

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



José Eduardo Scabora

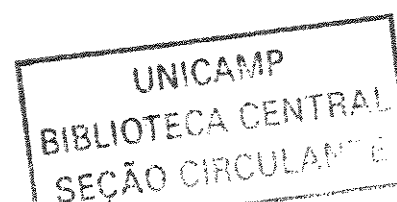
**ASPECTOS HISTOQUÍMICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DE
ENXERTOS AUTÓLOGOS DE NERVOS ESTOCADOS EM
DIFERENTES SOLUÇÕES CONSERVADORAS.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
José Eduardo Scabora
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. Francesco Langone

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIUNICAMP
	Sca 18 a
V	EX
TOMBO BC	56039
PROC.	16-12-2003
C	D
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/10/03
Nº CPD	

CM00190411-4
Bib 16 302176

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

Sca29a

18

Scabora, José Eduardo

Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais de enxertos autólogos de nervos estocados em diferentes soluções conservadoras / José Eduardo Scabora. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Francesco Langone

Co-orientador: Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

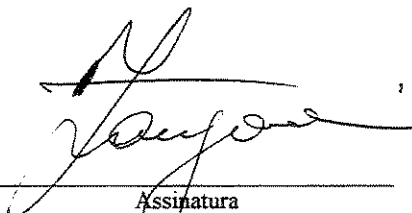
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Nervos periféricos. 2. Regeneração do sistema nervoso. 1. Langone, Francesco.
- II. Esquisatto, Marcelo Augusto Marretto. III. Universidade Estadual de Campinas.
- Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 26 de junho de 2003.

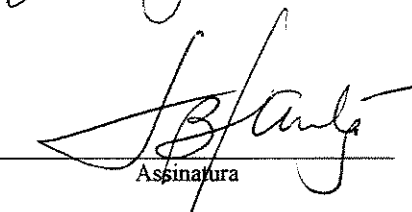
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos



Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



Assinatura

Profa. Dra. Anamarli Nucci

Assinatura

**À minha esposa Danielle, pela
paciência, apoio e estímulo
constantemente.**

Dedico

Obrigado, Senhor,
pela vida que me destes,
assim como é, assim como foi,
Obrigado, Senhor,
por todos os sonhos que já tive
e que não floriram,
pelos sonhos que tenho
e que talvez irão florir...
(Perdão pelos erros
que na vida cometi,
iguais as malhas de uma rede
que por vezes se rompem).
Obrigado pelos consertos
que destes nesta minha "rede"
com vossas mãos divinas.
E muito obrigado, principalmente,
por mais um dia que surge,
por mais um raio de sol
que banha minha alma e meu corpo,
refletindo em mim a felicidade
de ser mais gente e de amar a todos.
Muito obrigado, meu Senhor!

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Francesco Langone**, pela acolhida, amizade e orientação segura.

Ao professor **Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto**, pela dedicação e incondicional atenção.

Ao professor **Ms. Antonio Carlos Magagnini Jr.**, pelo incentivo e apoio constante.

Ao professor **Ms. André Hebling**, pelas palavras de estímulo.

A professora **Dra. Mirian de Magalhães Oliveira Levada**, pelo apoio na realização deste trabalho.

A Profa. **Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**, pelos esclarecimentos e sugestões que melhoraram este trabalho.

A Profa. **Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari**, pela atenção e dedicação na análise desse trabalho.

A Profa. **Dra. Anamarli Nucci**, pela correção prévia deste manuscrito.

A Sra. **Líliam Alves Senne Panagio**, secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela paciência e atenção dedicada ao autor.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Minha Gratidão

SUMÁRIO

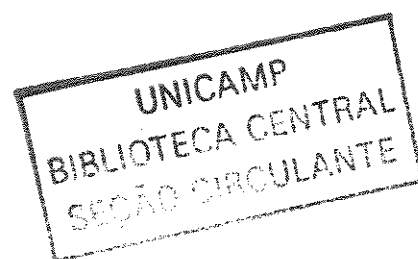
	Pag.
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	01
2. Dados históricos sobre o tratamento cirúrgico das lesões nervosas periféricas	01
2.1. Morfologia do nervo periférico	02
2.1.1. Aspectos anatômicos e histológicos	02
2.1.2. Características morfológicas das fibras nervosas	03
2.1.3. Características morfológicas do axônio	04
2.2. Lesões do nervo periférico	05
2.2.1. Classificação das lesões	05
2.2.2. Alterações proximais provocada pela neurotomia	06
2.3. Regeneração do nervo periférico	07
2.3.1. Conceitos básicos	07
2.3.2. Importância dos elementos celulares e dos fatores neurotróficos para o nervo	08
2.4. Tratamento cirúrgico das lesões nervosas periféricas	08
2.4.1. Neurorrafias e tubulizações	09
2.5. Enxertos de nervos: vantagens e limitações	09
3. Objetivos	14
4. Artigo: Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais de enxertos autólogos de nervos estocados em diferentes soluções conservadoras.	15
4.1. Abstract	16
4.2. Introdução	17
4.3. Material e métodos	17
4.4. Resultados	20
4.5. Aspectos histoquímicos	20
4.6. Aspectos ultra-estruturais	21
4.7. Discussão	22
4.8. Referências bibliográficas	27
4.9. Legendas e figuras	30
4.10. Legenda Figura 1	31
4.11. Figura 1	32
4.12. Legenda Figura 2	33
4.13. Figura 2	34
4.14. Legenda Figura 3	35
4.15. Figura 3	36
4.16. Legenda Figura 4	37
4.17. Figura 4	38
4.18. Legenda Figura 5	39
4.19. Figura 5	40
4.20. Legenda Figura 6	41
4.21. Figura 6	42
5. Conclusões gerais	43
6. Referências bibliográficas gerais	44

Resumo

Os efeitos de soluções conservadoras de órgãos (SC) sobre a estrutura e a viabilidade de enxertos de nervos periféricos são pouco conhecidos. Neste estudo investigamos a organização histológica e ultra-estrutural de enxertos após sua manutenção em dois tipos de SC e após transplante autólogo. Ratos Wistar machos foram agrupados para obtenção de nervos ciáticos normais (NN), transplantados a fresco (NF), conservados em solução de Wisconsin/Belzer ou solução de Collins, por 24 ou 72 horas a 4°C (W1,W3;C1,C3), e conservados e transplantados (W1-T,W3-T;C1-T,C3-T). Após os períodos de conservação ou transplante, os espécimes foram processados para análise ao microscópio óptico e eletrônico. A morfologia dos segmentos de nervos conservados apresentou alterações na sua estrutura comparativamente aos segmentos de nervos frescos. Foi observada redução da basofilia tecidual em todos os segmentos conservados quando comparados ao nervo normal. Esta redução foi mais acentuada no grupo C3. Os grupos W1 e W3 apresentaram aspectos semelhantes entre si. Em todos os grupos não foram observadas alterações quanto à distribuição e organização das fibras colágenas. Após 50 dias de transplante a basofilia tecidual e a celularidade foram semelhantes entre os grupos W1-T,W3-T;C1-T,C3-T e NF. Por outro lado, a vascularização nos enxertos dos grupos tratados mostrou-se aparentemente mais densa que os enxertos do grupo NF. Não foram observadas alterações nas células do perineuro, mas em todos os grupos tratados foram detectadas áreas com abundante deposição de fibras colágenas entre as camadas de células perineurais. Este fato foi especialmente mais intenso nos grupos C1-T e C3-T. A análise ultra-estrutural revelou no grupo C3 uma acentuada desorganização das fibrilas de colágeno do endoneuro quando comparado ao grupo NN. Os grupos C1 e C3 apresentaram maior frequência de alterações das lamelas da bainha de mielina, comparativamente aos grupos W1 e W3, e seus axônios exibiam clara desorganização dos neurofilamentos. Não foram detectadas alterações na lâmina basal das fibras mielínicas e dos feixes amielínicos. As células de Schwann mantiveram a integridade de sua estrutura nos grupos C1 e W1. Contudo, no grupo C3 foram observadas numerosas células de Schwann exibindo vacuolização e aumento de volume do citoplasma. Os grupos W1-T e W3-T apresentaram maior densidade de fibras mielínicas e organização tecidual semelhante ao grupo NF. Por sua vez, os grupos C1-T e C3-T apresentaram grande número de mini-fascículos e colágeno endoneural. O perineuro dos diferentes grupos apresentou-se semelhante ao observado nos grupos NN e NF. As análises estrutural e ultra-estrutural mostraram que a preservação das células de Schwann e demais elementos que suportam a regeneração axonal foi superior nos enxertos conservados na solução de Wisconsin/Belzer. Estes resultados embasam estudos em andamento para a formulação de SC que viabilizem a criação de bancos de nervos para transplantes heterólogos.

Abstract

The effects of the organ conservative solutions (CS) on the structure and the viability of peripheral nerve grafts are largely unknown. We investigate the histology and the ultra-structure of peripheral nerve grafts after storage in two types of CS and/or used for autologous transplantation. A group of male Wistar rats was used to obtain sciatic nerve grafts that had been conserved in Wisconsin/Belzer (W) or Collins (C) solutions, for 24 or 72 hours 4°C (W1, W3; C1, C3). Another group of animals was used to obtain tibial nerve grafts that were immediately transplanted (NF) or conserved in W or C solutions, for 24 or 72 hours 4°C, and then transplanted (W1-T, W3-T, C1-T, C3-T). After the conservation periods (24 or 72 hours) or 50 days after the transplantation the nerve grafts had been processed for light and electronic microscope analysis. The basophilia was decreased in the specimens of the groups conserved in S or C solutions when compared to normal nerves (NN). This reduction was more prominent in the C3 group. The W1 and W3 groups presented similar aspects. No alterations were observed in the distribution and organization of collagen fibers. Fifty 50 days after transplantation a similar basophilia and cellularity were found in W1-T, W3-T, C1-T, C3-T and NF groups. On the other hand, the vascularization of the conserved grafts was more conspicuous than in the NF grafts. No alteration was observed in the perineurium but some intense deposition of collagen fibers was similar to that observed in nerve fibrosis has detected in all the groups. This fact was more frequent in C1-T and C3-T groups. The ultra-structural analysis of the C3 group showed a higher degree of collagen fibrils derangement in the endoneurium in relation to the normal nerves. The C1 and C3 groups presented a higher frequency myelin sheath alterations when compared to the W1 and W3 groups and the axons exhibited neurofilament derangement. None alteration was detected in the basal lamina of the myelinated or unmyelinated nerve fibers. The integrity of Schwann cells structure was maintained in the C1 and W1 groups, but exhibited vacuolization and cytoplasmatic edema in C3 group. The W1-T and W3-T groups presented a higher density of the myelinated fibers and a similar tissue organization to the NF group. The C1-T and C3-T groups presented a large number of mini-fascicles and endoneural collagen. The perineurium structure was similar to the observed in NN and NF groups. The structural and ultra-structural analysis have shown that the preservation of the Schwann cells and the other elements which support the axonal regeneration was greater in the grafts that had been conserved in the Wisconsin/Belzer solution. Our observations contribute to better known the effects of conservative solutions on peripheral nerves and support the creation of a bank of nerve grafts for heterologous transplantation



1. INTRODUÇÃO

A história do progresso da medicina cirúrgica mostra que os melhores resultados sempre foram alcançados à medida que o avanço do conhecimento dos processos anatomofisiopatológicos foi acompanhado pelo domínio das técnicas a serem empregadas.

Neste cenário o tratamento cirúrgico das lesões no sistema nervoso periférico é ainda um desafio importante. Particularmente, as lesões de nervos com perda de substância são as que apresentam pior prognóstico e o reparo cirúrgico das mesmas ainda não é capaz de produzir resultados totalmente satisfatórios, embora o aprimoramento da microcirurgia e o avanço no conhecimento dos fenômenos celulares e moleculares envolvidos na regeneração axonal tenha sido significativo nos últimos anos (Benzel, 1996; Watchmaker e col 1997; Evans 2000).

A criação de bancos de nervos parece ser uma alternativa interessante para a melhora do tratamento cirúrgico das lesões de nervos com extensa perda de substância. A viabilização destes tem motivado fortemente vários grupos de pesquisa (Evans e cols., 1994; Mackinnon, 1996).

Entretanto, para a criação destes bancos ainda existem importantes questões a serem resolvidas, tais como: Qual o meio mais adequado para manter os enxertos de nervos? Qual o tempo máximo que estes enxertos podem ser mantidos no meio de conservação? Quais os efeitos destes meios sobre os elementos celulares do nervo? Além disso, a compreensão adequada dos processos de histocompatibilidade é outro importante obstáculo a ser ultrapassado para a validação de um banco de nervos.

2. DADOS HISTÓRICOS SOBRE O TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

Ferrer foi o primeiro a relatar o emprego de suturas para o reparo cirúrgico de nervos ainda no século 17 (apud Flynn, 1975). Porém, somente no século 19, Baudens fez os primeiros relatos de justaposição de cotos nervosos suturando suas extremidades. No início do século 20, Huber fez um amplo estudo da reparação cirúrgica de nervos e relatou

a recuperação parcial, e mesmo completa, das funções motoras e sensitivas dos pacientes (apud Flynn, 1975). Por sua vez Bristow e Platt (1920), atuando como cirurgiões durante a primeira guerra mundial, realizaram suturas primárias nas lesões nervosas incompletas e relataram que este procedimento melhorava o quadro lesional. A moderna cirurgia de nervos periféricos iniciou-se durante a Segunda Grande Guerra. Contudo, naquele período as lesões geralmente abordadas eram extensas e severas e o tratamento cirúrgico pouco refinado, sendo os resultados limitados (Woodhall, 1954; Seddon, 1954).

Os estudos anatômicos de Sunderland (1978), a exploração intra-operatória de Kline e cols. (1969), o reparo cirúrgico livre de tensão proposto por Millesi (1986) e os importantes dados clínicos sobre a recuperação da função sensitiva apresentados por Moberg (1991) representam contribuições relevantes para o aprimoramento do tratamento de lesões nervosas periféricas durante a segunda metade do século 20. Dentro desse período, destaque importante deve-se fazer ao advento das técnicas microcirúrgicas, difundidas particularmente por Millesi e cols. (1972, 1973). Tais técnicas associadas ao implante de enxertos autólogos e de próteses tubulares, construídas com materiais sintéticos e orgânicos, propiciaram importante avanço na cirurgia de nervos Mackinnon, (1996).

2.1. MORFOLOGIA DO NERVO PERIFÉRICO

2.1.1. Aspectos anatômicos e histológicos

Durante a formação do sistema nervoso central, células neuroectodérmicas passam a formar o tubo e as cristas neurais. A partir destas estruturas se originam os neurônios motores somáticos, pré e pós-ganglionares simpáticos e parassimpáticos, neurônios sensoriais e as células de Schwann que participarão na composição dos nervos periféricos espinais. Por sua vez, as células de Schwann formarão a bainha lipídica ao redor dos axônios mielínicos ou passam a envolver feixes de axônios amielínicos.

Macroscopicamente, os nervos periféricos apresentam aspecto de cordões esbranquiçados, conferido pelo tecido conjuntivo das bainhas que o envolvem. A bainha mais externa é denominada de epineuro; a segunda é o perineuro e a camada conjuntiva mais interna, que se relaciona intimamente com as fibras nervosas, é o endoneuro.

O epineuro é constituído de fibroblastos distribuídos em camadas concêntricas e

separadas por fibras de colágeno tipo I, dispostas longitudinalmente, que reforçam a sua arquitetura. Apresenta vasos sanguíneos com maior calibre que os encontrados nas demais regiões conjuntivas do nervo (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997).

O perineuro reveste os fascículos nervosos e é formado por células achatadas, dispostas em 3 a 4 camadas concêntricas, separadas por feixes de colágeno tipo I e III. Caracteristicamente, essas células apresentam-se envolvidas por uma lâmina basal. As células perineurais são constituídas de citoplasma contendo pouco retículo endoplasmático, mas apresentam abundantes filamentos e vesículas. Estabelecem entre si zonas ocluentes (“tight junctions”), cuja função é controlar a passagem de substâncias através das camadas do perineuro. Parece que uma função importante do perineuro é contribuir para a homeostasia do microambiente do nervo. As células desta bainha conjuntiva parecem controlar o tráfego de substâncias participando, assim, na formação da barreira hemato-nervosa (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997).

O endoneuro corresponde aos elementos conjuntivos que se encontram em íntimo contato com as fibras nervosas no interior do nervo periférico. Encontram-se distribuídos ao redor das fibras nervosas, mielínicas e amielínicas, feixes de colágeno tipo III, fibroblastos, capilares e alguns mastócitos. Os fibroblastos são idênticos ao resto do corpo e o colágeno encontra-se altamente organizado, formando dois folhetos distintos ao redor das fibras nervosas e respectivas células de Schwann. O mais externo é formado por grandes fibras colágenas longitudinais, e o mais interno é composto por fibras de colágeno finas e orientadas de forma oblíqua e circunferencial ao nervo (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997)

Os vasos que suprem os nervos periféricos são provenientes de ramos vasculares de artérias regionais. Esses ramos se distribuem inicialmente no epineuro e penetram no perineuro, formando intercomunicações ou anastomoses de plexos. A partir do perineuro estes se subdividem e penetram no endoneuro, geralmente na forma de capilares (Wadhwani e Rapoport, 1994).

2.1.2. Características morfológicas das fibras nervosas

Conforme já referido, as células de Schwann que se originam das células da crista neural acompanham os axônios e passam a organizar ou não uma bainha de mielina ao redor dos mesmos, dando origem assim às chamadas fibras nervosas mielínicas e

amielínicas, respectivamente. As fibras amielínicas se organizam em feixes onde cada axônio encontra-se envolvido por um prolongamento da célula de Schwann, e, desta forma, separado dos demais. Além disso, um verdadeiro tubo de membrana basal é organizado pelas células de Schwann ao redor das fibras nervosas, que se estende da região de emergência dos filamentos radiculares até as terminações axonais, distalmente. Este tubo de membrana basal é considerado matriz extracelular e é composto por colágeno IV e V, glicoproteínas e proteoglicanos. Ao microscópio eletrônico distinguem-se 3 camadas na membrana basal. A primeira é uma lâmina tênue que constitui uma região mais clara e sua espessura varia de 20 a 40 nanômetros. A segunda lâmina, denominada lâmina densa ou basal, situa-se entre a lâmina rara e a lâmina reticular e sua espessura é de 20 a 100 nanômetros, é eletrodensa e constituída por uma malha de filamentos. A terceira camada, a lâmina reticular ou rara interna, é brilhante ao microscópio eletrônico e de espessura variada, localizando-se entre a lâmina densa e o endoneuro (Martin e Webster, 1973).

2.1.3. Características morfológicas do axônio

O axônio é um prolongamento diferenciado do corpo celular do neurônio, sendo sua função de permitir a condução de sinais elétricos e químicos. Possuem um citoesqueleto formado principalmente por neurofilamentos e microtúbulos. Os neurofilamentos, descritos originalmente por Ramon y Cajal e Bielschowsky como neurofibrilas argentófilos (apud Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997), apresentam um diâmetro de 8 a 10 nm, com comprimento variável. Os microtúbulos têm a aspecto cilíndrico oco e são compostos por subunidades globulares de tubulina com 4 a 5nm de diâmetro. Exercem função importante no transporte axonal, ancorando e permitindo o avanço de vesículas transportadoras de neurotransmissores e outros produtos do metabolismo neuronal (Block, 1994).

A bainha de mielina que envolve o axônio quando observada ao microscópio eletrônico apresenta as chamadas linhas densas principais e as linhas intraperiódicas. Estas se formam pela fusão das faces internas e externas da membrana da célula de Schwann durante o processo de mielinização (Ross, 1993). Também durante esse processo, porções de citoplasma permanecem entre as membranas das células de Schwann constituindo as incisuras ou fendas de Schmidt-Lanterman. Parece que a função destas estruturas seja evitar o fluxo ou deslocamento de mielina semi-líquida ao longo das fibras nervosas e

favorecer por difusão, a passagem de nutrientes ao axônio. A bainha de mielina, por sua vez, é constituída por 75% de lipídios (colesterol, esfingomielina e galactolipídeo) e 25% de proteínas. A região entre duas células de Schwann adjacentes, onde não há mielina, chama-se nódulo de Ranvier. Nesta região a membrana axonal está em direta comunicação com o meio extracelular, sendo rica em canais iônicos, cujo funcionamento determina a geração e propagação do impulso nervoso (Waxman e Ritchie, 1985; Scholz, 1993). É importante destacar que no funcionamento do sistema nervoso, a bainha de mielina atua como isolante elétrico e aumenta a velocidade de condução do impulso nervoso, sem necessidade de aumento do diâmetro da fibra nervosa (Waxman e Ritchie, 1985; Scholz, 1993).

2.2. LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO

2.2.1. Classificação das lesões

Variados agentes lesivos, associados ou não, de natureza mecânica, isquêmica, química, térmica ou elétrica são capazes de causar danos ao nervo periférico. A extensão destas lesões pode abranger um pequeno segmento, quando causado por um instrumento cortante, por exemplo, ou abranger uma extensão relativamente grande, quando provocado por esmagamento ou tração (Leffert, 1988).

Neuropraxia, **axonotomia** e a **neurotomia** são denominações atribuídas por Seddon (1943) aos diferentes graus de lesões nervosas periféricas, cuja classificação foi posteriormente ampliada por Sunderland (1953). A neuropraxia é causada pela compressão do nervo e provoca o bloqueio parcial da condução do impulso nervoso, sem que haja interrupção anatômica da fibra nervosa. A axonotomia é decorrente do esmagamento do nervo, que provoca a secção de muitas fibras nervosas, e tem como consequência o desencadeamento da degeneração Walleriana e bloqueio importante da condução do impulso nervoso. A neurotomia corresponde à secção total do nervo, com a interrupção das bainhas conjuntivas e das fibras nervosas, tendo como consequência o bloqueio total da condução do impulso nervoso associado à intensa degeneração da porção distal à lesão.

A probabilidade de regeneração do nervo, com retomada total da sua funcionalidade, diminui em proporção à gravidade da lesão. Assim, após uma neurotomia, a

probabilidade de recuperação funcional sem a utilização de algum tratamento cirúrgico é muito pequena.

2.2.2. Alterações proximais provocadas pela neurotomia

A secção do nervo provocada pela neurotomia gera a formação de dois cotos, proximal e distal. Na extremidade do coto proximal, os axônios seccionados apresentam uma perda de material axoplasmático imediatamente após a lesão, que cessa após alguns minutos com a reorganização da membrana plasmática axonal. No corpo celular dos neurônios axotomizados desencadeia-se o fenômeno da cromatólise, caracterizada pela desintegração da substância de Nissl e aumento de basofilia. Seu volume aumenta e o núcleo migra para a periferia da célula. Embora estes fenômenos ainda não sejam entendidos do ponto de vista funcional, eles estão relacionados com as alterações na síntese protéica e com eventos que podem dar início aos processos de regeneração axonal ou de morte dos neurônios (Fawcett e Keynes, 1990, Horie et al 1999, Zheng et al 2001).

No coto distal tem lugar um processo degenerativo denominado “degeneração Walleriana”, durante o qual os axônios separados do coto proximal entram num processo autolítico. Estudos ultra-estruturais mostraram que a primeira alteração a ocorrer nos segmentos axonais distais é o acúmulo de mitocôndrias no axoplasma da região dos nodos de Ranvier (Donat e Wisniewski, 1973). A seguir há uma retração da bainha de mielina, fragmentação do axoplasma e um rompimento das mitocôndrias. Após 12 horas da lesão a fibra nervosa torna-se intumescida e deformada com o aumento das incisuras de Schmidt-Lantermann. Apresentam também um afrouxamento das lamelas de mielina e retração da bainha em direção aos nodos de Ranvier. Num período de 3 a 7 dias os axônios e a bainha de mielina estarão completamente fragmentados em segmentos elipsóides (Carpenter, 1988).

As alterações no comportamento das células de Schwann são um fato importante na degeneração Walleriana. O citoplasma destas células se hipertrofia, aumenta o número de organelas e se amplificam os movimentos citoplasmáticos. Durante essa fase, monócitos e macrófagos são recrutados para o coto distais que, junto com células de Schwann, aceleram a autólise dos axônios e a degradação da bainha de mielina (Stoll e cols., 1989).

Beuche e Friede (1984) mostraram que fragmentos de nervos mantidos no interior

de recipientes de “milipore” e implantados intraperitonealmente, não apresentaram degeneração Walleriana. Esses recipientes não permitiam o ingresso de macrófagos nos fragmentos de nervos, assim, os axônios e as bainhas de mielina permaneciam íntegros por vários dias após o implante. Isso foi confirmado por White e cols. (1989), e mais recentemente Dahlin (1995), em experimentos onde a entrada de células no micro-ambiente do nervo lesado foi impedida, evidenciando-se a grande importância do papel dos macrófagos durante a degeneração Walleriana.

2.3. REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

2.3.1. Conceitos básicos

A regeneração do nervo periférico depende de vários fatores tais como o grau de comprometimento das bainhas conjuntivas, à distância entre o local da lesão e o corpo celular do neurônio, a disponibilidade de moléculas neurotróficas no sítio da lesão e a capacidade de regeneração intrínseca da própria célula nervosa.

Quando as condições criadas por esses fatores são minimamente favoráveis, os neurônios axotomizados passam a regenerar seus axônios. Na extremidade destes organiza-se uma estrutura altamente diferenciada, denominada “cone de crescimento”. Este que corresponde a uma intumescência, com 50 µm de diâmetro e 100 µm de comprimento, contém organelas celulares e fibrilas organizadas junto à membrana que emitem finos prologamentos denominados filopódios. A membrana do cone de crescimento, em particular a dos filopódios, possuem receptores para moléculas com propriedades neurotróficas e neurotóxicas presentes no ambiente extracelular (Fawcett e Keynes, 1990; Vesa et al 2000; Jones et al 2001). Distalmente à lesão, no decurso da degeneração Walleriana, as células de Schwann se multiplicam e se organizam formando cordões (bandas de Büngner) envolvidos pela membrana basal produzida por elas. Os cones de crescimento penetram as bandas de Büngner e os axônios se alongam em contato com a membrana da célula de Schwann e sua respectiva membrana basal (Ortiz-Hidalgo e Weller, 1997). Estes axônios em regeneração podem ou não ser mielinizados pelas células de Schwann e, embora se saiba este processo dependa de uma sinalização axonal, a natureza desta ainda não é bem compreendida (Griffin e cols, 1993).

2.3.2. Importância dos elementos celulares e dos fatores neurotróficos para o nervo

Conforme já referido, os sinais físicos e bioquímicos no micro-ambiente de regeneração são detectados pelo cone de crescimento que medeia a sinalização necessária para a sobrevivência do neurônio e o crescimento axonal em direção ao alvo periférico (Dodd e Jessel, 1988). Os elementos celulares de origem não-neural, sobretudo as células de Schwann, respondem pela produção de neurotrofinas, tais como NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) e GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) (Raivich e Kreutzberg, 1987; Funakoshi e cols., 1993; Watabe e cols, 1995; Hammarberg e cols, 1996; Arce e cols, 1998).

Taniuchi e cols. (1988) demonstraram que as células de Schwann também expressam receptores para a NGF e que esta expressão parece ser controlada pelo contato axonal. Assim, durante a degeneração Walleriana o número desses receptores aumenta nas células de Schwann e diminui durante o processo regenerativo, à medida que os axônios restabelecem o contato com as mesmas. Por sua vez, (Funakoshi e cols. 1993) mostraram alterações substanciais da quantidade de vários outros fatores neurotróficos no nervo, bem como dos seus receptores de alta afinidade, durante o processo degenerativo e regenerativo axonal.

Concomitantemente às alterações na expressão e disponibilidade de fatores neurotróficos, distalmente à lesão as células não neurais aumentam a síntese de diversos componentes da matriz extracelular capazes de promover o crescimento e a orientação dos axônios em regeneração, tais como laminina, colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos (Tona e cols., 1993).

2.4. TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

No tratamento cirúrgico das lesões nervosas periféricas devem ser consideradas as condições anatômicas e fisiológicas da região traumatizada, além do intervalo de tempo decorrido após a lesão. As técnicas operatórias a serem empregadas dependerão em grande parte desses fatores (Benzel, 1996; Evans, 2000). Consideraremos a seguir algumas das

técnicas mais empregadas, bem como sua adequação para as diversas situações.

2.4.1. Neurorrafias e tubulizações

A neurorafia é a técnica mais empregada para o tratamento cirúrgico de nervos. Esta consiste na sutura das extremidades dos cotos proximal e distal e entre si ou destes às extremidades de enxertos empregados na reconstrução do nervo. A neurorafia pode ser **epineural** (Rouleau, 1981), **perineural** (Sunderland, 1953; Millesi e cols., 1972; Millesi, 1981) ou **epiperineural** (Brunnelli, 1969). Alguns autores não fazem distinção entre as suturas epineural e interfunicular (Hudson e cols., 1979; Buelher e cols., 1990).

Diversos autores investigaram métodos alternativos para a neurorafia, contudo os resultados foram similares ou inferiores. Dentre estas alternativas pode-se destacar a união dos cotos nervosos com cola acrílica (Freeman, 1965) e cola de fibrina (Bento e Minit, 1989; Maragh e cols., 1990).

Para o tratamento de lesões onde ocorreu perda de substância, não sendo possível a união direta dos cotos, tem sido proposto emprego de próteses tubulares construídos com diversos tipos de materiais biocompatíveis. Dentre estes encontram-se materiais não bioabsorvíveis, como silicone e outros aloplásticos (Ducker e Hayes, 1968; Ashur e cols., 1987; Langone, 1991, Francel e cols., 1997), materiais bioabsorvíveis, como os derivados de ácido poliglicólico, ácido hialurônico e polifosfazenos (Dellon e Mackinnon, 1988; Pham e cols., 1991, Favaro e cols., 1992; Langone e cols., 1995), e colágeno (Braun, 1966; Archibald e cols., 1991; Langone e cols., 1997; Lora e cols., 1997, Chen e col., 2000, Suzuki e cols. (2000), Krekoski e cols., 2001, Hadlock e cols., 2001, Karacaoglu e cols., 2001, Evans e cols., 2002).

2.5. ENXERTOS DE NERVOS: VANTAGENS E LIMITAÇÕES

Quando a lesão do nervo periférico produz acentuada perda de substância, da ordem de centímetros, o emprego de próteses tubulares e outras alternativas citadas acima passam a ser inviáveis. Nestes casos, o enxerto autólogo de nervo (EAN) é a opção mais freqüentemente escolhida, especialmente pela ausência da rejeição e a sua relativa facilidade de obtenção. Contudo, seu emprego sempre leva a denervação da região doadora

e é limitado pela extensão da lesão e pelo calibre do nervo comprometido pela mesma (Holmes, 1947; Seddon, 1947, 1963; Sunderland e Ray, 1947; Spiegel, 1949; Millesi e cols., 1972, 1986; Narakas, 1989; Wong e Scott, 1991, Atchabahan 1998).

Os enxertos homólogos de nervos (EHN) são uma atraente alternativa aos EAN. Contudo, o seu emprego é dependente do grau de histocompatibilidade existente entre o doador e o receptor. O desenvolvimento de drogas imunossupressoras levou vários grupos investigarem a possibilidade da utilização dos EHN como um método mais vantajoso que os EAN (Pollard e Fitzpatrick, 1973; Zalewsky e Gulati, 1981, 1984; Mackinnon e cols., 1984 a,b, 1987; Bain e cols., 1988a; 1988b; Gulati, 1989; Grochowiec e cols., 1989; Yu e cols., 1989; Ansselin e cols., 1990; Mackinnon e cols., 1992; Ansselin e cols., 1992; Zalewsky e cols., 1993; Evans e cols., 1998).

O tratamento de ratos e primatas com Azatioprina e Ciclosporina conferiu imunoproteção dos EHN transplantados nesses animais e promoveu a regeneração nervosa (Pollard e cols., 1973; Zalewsky e Gulati, 1981, 1984; Mackinnon e cols., 1984 a,b, 1987; Bain e cols., 1988a, 1988b; Mackinnon e cols., 1992). Contudo, o efeito colateral dessas drogas, toleráveis nos transplante de órgãos vitais como rim, coração ou fígado, não são aceitáveis na imunoproteção dos EHN. Esses efeitos mostraram-se mais adversos que a própria lesão do nervo, gerando assim um dilema ao se avaliar a relação custo/benefício desta escolha. Ainda diversos autores observaram que EHN transplantados em ratos submetidos à imunossupressão com Ciclosporina A por longo período (9-20 semanas) sofreram uma rápida e total rejeição uma vez cessada a administração da droga (Zalewski e Gulati 1981; Yu e cols., 1989; Ansselin e cols., 1990; Ansselin e cols., 1992).

Após estudos da ultraestrutura dos EHN, Pollard e Fitzpatrick (1973) puderam associar a rejeição dos EHN com a sua invasão por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos ativados. Ansselin e Pollard (1990), quantificaram e acompanharam a cronologia da invasão dos diferentes tipos de linfócitos nos EHN realizadas entre ratos Dark Agouti (doadores) e Wistar (receptores), do 1º ao 14º dia após o transplante. Observaram também que as células de Schwann passaram a expressar moléculas classe I e classe II do Sistema de Histocompatibilidade Principal (MHC) a partir do 2º dia após o transplante. Ansselin e Pollard (1990) propuseram, então, que as células de Schwann poderiam estar atuando como células apresentadoras do antígeno (APC), disparando assim

a resposta imune e se tornando, elas mesmas, alvo do processo de rejeição.

Visando diminuir a antigenicidade dos EHN muitos experimentos foram realizados utilizando-se das mais variadas técnicas, os EHN foram submetidos aos mais diferentes tipos de tratamentos prévios, tais como: predenervação, congelamento, resfriamento, irradiação ou liofilização (Das Gupta, 1967; Pollard e Fitzpatrick, 1973; Pollard e McLeod, 1981; Zalewski e Gulati, 1982; Ide, 1983; Ide e cols., 1983; Mackinnon e cols., 1984a,b; Gulati, 1988; Osawa e cols., 1986, 1987; Hare e cols., 1993; Zalewski e cols., 1993).

Utilizando técnicas de congelamento, associadas ou não a predenervação dos EHN, Ide (1983), Ide e cols. (1983), Gulati e Zalewski (1985), Osawa e cols. (1986, 1987) e Tohyama e cols. (1990) mostraram que o processo de rejeição dos EHN promove a eliminação da mielina, dos axônios e das células de Schwann, porém, preserva os tubos de membrana basal destas últimas. Contudo, à medida que os axônios, acompanhados pelas células de Schwann do receptor, crescem no interior do nervo transplantado, os tubos antigos de membrana basal vão se fragmentando. Os tubos de membrana basal tem papel importante na orientação e crescimento dos axônios em regeneração, tanto no interior dos EAN, quanto no interior dos EHN (Ide e cols., 1990).

Por outro lado, a eliminação dos elementos celulares no interior de EAN reduz a eficiência destes em comparação à que se observa com enxertos autólogos de nervos frescos. De fato, grande quantidade de dados mostra que os componentes celulares do nervo, especialmente as células de Schwann, produzem várias moléculas neurotróficas responsáveis pela sobrevivência dos neurônios e pelo crescimento axonal (Fawcett e Keynes, 1990; Hurst e Badalamente, 1991; Hammarberg e cols, 1996; Arce e cols, 1998). Por outro lado, conforme já mencionamos, os elementos celulares nos EHN têm importante papel no desencadeamento da rejeição do enxerto pelo sistema imunológico do receptor.

Dessa forma, um passo importante seria o desenvolvimento de um método que possibilitasse o emprego dos EHN, onde os elementos celulares fossem preservados, ao mesmo tempo em que sua antigenicidade fosse eliminada ou diminuída. Neste último caso, embora a imunossupressão sistêmica ainda fosse necessária, ela poderia, então, ser reduzida a níveis aceitáveis.

Hare e cols. (1993) analisaram a migração de linfócitos para o interior de EHN frescos ou pré-tratados transplantadas subcutaneamente em ovelhas. O pré-tratamento dos

EHN foi realizado por congelamento ou por resfriamento a 5°C. Estes últimos foram mantidas em solução conservadora Wisconsin/Belzer por períodos de 6 horas a 3 semanas. A análise da migração de linfócitos do hospedeiro, previamente marcados com índio¹¹¹, realizada 7 dias após o implante, mostrou que ambos os tratamentos inibiram significativamente a migração de linfócitos para o interior dos EHN, quando comparados com os nervos frescos. Foram particularmente interessantes os resultados obtidos por esses autores com o resfriamento e conservação nos nervos na solução Wisconsin/Belzer. De fato, a inibição da imigração de linfócitos para o interior dos EHN foi realmente muito acentuada quando os mesmos foram mantidos na solução conservadora de Wisconsin/Belzer pelo período de 1 a 3 semanas. Entretanto, a conservação das EHN por períodos curtos, de 6 a 24 horas, produziu, paradoxalmente, um aumento da migração de linfócitos. Considerando o observado em transplantes renais, nos quais curtos períodos de isquemia do órgão podem levar a um aumento da expressão dos MHC classe II no endotélio vascular, os autores atribuíram a maior migração de linfócitos à ocorrência de um fenômeno análogo nos EHN. Por outro lado, tempos longos de conservação a frio poderiam estar provocando uma depleção e/ou inibição de células endoteliais, bem como de outras células apresentadoras de antígeno, determinando, assim, a redução da migração dos linfócitos.

Evans e cols. (1995) avaliaram o potencial da técnica de conservação de enxertos de nervos em solução Wisconsin/Belzer, empregando o modelo de transplante de nervo ciático entre ratos de linhagem isogênica. Esses autores estudaram o efeito de diferentes temperaturas de conservação (5, 22 e 37°C) sobre a potencialidade dos mesmos em sustentar a regeneração do nervo. Após 14 meses do transplante verificaram que os parâmetros histológicos, eletrofisiológicos e funcionais computados nos animais que receberam enxertos conservados a 5°C por até três semanas foram equivalentes aos observados nos animais que receberam transplantes de nervos frescos.

Realmente, a técnica de conservação de nervos para transplante parece ser promissora. Contudo, ainda são necessários trabalhos experimentais voltados ao estudo da viabilidade dos EAN e EHN conservados em meios que preservam os elementos celulares e que, de alguma maneira, reduzam seu potencial antigênico. Neste sentido, consideramos importante aprofundar nosso conhecimento sobre a eficácia de diferentes tipos de soluções

conservadoras, bem como, sobre o tempo máximo de conservação dos enxertos sem que haja comprometimento da sua viabilidade. Tais dados, associados ao estudo do(s) mecanismo(s) que inibem a resposta imunológica do receptor aos enxertos homólogos de nervos mantidos em tais soluções, poderão viabilizar o desenvolvimento e implantação de um banco de nervos.

3. Objetivos

Considerando as propriedades das soluções conservadoras atualmente utilizadas no transplante de órgãos, este projeto teve como objetivo geral fornecer dados sobre a viabilidade do emprego dessas soluções na criação de um banco de enxertos de nervos periféricos.

Especificamente, neste trabalho foi realizado:

1. A análise das características morfológicas de enxertos de nervos periféricos após manutenção, por 24 ou 72 horas, em solução de Wisconsin/Belzer ou solução de Collins.
2. Avaliou, através de critérios morfológicos, o sucesso da regeneração axonal através dos enxertos nervosos mantidos nas soluções referidas.

4. Artigo

Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais de enxertos autólogos de nervos estocados em diferentes soluções conservadoras.

José Eduardo Scabora¹, Marcelo Augusto Marretto Esquisatto¹, Antonio Luiz Carone², José Francisco Figueiredo³, Francesco Langone⁴.

¹ Centro Universitário Herminio Ometto, Araras, São Paulo, Brasil;

² Faculdade de Medicina de Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil;

³ Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

⁴ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

Título Abreviado: Nervos em soluções conservadoras

Palavras chaves: Nervo Periférico, Regeneração, Enxerto, Conservação, Wisconsin, Collins

Agradecimentos: CAPES, CNPq/PIBIC, FAEP/UNICAMP e PROPESq/UNIJARARAS

***Correspondência:**

Dr. Francesco Langone

Departamento de Fisiologia e Biofísica - IB - UNICAMP –

CP 6109 - Campinas - SP - 13083-970 - Brasil

Tel/Fax : 055 019 3788-6184

e-mail : langone@unicamp.br

4.1. Abstract

We have compared the nerve regeneration by autografts stored in preservative solutions. Wistar male rats groups had the both tibial nerves removed and stored during 24 or 72 hours in Wisconsin/Belzer or Collins solutions at 4° C. Following storage period those nerves are processed for histochemical and ultrastructural analysis. In other animals, the stored nerves were transplanted. After fifty days of the transplant, the animals were reoperated to remove the nerve graft and processed. Sections of the nerve grafts were obtained and observed in Light and Transmission Electron Microscopies. The ultrastructural analysis shows that the structure of the nerve was well preserved after preservation time in both solutions. The nerve fiber regeneration was more advanced in the grafts previously stored in Wisconsin/Belzer solution, but was not similar to the observed in fresh nerve graft. The fibrous matrix compartments were more preserved in nerve grafts maintained in the Wisconsin/Belzer solution. The cellular density in regenerated grafts was apparently higher. Our observations suggest that Wisconsin/Belzer solution is the best choice because must preserve more functional elements that permits a better nerve reorganization in autografts.

4.2. Introdução

O enxerto autólogo de nervo (EAN) ainda é o método mais frequentemente utilizado no reparo cirúrgico de lesões nervosas periféricas com perda de substância (Evans, 2000). Contudo, o EAN envolve sempre o sacrifício da região doadora e a utilidade deste diminui significativamente quando a extensão da lesão ou o calibre do nervo são grandes (de Medinacelli e Seaber 1989). Estas razões têm motivado a intensa investigação de alternativas para o reparo cirúrgico de nervos quando a reconstrução dos mesmos se faz necessária. Entre tais alternativas encontram-se o uso de conduítes sintéticos ou biológicos, enxertos arteriais e venosos e enxertos de músculo acelular (Chen et al., 1994; Atchabahian et al., 1998, Fansa et al., 2000, Krekoski et al., 2001, Karacaoglu et al., 2001, Evans et al., 2002). Outra alternativa interessante ao EAN são os enxertos homólogos de nervos (EHN), na medida em que sejam superadas as dificuldades impostas pelos fenômenos de rejeição e de sua conservação (Sunderland 1999, Fansa et al 1999, Evans et al. 1995, 1998, Hare et al. 1993).

Dessa forma, um passo importante é o desenvolvimento de métodos que mantenham a viabilidade dos enxertos após períodos adequados de estocagem e, no caso dos EHN, eliminem ou restrinjam significativamente a antigenicidade dos mesmos. De fato, nos últimos anos têm-se investigado a formulação de meios de conservação que permitam a criação de bancos de enxertos de nervos (Levi et al., 1994, Evans et al., 1995, 1998, Atchabahian et al., 1999). Contudo, ainda é pequeno o conhecimento dos efeitos desses meios sobre as características morfológicas dos nervos após diferentes períodos de conservação, bem como após o seu transplante. Neste trabalho investigamos as características histoquímicas e ultra-estruturais de enxertos de nervos mantidos por 24 e 72 horas em dois tipos de solução conservadora, bem como 50 dias após o transplante autólogo.

4.3. Material e Métodos

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 300 e 350 gramas, adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp. Antes de cada procedimento cirúrgico os

animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50mg/kg de peso corporal; Hypnol, Laboratórios Cristália) e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp.

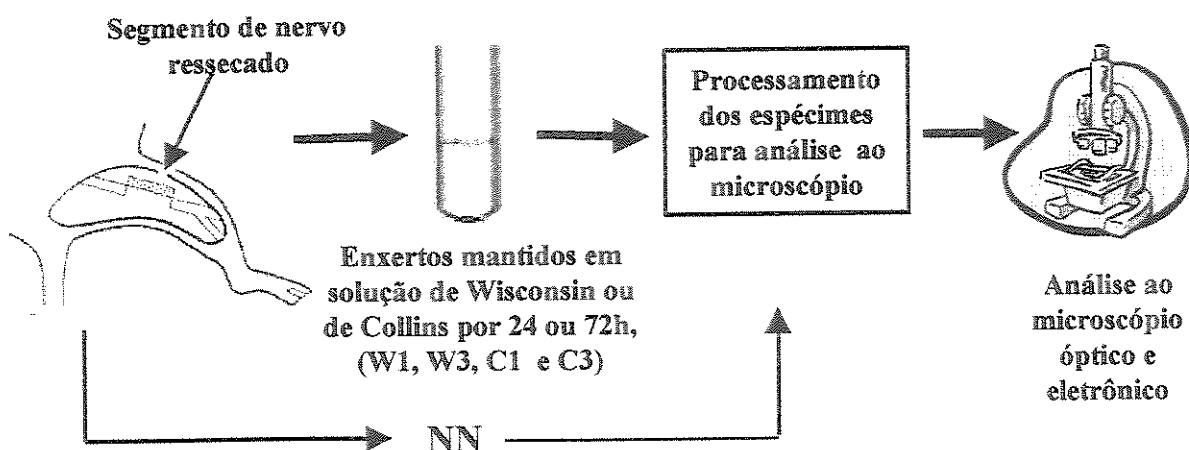
Para o estudo das características histoquímicas e ultra-estruturais dos enxertos de nervos, um grupo de doze animais tiveram os nervos ciático esquerdo e direito removidos e conservados em solução de Wisconsin/Belzer ou solução de Collins, por 24 ou 72 horas a 4°C (grupos W1, W3, C1 e C3, respectivamente). A solução de Wisconsin/Belzer foi adquirida da Du Pont Pharma (Amsterdam, Holanda) e possuía a seguinte composição: KH_2PO_4 (25mM); MgSO_4 (5mM); Lactobianato de K^+ (100mM); Adenosina (5mM); Glutathione Total (3mM); Rafinose (30mM); Alopurinol (1mM); Hidroxi-etil-amato (50g/L); pH 7,4; Osmolaridade 320 mOsmol/L. A solução de Collins foi adquirida da B.Braun S/A (Rio de Janeiro, Brasil), e possuía a seguinte composição: KCl (15mM); NaHCO_3 (10mM); MgSO_4 (28mM); KH_2PO_4 (15mM); K_2HPO_4 (42mM); Glicose (139mM); pH 7,0; Osmolaridade 317 mOsmol/L.

Para o estudo das características histoquímicas e ultra-estruturais dos enxertos após conservação e transplante autólogo, um segundo grupo de doze animais tiveram o nervo tibial esquerdo removido e conservado por 24 ou 72 horas em solução de Wisconsin/Belzer ou solução de Collins (grupos W1-T, W3-T, C1-T e C3-T, respectivamente). Após esses períodos os nervos foram transplantados no lado direito dos mesmos animais. Passados cinquenta dias, um segmento de nervo, contendo o enxerto e as porções proximal e distal ao mesmo, foi removido do animal, fixado em solução de Karnovsky e processado para embebição em resina Araldite F (CY-205, Uegama) para microscopia eletrônica e resina Paraplast (Merck) para microscopia luz. Para análise histoquímica foram realizadas secções longitudinais (6 μm) e tratados com Azul de Toluidina em tampão McIlvaine pH 4,0 e pelo Picrossirius-hematoxilina. Para as observações ultra-estruturais foram realizados cortes ultrafinos empregando-se ultra-micrótomo LKB (Bromma 8800). Os mesmos foram tratados pela técnica convencional e documentados em microscópio eletrônico LEO 906/ Carl Zeiss.

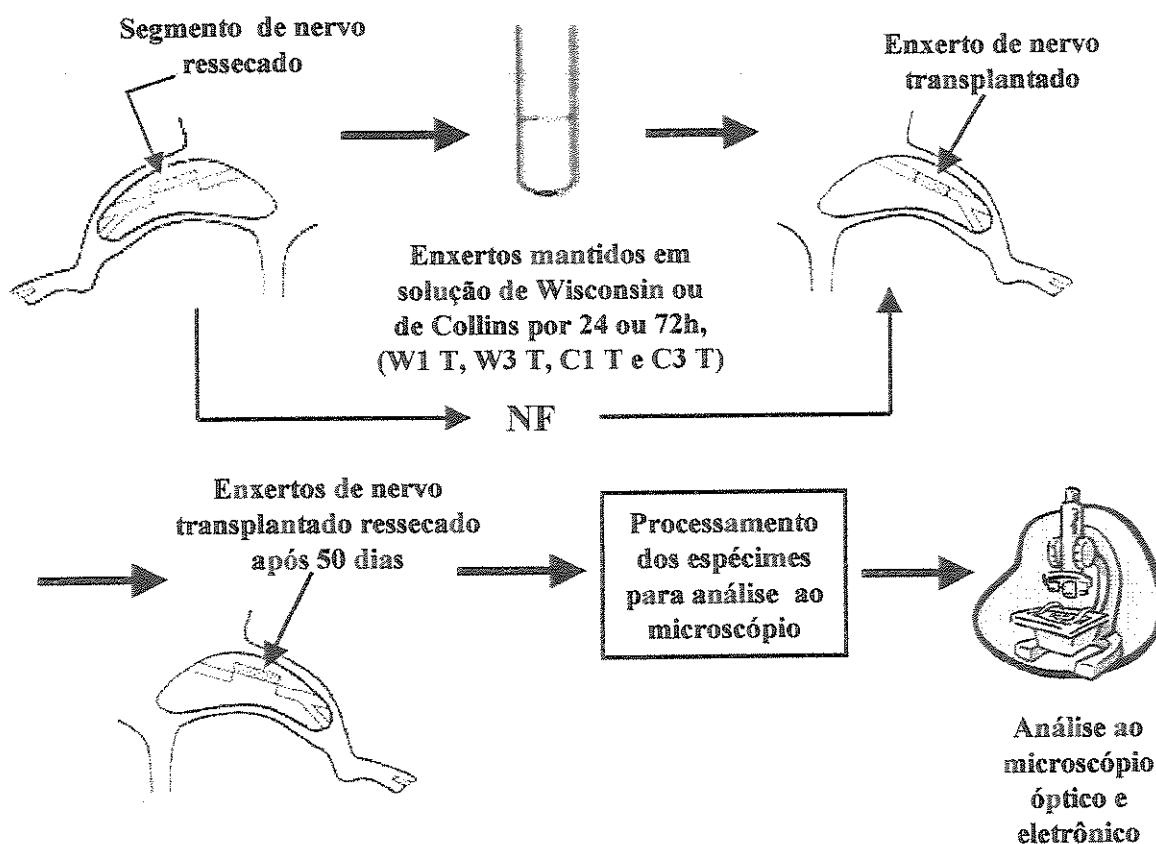
Outros dois grupos de animais foram utilizados como controle. Três animais tiveram um segmento de quinze milímetros do nervo tibial esquerdo removido e imediatamente transplantado para o lado direito (grupo NF). Após 50 dias da cirurgia, os

enxertos foram removidos, processados e documentados segundo o protocolo descrito acima. Três animais da mesma idade dos demais tiveram os nervos ciático direito e esquerdo removidos e imediatamente tratados como relatado acima (grupo NN).

Esquema para obtenção dos nervos controle e de enxertos mantidos nas soluções conservadoras (Grupos W1, W3, C1, C3 e NN)



Esquema da obtenção dos enxertos frescos e de enxertos mantidos nas soluções conservadoras e transplantados (Grupos W1 T, W3 T, C1 T, C3 T e NF)



4.4. Resultados

4.5. Aspectos histoquímicos

A análise histológica dos segmentos de nervos mantidos em solução de Wisconsin/Belzer ou em solução de Collins durante 24 ou 72 horas revelou que a morfologia destes sofreu alterações na sua estrutura comparativamente aos segmentos de nervos normais. Contudo, à microscopia de luz os axônios mielínicos não apresentavam evidências de degeneração (Fig 1 e 2).

O tratamento com Azul de Toluidina revelou a redução da basofilia tecidual em todos os segmentos conservados (Fig 1B-E) quando comparados ao nervo normal (Fig 1A). Nos nervos conservados em solução de Collins tal redução foi mais acentuada no grupo C3 (Fig. 1C). Já os nervos conservados em solução de Wisconsin/Belzer por 24 ou 72 horas (Fig. 1D-E) apresentavam aspecto semelhante entre si. Contudo, a coloração foi similar à observada no grupo C1.

A coloração com Picrosirius, avaliou a acidofilia tecidual detectando preferencialmente a organização das fibras colágenas nas bainhas conjuntivas dos nervos. Em todos os grupos não foram observadas alterações quanto à distribuição e organização das fibras colágenas nos nervos conservados nas diferentes soluções e tempos (Fig.2 A-E).

Após 50 dias de transplante a coloração com Azul de Toluidina detectou uma basofilia tecidual semelhante entre os diferentes grupos de enxertos previamente mantidos em soluções conservadoras (Fig 1G-J) e o grupo de enxertos de nervos frescos (Fig. 1F). A celularidade também foi semelhante entre os enxertos previamente conservados (Fig. 1 G-J) e os enxertos de nervos frescos (Fig. 1F). Por outro lado, a vascularização nos enxertos mantidos na solução de Wisconsin/Belzer ou na solução de Collins, por 24 ou 72 horas, mostrou-se aparentemente mais densa que nos enxertos de nervos frescos. Não foram observadas alterações quanto às bainhas conjuntivas. Contudo, o tratamento com Picrosirius detectou áreas de deposição intensa de fibras colágenas, semelhantes ao que se observa nas fibroses, em todos os grupos tratados (C1-T, C3-T, W1-T e W3-T). Este fato foi mais freqüente nos grupos C1-T e C3-T e não foi observado no grupo NF (Fig 2 F).

4.6. Aspectos ultra-estruturais

Os enxertos estocados em ambas as soluções (C1, C3, W1 e W3) apresentaram alterações ultra-estruturais similares, que se acentuaram após 72 horas de conservação. Todos os enxertos apresentaram alterações na organização das fibras colágenas no espaço endoneural quando comparados aos nervos normais (grupo NN). Estas se encontravam mais frouxamente organizadas por entre as fibras nervosas, sendo que no grupo C3 (Fig 3C) tal alteração foi significativamente mais acentuada que nos grupos W1 e W3 (Fig. 3D-E). Por outro lado, não foram detectadas evidências de desintegração das fibras colágenas em nenhum dos espécimes conservados nas soluções de Collins ou Wiscosin, quer após 24 ou 72 horas.

A estrutura da bainha de mielina também sofreu importantes alterações nos enxertos submetidos aos dois meios de estocagem. Tais alterações foram caracterizadas pelo afastamento das lamelas lipídicas, muito evidentes nas fibras nervosas de maior diâmetro. Nos grupos C1 e C3 (Fig 4A e B) essas modificações estavam mais acentuadas e freqüentes que nos grupos W1 e W3 (Fig 4E e F).

As alterações da bainha de mielina foram acompanhadas por modificações na estrutura dos axônios. Estes se encontravam retraídos e exibiam fragmentação de seu citoesqueleto, evidenciada pela aglutinação dos neurofilamentos, que pareciam formar feixes isolados quando observados em cortes transversais. Tais alterações dos axônios se mostravam mais intensas quanto mais desestruturadas as lamelas da bainha de mielina se encontravam. Por outro lado, os axônios amielínicos não mostravam modificações de sua estrutura em qualquer dos grupos estudados (Fig. 4 A-B). Mesmo aqueles de maior calibre apresentavam uma morfologia similar à observada nos axônios dos nervos normais (Fig. 3 A). Interessantemente, em ambos os tipos de tratamento e tempos de conservação a lâmina basal ao redor das fibras mielínicas e amielínicas não se mostrava alterada na sua estrutura. Ou seja, mesmo ao redor das fibras mielínicas, cujas lamelas se encontravam bastante desarranjadas, a lâmina basal não apresentava sinais de interrupção (Fig. 4 A e B). Por sua vez, as células de Schwann mantiveram a integridade de sua estrutura após 24 horas de conservação em ambos meios empregados (Fig.4C). Contudo, após 72 horas de conservação foram detectadas células exibindo alterações ultra-estruturais, tais como

vacuolização do citoplasma e edema citoplasmático (Fig. 4D). Este fenômeno foi mais freqüente no grupo C3 que no grupo W3.

Nos grupos de enxertos conservados por 72 horas (Fig 6B) as membranas conjuntivas epineural e perineural não apresentaram alterações na sua organização quando comparadas ao nervo normal (Fig. 6A). Sugerindo que a associação destas células foi preservada durante o período de conservação.

Após 50 dias do transplante, a análise ultra-estrutural mostrou que os enxertos dos grupos W1-T e W3-T (Fig. 5 B-C) apresentaram um número aparentemente mais elevado de fibras mielínicas e um padrão de organização tecidual semelhante ao grupo NF (Fig. 5A). Contudo, a densidade dos axônios mielínicos parece ser menor que a observada nos grupos NN. Também foi observada a presença de minifascículos em todos os grupos. No entanto, eles foram mais freqüentes nos grupos C1-T e C3-T. Ao mesmo tempo foi observado aumento da quantidade de fibras colágenas no endoneuro destes grupos (Fig. 5 D-E).

A organização ultra-estrutural do epineuro e do perineuro (Fig 6 D) dos enxertos mantidos nas soluções conservadoras apresentou-se semelhante à observada nos enxertos de nervos frescos grupo NF (Fig. 6C).

4.7. Discussão

O reparo de lesões de nervos periféricos com perda de substância é ainda um desafio importante para os cirurgiões e neurocientistas. O estabelecimento de bancos de nervos parece ser uma atraente via para enfrentar esse problema (Mackinnon, 1996). No presente estudo pudemos confirmar os achados de Carone (1998), mostrando que a conservação de segmentos de nervos tibiais de ratos em solução de Wisconsin/Belzer e em solução de Collins a 4°C, por 24 ou 72 horas, mantém a viabilidade dos mesmos quando transplantados. Essa viabilidade pôde ser comprovada pela observação do desenvolvimento do processo regenerativo axonal 50 dias após o transplante autólogo desses segmentos.

Contudo, nossos resultados evidenciaram importantes diferenças das características histoquímicas e ultra-estruturais entre os segmentos de nervos conservados nas duas soluções após 24 ou 72 horas. Tais diferenças parecem justificar o maior número de

axônios regenerados nos enxertos mantidos na solução de Wisconsin/Belzer, comparativamente aos conservados na solução de Collins, relatados por Carone (1998).

Sabe-se que a eficácia dos enxertos nervosos está relacionada à preservação estrutural e funcional das bainhas conjuntivas e das células de Schwann, além da qualidade do microambiente molecular do meio extracelular, com as quais estas células interagem (Chen et al., 2000).

Em particular, as células de Schwann são as principais responsáveis pela manutenção de um ambiente trófico adequado à regeneração axonal (Trumble and Parvin 1994). A conservação das mesmas depende da integridade dos componentes da sua membrana basal e dos receptores celulares que interagem com a mesma (Terenghi 1995). Entre os componentes da matriz extracelular, que interagem fortemente com as células de Schwann, destaca-se a laminina. Esta glicoproteína de adesão se agrega com proteoglicanos e colágeno do tipo IV na membrana basal. Ela é um dos mais potentes promotores do crescimento axonal durante a regeneração (Evans et al. 1998).

O sucesso dos meios de conservação deve garantir a preservação dos elementos celulares e a integridade da matriz extracelular diretamente associada com as mesmas. De fato, nossos resultados evidenciaram que os elementos estruturais dos nervos mantiveram-se íntegros após 24 e 72 horas de estocagem nas soluções conservadoras empregadas. Todavia, os enxertos conservados na solução de Collins apresentaram acentuada redução na basofilia tecidual, sugerindo que os proteoglicanos da membrana basal e bainhas conjuntivas foram menos preservados nos grupos C1 e C3. Contudo, o arcabouço fibroso parece não ter sofrido dano considerável durante a preservação em ambas as soluções.

A análise das características ultra-estruturais dos enxertos também revelou alterações na mielina, na integridade da célula de Schwann e na organização do endoneuro, as quais foram mais freqüentes nos segmentos dos grupos C1 e C3. Por outro lado, não foram observadas alterações ultra-estruturais dos componentes celulares e da matriz extracelular no perineuro e epineuro quer nos grupos C1 e C3, quer nos grupos W1 e W3.

A observação das características histoquímicas e ultra-estruturais dos enxertos após 50 dias de transplante revelaram a presença de expressiva quantidade de fibras colágenas no endoneuro dos enxertos dos grupos C1-T e C3-T, ao passo que nos grupos W1-T e W3-T esta se assemelhava à observada no grupo NF. Estes dados, associados ao fato de que nos

enxertos dos grupos C1-T e C3-T os minifascículos foram mais abundantes e de menores dimensões que nos grupos W1-T e W3-T, nos permitem inferir que o número de células de Schwann funcionalmente preservadas foi maior nestes últimos. Por outro lado, nos enxertos dos grupos C1-T e C3-T prevaleceram os fibroblastos e células perineurais. Nossos resultados são corroborados pelos achados de Strasberg et al. (1996), que observaram pouca deposição de fibras colágenas nas bainhas conjuntivas de autoenxertos nervos conservados em solução de Wisconsin por sete dias antes de serem transplantados em carneiros. Além disso, nossos dados também são suportados pelos achados de Carone (1998), empregando modelo experimental igual ao empregado neste estudo. Estes autores computaram um número significativamente maior de axônios mielínicos regenerados, após 50 dias de transplante, nos enxertos conservados em solução de Wisconsin/Belzer, quando comparado ao registrado naqueles mantidos em solução de Collins.

Neste sentido, nossos dados sugerem que os componentes da solução de Collins, eletrólitos na sua maioria, não são capazes de assegurar otimamente a viabilidade dos elementos celulares do nervo durante o período de conservação. Em contraposição, a solução de Wisconsin/Belzer possui alguns elementos na sua composição que parecem proteger essas células, especialmente as células de Schwann, melhorando assim a regeneração axonal.

A eficiência da composição da solução de Wisconsin/Belzer, inicialmente observada na conservação de órgãos, tem sido modificada e testada para a conservação de diversos órgãos e tecidos, inclusive nervos (Belzer et al. 1988, Janieson et al. 1989, Strasberg et al., 1996, Evans et al., 1995, 1998). Dentre os componentes dessa solução destaca-se o alopurinol que, inibindo a enzima xantina-oxidase intracelular, protege a célula dos radicais livres de oxigênio produzidos pela isquemia do órgão/tecido durante a sua conservação (Toledo-Pereyra, 1977; Koyama, 1985; Southard e cols, 1987). Por sua vez, o lactobionato de potássio, também possui ação protetora contra radicais livres de oxigênio produzidos nas células. Além disso, fornece potássio à célula e, juntamente com a rafinose, atua osmoticamente reduzindo o edema tissular (Sumitomo e cols., 1992a,b; Figueiredo, 1997).

Outro importante componente da solução de Wisconsin/Belzer para a manutenção da viabilidade celular parece ser a glutatona. Este composto participa de muitas reações

intracelulares, incluindo-se aquelas envolvidas no metabolismo de peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos (Ametani e cols, 1990; Kerr-Conte, 1991; Vreugdenhil e cols., 1992). Diversos autores têm demonstrado que a isquemia produzida pelos procedimentos de conservação de órgãos a frio depleta a glutatona celular (Ametani e cols, 1990; Kerr-Conte, 1991; Vreugdenhil e cols., 1992). Este fato torna a célula mais susceptível à ação dos radicais livres de oxigênio e, conseqüentemente, reduz sua viabilidade (Ametani e cols, 1990; Kerr-Conte, 1991; Vreugdenhil e cols., 1992).

Consideramos razoável supor que a presença dos compostos inibidores da produção de radicais livres, ou seqüestradores (*scavengers*) destes elementos nas células não neurais do enxerto contribuíram para a sua sobrevivência durante o período de conservação e, conseqüentemente, para a regeneração do nervo.

Na composição da solução de Wisconsin/Belzer encontramos também o hidroxí-etil-amato. Este composto pode ter contribuído para a estabilização da membrana celular durante o período de conservação a baixa temperatura. Tem sido demonstrado que as membranas lipídicas passam de um estado líquido cristalino a um estado mais rígido de estrutura, quando submetidas a temperaturas baixas. Nas células este fato poderia levar a um aumento da permeabilidade da membrana e perda de componentes osmóticos ativos (Figueiredo, 1997). Através de seu efeito coloidal, o hidroxí-etil-amato pode ter contribuído para reduzir a ação da hipotermia sobre as células do enxerto, protegendo-as.

Os componentes iônicos são comuns nas soluções de Wisconsin/Belzer e de Collins. Dentre eles devemos destacar o magnésio, que tem sido considerado como um inibidor da Na-K ATPase e protetor de membrana celular de órgãos conservados para transplante (Figueiredo, 1997). Assim, é plausível afirmar que a presença deste íon nas soluções por nós empregadas pode ter contribuído eficazmente na preservação da viabilidade das células de Schwann e demais elementos celulares não neurais dos segmentos de nervos que foram transplantados.

As soluções conservadoras têm sido classificadas como de primeira, segunda e terceira geração. As de primeira e segunda geração são também denominadas intracelulares, por terem baixa concentração de sódio e alta concentração de potássio, além de possuírem magnésio elevado. As soluções de terceira geração são mais sofisticadas, mantendo o padrão intracelular e tamponante, também com magnésio, são acrescidas de

substâncias energéticas, coloidosmóticas e de sequestradores de radicais livres de oxigênio (Belzer e cols., 1992; Figueiredo, 1997).

A solução de Wisconsin/Belzer deve ser considerada de terceira geração. Corroborando as observações obtidas por diversos outros autores (Carone, 1998; Evans et al., 1996 e 1998), nossos resultados revelaram claramente sua maior eficácia na conservação de enxertos nervosos quando comparada à solução de Collins.

Contudo, a base teórica necessária à formulação de soluções conservadoras que viabilizem a criação de bancos de nervos para transplante ainda exige estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares minuciosos sobre a viabilidade celular ex-vivo.

4.8. Referências bibliográficas

- Ametani MS, Southard JH, Belzer FO.(1990) Importance of glutathione and adenosine in cold storage of the kidney. *Transplant. Proc.* 22:469-471.
- Atchabahian A, Mackinnon SE, Hunter DA, (1999) Cold preservation of nerve grafts decreases expression of icam-1 and class II MHC antigens. *J. of Recost. Microsurgery* 15:307-311.
- Atchabahian A, Gender EM, Mackinnon SE, Doolabh VB, Hunter DA, (1998) Regeneration through long nerve grafts in the swine model. *Microsurgery* 18:379-382.
- Carone, A. L. (1998) Estudo da viabilidade de enxertos de nervos mantidos em soluções conservadoras. (Tese) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR, Murrel GAC. (1994) Denatured muscle as nerve conduit: a functional, morphologic and electrophysiologic evaluation. *J. Reconstr. Microsurg.* 10: 137-144.
- Chen YS, Hsieh, CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng YS, Hu CL, Yao H.(2000) Peripheral nerve Regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and Fibronectin *Biomaterials* 21:1541-1547.
- De Medinacelli I, Seaber AV (1989) Experimental nerve reconnection: importance of initial repair. *Microsurgery* 10: 56-70.
- Evans GRD, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, Wang B, Meszlenyi RK, Lu L, Mikos AG, Patrick Jr CW, (2002) Bioactive poly(L-lact acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 23 841-848.
- Evans PJ, Mackinnon SE, Levi ADO, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, Midha R (1998) Cold preserved allografts, changes in basement membrane, viability, immunogenicity and regeneration. *Muscle & Nerve* 21: 1507-1522.
- Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, Hunter DA, Midha R. (1995) Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle & Nerve* 18: 1128-1138.
- Fansa H, Lassner F, Kook PH, Keilhoff G, Schneider W (2000) Cryopreservation of peripheral nerve grafts. *Muscle & Nerve* 23: 1227-1233.
- Fansa H, Keilhoff G, Plogmeier K, Frerichs O, Wolf G, Schneider W (1999) Successful implantation of Schwann cells in acellular muscles. *J. Reconstr. Microsurg.* 15: 61-65.
- Figueiredo JF. (1997) Fisiologia e Fisiopatologia da Conservação de Órgãos. Captação de Órgãos para Transplante. Ubirajara Ferreira, coord. -Campinas, SP: Gráfica e Editora Tecla Tipo 165-1 83.

Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML. (2001) A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers. *Microsurgery* 21:96-101.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE (1993) Effect of cold preservation on lymphocyte migration into peripheral nerve allografts in sheep. *Transplantation* 56: 114-116.

Janieson NV, Lindell R, Southard JH, Belzer FO. (1989) Evaluation of simplified variants of the UW solution using the Isolated perfused rabbit liver. *Transpl. Proc.* 21:1294-1295.

Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler M, (2001) Nerve regeneration through sheath: Its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery* 21:196-201.

Kerr-Conte J. Boudjema K. Southard JH Cinqualbre J. (1991) Mechanism of hypothermic cell death: glutathione prevents injury in hepatocytes during hypothermic (4°C) preservation. *Transplant. Proc* 23:2405-2406.

Koyama I (1985) The role of oxygen free radicals in mediating reperfusion injury of cold preserved ischemic kidneys. *Transplantation* 40:590-596.

Krekoski CA, Neubauer D, Zuo J, Muir D, (2001) Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *The J. of Neuroscience* 21(16):6206-6213.

Levi ADO, Evans PJ, Mackinnon SE, Bunge RP, (1994) Cold storage of peripheral nerve: An in vitro assay of cell viability and function. *Glia* 10:121-131.

Suzuki K, Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi H, Endo K, Nishimura Y. (2000). Reconstruction of rat peripheral nerve gap without sutures using freeze-dried alginate gel. *J. Biomed Mater Res.* 49:528-533.

Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF, Belzer FO. (1987) The importance of O₂-derived free radical injury to organ preservation and transplantation. *Transplant. Proc.* 19:1380-1381.

Strasberg SR, Mackinnon SE, Genden EM, Baian JR, Purcell CM, Hunter DA, Hay JB. (1996). Long-segment nerve allograft regeneration in the sheep model: Experimental study and review of the literature. *J. Reconst Microsurg* 12:8:529-537.

Sumitomo R, Dohi K, Urishiraha T, Jamieson NV, Ito H, Sumimoto K, Fukuda Y. (1992 a) An examination of the effects of the solution containing histidine and lactobionate for heart, pancreas and liver preservation in the rat. *Transplantation* 53:1206-1210.

Sumitomo R, Lindell SL, Southard JH, Belzer FO. (1992 b) A comparison of histidine-lactobionate and UW solution in 48-hour liver preservation. *Transplantation* 54:610-614.

Terenghi G. (1995) Peripheral nerve injury and regeneration. *Histol Histopathol* 10:707-717.

Hadlock Tessa A, Sundback CA, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML.(2001) A new artificial nerve grafts containing rolled Schwann cell monolayers. *Microsurgery* 21:96-101.

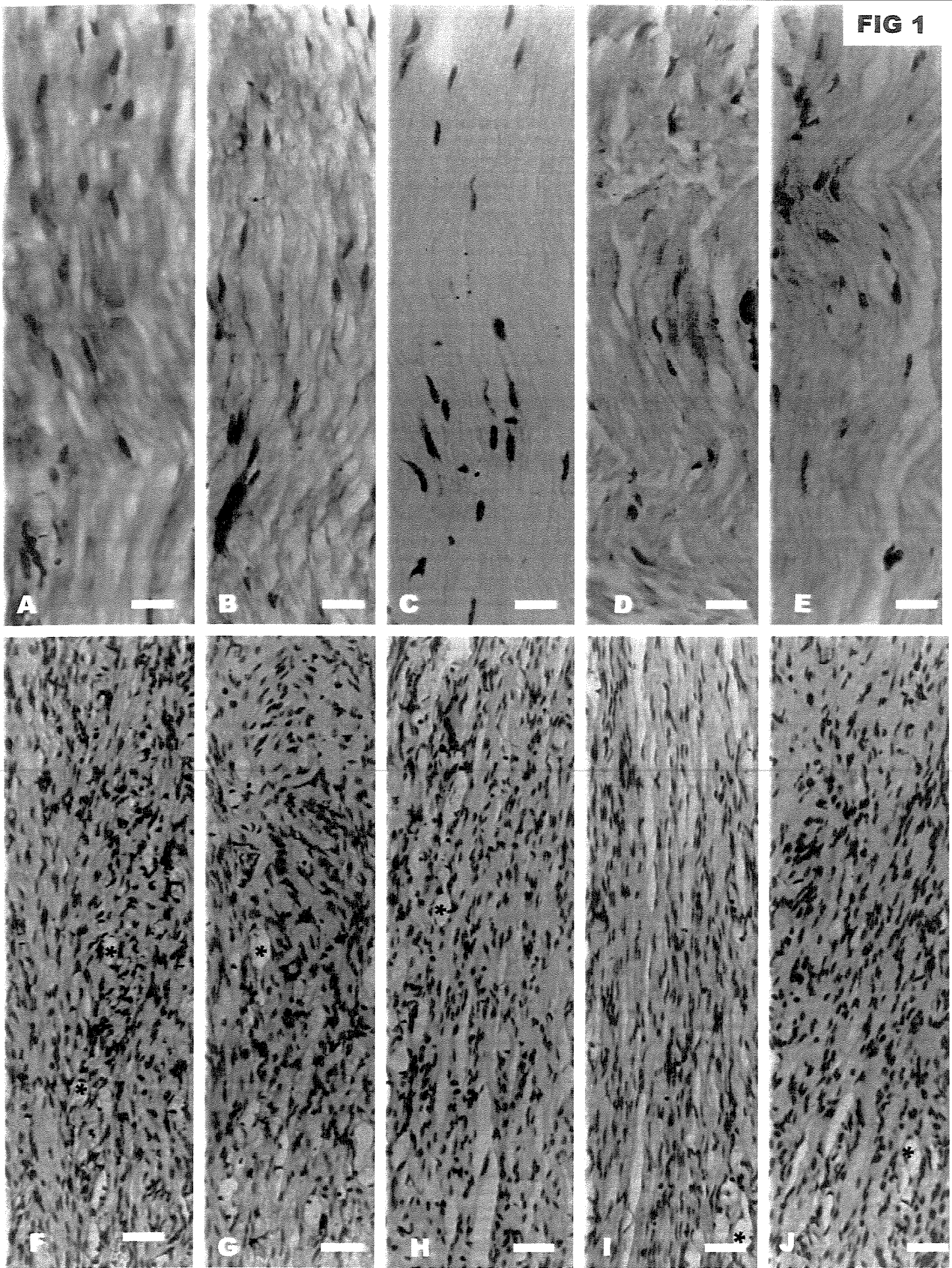
Toledo-Pereyra LH, (1977) Clinical effects of alluporinol on preserved Kindleys: a randomized double-blind study. *Ann Surg.* 185:128-136.

Trumble TE, Parvin D. (1994) Cell viability and migration in nerve isograft and allografts. *J Reconstr Microsurg* 10:27-34

Vreugdenhil PK, Evans W, Belzer FO, Southard JH. (1992) Glutathione depletion in cold-storage organs. *Transplant. Proc.* 22:455-457.

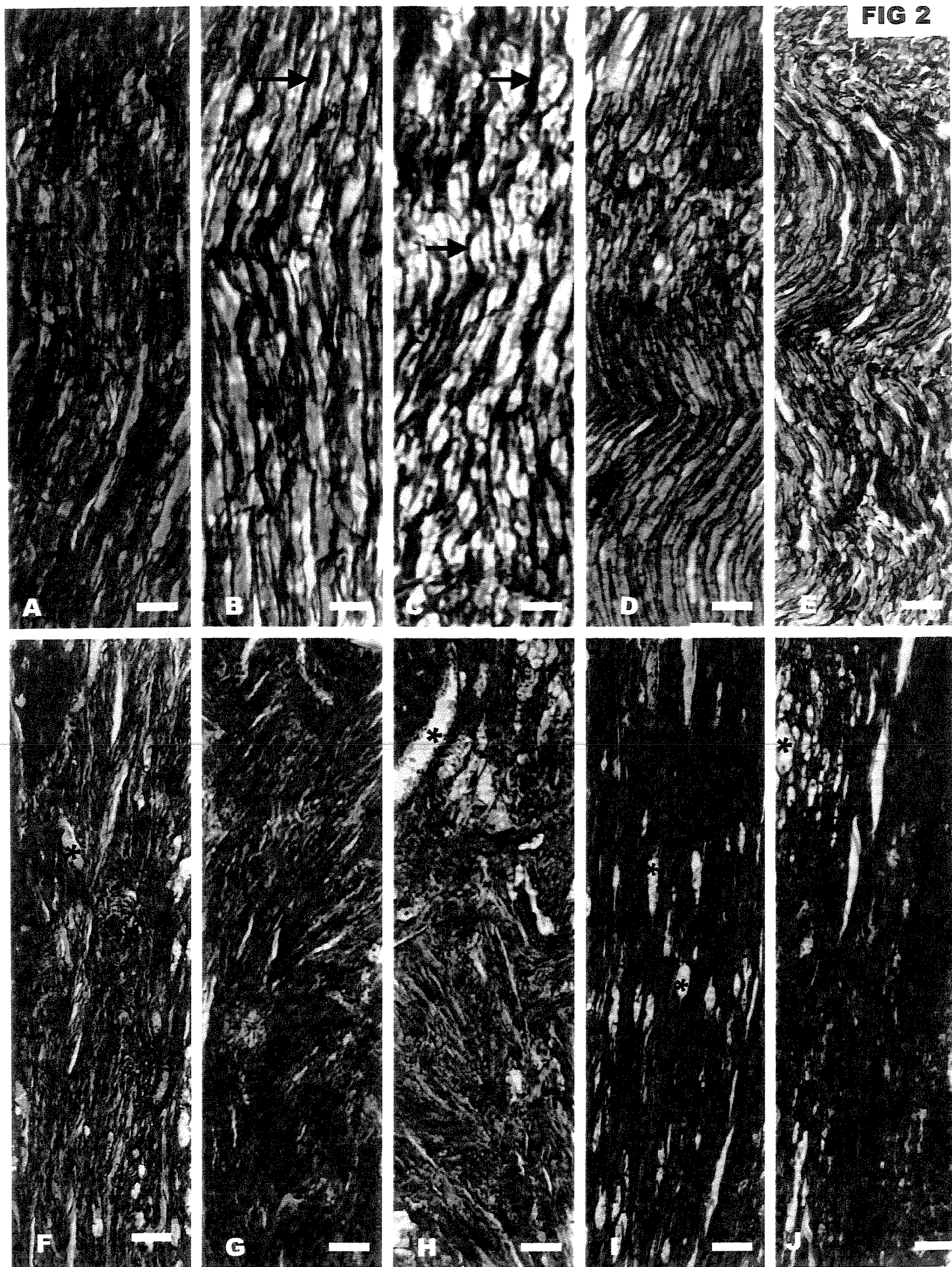
4.9. Legendas e Figuras

4.10. Figura 1 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo maior dos nervos normais (A), transplantados a fresco (F), somente conservados em solução de Collins por 24h (B) e 72h (C), e em solução Wisconsin/Belzer por 24h (D) e 72h (E), além dos segmentos transplantados após conservação prévia em solução de Collins por 24h (G) e 72h (H) e Wisconsin/Belzer por 24h (I) e 72h (J). Observe que houve redução da basofilia tecidual em todos os segmentos conservados quando comparados ao nervo normal. Nos nervos conservados em solução de Collins tal redução foi mais acentuada no grupo C3. Note que os nervos conservados em solução de Wisconsin/Belzer apresentaram aspectos semelhantes entre si. Contudo a coloração foi similar à observada no grupo C1. Veja que após 50 dias de transplante a basofilia tecidual foi semelhante entre os diferentes grupos quando comparados com o grupo NF. Pode ser observado ainda que os enxertos transplantados apresentaram grande número de células e aumento de vasos sanguíneos no interior do nervo. Coloração: Azul de toluidina em solução de pH 4,0. Barra = 50µm. (*) = Vasos sanguíneos.



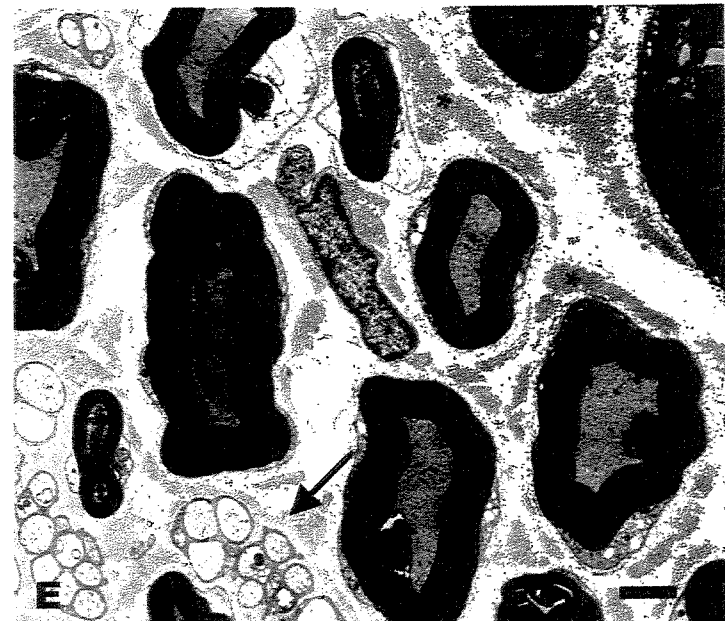
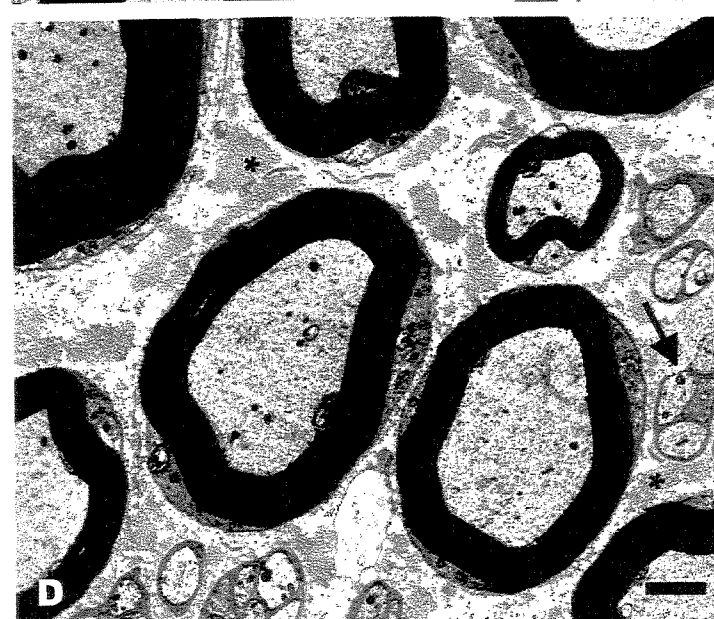
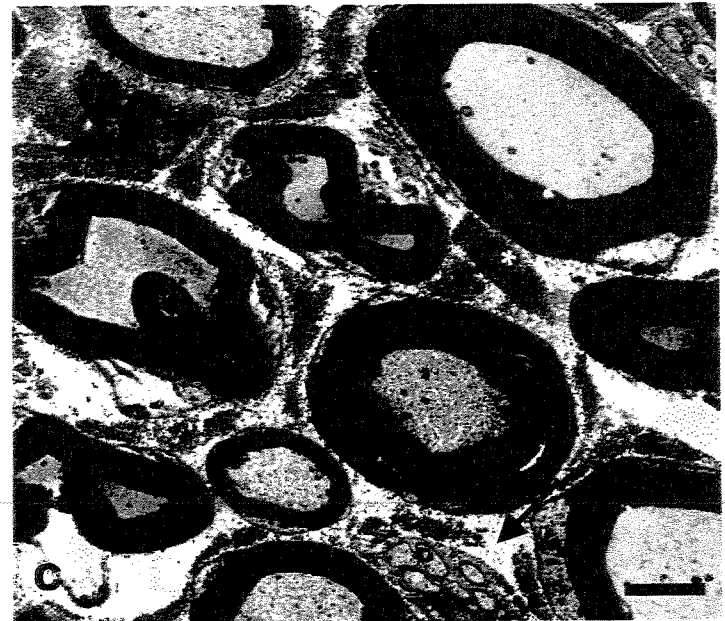
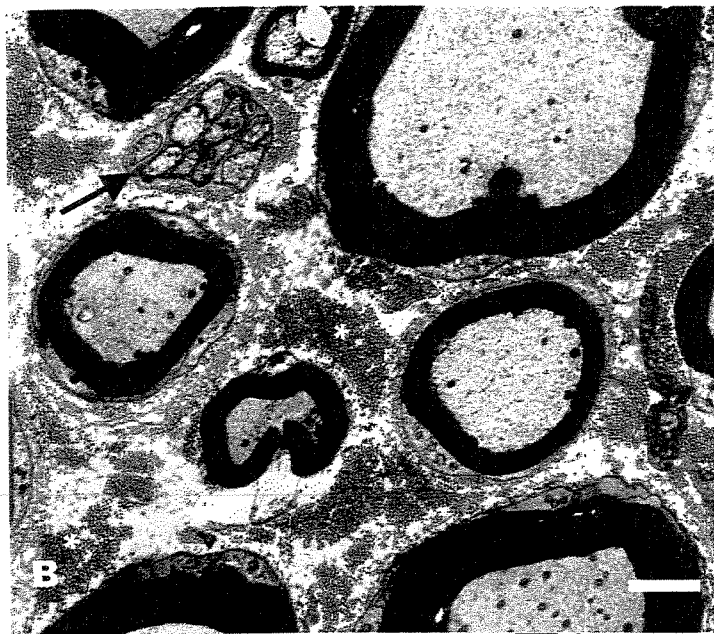
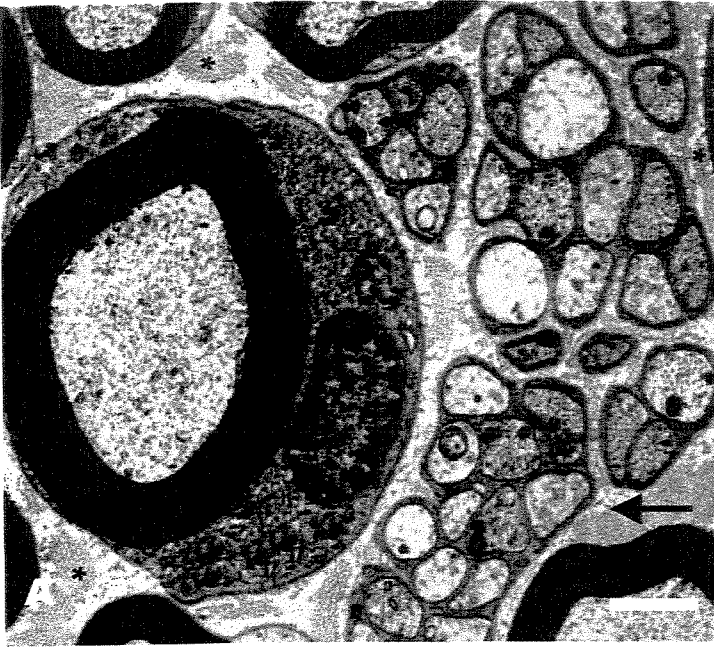
4.12. Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo maior dos nervos normais (**A**), transplantados a fresco (**F**), somente conservados em solução de Collins por 24h (**B**) e 72h (**C**), e em solução Wisconsin/Belzer por 24h (**D**) e 72h (**E**), além dos segmentos transplantados após conservação prévia em solução de Collins por 24h (**G**) e 72h (**H**) e Wisconsin/Belzer por 24h (**I**) e 72h (**J**). Note que em todos os grupos não foram observadas alterações quanto à distribuição e organização das fibras colágenas nos nervos conservados nas diferentes soluções e tempos. Observe ainda a intensa deposição de fibras colágenas, semelhantes ao que se observa nas fibroses, em todos os grupos tratados. Este fenômeno não foi observado no grupo NF. Veja que este fato foi mais freqüente nos grupos C1-T e C3-T, apesar de serem detectados nos enxertos dos grupos W1-T e W3-T. Coloração: Picrossirius-hematoxilina. Barra = 50µm. Seta = fibras colágenas. (*) = Vasos sanguíneos.

FIG 2

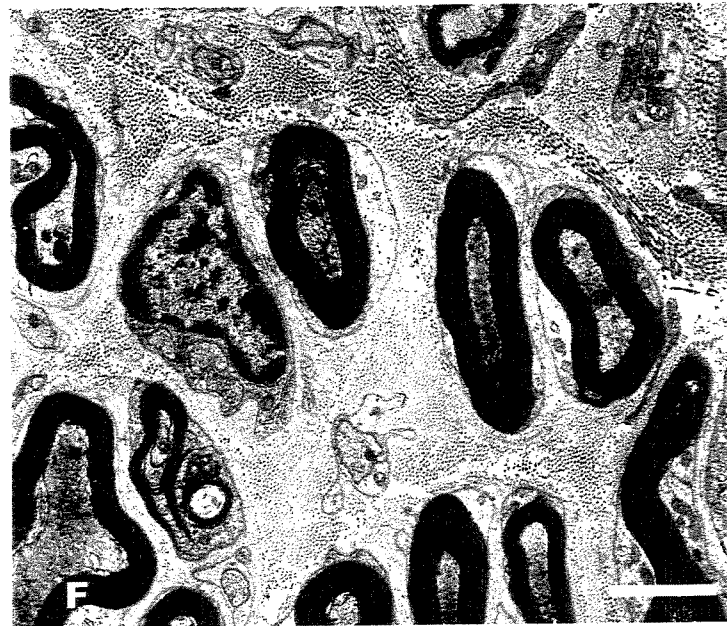
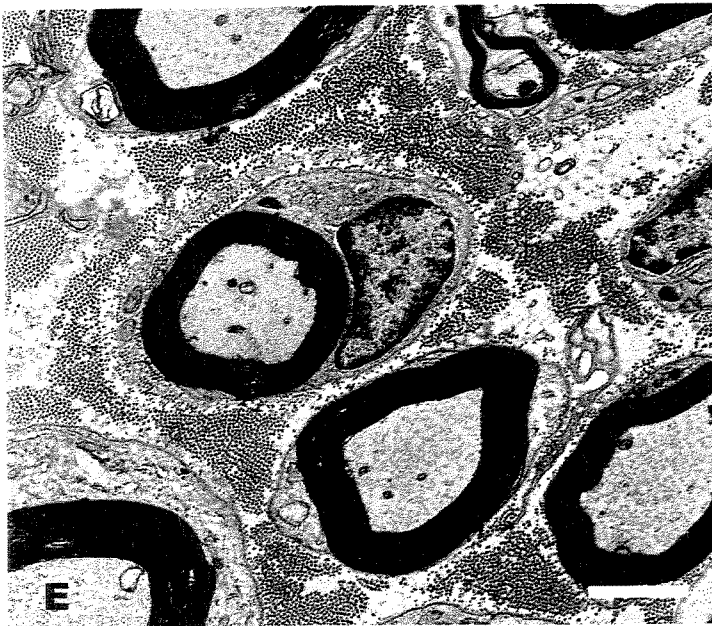
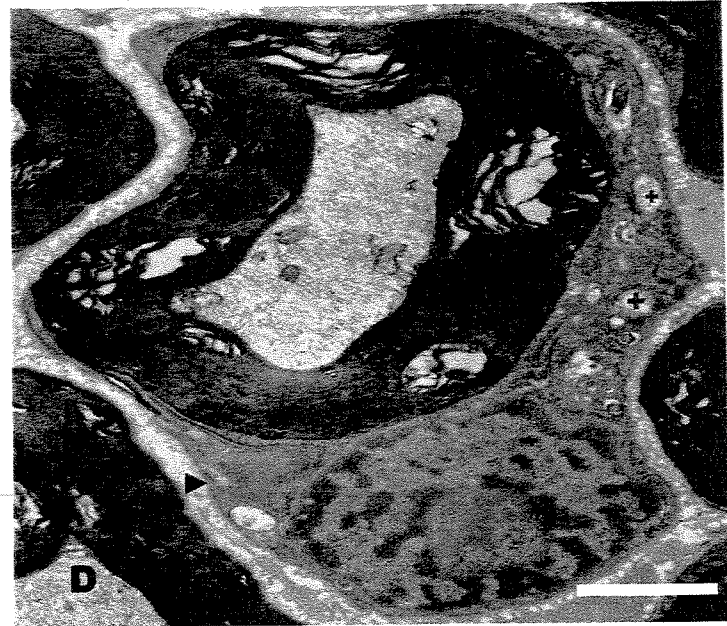
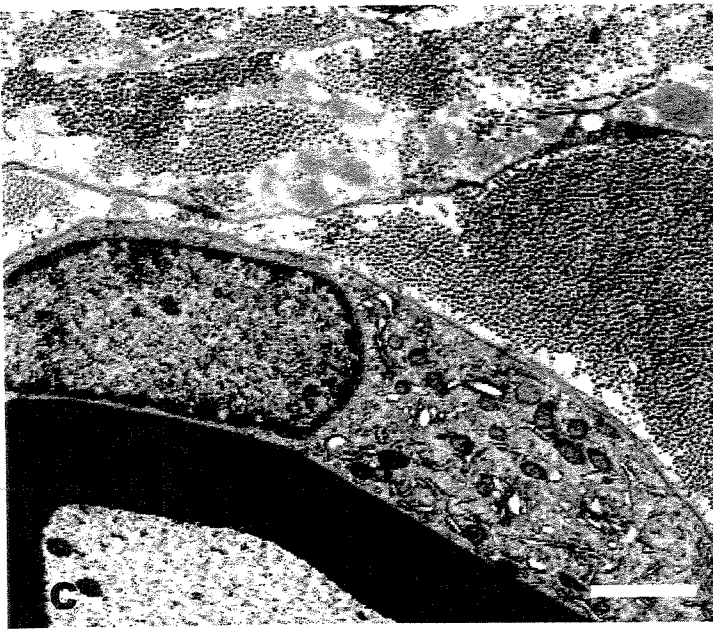
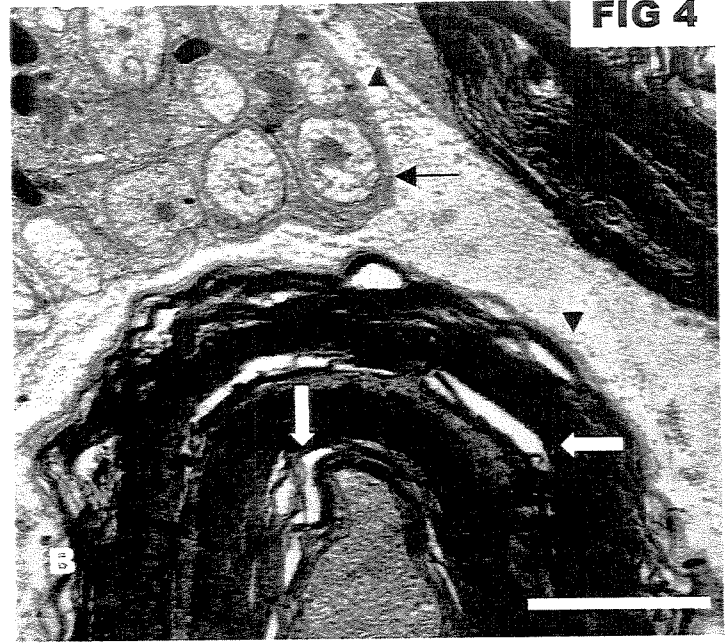
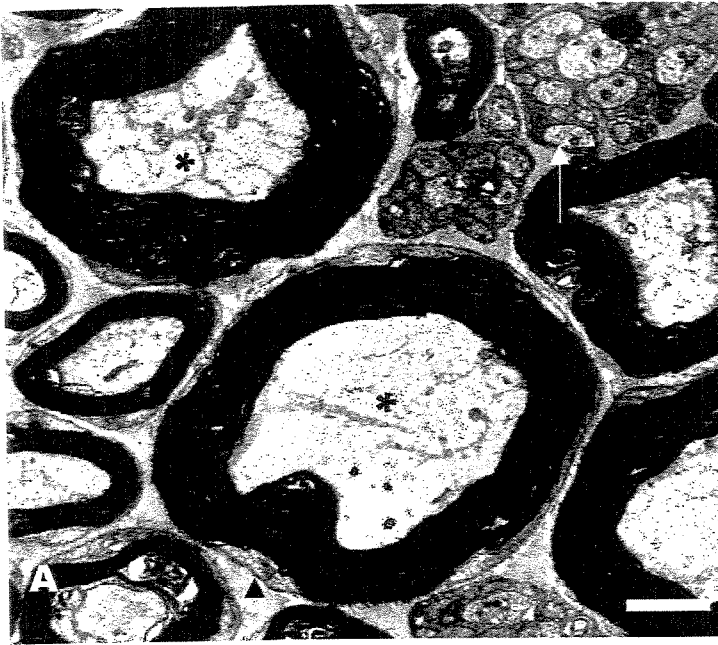


4.14. Figura 3 – Micrografias eletrônicas de cortes transversais ao eixo maior dos nervos normais (A), e conservados em solução de Collins por 24h (B) e 72h (C), e em solução Wisconsin/Belzer por 24h (D) e 72h (E). Veja que os enxertos estocados em ambas as soluções apresentaram alterações ultra-estruturais similares, que se acentuaram após 72 horas de conservação. Note que todos os enxertos apresentaram alterações na organização das fibras colágenas no espaço endoneural quando comparados aos nervos normais. Estas se encontravam mais frouxamente organizadas por entre as fibras nervosas, sendo que no grupo C3 esta alteração foi significativamente mais acentuada que nos grupos W1 e W3. Observe ainda que não foram detectadas evidências de desintegração das fibras colágenas em qualquer dos espécimes conservados. Barra = 1µm. (*) = fibrilas de colágeno. Seta = Axônios amielínicos.

FIG 3

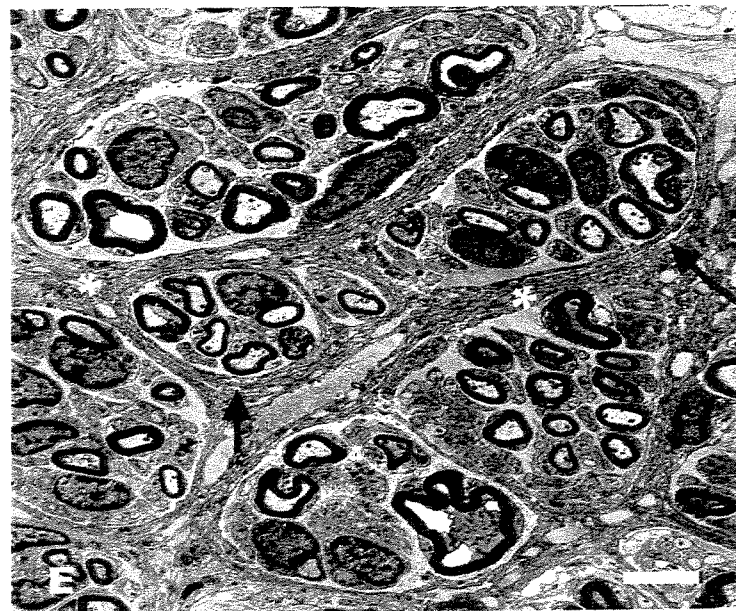
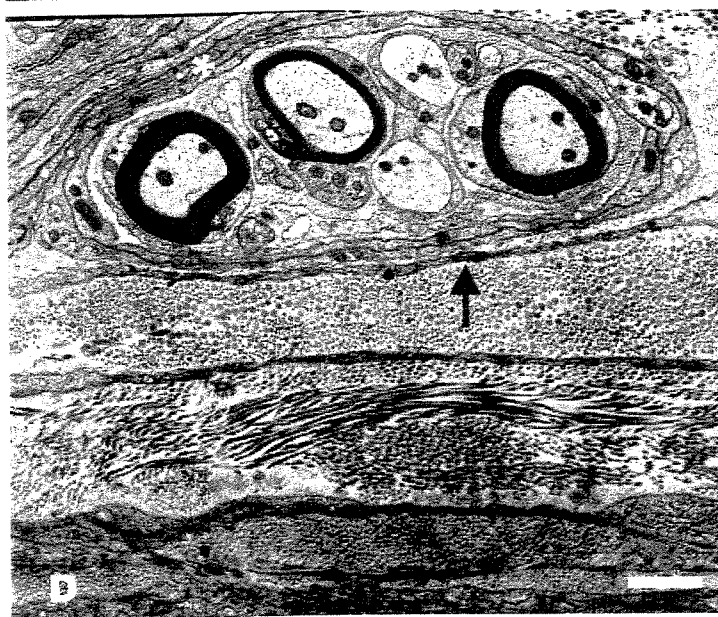
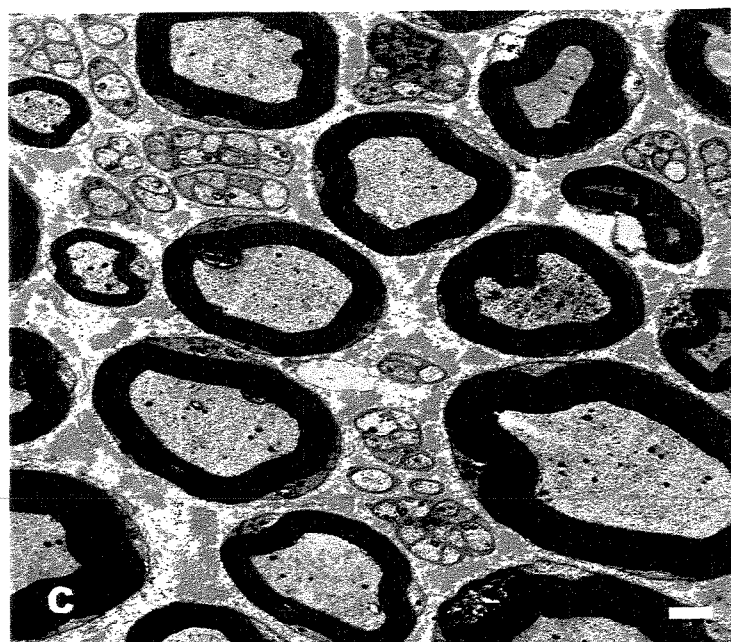
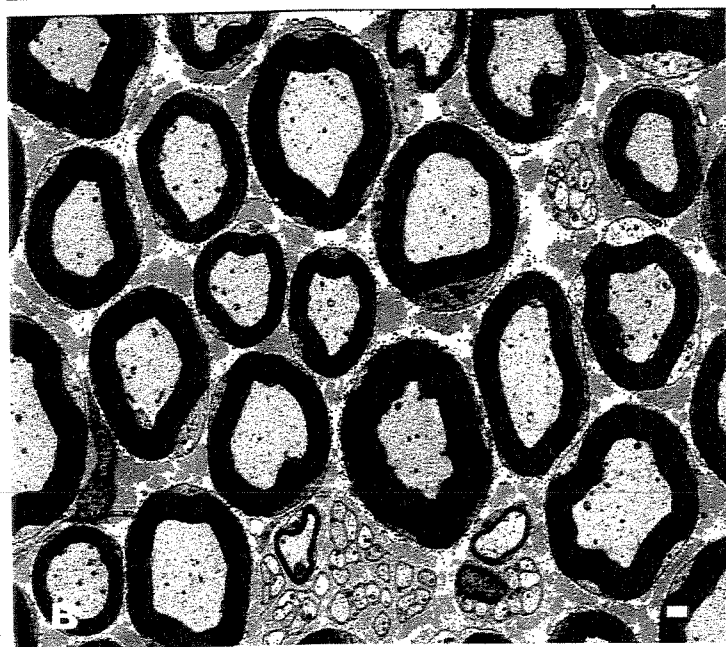
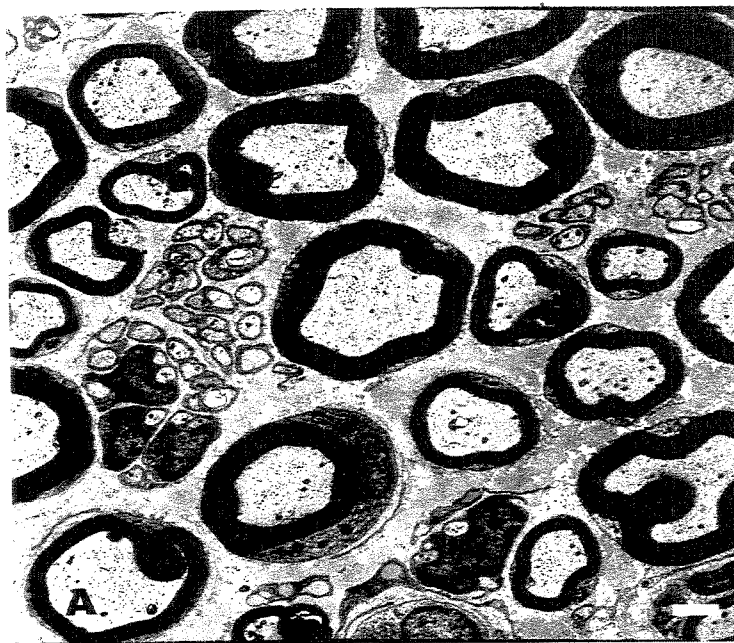


4.16. Figura 4 – Micrografias eletrônicas de cortes transversais ao eixo maior dos nervos conservados em solução de Collins por 24h (**A** e **C**) e 72h (**B** e **D**), e em solução Wisconsin/Belzer por 24h (**E**) e 72h (**F**). Observe que a estrutura da bainha de mielina também sofreu importantes alterações nos enxertos submetidos aos dois tipos de meios de estocagem. Tais alterações foram caracterizadas pelo afastamento das lamelas lipídicas, muito evidentes nas fibras nervosas de maior diâmetro (**seta**). Note que nos grupos C1 e C3 essas modificações estavam mais acentuadas e freqüentes que nos grupos W1 e W3. Veja que as alterações da bainha de mielina foram acompanhadas por modificações na estrutura dos axônios. Estes se encontravam retraídos e exibiam fragmentação de seu citoesqueleto, evidenciada pela aglutinação dos neurofilamentos (*), que pareciam formar feixes isolados. Veja que os axônios amielínicos não apresentaram modificações de sua estrutura em qualquer dos grupos estudados (**seta fina**). Observe ainda que em ambos os tipos de tratamento e tempos de conservação a lâmina basal (**cabeça de seta**) ao redor das fibras mielínicas e amielínicas não se mostrava alterada na sua estrutura e as células de Schwann mantiveram a integridade de sua estrutura após 24 horas de conservação em ambos meios empregados. Por outro lado, note que após 72 horas de conservação foram detectadas células exibindo alterações ultra-estruturais, tais como vacuolização do citoplasma e edemaciamento (+). Barra = 1µm.



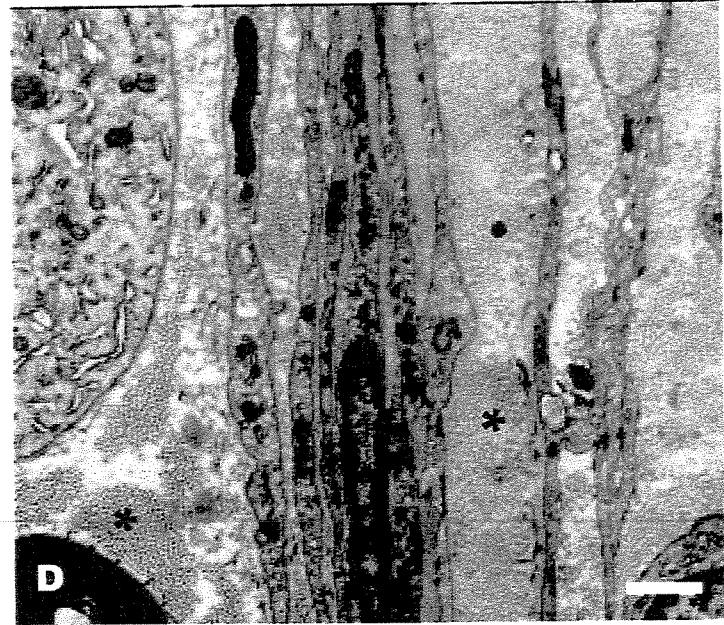
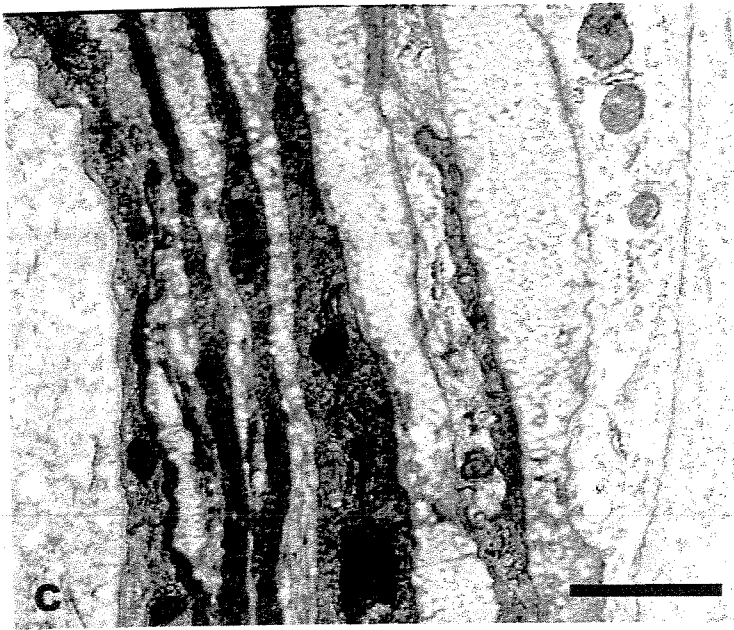
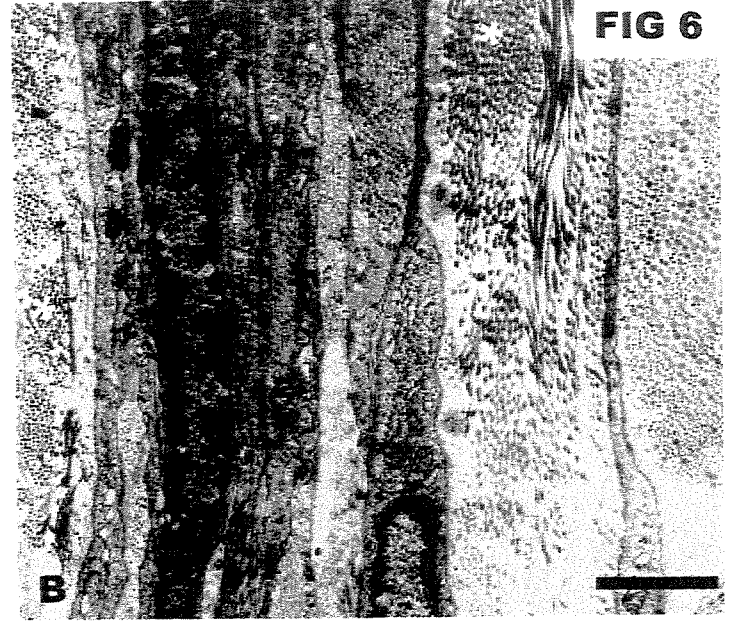
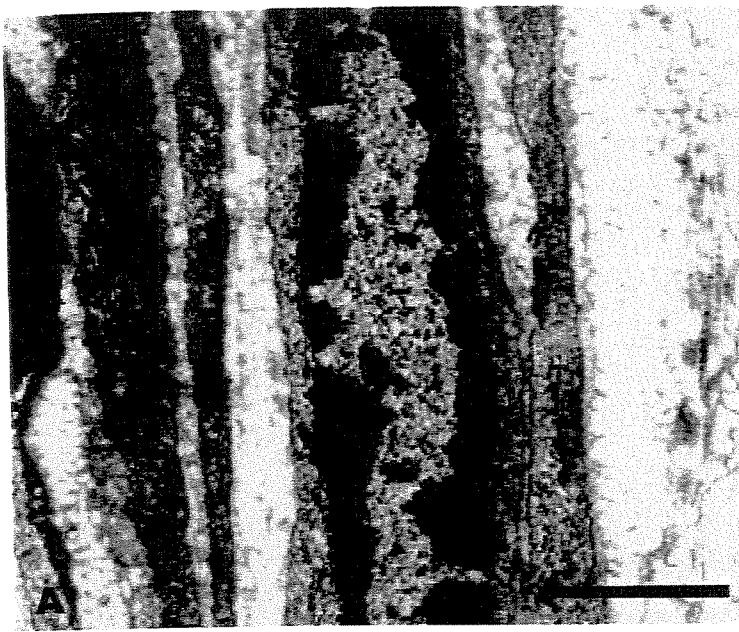
4.18. Figura 5 – Micrografias eletrônicas de cortes transversais ao eixo maior dos nervos transplantados a fresco (A) e transplantados após conservação em solução de Collins por 24h (D) e 72h (E), e em solução Wisconsin/Belzer por 24h (B) e 72h (C). Observe que, após 50 dias do transplante, os grupos W1-T e W3-T apresentaram um número aparentemente mais elevado de fibras mielínicas e um padrão de organização tecidual semelhante ao grupo NF. Veja que também pode ser observada a presença de numerosos minifascículos (*seta*) nos grupos C1-T e C3-T. Note ainda que ao mesmo tempo pode ser observado o aumento da quantidade de fibrilas colágenas (*) no endoneuro destes grupos. Barra = 1 μ m.

FIG 5



4.20. Figura 6 – Micrografias eletrônicas de cortes transversais ao eixo maior dos nervos normais (**A**), conservados em solução de Collins por 72h (**B**), transplantados a fresco (**C**), e transplantados após conservação em solução Collins por 72h (**D**). Note que a organização ultra-estrutural do perineuro dos enxertos transplantados não apresentou alteração quanto comparada aos grupos NN e NF. Barra = 1 μ m. (*) = fibrilas colágenas.

FIG 6



5. Conclusões gerais

Os resultados deste trabalho permite concluir que:

1. A estocagem dos seguimentos de nervos na solução conservadora de Wisconsin/Belzer ou na solução conservadora de Collins por 24 ou 72 horas preserva sua organização estrutural macro e microscopicamente após esses períodos.
2. Os enxertos estocados nas soluções Wisconsin/Belzer ou Collins apresentaram alterações ultra-estruturais similares, mais acentuadas nos seguimentos de nervos após 72 horas.
3. Nos grupos de nervos conservados por 24 ou 72 horas em ambas as soluções, bem como nos grupos de enxertos transplantados as membranas epineurais e perineurais não apresentaram alterações organizacionais quando comparadas aos seguimentos dos nervos normal e nervo fresco respectivamente.
4. De acordo com as observações estruturais os enxertos mantidos na solução de Wisconsin/Belzer apresentaram um padrão regenerativo mais eficiente.....

6. Referências Bibliográficas Gerais

- ANSSELIN, A.D. and POLLARD, J.D. Immunopathological factors in peripheral nerve allograft rejection: quantification of lymphocyte invasion and major histocompatibility complex expression. **J. Neurol. Sci.**, **96**:75-88, 1990.
- ANSSELIN, A.D.; POLLARD, J.D.; DAVEY, D.F. Immunossupression in nerve allografting: is it desirable? **J. Neurol. Sci.**, **112**:160-169, 1992.
- ARCE, V.; POLLOCK, R. A.; PHILIPPE, J. M. ; PENNICA, D. ; HENDERSON, C. E.; D'LAPEYRIERE, O. Synergistic effects of schwann and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1). **J. Neurosci.**, **18**:1440-1448, 1998.
- ARCHIBALD, S.J.; KRARUP, C.; SHEFNER, J. et al. A collagen based guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and primates. **J.Comp.Neurol**, **306**:685-696, 1991.
- ASHUR, H.; VILNER, Y.; FINSTERBUSH, A. et al. Extent of fiber regeneration after peripheral nerve repairs: silicone splint vs. suture, gap vs. graft. **Exp.Neurol.**, **97**:365-374, 1987.
- BAIN, J.R.; MACKINNON, S. E.; HUDSON, A. R.; FALK, R. E., FALK, J. A. and HUNTER, D. A. The peripheral nerve allograft: A dose-response curve in the rat immunosuppressed with cyclosporin A. **Plast. Reconst. Surg.**, **82**:447-455, 1988 a.
- BAIN, J.R.; MACKINNON, S. E.; HUDSON, A. R.; FALK, R. E., FALK, J. A. and HUNTER, D. A. The peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. **Plast. Reconstr. Surg.**, **82**:1052-1066, 1988 b.
- BENTO, R.F.; MINITI, A. Comparision between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in intratemporal facial nerve of cats. **Acta OtoLaryngol.**, **465**:5-36, 1989.
- BENZEL, E.C. Management of peripheral Nerve Trauma. In: **The practice of neurosurgery**, Willians&Wilkins, Baltimore, 1996, p.28'49-2857.
- BEUCHE, W. and FRIED, R.L. The role of non-resident cells in wallerian degeneration. **J.Neurocytol.**, **13**:767-796, 1984.
- BLOCK, M.M. Microtubule transport and assembly cooperate to generate the microtubule array in growing axons. **Brain Res.**, **102**:61 -77, 1994.
- BRAUN, R.M. Comparative studies of neurorraphy and sutureless peripheral nerve repair. **Surg.Gynecol.Obs.**, **36**: 15-18, 1966.

- BRUNELLI, G. Attuali orientamenti per la riparazione die nervi della mano.
Riv.Chir.Mano,7:40, 1969.
- BUELHER, M.J.; SEABER, A.V.; URBANIAK,J.R. The relationship of functional return to varying methods of nerve repair. **J.Reconstr.Microsurg.**,6:61-69,1990.
- CAJAL, S.R. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner, p.459,1959.
- CARPENTER, M.B. Human neuroanatomy, Interamericana, 7a ed., p.700, 1988.
- DAHLIN, L.B. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. **Brain Res.**,679:274-280, 1995.
- DAS GUPTA, T.K. Mechanisms of rejection of peripheral nerve allografts. **Surg. Gynecol. Obstet.**,125:1058-1068, 1967.
- DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. An. alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. **Plast.Reconstr.Surg.**,82:849-856,1988.
- DODD,J. and JESSEL, T.M. Axon guidance and patterning of neuronal projections in vertebrates. **Science**, 242:641-799,1988.
- DONAT, J.R. and WISNIEWSKI, H.M. The spatio Temporal pattern of wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. **BrainPress**, 53:41 -53,1973.
- DUCKER, T.B.; HAYES, G. Experimental improvements in the use of silastic cuff of peripheral nerve repair. **J.Neurosurg.**,28:582, 1968.
- EVANS, G.R.D. Challenges to nerve regeneration. **Semin Surg Oncol** 19: 312-8 review, 2000.
- EVANS, P.J.; MIDHA, R.; MACKINNON, SE. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. **Prog. Neurobioi.**, 43:187-233,1994.
- FAVARO, G.; LANGONE, F.; SCHIAVINATO, A.; LINI, E.; SPINI, S.; CAVICCHIOLI, L.; DORIGATI,F.; GOVONI, E. Peripheral nerve regeneration through resoarbable hyaluronic acid ester and silicone nerve guides. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 18:271.2, 1992
- FAWCETT, J.W. and KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**,13:43-60,1990.
- FLYNN, W.F., Peripheral Nerve Injuries in the hand. in:**Hand Surgery, 2nd Edition**, Williams&Wilkins, Baltimore, 1975, p.282-294.

- FRANCEL, P.C.; FRANCEL, T.J.; MACKINNON SE., and HERTL, C. Enhancing Nerve Regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. **J. Neurosurg.**, **87**:887-892, 1997.
- FREEMAN, B. Adhesive neural anastomosis. **Plast. Reconstr.Surg.**,**35**: 167-176,1965.
- FULLERTON, A. On the use of a sleeve of vein in the nerve suture.**Br.Med.J.****28**:320, 1915.
- FUNAKOSHI, H.; FRISÉN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSK,T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V.M.K. and PERSSON, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J.Cell Biol.**,**123**:445-465, 1993.
- GRIFFIN, J.W.; KIDD, G. and IRAPP, B.D. Interaction Between axons and Schwann cells in **Peripheral Neuropathy**. Eds.P.J. Dick , P.K. Thomas,J.W.Griffin, P.A. Low and J.F. Poduslo. Saunders, Philadelphia, 1993, p.317-330.
- GROCHOWICZ, P.; ROMANIUK, A.; DIAMANTSTEIN, T.; OLSZEWSKI, W.L. Cyclosporin A versus monnoclonal antibody immunosuppression in peripheral nerve allografting. **Transplant. Proc.**, **21**:3181-3182, 1989.
- GULATI, A. K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat periperal nerve. **J. Neurosurg.**,**68**:117-123 , 1988.
- GULATI, A.K. Axon regeneration through blood vessel allografts after Cyclosporin treatment. **J. Neurosurg.**, **70**:115-121, 1989.
- GULATI, A.K. and ZALEWSKY, A.A. Basement membrane component changes in nerve allografts and isografts. **Muscle Nerve**, **8**:280-283, 1985.
- HAMAMBERG, H.; PIEHL, F. CULLHEIM, S. ; FJELL,J.; HOKFELT, T.; FRIED, K. GNDF mRNA in schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. **Neuroreport.**,**7**:857-860, 1996.
- HOLMES, W. Histological observations on the repair of nerves by autografts. **Brit. J. Surg.**,**35**:167-173, 1947.
- HORIE, H.; INAGAKI, Y.; SOHM, Y.;NOZAWA, R.; OKAWA, K.; HASEGAWA, M.; MURAMATSU, N.; KAWANO, H.; HORIE, M.; KOYAMA,H.; SAKAI,I.; TAKESHITA, K.; KOWADA, Y.; TAKANO, M.; KADOYA T. Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves, after axotomy, **The Journal of Neuroscience**, **19**:9964-9974, 1999.
- HUDSON, A.R.; HUNTER, D.; KLINE, DO. et al. Histological studies of experimental interfascicular graft repairs, **J.Neurosurg.**,**51** :333-340,1979.

- HURST, L.C. e BADALAMENTE, M.A. Biochemical proprieties of peripheral nerve. In: OPERATIVE nerve repair and reconstruction, 1991. Ed. R.H. Gelberman. Philadelphia, Lippincott, p.55-73.
- IDE, C. Nerve regeneration and Schwann cell basal lamina: observations of the long-term regeneration. **Archs. Histol. Jap.**, **46**:243-257, 1983.
- IDE, C; OSAWA, T; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through allogenic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. **Progr. Neurob.** **34**:1-38, 1990.
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, **288**: 61-75, 1983.
- JONES, L.L.; OUDEGA, M.; BUNGE, M.B. TUSZYNSKI, M.H. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury, **Journal of Physiology** **533**:1:83-89, 2001.
- KLINE, D.G.; HACKETT, E.R.; MAY, P.F. Evaluation of nerve injuries by evoked potentials and electromyography. **J. Neurosurg.** **31**:138, 1969.
- LANGONE, F. Estudo ultra-estrutural e morfométrico de nervos regenerados no interior de próteses tubulares. **São Paulo, 1991, 201p. tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da USP.**
- LANGONE, F.; LORAS.; VERONESE, F.M.; CALICETI, P.; PARNIGOTTO, P.P.; VALENTI, F. and PALMA, O. Peripheral Nerve Repair using a Poly(organo)Phosphazene Tubular Prothesis. **Biomaterials**, **16**:347-353, 1995.
- LANGONE, F.; OLIVEIRA, A. L. R.; ESQUISATTO, M.A.M.; CARENZA, M.; CALICETI, P.; LORA, S. Peripheral nerve repair using a new based collagen tubular prothesis: morphological analysis. **1st Smith & Nephew Intemotional Symposium - Advances in Tissue Engineenng and Biomatenals Abstracts**, **55**, 1997.
- LEFFERT, R.D. Surgery of the Peripheral Nerves and Brachial Plexus. In: **Operative Neurosurgical Techniques indications, Methods, and results. Grune & Stratton**, 2nd Ed., 1988, p.1563-1582.
- LORA, S.; OARENZA, M.; CALICETI, P.; ESQUISATTO, M.A.M.; OLIVEIRA, A. L. R.; LANGONE, F. A new based collagen tubular prothesis for nerve repair. **1st Smith & Nephew Intemotional Symposium - Advances in Tissue Engineenng and Biomaterials Abstracts**, **56**, 1997.
- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; BAIN, JR.; FALK, R.E.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration in the immunosuppressed host. **Plast. Reconst. Surg.**, **79**:436-444, 1987.

- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; FALK, R.E.; KLINE, D.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: an immunological assessment of pretreatment methods. **Neurosurgery**,**14**: 167-171, 1984a.
- MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; FALK, R.E.; KLINE, D.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: an immunological assessment of regeneration across pretreated nerve allografts. **Neurosurgery**,**15**: 690-693, 1984b.
- MACKINNON, S.E.; MIDHA, R.; BAIN, J.; HUNTER, D. WADE, J. An assessment of regeneration across peripheral nerve allografts in rats receiving short courser of Cyclosporin A. **Neuroscience**, **46**:585-593, 1992.
- MACKINNON, S.E. Techniques of Nerve Repair. In:**The prattice of neurosurgery** , Willians&Wilkins, Baltimore, 1996, p.2879-2908.
- MARAGH, H.; MEYER, B.S.; DAVENPORT, D. et al. Morphofunctional evaluation of fibrin glue versus microsuture nerve repairs. **J.Reconstr. Microsurg.**,v.6:331 - 337,1990.
- MARTIN, J.R. and WEBSTER, H de F. Mitotic schwann cells in developing nerve their changes in shape, fine structure and axons relationships. **Dev. Biol.**,**32**:41 7-431,1973.
- MILLES, H. ;MEISL, O.; BERGER, A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. **J. Bone Joint Surg.**,**54**:727-750, 1972.
- MILLES, H. Microsurgery of peripheral nerves. **Hand**,**5**:157-160, 1973.
- MILLES, H. Reappraisal of nerve repair, **Surg.Clin.North.Am.**,**61** :321-340,1981.
- MILLES,H. The nerve gap. theory and clinical practice. **Hand Clin.**,**2**:651-663, 1986.
- MOBERG,E. The unsolved problem-how to test the functional value of hand sensibility. **J. hand.**, 105-110, 1991.
- NARAKAS, A. Les greffes nerveuses, expérience clinique. **Ann. Chir. Main**,**8**:302-311,1989.
- ORTIZ-HIDALOO, O., and WELLER R.O. Peripheral Nervous System. In:Histology for Pathologists, **Raven Press Ltd., 2nd Ed.**, 1997, p.193.
- OSAWA, T.; IDE, C.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through cryo-treated xenogeneic nerve grafts. **Archs Histol. Jap.**,**50**:193-208, 1987.
- OSAWA, T.; IDE, C.; TOHYAMA, K. Nerve regeneration through the allogenic nerve grafts in mice. **Archs. Histol. Jap.**,**49**:69-81, 1986.

- PHAM, H.N.; PADILLA, J.A.; NGUYEN, K.D. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. **J.Reconstr.Microsurg.**,7:31 -36,1991.
- POLLARD, J.D. and FITZPATRICK, L. An ultrastructural comparison of peripheral nerve allografts and autografts. **Acta Neuropathol.**, 23:152-165, 1973.
- POLLARD, J.D. and McLEOD, J.G. Fresh and predegenerated nerve allografts and isografts in trembler mice. **Muscle Nerve**, 4:274-281, 1981.
- RAIVICH, O. and KREUTZBERG, G.W. Expression of growth factor receptors in injured nervous tissue. I. Axotomy leads to a shift in the cellular distribution of specific B-nerve growth factor binding in the injured regenerating PNS. **J.Neurocytol**,16:689-700,1987.
- ROSS, M.H. **Tecido Nervoso, Histologia Texto e Atlas. 2.Ed.**, Editora Médica Panamericana ,Rio de Janeiro, 1993, p.241 -304.
- ROULEAU, M.; OREPEAU, J.; IEIREAULI, L. et al. Facial Nerve sutures: epineural versus perineural sutures, **J.Otolaryngol.**,10:338-342, 1981.
- SCHOLZ, A. and REID, O. Ion Channels in human axons. **J.Neurophysiol.**,70:1274-1279, 1993.
- SEDDON, H. J. Nerve Grafting **J. Bone Joint Surg.**,45:447-461,1963.
- SEDDON, H. J. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. **Brit. J. Surg.**,35:151-167, 1947.
- SEDDON, H.J. Peripheral Nerve Injuries. Lond.: Her Majesty's Stationary Office,1954. (Medical Research Council;special reports series 282)
- SEDDON, H.J. Three types of nerve injury. **Brain**, 66:237-288,1943.
- SPEIGEL, I. J. Full autogenous nerve graft. **J. Neurosurg.**,6:421-422, 1949.
- STOLL, O.; ORIFFIN, J.W.; LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system Participation of both schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J. Neurocytol.**,18:671-683,1989.
- SUNDERLAND, S. and RAY, L. J. The selection and use of autografts for bridging gaps in injured nerves. **Brain**,70:75-92, 1947.
- SUNDERLAND, S. Funicular suture and exclusion in repair of severed nerves, **Brit. J. Surg.**,40:580-587, 1953.
- SUNDERLAND, S. **Nerve and Nerve Injuries.** 2nd. Ed. Edinburg,Scotland: Churchill Livingstone,1978.

- TANIUCHI, M.; CLARKE, H.B.; SCHWEITZER, J.B.; JOHNSON, E.M. Expression of nerve growth factor receptor by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, suppression by axonal contact and binding properties. **J. Neurosci.**, **8**:664-681, 1988.
- TOHYAMA, K.; IDE, C.; OSAWA, T. Nerve regeneration through the cryoinjured allogenic nerve graft in the rabbit. **Acta Neuropathol.**, **80**:138-144, 1990.
- TONA, A.; PERIDES, O.; RAHEMTULIA, F.; DAHL, D. Extracellular Matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. **J.Histochem. Cytochem.**, **41** (4):593-599, 1993.
- VESA, J.; KRÜTTGEN, A.; SHOOTER, E.M. p75 reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5, **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** **32**:24414–24420, 2000.
- WADHWANI, K.C. and RAPOPORT, SE. Transport properties of vertebrate blood-nerve barrier Comparison with blood-brain barrier. **Prog in Neurobiol.**, **43**:235-279, 1994.
- WALLER, A.V. Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. Philo. **Trans. R. Soc.**, **140**:423-9, 1850.
- WATABE, K.; FUKUDA, T.; TANAKA, J.; HONDA, H.; TOYOHARA, K.; SAKAY, O. Spontaneously immortalized adult mouse schwann cells secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities., **J. Neurosci Res.**, **41** :279-290, 1995.
- WATCHMAKER, G.P. ; Mackinnon S.E. Advances in peripheral nerve repair., **Clinics in Plastic Surgery** **1**:63-73, 1997.
- WAXMAN, S. G. and RIICHIE, J.M. Organization of ion channels in myelinated nerve fiber, **Science**, **228** :1502-1507, 1985.
- WHITE, F.V.; IOFWS, A.D.; GOODRUM, J.F.; NOVICKI, D.I.; BOULDINO, T.W.; MORREL, P. Lipid metabolism during early stages of wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. **J. Neurochemistry**, **52**:1085-1 092, 1989.
- WONG, A.Y.C. and SCOTT, J.J.A. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. **Exp. Neurol.**, **114**:364-366, 1991.
- WOODHALL, B. **Peripheral Nerve Injury**. Surg. Clin. North Am., (a) 1147 (b) 1162 (c), p.1165, 1954.
- YU, L.T.; ENGLAND, J.; HICKEY, W.F.; SUMMER, A.; RHEE, E.; ROSTAMI, A.;

- LAROSSA, D. Survival and function of peripheral nerve allografts after cessation of long-term Cyclosporin immunosuppression in rats. **Transplant. Proc.**, **21**:3178-3180, 1989.
- ZALEWSKI, A. A. and GULATI, A. K. Rejection of nerve allograft after cessation of immunosuppression with cyclosporin A. **Transplantation**, **31**:88-89, 1981.
- ZALEWSKI, A.A. and GULATI, A.K. Survival of nerve allografts in sensitized rats treated with Cyclosporin A. **J. Neurosurg.**, **60**:828-834, 1984.
- ZALEWSKI, A.A. and GULATI, A.K. Evaluation of histocompatibility as a factor in the repair of nerve with a frozen nerve allograft. **J. Neurosurg.**, **56**:550- 554, 1982.
- ZALEWSKI, A.A.; FAHY, G.M.; AZZAN, N.A.; AZZAN, R.N. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. **J. Comp. Neurol.**, **331**:134-147, 1993.
- ZHENG, JUN-QUI; KELLY, T.K.; CHANG, B.; RYAZANTSEV, S.; RAJASEKARAN, A.K.; MARTIN K.C.; TWISS, J.L. A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. **J. Neuroscience** **21**:9291-9303, 2001T.