUPO II (-40°C, n=7)	GRUPO III (24 hs, n=7)
RG (IMP)	0,66 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,63 ± 0,02
RG (CD)	0,58 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,55 ± 0,01

Tabela 5. Razão G(RG) dos axônios mielínicos regenerados nos 3 grupos experimentais.

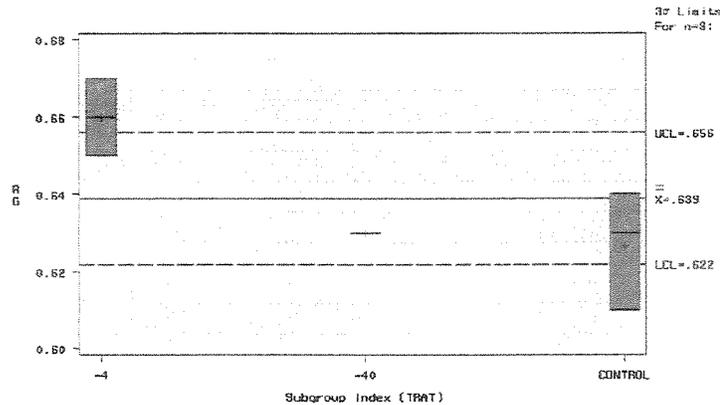


Figura 15. Valor médio da Razão G (RG), no grupo I, -4°C, n=5, grupo II, - 40°C, n=5 e grupo III (Controle), na região do implante.

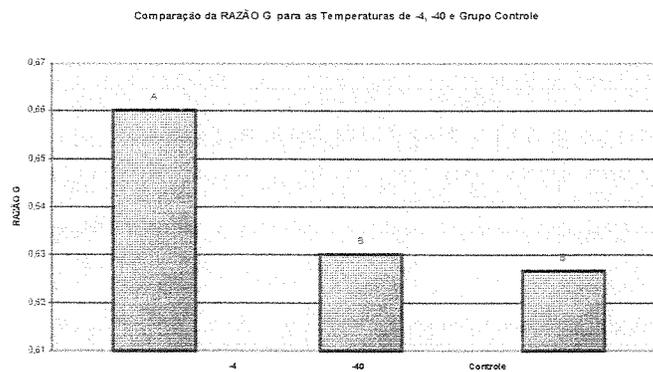


Figura 16. Razão G (RG) dos grupos experimentais, na região do implante. Não há diferenças significativas entre os grupos Controle e - 40°C, no entanto ambos diferem do grupo I (- 4°C).

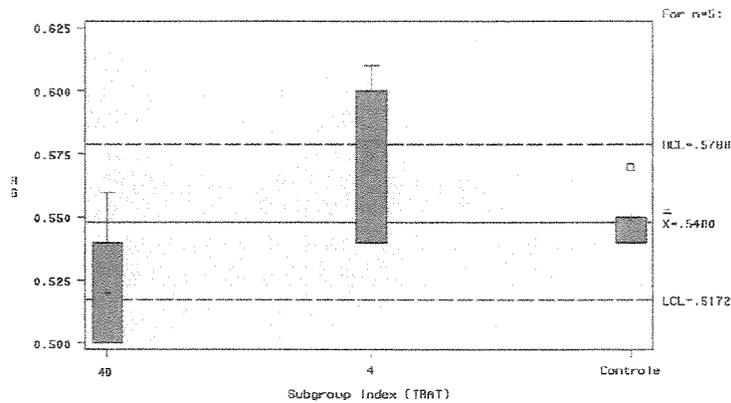


Figura 17. Valor médio da Razão G (RG), no grupo I, -4°C , $n=5$ (4), grupo II, -40°C , $n=5$ (40) e grupo III (Controle), no coto distal.

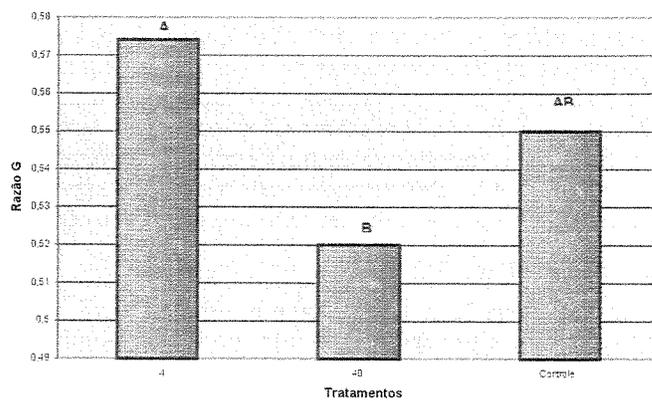


Figura 18. Razão G (RG) dos grupos experimentais, no coto distal. Nota-se que quando tratada a -4°C (4) a Razão G difere significativamente de quando tratada a -40°C (40), entretanto a Razão G do grupo controle (Controle) não difere significativamente dos demais (4 e 40).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRILL, M.; WAXMANN, S.G.; MOORE, J.W.; JOYNER, R.W. Conduction velocity and spike configuration in myelinated fibres computed dependence on internode distance. *J Neurol Neuros Psychiat*, 40: 769-774, 1977.
2. CARPENTER, M. B. **Human Neuroanatomy**, 7ed. New York: Interamericana, 1988. 700p
3. DA SILVA, C.F.; LANGONE, F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prothesis increases sensory neuron regeneration in vivo. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, 22(6):691-694, 1989.
4. -----; SIDMAN, R.L.; DIKKES, P. Laminin gel stimulates axonal regeneration in vivo. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 10:85-91, 1984.
5. DEN DUNNEN, W.F.A.; VAN DER LEI, B.; SCHAKENRAAD, J.M.; BLAAUW, E.H.; STOKROOS, I.; PENNING, A.J.; ROBINSON, P.H. Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide. *Microsurgery*, 14(8): 508-515, 1993.
6. EVANS, P.; MACKINNON, S.E.; LEVI, A.D.O.; WADE, J.A.; HUNTER, D.A.; NAKAO, Y. MIDHA, R. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity and regeneration. *Muscle & Nerve*, 21: 1507-1522, 1998.
7. -----; MACKINNON, S.E.; BEST, J.T.; WADE, J.A.; AWERBUCK, D.C.; MACKINO, A.P.; HUNTER, D.A.; MIDHA, R. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle & Nerve*, 18: 1128-1138, 1995.
8. -----; MACKINNON, S.E.; BEST, J.T.; WADE, J.A.; NAKAO, Y.; HARE, G.M.T.; HUNTER, D.A.; MIDHA, R. Regeneration across cold preserved

- peripheral nerve allografts. **Microsurgery**, 19: 115-127, 1999.
9. FAHRENKAMP, I.; FRIEDE, R.L. Characteristic variations of relative myelin sheath thickness in 11 nerves of rat. **Anat Embryol.**, 177: 115-121, 1987.
 10. FANSA, H.; LASSNER, F.; KOOK, P.H.; KEILHOFF, G.; WOLF, G.; SCHNEIDER, W. Cryopreservation of peripheral nerve grafts. **Muscle & Nerve**, 23: 1227-1233, 2000.
 11. FANSA, H.; KEILHOFF, G.; HORN, T.; ALTMANN, S.; WOLF, G.; SCHNEIDER, W. Stimulation of Schwann cells growth and axon regeneration of peripheral nerves by the immunosuppressive drug FK 506. **Handch.Mikroch. Plast.Chir.**, 31(5): 323-9, Sept. 1999.
 12. FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Muscle basal lamina: A new graft material for peripheral nerve repair. **J.Neurosurg.**, 65(3):354-363, 1986.
 13. FIELDS, R.D.; ELLISMAN, M. H. Axons regenerated through silicone tube splices: functional morphology. **Exp. Neurol.**, 92(1): 61-74, 1986.
 14. GEUNA, S.; TOS, P.; BATTISTON, B.; GUGLIELMONE, R.; GIACOBINE-R., M. Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle **Anat Embriol.**, 12:082(1-8), 2000.
 15. GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: Developing a new method of nerve repair. **Clinical Anatomy**, 3: 161-182, 1990.
 16. GLASBY, M.A.; HITCHCOCK, R.J.I.; HUANG, C.L-H. Comparison of nerve regeneration through nerve and muscle grafts in rat sciatic nerve. **Neuro-Orthopaedics**, 2:21-28, 1986c.

17. -----; GSCHMEISSNER, S.E.; HITCHCOCK, R.J.I.; HUANG, C.L-H
Dependence of nerve regeneration through muscle grafts on the availability
and orientation of basement membrane in rats. **J.Neurocytol.**, 15(4), p. 497-
510, Aug. 1986b.
18. -----; GSCHMEISSNER, S.E.; HITCHCOCK, R.J.I.; HUANG, C.L-H
Effect of muscle basement membrane on regeneration of rat sciatic nerve.
J. Bone Jt. Surg., 68(5): 829-833, 1986a.
19. GRAND, A.G.; MYCKATYN, T.M.; MACKINNON,S.E.; HUNTER, D.A.
Axonal regeneration after cold preservation of nerve allografts and
immunosuppression with tacrolimus in mice. **J. Neurosurgery**,
96(5): 924-932, 2002.
20. GSCHMEISSNER , S.E.; GATTUSO, J.M.; GLASBY,M.A. Morpholgy of
nerve fibers regenerating through freeze-thawed autogenous sketetal muscle
grafts in rats. **Clinical Anatomy**, 3: 107-119, 1990.
21. GUTMANN, E.; SANDERS F.K. Recovery of fibre numbers and diameters in
the regeneration of peripheral nerves. **J. Physiol.**, 101: 489-518,
1943.
22. HALL, S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. **J. Anat**,
190(1): 57-71, 1997.
23. -----. Nerve Repair: a Neurobiologist's view. **J.Hand Surg.**, 26(2)
:129-36, 2001.
24. HALL, S.M.; ENVER, K. Axonal regeneration through heat pretreated muscle
autografts. **J. Hand Surg**, 19B(4): 444-451, 1994.

25. HALL, Z.W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell.(72/Neuron)*, 10(suppl): 99-121, 1993.
26. HIRASÉ, Y.; KOJIMA, T.; UCHIDA M.; TAKEISHI, M. Cryopreserved allogenic vessel and nerve grafts: hind- limb replantation model in the rat. *J Reconstr Microsurg*, 8: 437-443, 1992.
27. HOGAN, Q.; DOTSON, R.; ERICKSON, S.; KETTLER, R.; HOGAN, K. Local anesthetic myotoxicity: a case and review. *Anesthesiol.*, 80(4): 942-947, 1994.
28. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL T.M. *Principles of Neural Science*. New York: Elsevier, 1991. 510p
29. KEYNES, R.J.; HOPKINS, W.G.; HUANG, C.L-H. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane. *Brain. Res.*, 295(2): 275-281, 1984.
30. KOHAMA, I.; LANKFORD, K.L.; PREININGEROVA, J.; WHITE, F.A. ; VOLMER, T.L.; KOCSIS, J.D. Transplantation of cryopreserved adult human Schwann cells enhances axonal conduction in demyelinated spinal cord. *J. Neurosc*, 21(3): 944-950, 2001.
31. 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 Surg*, 5: 663-700, 1995.
32. LENIHAN, D.V.; CARTER, A.J.; GLASBY, M.A. An electrophysiological and morphological comparison of the microwave muscle graft and the freeze-thawed muscle graft. *Brit J Plast Surg*, 51: 300-306, 1998a.

33. -----; CARTER, A.J.; GILCHRIST, T.; HEALY, D.M.; MILLER, I.A.; MYLES, L.M.; GLASBY, M.A. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. **J. Had Surg.[Br]**, 23(5): 588-593, 1998b.
34. LUNDBORG, G. Nerve Regeneration and Repair. **Acta Orthop. Scand.**, 58: 145-169, 1987.
35. -----; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: ~~Growth across a six-millimeter gap~~. **J. Neuropath.Exp. Neurol.**, 41(4): 412-422, 1982.
36. MACKINNON, S.E.; DELLON, A. L. A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (Collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. **J. Reconstr. Microsurg.**, 6(2): 117-121, 1990.
37. MACKINNON, S.E.; DOOLABH, V.B.; NOVAK, C.B.; TRULOCK, E.P. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. **Plast.Reconst. Surgery**, 107(6): 1419-1429, 2001.
38. MADISON, R.D.; DA SILVA, C.F.; DIKKES, P. Entubation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. **Brain Res.**, 447(2): 325-334, 1988.
39. -----; DA SILVA, C.F.; DIKKES, P.; CHIU, T.H.; SIDMAN, R.L. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and laminin containing gel. **Expl. Neurol.**, 88(3): 767-772, 1985.

40. -----.; SIDMAN, R.L.; NYILAS, E.; CHIU, T.H.; GREATOR, D. Nontoxic nerve guide tubes support neovascular growth in transected rat optic nerve. **Expl. Neurol.**, 86(3): 448-461, 1984.
41. MARQUES, M.J. **Estudo Ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares.** São Paulo, 1992, 139p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
42. MATSUYAMA, T.; MIDHA, R.; MACKINNON, S.E.; MUNRO, C.A.; WONG, P.Y.; ANG, L.C. Long nerve allografts in sheep with ciclosporin A immunosuppression. **J.Reconst.Microsurgery**, 16(3): 219-225, 2000.
43. MEYER, M.; MATSUOKA, I.; WETMORE, C.; OLSON, L.; 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.**, 119(1) : 45-54, 1992.
44. MONTES, G.S.; COTTA, P.; JUNQUEIRA, L.C.U. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. **Cell Neurobiol.**, 5:177-218, 1984.
45. NISHIHARA, S.; McCAFFREY, T.V. Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 100(1): 17-21, 1989.
46. NONAKA, I.; TAKAGI, A.; ISHIURA S.; NAKASE, H.; SUGITA, H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). **Acta Neuropathol [Berl]**, 60:167-174, 1983.

47. NORRIS, R.W.; GLASBY, M.A.; GATTUSO J.M.; BOWDEN, R.E. Peripheral nerve repair, a new technique using muscle autografts. **J. Bone Jt. Surg.** , 70(4): 530-533, 1988.
48. PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H.F. In: **The fine structure of the nervous system: the neurons and sprouting cells.** Philadelphia: Saunders, 1976. 406p.
49. RICE, D.H.; BERSTEIN, F.D. The use of autogenous vein for nerve grafting. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 92(4): 410-412, 1984. Apud TERRIS & FEE Op. cit. Ref.59.
50. ROBINSON, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, 23: 863-873, 2000.
51. ROSEN, J. M.; PHAM, H.N.; HENTZ, V.R. Fascicular tubulization: a comparison of experimental nerve repair techniques in the cat. **Ann. Plast.Surg.**, 22(6): 467-478, 1989.
52. RUSHTON, W. A theory of the effects of fibre size in medulated nerve. **J Physiol**, 115: 101-122, 1951. Apud FAHRENKAMP & FRIEDE Op. cit. Ref.10.
53. SANDERS, F.K.; YOUNG, J. Z. The influence of peripheral connections on the diameter of regeneration nerve fibre. **J. Exp. Biol.**, 22: 203-212, 1954.
54. SANTO NETO, H.; R.M. TEODORI; SOMAZZ, M.C.; MARQUES, M.J. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. **Br. J. Plast. Surg.**, 51(7): 555-560, 1998.

55. SEDON, H.J. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. **Brain J Surg.**, 35: 151-167, 1947. Apud TERRIS & FEE Op. cit. Ref.59.
56. -----. Three types of nerve injury. **Brain**, 66: 237-288, 1963. Apud ROBINSON, L.R. Op cit. Ref.50.
57. SOMAZZ, M.C. **Reparo da lesão de nervo ciático através de autotransplante de músculo esquelético em ratos: retalho obtido com injeções intramusculares de anestésicos locais.** Campinas, 1994, 90p. Tese (Doutorado, área de concentração em Anatomia) - Fac. de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas.
58. SPECTOR, J.G.; LEE, P.; DERBY, A.; ROUFA, D.G. Early stages of facial nerve regeneration through silicone chambers in the rabbit. **Laryngoscope**, 101:1109 –1123, 1991.
59. TERRIS, D.J.; FEE JR., W. Current issues in nerve repair. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 119:725-731, 1993.
60. TOHYAMA, K.; IDE C.; OSAWA, T. Nerve regeneration through the cryoinjured allogeneic nerve graft in the rabbit. **Acta Neuropathol.**, 80(2): 138-144, 1990.
61. WALTON, R.L.; BROWN, R.E.; MATORY, W.E. Jr.; BORAH, G.L.; DOLPH, J.L. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Plast. Reconstr. Surg.**, 84(6): 944-949, 1989.
62. WANG, G.Y.; HIRAI, K.I.; SHIMADA, H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within

antiserum-treated nerve grafts. **Brain Res.**, 570: 116-125, 1992.

63. WEISS, P. Nerve reunion with sleeves of frozen-dried artery in rabbits, cats and monkeys. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 54:274-277, 1943.

64. ZALEWSKI, A.; FAHY, G.M.; AZZAM, N.A.; AZZAM, R.N. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. **J Comp Neurol**, 331:134 –147, 1993.

65. ZHANG, F.; ATTKISS, K.J.; WALKER, M.; BUNCKE, H.J. Effect of cryopreservation on survival of composite tissue grafts. **J Reconstr Microsurgery**, 14: 559-564, 1998.