

ANA PAULA INOE TOMAZINI

**Ação do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração nervosa periférica. Estudo experimental em camundongos.**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de Concentração:**

Cirurgia

**Orientador:**

Prof. Dr. Angelo João Stopiglia

São Paulo  
2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1295 Tomazini, Ana Paula Inoe  
FMVZ Ação do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração nervosa periférica. Estudo experimental em camundongos / Ana Paula Inoe Tomazini. -- São Paulo : A. P. I. Tomazini, 2003.  
165 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2003.

Programa de Pós-graduação: Cirurgia.  
Área de concentração: Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Angelo João Stopiglia.

1. Camundongos. 2. Nervos periféricos (regeneração). I. Título.

2003  
L 60550



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

*PARECER*

Interessado: Ana Paula Inoe Tomazini

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 329/2003, intitulado: "Ação do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração nervosa periférica. Estudo experimental no camundongo", foi utilizado 12 camundongos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, constatou que o mesmo foi realizado empregando protocolo de experimentação compatível com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 06 de junho de 2003

  
Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TOMAZINI, Ana Paula Inoe

Título: Ação do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração nervosa periférica. Estudo experimental em camundongos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de concentração Cirurgia

Aprovado em: 14/ 11 / 2003

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Angelo João Stopiglia

Instituição: FMVZ - USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes C. da Silva

Instituição: FMVZ - USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno

Instituição: FMVZ - USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Vilnei Mattioli Leite

Instituição: EPM - UNIFESP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira

Instituição: ICB- USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ao meu marido

Marcos e aos meus filhos

Maria Clara e João Francisco

dedico com carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Nada se faz sozinho, o desenvolvimento deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. À todas elas o nosso agradecimento, e de forma particular:

ao Prof. Dr. Angelo João Stopiglia pela orientação, pelo apoio, pelo incentivo e pela confiança durante todos estes anos;

ao Prof. Dr. Ciro Ferreira Da-Silva pelos ensinamentos, pela orientação e por ter proporcionado as condições para o desenvolvimento deste trabalho;

ao Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira pelo constante apoio, pelo auxílio e pelo incentivo inestimáveis ;

à Jennifer A. Biagioni Ribeiro, técnica do Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Histologia e Embriologia pelo grande auxílio através das preparações cirúrgicas, manutenção dos animais, preparação das lâminas para o estudo histológico e pela atenção dispensada em todos os momentos;

à Rosana C. Prisco pelo grande auxílio na análise estatística;

ao meu marido Marcos pelo carinho, apoio, dedicação e compreensão, por compartilhar as minhas angústias e dificuldades durante todos estes anos, dando-me força para prosseguir;

aos meus amados filhos Maria Clara e João Francisco por entenderem os momentos de ausência;

aos meus pais Paulo e Clara, que desde cedo me ensinaram a valorizar o trabalho e me mostraram os grandes valores da vida;

à querida Márcia pela amizade, dedicação e apoio em todos os momentos;

à Cecília pelo incentivo constante;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

## RESUMO

TOMAZINI, A. P. I. **Ação do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração nervosa periférica. Estudo experimental em camundongos.** [N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine on peripheral nerve regeneration. Experimental study in mice]. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Avaliou-se o efeito do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração de neurônios periféricos em animais adultos. O nervo ciático esquerdo de oito camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6J foi seccionado e o coto proximal e distal foram ancorados no interior de um tubo de polietileno (TP) com diâmetro interno de 0,76 mm, mantendo-se uma distância de quatro mm entre os mesmos. Os animais foram divididos aleatória e eqüitativamente em dois grupos e receberam 2 $\mu$ l de solução purificada de colágeno (Vitrogen®2,4 mg/ml) (COL) ou colágeno e MDP na proporção de 1:1 obtendo-se uma concentração de 1 mM (COL/MDP). Outros quatro animais não operados serviram como controle de normalidade (NOR). Após quatro semanas, os TP com os cabos de regeneração (CR) no seu interior, foram coletados para determinação do número de axônios mielínicos e da média do diâmetro das fibras mielínicas regeneradas. Os resultados revelaram diferença significativa no número de axônios entre os grupos NOR (4355  $\pm$  32), COL (1869  $\pm$  289) e COL/MDP (2430  $\pm$  223). Houve redução significativa no diâmetro das fibras mielínicas nos grupos que receberam as próteses tubulares (COL= 3,38  $\mu$ m  $\pm$  1,16 e COL/MDP= 3,54  $\mu$ m  $\pm$  1,16) quando comparados ao grupo NOR (6,19  $\mu$ m  $\pm$  2,45). O gânglio da raiz dorsal L5 também foi removido e



seccionado em série para a contagem e mensuração dos neurônios sensitivos.

O número de neurônios não diferiu entre os grupos experimentais (COL =  $564 \pm 51$  e COL/MDP =  $514 \pm 56$ ), os quais apresentaram menor número de neurônios sensitivos em relação ao grupo não operado (NOR =  $1097 \pm 142$ ). Os resultados indicam que a aplicação local do MDP estimula a regeneração de nervos em camundongos.

Palavras-chave: camundongo, tubulização, regeneração, nervo periférico, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina

## ABSTRACT

TOMAZINI, A. P. I. **N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine on peripheral nerve regeneration. Experimental study in mice.** [Ação do N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) na regeneração nervosa periférica. Estudo experimental em camundongos]. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) was evaluated for its effect on the regenerating peripheral neurons in adult animals. The left sciatic nerve of nine male adult mice C57BL/6J was cut, the proximal and distal nerve stumps were inserted into a polyethylene tube (PT) with 0,76 mm inner diameter, leaving a four mm distance gap. Animals were randomly distributed into two groups and received 2 $\mu$ l of purified preparation of collagen (Vitrogen® 2,4 mg/ml) (COL) or collagen and MDP made up in 1:1 volume ratio, obtaining a 1 mM (COL/MDP) concentration. Other four non-operated animals served as controls (NOR). After four weeks, PT with the regenerated nerve cables (RC), were processed for total myelinated axon counts and myelinated fiber diameter. The results revealed significant difference ( $p < 0.05$ ) in the axons count among the groups NOR ( $4355 \pm 32$ ), COL ( $1869 \pm 289$ ) and COL/MDP ( $2430 \pm 223$ ). There was a significant reduction in the diameter of myelinated fibers in the operated groups (COL =  $3,38 \mu\text{m} \pm 1,16$  and COL/MDP =  $3,54 \mu\text{m} \pm 1,16$ ) when compared to non-operated animals ( $6,19 \mu\text{m} \pm 2,45$ ). The L5 dorsal root ganglion (DRG) was also removed from the same mice and serially sectioned for sensory neurons count and measurement. No difference was found in

the number of DRG neurons among the experimental groups (COL =  $564 \pm 51$  and COL/MDP =  $514 \pm 56$ ), which presented fewer sensory neurons compared to non-operated group (NOR =  $1097 \pm 142$ ). The results indicate that the locally applied MDP stimulates peripheral nerve regeneration in mice.

Key-words: mouse, tubulization, regeneration, peripheral nerve, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{m}^2$	Micrômetro quadrado
aFGF	<i>Acidic fibroblast growth factor</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
CTL	Linfócito T citotóxico
cm	Centímetros
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
COL	Colágeno
COL/MDP	Colágeno associado a MDP
CR	Cabo de regeneração
CT-1	Cardiotrophin-1
DFM	Diâmetro da fibra mielínica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
g	Gramma
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolissacaride
M	Molar
MAPs	Proteínas associadas ao microtúbulo
MCP-1	<i>Macrophage chemotatic protein-1</i>
MDP	N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MIP1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
N-CAM	Molécula de adesão celular neuronal
Ng- CAM	<i>Neuron-glia-CAM</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
n $^{\circ}$	Número
NK	<i>natural Killer</i>
NOR	Normal
NOS	Óxido nítrico sintase
NT	<i>Neurotrophin</i>
OSM	Oncostatin M
pH	Percentual de hidrogênio
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
TGF- $\beta$	Fator de crescimento celular transformante $\beta$
Th	Células T <i>helper</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TP	Tubo de polietileno
Trk	<i>Tropomyosin receptor kinase</i>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
	2.1 Da estrutura do nervo e dinâmica axonal .....	20
	2.2 Da cirurgia dos nervos periféricos .....	25
	2.3 Da técnica de tubulização .....	29
	2.4 Da regeneração do nervo periférico .....	35
	2.4.1 O corpo celular e o segmento proximal .....	36
	2.4.2 O segmento distal .....	38
	2.4.3 No interior de próteses tubulares.....	41
	2.4.4 Aspectos morfométricos dos axônios em regeneração no interior de próteses tubulares .....	45
	2.5 Fatores que influenciam a regeneração do nervo .....	46
	2.6 Imunologia e neuroimunologia.....	55
	2.7 O N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP).....	66
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>69</b>
	3.1 Animais e aditivo .....	69
	3.2 Técnica cirúrgica para a tubulização .....	70
	3.3 Processamento para a microscopia óptica de luz.....	72
	3.4 Análise qualitativa .....	73
	3.5 Análise quantitativa .....	74
	3.6 Análise morfométrica .....	75
	3.7 Tratamento estatístico .....	76
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
	4.1 Dados qualitativos do cabo de regeneração e do nervo ciático .....	77
	4.1.1 Aspecto macroscópico.....	77
	4.1.2 Aspecto microscópico.....	77
	4.2 Dados quantitativos dos axônios mielínicos .....	79
	4.2.1. Número de axônios mielínicos.....	79
	4.2.2 . Morfometria das fibras mielínicas.....	82
	4.3. Dados qualitativos do gânglio espinhal .....	86

4.4. Dados quantitativos dos neurônios sensitivos .....	87
4.4.1 Número de neurônios sensitivos .....	87
4.4.2 Morfometria dos neurônios sensitivos .....	89
5 DISCUSSÃO .....	93
6 CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113
APÊNDICE.....	164





A seção ou esmagamento, por traumatismo, de um nervo periférico ainda constitui uma condição preocupante, pois a perda da função sensitiva e/ou motora são significantes, impossibilitando a realização de diversas atividades. Ao contrário de outras células do organismo animal, os neurônios não sofrem replicação. Vista desta perspectiva, a regeneração de um nervo lesado é um processo deficiente e desapontador que tem inspirado, de certa forma, vários experimentos no campo da cirurgia, neurologia e neurobiologia, na esperança de aumentar o processo reparador no sistema nervoso.

Durante décadas, os neurobiologistas vêm tentando explorar a complexa rede de fatores que regulam a sobrevivência e o crescimento neuronal *in vivo* e *in vitro*, bem como as exigências fundamentais ao crescimento e orientação axonal no local da lesão. O tratamento cirúrgico de um nervo lesado restringe-se ao preparo adequado das extremidades do nervo, ao posicionamento correto destas e à utilização precisa do microscópio cirúrgico para a sua sutura.

Os animais domésticos como os cães e gatos estão sujeitos a traumatismos que podem resultar na seção ou esmagamento de um nervo periférico.

Embora a cirurgia de um nervo periférico seja possível, vários fatores dificultam a obtenção de um reparo ideal, para a restauração funcional normal. Alguns fatores podem ser apontados como: a aposição precisa no local da neurorrafia; o número de neurônios que se mantém viáveis após a lesão; a condição dos tecidos alvos; o número limitado de sítios doadores disponíveis para corrigir defeitos extensos; a habilidade para orientar os fascículos e aumentar a regeneração. Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando elucidar os aspectos ora citados.

A técnica ideal preconizada para o tratamento da lesão de um nervo periférico é a sutura fascicular primária sem tensão, utilizando-se o microscópio cirúrgico e material de sutura monofilamentar n.º 9.0 ou 10.0, com técnica minuciosa, atraumática, permitindo o alinhamento fascicular. A introdução do microscópio cirúrgico e o conhecimento de vários aspectos acerca dos eventos que se seguem após a lesão e durante a regeneração de um nervo, possibilitaram o desenvolvimento de métodos tecnicamente precisos com aumento nas taxas de recuperação funcional.

O tipo de lesão pode influenciar negativamente a recuperação funcional. Se os cotos estiverem separados devido a uma falha segmentar, a entrada das projeções axoplasmáticas no coto distal pode ser precedida pela formação de tecido de granulação. As suturas microcirúrgicas e a cola de fibrina são freqüentemente utilizadas no reparo microcirúrgico de um nervo lesado, contudo, a união dos dois cotos pode criar problemas se houver o desenvolvimento de tensão após a união destes. O estiramento excessivo do nervo pode resultar em lesões estruturais do axônio e tecido vascular. Alguns materiais podem ser utilizados para corrigir falhas no nervo, objetivando obter sutura sem tensão, como os enxertos autólogos de nervos. Nos defeitos pequenos, as próteses constituem uma opção factível. A técnica da tubulização foi descrita no século XIX, com a utilização de osso descalcificado para criar um conduto à regeneração nervosa. Desde então, diversos materiais de origem biológica ou sintética, biodegradáveis ou não, têm sido utilizados na busca por um material ideal, com resultados variados. Alguns grupos relataram resultados iguais ou superiores aos obtidos com a sutura epineural, quando utilizaram a técnica da tubulização.

A tubulização possui a vantagem de atuar como câmara, permitindo a avaliação *in vivo* dos efeitos de várias substâncias, tais como fatores neurotróficos, fatores promotores de crescimento e componentes da matriz extracelular. A tubulização tem sido empregada por diversos autores, associada a fármacos que visam ao aumento nas taxas de recuperação axonal.

A resposta inflamatória constitui pré-requisito para a reparação do tecido lesado. Ela ocorre como consequência da lesão em todos os tecidos com capacidade regenerativa, incluindo o sistema nervoso periférico. Após a lesão, a reação inflamatória, que envolve macrófagos, resulta na fagocitose dos debris celulares e na secreção de citocinas, indicando a sua natureza fundamental no processo reparativo. Esta reação é necessária à restauração e à regeneração. Nos casos em que a reação inflamatória é insuficiente, o processo de regeneração tecidual ocorre lentamente, sendo, muitas vezes, incompleto. Contudo, a intervenção no processo de reparação através da introdução de células inflamatórias ou pela indução da reação inflamatória aceleram a regeneração tecidual.

O N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) é a unidade estrutural mínima responsável pela indução da resposta imune. O MDP possui características que favorecem a regeneração do sistema nervoso, pois estimula a fagocitose por parte das células imunocompetentes, facilitando a remoção da mielina sem afetar a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Assim, experimentalmente, já foi utilizado após lesão de medula espinhal com resultados positivos.

O presente trabalho visa a avaliação dos efeitos do MDP administrado local e imediatamente após a lesão do nervo ciático reparado com a técnica da tubulização em camundongos adultos, através de variáveis quantitativas.



## 2.1 - Da estrutura do nervo e dinâmica axonal

O neurônio é a unidade estrutural e funcional do tecido nervoso. Ele é composto por um corpo celular e seus prolongamentos, os dendritos e uma extensão longa, o axônio. A subunidade básica de qualquer nervo periférico é o axônio. Histologicamente o axônio pode ser visto com componentes distintos (DUCKER et al., 1966). A porção central de cada axônio é composto pelo axoplasma, que é uma extensão citoplasmática do corpo celular do neurônio. O axoplasma possui zonas responsáveis pelo transporte de nutrientes e componentes essenciais à sobrevivência axonal. A membrana celular envolve o axoplasma e é denominada axolema. Em torno da unidade axoplásmica está a célula de Schwann, que pode envolver uma ou mais unidades axoplásmicas. A membrana plasmática das células de Schwann forma lamelas concêntricas em torno do axônio. A bainha de mielina é uma espiral dupla de lipoproteína que é contígua à membrana plasmática da célula de Schwann. A formação da bainha de mielina ocorre durante o desenvolvimento das células de Schwann e constitui produto da extrusão citoplasmática da lamela. Uma fibra mielínica possui a célula de Schwann e as estruturas associadas envolvendo uma unidade axoplásmica. As fibras amielínicas não são tão organizadas histologicamente. Várias fibras de diâmetro reduzido são envolvidas por uma camada de citoplasma das células de Schwann (DUNCAN, 1980).

Cada célula de Schwann e sua bainha de mielina, envolvem uma zona histologicamente distinta, denominada segmento internodal . Os espaços entre dois

internodos são chamados nodos de Ranvier (DUCKER, 1972; PEACOCK; VANWINKLE, 1972).

Externamente à unidade célula de Schwann e ao axônio, está a membrana basal da célula de Schwann. Esta estrutura serve como demarcação histológica entre o tecido neural e elementos conjuntivos do nervo periférico. A lâmina basal é formada por matriz extracelular que contém colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, heparan sulfato e proteoglicanas (IDE et al., 1983). Imediatamente adjacente à membrana basal está o endoneuro, que é composto por dupla camada de colágeno, fibroblastos e células endoteliais da rede capilar endoneural. Este forma uma estrutura tubular ao redor da unidade axonal. A lâmina basal das células de Schwann associada às fibras colágenas do endoneuro forma a parede que limita externamente a fibra nervosa, denominada de tubo endoneural (SUNDERLAND, 1978). Os axônios e o endoneuro associados formam agregados denominados feixes nervosos, fascículos ou funículos (PEACOCK; VANWINKLE, 1972). Os macrófagos estão presentes no endoneuro, e freqüentemente localizados nas proximidades dos vasos sangüíneos endoneurais. Estas células retiram as substâncias estranhas do fluido endoneural e participam na defesa deste compartimento das influências exógenas (ARVIDSSON, 1977). Devido a sua capacidade de fagocitose, os macrófagos residentes constituem 2 a 4% dos componentes celulares do nervo periférico normal (GRIFFIN et al., 1993). Os mastócitos estão presentes no endoneuro de nervos normais. Eles podem influenciar direta ou indiretamente o microambiente do compartimento intrafascicular. Tais células são ricas em heparina, histamina e vários outros componentes biologicamente potentes, e podem degranular, liberando seus

produtos no fluído endoneural em diversos processos patológicos. Além disto, os mastócitos podem aumentar consideravelmente em número em certas neuropatias, com aumento dos seus produtos, contribuindo para a formação do edema vasogênico em algumas condições patológicas (POWELL et al., 1991).

Os fascículos são envoltos por colágeno, por células achatadas dispostas em lamelas concêntricas, o perineuro, que atua como barreira semipermeável às substâncias difusíveis, preservando o microambiente endoneural, e como arcabouço para os leitos vasculares. Envolvendo os fascículos está o revestimento mais externo, o epineuro, que é formado por uma rede de tecido conjuntivo denso, elastina e um rico aporte vascular. O epineuro protege o nervo dos traumas, possui propriedades elásticas e fornece resistência à tração (DUCKER, 1972; DUNCAN, 1980).

A transmissão de impulsos bem como o transporte axonal exigem um suprimento energético constante. Os nervos periféricos são estruturas bem vascularizadas com sistemas microvasculares separados, porém interconectados no epineuro, perineuro e endoneuro (LUNDBORG, 1975). O padrão vascular é caracterizado por vasos orientados longitudinalmente, que se comunicam por um grande número de anastomoses (LUNDBORG, 1988b). Há um sistema vascular intrínseco, que consiste em plexos vasculares no epi, peri e endoneuro e em um sistema extrínseco envolvendo vasos regionais segmentares que se aproximam do tronco nervoso em vários locais ao longo do seu curso (LUNDBORG, 1988b). As arteríolas nutridoras surgem a intervalos irregulares, cursam nas proximidades dos nervos periféricos e estão contidas por tecido conjuntivo delicado denominado mesoneuro. Todos os vasos penetram no nervo através da borda mesoneural. Após



entrar pelo epineuro, as arteríolas ramificam-se formando uma rede anastomótica de vasos sanguíneos longitudinais segmentares (LUNDBORG, 1988b).

Os pequenos vasos endoneurais possuem células endoteliais hermeticamente justapostas que coíbem a passagem de várias substâncias, como proteínas e marcadores. Tais aspectos parecem constituir a base anatômica da barreira sangue-nervo (OLSSON; REESE, 1971), enquanto os vasos epineurais permitem a sua passagem (LUNDBORG, 1988b).

A matriz extracelular está organizada ao redor da membrana basal, nos nervos periféricos, no espaço perineural. Dentre os constituintes moleculares da matriz extracelular, estão o colágeno, fibronectina, glicoproteínas e proteoglicanas (CARBONETTO; DAVID, 1993). O endoneuro possui uma quantidade substancial de colágeno que constitui uma das substâncias mais importantes do tecido conjuntivo que forma o esqueleto dos fascículos. A matriz permite que o nervo tenha resistência à tensão e compressão.

A laminina e a fibronectina são as principais glicoproteínas da matriz extracelular que também estão associadas à adesão celular e provêm suporte ao crescimento axonal. As glicosaminoglicanas são açúcares poliméricos usualmente associados a proteínas, constituindo proteoglicanas. As proteoglicanas, especialmente as que contêm heparam sulfato ou heparina, atuam como substrato para o crescimento axonal (LUNDBORG et al., 1994).

O espaço extracelular dos fascículos nervosos recebe continuamente componentes fluidos dos vasos endoneurais. O fluido é parcialmente reabsorvido pelos microvasos. A maior parte do metabolismo da célula nervosa está concentrada no corpo celular, onde ocorre a síntese de materiais necessários à

manutenção da integridade funcional e estrutural do axônio e seus terminais, tornando necessária a existência de transporte intracelular no neurônio. Para suprir tais necessidades, o neurônio possui um sistema único de transporte intracelular anterógrado e retrógrado. Através do transporte anterógrado, uma grande variedade de substâncias produzidas no corpo celular são transportadas ao longo do axônio com taxas diferentes. Algumas destas substâncias possuem papéis funcionais nos neurônios, como é o caso dos neurotransmissores, seus precursores ou as enzimas necessárias à transmissão nos terminais axonais. O transporte axonal também envolve organelas inteiras, como mitocôndrias, assim como glicoproteínas ou proteínas destinadas à incorporação na membrana celular ou à construção dos componentes do citoesqueleto, como microtúbulos, neurofilamentos e microfilamentos (LUNDBORG, 1988a). Dois componentes principais do transporte axonal têm sido descritos: o transporte lento (0,1 a 30 mm/ dia) envolvendo elementos do citoesqueleto (MCLEAN; MCKAY, 1983), e o transporte rápido (400 mm/ dia) que leva principalmente vesículas de transmissores, constituintes da membrana plasmática, como glicoproteínas, lipídeos e enzimas (MCLEAN; MCKAY, 1983).

O transporte axonal não é unidirecional. Existe um transporte retrógrado a partir dos terminais do axônio para o corpo celular, dentro desta rede de microtúbulos. Vários materiais extracelulares podem ser absorvidos pelos terminais axonais ou extremidades dos axônios seccionados (DAHLIN; MCLEAN, 1986). A velocidade de transporte retrógrado tem sido estimada em 100 a 290 mm/dia, mas um componente lento (3-8 mm/dia) também foi relatado. A função do transporte retrógrado é restituir membranas ao corpo celular (DAHLIN; MCLEAN, 1986). Além

do material membranoso, algumas enzimas, proteínas e fosfolípídeos parecem participar do transporte retrógrado (LUNDBORG, 1988a). O transporte envolve a transferência de informações a respeito dos axônios e do microambiente nos terminais, através de substâncias derivadas dos órgãos alvo ou das células de Schwann, com ação trófica no corpo celular (VARON; ADLER, 1980; LUNDBORG et al., 1994).

## **2.2 - Da cirurgia dos nervos periféricos**

As lesões dos nervos periféricos são freqüentemente encontradas na prática veterinária e normalmente estão associadas a traumas mecânicos como as fraturas dos membros locomotores, fraturas pélvicas e mordeduras. Devido a sua localização anatômica, alguns nervos são mais vulneráveis aos traumas (BENNETT, 1976; CHAMBERS ; HARDIE, 1986; GILMORE, 1984;).

Tais lesões ocorrem em diferentes graus e, quando não tratadas, podem ter conseqüências graves, com a perda da função sensitiva e motora. Quando o tratamento clínico não é suficiente para promover a reabilitação funcional do nervo afetado, a restauração cirúrgica do tecido lesado torna-se imprescindível.

A partir de 1850, com os trabalhos de Augustus Waller, soube-se que um nervo quando seccionado sofre processo de degeneração da bainha de mielina e desaparecimento de axônios na sua porção distal. Neste contexto, diversos pesquisadores passaram a estudar os processos que envolvem a regeneração nervosa periférica (CHAMBERLAIN et al., 2000; PATRICK et al., 2001; SUNDERLAND; BRADLEY, 1950; THOMAS, 1964).

O fenômeno da regeneração nervosa foi demonstrado no início do século por RAMÓN y CAJAL (1928), que demonstrou que as fibras nervosas viáveis de um nervo periférico degenerado originam-se e crescem a partir do coto proximal e não através da auto-regeneração da porção distal degenerada. A literatura concernente aos fenômenos relativos à regeneração dos nervos periféricos, em seus diferentes aspectos, tornou-se ampla e, a cada dia, novos dados são obtidos (BARDE et al., 1983; DAHLIN, 1992; DUBUISSON et al., 1993; LEVI-MONTALCINI, 1987; SIEMIONOW et al., 2002).

Diversos pesquisadores vêm investigando técnicas inovadoras com a finalidade de obter a reabilitação sensitiva e motora nos traumatismos dos nervos periféricos (CALDER; NORRIS, 1993; DOI et al., 1992; DUKER; HAYEES, 1968; HINCKLEY et al., 1991; MACKINNON et al., 2001; MATTAR Jr, et al., 1990; MERLE; DAUTEL, 1991; MOURAD et al., 2001; SUD et al., 2001; WEINZWEIG et al., 2000). O objetivo primário do cirurgião é restaurar a reinervação correta dos alvos periféricos o mais rápido possível.

Na prática cirúrgica, o nervo periférico seccionado deve ser reparado através da sutura primária dos cotos separados, sem tensão entre os cotos, com técnica cirúrgica meticulosa. Várias técnicas têm sido empregadas, visando a reparação de tais lesões, como as neurorrafias epineurais, perineurais e epiperineurais (BORA JR, 1978; LEVINTHAL, 1977; STOPIGLIA; ERHART, 1987; TUPPER et al., 1988).

As lesões dos nervos periféricos mais significantes são aquelas resultantes de uma falha (“gap”) na continuidade do nervo. Tais defeitos ocorrem quando há perda segmentar do nervo, quer causada por traumatismos quer intencionalmente provocada durante o tratamento de neoplasias ou lesões de continuidade

(MELENDZ et al., 2001; TOH; FRIEDMAN., 2001). O tratamento cirúrgico tardio de lesões nervosas também resulta na formação de falhas segmentares devido à retração dos cotos do nervo. As opções de correção cirúrgica consistem de técnicas como transposição de nervo, neurotização, reposicionamento articular, encurtamento ósseo, dentre outras (McCALLISTER et al., 2001). Contudo, estas falhas ainda representam um desafio quanto ao procedimento cirúrgico empregado (WOOD et al., 1991).

Importante opção no tratamento das lesões dos nervos periféricos, são as neurorrafias término-laterais. Este tipo de neurorrafia foi introduzido no século passado (GLUCK, 1903 apud SHERREN, 1906; MANASSE, 1900 apud BALLANCE et al., 1903; SICK, 1905 apud SHERREN, 1906). A literatura a tal respeito recomendava que fossem realizadas incisões nos nervos doadores e, neste local, fossem introduzidos os nervos receptores. As incisões nos nervos doadores provocavam prejuízos funcionais nas estruturas por eles inervadas. Provavelmente devido a este fato, Babcock (1927) sugeriu o abandono deste tipo de neurorrafia. Esta representa opção no tratamento das lesões dos nervos periféricos nas quais somente o coto distal está disponível. A neurorrafia término-lateral, reintroduzida por Viterbo (1992), sem a incisão do nervo doador e até mesmo sem a remoção do epineuro, representa importante contribuição no tratamento das lesões dos nervos periféricos. Este detalhe é de extrema importância, pois possibilita a reinervação de uma estrutura sem o prejuízo de outra originalmente inervada pelo nervo doador. Trabalhos experimentais em ratos e mais tarde os resultados clínicos em paralisia facial (VITERBO, 1992 e 1993; VITERBO et al., 1993, YAMAUCHI et al., 2001) demonstraram que esta técnica permite o tratamento de casos específicos.

McCALLISTER et al. (2001) sugeriram a utilização do epineuro de um nervo intacto como ponte para o crescimento de axônios em regeneração. Através da sutura dos cotos proximal e distal do nervo lesado lateralmente a um nervo íntegro, os autores concluíram que os axônios em regeneração podem passar através do epineuro de um nervo intacto antes de chegar ao coto distal do nervo lesado suturado lateralmente ao nervo íntegro. A técnica de ponte de nervo intacto pode constituir uma possível alternativa aos enxertos de nervo.

Recentemente, a dissecação ortotópica do epineuro, seguida do deslizamento sobre a linha de sutura ou sobre falhas segmentares, foi descrita com resultados positivos. Esta técnica possui como vantagem a utilização de material disponível no local da cirurgia, que faz parte do tecido nervoso, constitui uma técnica simples, não necessitando de material especial (AYHAN et al., 2000; SIEMIONOW, et al., 2002; YAVUZER et al., 2002).

Nos casos em que a falha do nervo seccionado é significativa, a neurorrafia término-terminal deve ser evitada, pois a tensão no nível da sutura causa proliferação de tecido conjuntivo, o qual interfere na maturação dos axônios, constituindo fator negativo para a reabilitação funcional do nervo lesado (KIM et al., 1991; MIYAMOTO, 1979). A utilização de tecidos que evitem a tensão sobre a linha de sutura constitui uma opção em tais casos (CALDER; NORRIS, 1993; HEMS; GLASBY, 1992; MACKINNON et al., 2001; TERZIS et al., 1975). Dentre as possibilidades de tratamento, o enxerto com nervo autólogo tem sido o método mais utilizado (KUMAR; HASSAN, 2002; MILLESI et al., 1972; WONG; SCOTT, 1991), especialmente nos grandes defeitos. Esta técnica produz bons resultados. Contudo, a colheita de um enxerto autólogo de nervo possui várias desvantagens como a

perda da função do nervo doador e a possibilidade de desenvolvimento de neuroma doloroso no sítio doador (DEN DUNNEN et al., 1996; HADLOCK et al., 1998).

### **2.3 – Da técnica de tubulização**

Além dos enxertos de nervos, outros materiais biológicos e sintéticos têm sido empregados com o objetivo de diminuir a tensão sobre a linha de sutura. Dentre outras possibilidades, a tubulização tem despertado grande interesse. A idéia de se reparar defeito em um nervo, com o emprego de um tubo não neural possui uma longa tradição, iniciada no século XIX, infelizmente com sucesso limitado (SMAHEL et al., 1993). Esta técnica, também conhecida por entubulização, consiste na implantação de uma prótese tubular ao redor da sutura no nervo ou sobre um defeito. Nesta técnica, as extremidades dos nervos são colocadas no interior do tubo e fixadas mantendo-se (método indireto) ou não (método direto) uma distância entre os cotos, através de sutura (HEIJKE et al., 2001). Além de evitar a lesão a um nervo doador, tais condutos, evitam a entrada de tecido conjuntivo no defeito, permitem a redução no número de suturas, confinam os cotos, criando um microambiente ao redor destes, permitem o contato entre as células e fatores tróficos com a região em regeneração, evitando a perda destes fatores, além de direcionar o crescimento axonal (FRANCEL et al., 1997; GILCHRIST, et al., 1998; HEIJKE, et al., 2001; TERRIS; FEE, 1993).

Um conceito interessante, considerado recentemente, é a possibilidade de que a tubulização constitui uma opção nos pequenos defeitos, pois apresenta resultados superiores aos da sutura epineural mesmo quando a sutura dos cotos é

possível sem tensão, além de evitar a lesão do nervo doador (DEN DUNNEN et al., 1996, KUMAR; HASSAN, 2002). A tubulização com uma pequena falha é preferível a sutura epineural com alinhamento inadequado. O espaço entre os cotos pode aumentar as chances de as fibras em regeneração alcançarem os tubos distais adequados devido à ação de fatores neurotróficos derivados dos órgãos-alvo (HASEGAWA et al., 1996, LUO; LU, 1996) .

Experimentalmente, a tubulização possui a vantagem de atuar como câmara, permitindo a avaliação *in vivo* dos efeitos de várias substâncias, tais como fatores neurotróficos, fatores promotores de crescimento e componentes da matriz extracelular (DA-SILVA, 1999; DA-SILVA et al., 1996; LAINETTI; DA-SILVA, 1993; LAINETTI et al., 1998; PEREIRA et al., 1998 e 2000). A tubulização especialmente com material biodegradável (DA-SILVA et al., 1985) tem sido empregada por diversos autores, associada a fármacos que visam ao aumento nas taxas de recuperação axonal (DA-SILVA, 2001; MOHAMMAD et al., 2000b). Dentre os vários componentes da matriz extracelular que figuram entre os aditivos utilizados; a laminina promoveu o crescimento axonal através do tubo (MADISON et al., 1985) assim como outros constituintes da matriz extracelular. A inclusão de um pequeno segmento de nervo autólogo dentro do tubo (FRANCEL et al., 1997) parece constituir uma fonte de células de Schwann e de fatores tróficos. A utilização direta de células de Schwann neste ambiente em regeneração também tem sido documentada com efeitos favoráveis, mesmo em se tratando de células cultivadas (BRYAN et al., 1996; GULATI et al., 1995; OGDEN et al., 2000)

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando à obtenção de um material ideal para a confecção das próteses tubulares. Inicialmente os tecidos



utilizados foram as artérias, veias e ossos (GILCHRIST et al., 1998; HEIJKE, et al., 2001). Cirurgiões, dentro desta linha de pesquisa, têm utilizado materiais orgânicos como tubos mesoteliais (LUNDBORG et al., 1982**b**; MACKINNON et al., 1985), vasos (CHIU et al., 1982; GULATI, 1989), tubos de colágeno (EPPLEY; DELFINO, 1988; MACKINNON; DELLON, 1990), membrana amniótica (MOHAMMAD et al., 2000 **a e b**), músculos (GSCHMEISSNER et al., 1990), entre outros. Materiais inorgânicos também têm sido implantados, tais como silicone (SANTOS et al., 1999; STOPIGLIA, 1992; STOPIGLIA et al., 1998), poliésteres (DEN DUNNEN et al., 1993), ácido poliglicólico (MATSUMOTO et al., 2000 **a e b**), outros materiais aloplásticos (ASHUR et al., 1987; GIBSON; DANILOFF, 1989; RENDE et al., 1991) e tubos de material sintético biodegradável (DELLON; MACKINNON, 1988; HENTZ et al., 1991; LENIHAN et al., 1998; PHAM et al., 1991; ZELLEM et al., 1989 ). Algumas das desvantagens associadas a tubulização incluem a reação de corpo estranho, o colapso do conduto, a invasão por tecido de granulação e a necessidade de um segundo procedimento para a retirada de componentes inabsorvíveis (McCALLISTER et al., 2001).

O tubo ideal deveria possuir simultaneamente as seguintes características: ser completamente reabsorvido através das vias metabólicas normais, poroso o suficiente para facilitar a passagem de fluídos e o transporte de oxigênio, ser biocompatível, atóxico e não carcinogênico, deve possuir diâmetro interno adequado e parede fina (FIELDS et al., 1989; GILCHRIST et al., 1998; NYILAS et al., 1983;).

Vários tipos de materiais foram sugeridos. Apesar dos dados que desencorajam o uso de material inabsorvível. As pesquisas com tubos de silicone continuam a ser desenvolvidas. A utilização clínica do silicone provoca alterações crônicas e degeneração walleriana mesmo quando o tubo não promove compressão (FERREIRA et al., 2002). Diversos autores que advogavam a tubulização com silicone no passado, atualmente concordam que os condutos biodegradáveis são preferíveis (TERRIS; FEE, 1993), pois estes são absorvidos ou dissolvidos quando o processo regenerativo está completo. Os tubos com taxa de degradação mais lenta são preferíveis na reparação de defeitos extensos (KIYOTANI et al., 1996).

As dimensões dos tubos afetam significativamente a regeneração, devendo-se considerar o diâmetro do tubo em relação ao nervo a ser reparado. O tubo deve ser largo o suficiente para acomodar qualquer edema do nervo e não deve por si só comprimir o nervo quando da sua regeneração. A área interna de seção do tubo deve possuir de 2,5 a três vezes o diâmetro do nervo. Durante a regeneração, o axônio traumatizado aumenta consideravelmente seu diâmetro, havendo compressão quando da utilização de tubos estreitos, com o possível desenvolvimento de neuromas proximal e distalmente ao tubo (DUCKER; HAYES, 1968; DUCKER et al., 1966). Os tubos com diâmetro superior a três vezes o diâmetro do nervo são ineficazes, pois podem permitir a invasão de tecido conjuntivo, impedindo o crescimento axonal (DUCKER; HAYES, 1968).

A utilização de estruturas tubulares com o mesmo diâmetro de um nervo intacto não provocou alterações fisiológicas ou morfológicas até o 4º mês. Contudo, os tubos de silicone justos devem ser evitados (SMAHEL et al., 1993), pois, a partir deste período, observou-se fibrose epineural, espessamento perineural,

desaparecimento das fibras mielínicas de maior diâmetro e alteração funcional (MACKINNON et al., 1984). A utilização de tubos justos, via de regra, parece incitar alterações degenerativas (SMAHEL et al., 1993).

O microambiente no local da regeneração nervosa é, de fato, importante, sendo que a permeabilidade da prótese também possui efeito sobre os resultados. Os tubos devem ainda permitir a passagem de nutrientes e suprimento sanguíneo até o nervo em regeneração (TERRIS; FEE, 1993). Os tubos permeáveis apresentaram índices de recuperação superiores com relação aos impermeáveis (KIYOTANI et al., 1996). Postulou-se que os tubos com macroporos permitem que os fatores neurotróficos constituam proteínas macromoleculares que chegam ao local do reparo nervoso (KIM et al., 1993). Jenq et al. (1987) sugerem que as células do tecido conjuntivo ganham acesso ao tecido em regeneração através da parede dos tubos, auxiliando a regeneração.

O aumento na extensão do defeito influencia negativamente a regeneração no interior de próteses tubulares, como resultado de formação ineficiente de matriz, reduzindo possibilidades de influência dos fatores tróficos do coto distal (LUNDBORG, 1991). Os fatores neurotróficos secretados no coto distal facilitam a regeneração. Porém, quando há aumento na extensão do conduto, o efeito de atrair os axônios em regeneração, parece ficar comprometido (STRAUCH et al., 1996). Alguns relatos têm demonstrado que a regeneração máxima no interior de um tubo, em coelhos, é de 3 cm (STRAUCH et al., 1996). Em primatas, houve regeneração através de uma distância de 3 cm em um tubo pseudosinovial (MACKINNON et al., 1985). O preenchimento do tubo com substâncias que aumentem a velocidade de regeneração axonal, permite aumentar a distância entre os cotos. Da Silva et al.

(1985) induziram o crescimento axonal através de uma distância de 20 mm dentro de tubos preenchidos com laminina ou colágeno.

Longo et al. (1983b) demonstraram o acúmulo de fatores neurotróficos em tubo de silicone. Estes autores constataram que a presença do coto distal do nervo, no interior do conduto, era essencial para que ocorresse a regeneração nos primeiros milímetros. Kyiotani et al. (1996) observaram que o limite da influência da extremidade do nervo em regeneração restringe-se a uma distância entre os cotos de 10 mm. Lundborg et al. (1982 a e b) avaliaram a influência dos cotos distais do nervo, na regeneração em ratos. Em seus experimentos, observaram regeneração através de um defeito de 10 mm na presença de um coto distal, mas não houve regeneração em um defeito de 15 mm. Tal fato sugere que a regeneração possui uma especificidade por um tecido alvo. Acredita-se que o nervo distal ou os órgãos alvo atraem e influenciam a regeneração através de fatores neurotróficos difusíveis (TOS et al., 2000).

O crescimento axonal, através de uma distância limitada dentro de próteses tubulares, indica a necessidade de um segmento distal. O efeito promotor do crescimento do segmento distal nos tubos pode ocorrer pela difusão de fatores e/ou células dentro da matriz, no interior de próteses tubulares (LUNDBORG, 1988a). A presença de um segmento distal influencia o grau de regeneração no segmento proximal através de próteses tubulares. Não há regeneração sem a presença de um segmento distal ou se ele for substituído por um tecido não nervoso como pele ou tendão (LUNDBORG, 1988a).

Após a introdução dos segmentos proximal e distal dentro de uma prótese tubular de silicone, há o acúmulo de um fluido seroso dentro de horas (LONGO et al., 1983 **a** e **b**). O fluido continua a envolver os eventos morfológicos subseqüentes que resultam na formação de um tronco nervoso. Dentro deste contexto, este fluido proveria a presença de fatores neurotróficos, fatores promotores de neuritos (LONGO et al., 1983 **a** e **b**, 1984) e fatores que promovem adesão, motilidade e proliferação das células de Schwann (LE BEAU et al., 1988**b**). Além disto, agentes exógenos podem ser adicionados a este fluido visando a aumentar a regeneração (FIELDS et al., 1989).

#### **2. 4- Da regeneração do nervo periférico**

A lesão de um nervo periférico incita respostas que envolvem seqüência de alterações moleculares e morfológicas no sistema nervoso que são particularmente pronunciadas em três locais diferentes: no local da lesão, no corpo celular dos neurônios lesados e nas células não neuronais adjacentes (GALIANO et al., 2001). O processo de regeneração nas lesões dos nervos é único entre os tecidos, pois leva ao reparo celular ao invés do reparo tecidual. Durante este processo é essencial que ocorra troca bioquímica entre o centro e a periferia, através de transporte axonal anterógrado e retrógrado. As células nervosas têm que recuperar o seu volume emitindo novos processos para compensar a porção amputada. Cada componente do nervo lesado reage de maneira particular ao traumatismo. O número de neurônios não aumenta, mas o reparo de cada célula ocorre em meio a

intensa proliferação celular como fibroblastos e células de Schwann (LUNDBORG, 1988a).

#### **2.4.1 - O corpo celular e o segmento proximal**

A lesão de um axônio, pode levar à morte de alguns neurônios dos gânglios dorsais. Tais lesões também evocam várias alterações estruturais e funcionais nos corpos celulares dos neurônios sobreviventes, que são revertidas após a ocorrência do processo de regeneração (HIMES; TESSLER, 1989). A amputação da parte distal do neurônio leva a alterações nas porções proximais restantes, incluindo a preparação metabólica para a reposição do volume axoplasmático perdido. O corpo celular é o local de maior síntese de proteínas e substâncias necessárias ao crescimento axonal (WONG; OBLINGER, 1989). A resposta típica do corpo celular à lesão do seu axônio inclui aumento do volume do corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia e desaparecimento do material basofílico do citoplasma. Tal reação reflete alteração no arranjo e concentração do ácido ribonucleico intracitoplasmático, denominada cromatólise, que conduz a alterações na síntese protéica importantes na regeneração axonal (LUNDBORG, 1988b). O grau de alteração celular depende do nível em que ocorre a lesão em relação ao corpo celular. Se a lesão for próxima ao corpo celular, proporcionalmente, haverá maior perda de axoplasma, exigindo maior biossíntese para que haja a regeneração. A lesão muito proximal pode exceder a capacidade de biossíntese da célula, levando a falha na regeneração (DUCKER et al., 1966). No nível molecular, os neurônios lesados apresentam aumento na síntese de proteínas associadas ao crescimento

(BENOWITZ et al., 1981), neuropeptídeos (RAIVICH et al., 1994), citocinas e neurotrofinas (GALIANO et al., 2001; ZHONG et al., 1999) e moléculas de adesão celular (JONES et al., 2000).

Com a transecção do nervo periférico, ocorrem alterações significativas na morfologia e organização tecidual em ambos os cotos. Há retração dos cotos devido à presença de tecido elástico dentro da bainha epineural. Ocorre hemorragia e formação de coágulo na extremidade dos cotos. No coto proximal, os axônios degeneram por certa distância, deixando o tubo endoneural vazio. Tal degeneração retrógrada pode se estender a um ou mais segmentos internodais, e o comprometimento depende da severidade da lesão (RAMÓN y CAJAL, 1928). A bainha de mielina perde a sua característica estratificada, os macrófagos digerem e removem a mielina degenerada. As células de Schwann respondem “vigorosamente” e proliferam formando cordões densos ao longo do eixo do axoplasma. Tais cordões possuem propriedades fagocíticas e retiram porções do axônio degenerado, fragmentos de mielina e outros debris celulares (DUCKER et al., 1966, PEACKOK; VANWINKLE, 1972). Dentro de poucos dias após a lesão, os axônios no coto proximal começam o processo de regeneração, produzindo grande número de projeções axoplasmáticas colaterais e terminais. O mecanismo que dispara o processo de projeção não é completamente conhecido e parece ser modulado por fatores locais no microambiente. Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o fenômeno de brotamento, como a liberação de substâncias a partir dos tecidos em degeneração, bainhas de nervo sem axônios ou músculos inativos. Sugere-se ainda que as terminações nervosas normalmente

liberam fatores que previnem o brotamento, portanto quando o nervo é lesado, o brotamento deixa de ser inibido (DIAMOND et al., 1976, VARON; ADLER, 1980). A resposta neuronal à lesão de um nervo periférico interrompe a sinalização originária do alvo e ativa as células de Schwann e macrófagos locais a sintetizarem fatores de crescimento, citocinas e moléculas de superfície promotoras do crescimento. Os genes que iniciam e mantêm o crescimento axonal são especificamente ativados (SNIDER et al., 2002). Nas primeiras semanas observa-se vários axônios, alguns podem estar circundados por células de Schwann, envoltas por uma única camada de lâmina basal. Ocorre a diminuição no número de brotamentos quando alguns axônios fazem conexões periféricas, sofrendo maturação (BRUSHART, 1988).

#### **2.4.2 - O segmento distal**

Quando a continuidade do axônio é interrompida, ocorrem alterações metabólicas e estruturais no segmento distal à lesão, envolvendo o axônio, a bainha de mielina, as células de Schwann bem como o colágeno endoneural. Este processo foi inicialmente descrito por Waller (1850) e é denominado degeneração walleriana. O padrão da degeneração walleriana não é um processo uniforme e o quadro histológico varia com a distância do ponto de lesão. Ela segue um padrão centrífugo de progressão (DONAT; WISNIEWSKI, 1973) no sentido distal (LUBINSKA, 1982). Os primeiros estágios deste processo incluem a desintegração dos microtúbulos e neurofilamentos por proteólise (LUBINSKA, 1982). De acordo com a teoria proposta por Schaeffer et al. (1979), a degeneração do citoesqueleto é



iniciada por um influxo de íons cálcio derivados do microambiente, o qual ativa as proteases que passam a degradar o citoesqueleto, especialmente os neurofilamentos.

O esmagamento e a seção do nervo provocam reações celulares no local da lesão primária, como a ruptura de mastócitos endoneurais seguida da liberação de aminas e outros compostos no endoneuro. Ocorre aumento na formação de colágeno endoneural que se acumula na superfície externa da membrana basal da célula de Schwann (THOMAS, 1964), resultando em espessamento da bainha. Com a progressão, o colágeno torna-se denso, provocando o estreitamento dos tubos endoneurais.

Os macrófagos exercem papel essencial na remoção da mielina e debris durante o processo de degeneração e também são importantes na regeneração. A seção do nervo estimula a ação de macrófagos residentes e a migração de macrófagos circulantes, que passam a fagocitar a mielina (STOLL et al., 1989). Estas células produzem a citocina IL-1 que estimula as células de Schwann dentro de 24 horas (LE BEAU et al., 1988b), embora a proliferação das células de Schwann não seja totalmente dependente da infiltração dos macrófagos (KIEFER et al., 2001). Os macrófagos secretam diversos fatores de crescimento e diferenciação para as células de Schwann. As células de Schwann passam a expressar uma proteína que estimula a sua proliferação e se unem aos macrófagos no processo de fagocitose da mielina (STOLL et al., 1989). Além disto, eles facilitam a regeneração axonal através da secreção de fatores de crescimento e citocinas (IL-1) que por sua vez estimulam a secreção de fatores de crescimento pelas células de Schwann

(NGF) (KIEFER et al., 2001; LINDHOLM et al., 1987). As células de Schwann sofrem mitose e formam cordões (bandas de Büngner), que servem como guia aos axônios em crescimento. Com o decorrer do tempo, há um declínio gradual no número de células de Schwann nos casos em que não houve crescimento axonal (WEINBERG; SPENCER, 1978). As células de Schwann reabsorvem lipídeos e isolam as espirais de mielina. Na fibras mielínicas pequenas é possível que elas sejam capazes de remover a mielina sem a participação de macrófagos (STOLL et al., 1999).

Os mastócitos estão presentes no sistema nervoso central e periférico em várias espécies . A resposta dos mastócitos à injúria compreende uma fase precoce e outra tardia. Na fase precoce há um aumento no número de mastócitos proximal ao local da lesão com a liberação de agentes bioativos como heparina e histamina, que promovem aumento no tamanho dos vasos endoneurais e aumento na permeabilidade vascular, permitindo o acesso de células precursoras de macrófagos e mastócitos. A fase tardia ocorre 40 dias após a transecção no coto distal em degeneração, que compreende a degranulação dos mastócitos. Estas células, intimamente associadas a macrófagos e células de Schwann, liberam grânulos secretórios no microambiente. Através das hidrolases ácidas liberadas os mastócitos em degranulação podem contribuir com os macrófagos e células de Schwann na degradação dos debris de mielina. Simultaneamente os mastócitos aparecem preenchidos por conteúdo granular no segmento proximal em regeneração, sugerindo que estas células desempenham papel importante nos

mecanismos de degeneração e regeneração através da secreção de moléculas difusíveis (ESPOSITO et al., 2002).

Após a transecção do nervo, a recuperação funcional total raramente ocorre. Isto se deve à morte de neurônios nos gânglios dorsais e medula espinal ocorrida após a seção de nervos sensitivos (LAINETTI et al., 1995) ou falha dos axônios em atingir o seu órgão alvo corretamente (LUNDBORG et al., 1994). O neurotrofismo determina o direcionamento dos axônios sensitivos e motores durante a regeneração através da eliminação dos brotamentos que cresceram inadequadamente pela ausência de suporte trófico (BRUSHART, 1988).

Os axônios em regeneração provenientes de fibras mielínicas crescem no segmento distal e as células de Schwann iniciam o processo de mielinização. O processo de mielogênese neuronal parece envolver a interação da membrana plasmática do axônio e da célula de Schwann. Os axônios fornecem o sinal que aumenta a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de mielina ou proteínas e lipídeos específicos para mielina em níveis necessários a produção de mielina (PODUSLO et al., 1985).

### **2.4.3 - No interior de próteses tubulares**

A regeneração com a técnica de tubulização, segundo Fields et al. (1989) inclui algumas fases: respostas pós-traumáticas, migração de células para o interior do tubo; diferenciação e maturação dos elementos neuronais, gliais e vasculares; crescimento axonal e mielinização. O processo regenerativo no interior de próteses

tubulares possui algumas particularidades na dependência do nervo estudado e da natureza do tubo. Tais fases são interdependentes e superpostas.

A seção do nervo ciático de ratos com introdução dos cotos proximal e distal dentro de próteses tubulares de silicone leva a acúmulo de líquido transparente que preenche toda a prótese nas primeiras horas. Tal líquido provém do plasma sangüíneo, dos fluídos das extremidades do nervo e da infiltração através da parede do tubo (LONGO et al., 1983 **a** e **b**; WILLIAMS et al., 1983; WILLIAMS; VARON, 1985). O fluído coletado do interior dos tubos possui fibrina e fatores neurotróficos com variações quanto aos fatores presentes e quanto ao seu volume nas primeiras 12 horas. Além dos fatores neurotróficos, que garantem a sobrevivência dos neurônios sensitivos, simpáticos e motores (LONGO et al., 1983**a** e **b**, LUNDBORG, 1982**b**) observou-se a presença de fatores promotores de neuritos (LONGO et al., 1984) e fatores promotores da proliferação, migração e adesão das células de Schwann (LE BEAU et al., 1988**b**). Os fatores neurotróficos são importantes no estado normal para a sobrevivência dos corpos celulares, mas eles também exercem papel importante no processo de regeneração, assim como na geração de especificidade.

No 3º (SCHRÖDER et al., 1993) ao 7º (LUNDBORG et al., 1982 **a** e **b**) dia após a criação de defeito de um centímetro no nervo ciático do rato, ocorre a precipitação de malha de fibrina dentro do tubo unindo os cotos. Dentro desta malha, estão presentes fibrina/fibrinogênio, eritrócitos, granulócitos, plaquetas e alguns macrófagos (DANIELSEN et al., 1993). A fibrina se dispõe principalmente no sentido longitudinal, existindo pequena fenda entre o cordão e a parede do tubo. A fenda aumenta no 7º dia, devido à retração do coágulo de fibrina (SCHRÖDER et

al., 1993). A fibrina orienta a migração de fibroblastos, células de Schwann e prolongamentos dos axônios (LUNDBORG et al., 1982 **a e b**), que se organizam em camadas concêntricas partindo dos cotos proximal e distal do nervo seccionado para formar a nova bainha perineural.

A partir da primeira semana observa-se intensa atividade mitótica das células de Schwann, que se mantém por alguns dias, coincidindo com a secreção de fator mitogênico para este tipo celular (LE BEAU et al., 1988**b**). Este regenerado possui estrutura similar à do nervo, porém sem a presença de axônios. Esta estrutura forma uma ponte celular que possibilita e fornece suporte ao crescimento de axônios no seu interior (WILLIAMS; VARON, 1985).

No local da lesão axonal, ocorre o crescimento de novas projeções axoplasmáticas distalmente e as células de Schwann iniciam a produção de fatores neurotróficos. Portanto, após o trauma, o processo de regeneração é dependente dos fatores neurotróficos produzidos localmente pelas células de Schwann (WHITWORTH et al., 1995).

As células de Schwann manifestam características que facilitam a regeneração do nervo. *In vivo* elas podem elaborar mielina e fatores neurotróficos (FRIEDMAN et al., 1996) como Nerve growth factor, Brain-derived neurotrophic factor e Ciliary neurotrophic factor (WHITWORTH et al., 1995). Quando a proliferação celular diminui e a diferenciação segue, as células de Schwann secretam elementos da membrana basal (LEBLOND; INOUE, 1989), incluindo colágeno tipo IV, e produzem mielina, vital à condução rápida dos impulsos (UYEMURA, 1993).

Quando a proliferação das células de Schwann é impedida durante a regeneração, através de irradiação ou agentes antimitóticos, há retardo no crescimento axonal e a mielinização é prejudicada (LOVE, 1983; PELLEGRINO; SPENCER, 1985). Na ausência de células de Schwann viáveis, outros componentes do nervo, como fibroblastos ou a lâmina basal das células de Schwann, são incapazes de sustentar o crescimento axonal (GULATI, 1988; HALL, 1986).

A fase seguinte do processo de regeneração compreende a maturação tecidual com formação de capilares, organização dos axônios e células, formação de sinapses e retração de conexões inadequadas, seguidas de mielinização (WILLIAMS et al., 1983). Dentro de três a quatro semanas, os axônios amielínicos envoltos pelas células de Schwann atingem o coto distal, enquanto que as fibras mielínicas são observadas com cinco a seis semanas após a entubulização. A mielinização possui grande importância no desempenho funcional, pois as relações entre o diâmetro do axônio, a espessura da bainha de mielina e distância internodal interferem na velocidade de propagação do impulso através do axônio (FIELDS et al., 1989). Com a evolução do processo de regeneração, observa-se o desenvolvimento de vários minifascículos, grupos de axônios mielínicos e amielínicos delimitados por bainha conjuntiva, a denominada compartimentalização (FIELDS; ELLISMAN, 1986; LE BEAU et al. 1988a). Posteriormente, ocorre a maturação e organização dos elementos regenerados. Contudo as características morfométricas originais, como número de axônios, diâmetro axonal e espessura da bainha de mielina não são atingidas (FIELDS; ELLISMAN, 1986).

#### **2.4.4 - Aspectos morfométricos dos axônios em regeneração no interior de próteses tubulares**

A escolha de um método para avaliar a regeneração nervosa nos estudos científicos sobre as técnicas de reparação de um nervo é crítica. Os métodos mais freqüentemente utilizados na avaliação dos resultados incluem os métodos morfológicos, morfométricos, eletrofisiológicos, funcionais e bioquímicos (DE MEDINACELLI et al., 1982; DELLON; MACKINNON, 1989; TERZIS et al., 1997).

O exame ao microscópico eletrônico de cortes ultrafinos, permite, sobretudo, uma análise satisfatória das fibras amielínicas, do conteúdo axonal, da estrutura da bainha de mielina e das células de Schwann, como a detecção de inclusões. A microscopia eletrônica possibilita maior precisão na obtenção dos parâmetros a serem analisados (CHIMELLI, 1993).

Os parâmetros morfométricos considerados com maior freqüência para avaliar o grau de regeneração de um nervo incluem número, diâmetro, perímetro, e área da seção transversal dos axônios mielínicos e amielínicos. Para os axônios mielínicos considera-se também a espessura da bainha de mielina e a distância internodal (LAINETTI, 1999).

O número de axônios é um dos melhores métodos para avaliar o grau de regeneração nervosa, sendo que o número de fibras mielínicas constitui bom parâmetro para determinar o grau de maturação do nervo em regeneração (SANTOS et al., 1999). O diâmetro axonal possui correlação direta com a condução nervosa. Portanto, espera-se melhor recuperação funcional nos casos em que os axônios do nervo em regeneração possuem maior diâmetro médio (HO et al. 1998)

A espessura da bainha de mielina deve ser proporcional ao diâmetro do axônio. A razão entre diâmetro do axônio mielínico e o diâmetro da fibra mielínica (axônio e bainha de mielina), denominada razão “g” apresenta valores considerados adequados entre 0,65 e 0,80 (SCHMIDTT; BEAR, 1991). Nos axônios regenerados, a espessura da bainha de mielina está reduzida quando comparada à espessura da bainha de mielina de uma fibra normal de mesmo diâmetro, resultando em aumento na razão “g”. As fibras regeneradas de menor diâmetro apresentam bainhas mais espessas que os axônios normais de mesmo diâmetro (FIELDS; ELLISMAN, 1986). Alguns autores observaram uma relação parabólica entre a espessura da bainha de mielina e o diâmetro axonal de nervos regenerados (razão “g”). Os valores da razão “g” são pequenos nas fibras de diâmetro pequeno, aumentam rapidamente acompanhando o aumento do diâmetro da fibra e alcançam um platô (SANTOS et al., 1999). Pode-se obter uma relação melhor quando as distâncias internodais são consideradas, pois nas fibras regeneradas a distância internodal está reduzida e, portanto, necessita uma mielinização mais fina. A redução na distância internodal pode estar associada às diferenças encontradas na espessura da bainha de mielina dos axônios regenerados (FIELDS et al., 1989).

## **2.5 - Fatores que influenciam a regeneração do nervo**

Registros na literatura científica descrevem vários fatores que contribuem para a regeneração bem sucedida do nervo lesado. Os fatores que não podem ser controlados pelo cirurgião incluem espécie, idade, tempo decorrido da lesão, nervo ou nervos envolvidos, estado dos tecidos lesados e nível em que a lesão ocorreu



(BROWN, 1972; DUCKER, 1972; SWAIN, 1972). Tais fatores podem auxiliar no estabelecimento de um prognóstico. Outros fatores relacionados ao manejo cirúrgico e pós-operatório podem ser controlados pelo cirurgião. A técnica cirúrgica meticulosa e uma seleção adequada do instrumental cirúrgico e do material de sutura, podem contribuir para o retorno da função sensitiva e motora (TERZIS et al., 1997). Como em qualquer tipo de cirurgia, a compreensão dos aspectos biológicos e fisiológicos, associada ao reparo cirúrgico adequado, resultará em um retorno funcional máximo possível (LUNDBORG, 1988a).

Além dos aspectos clínicos da lesão do nervo, alguns aspectos biológicos da lesão e regeneração nervosa devem ser considerados. Existe um elevado grau de precisão na seleção de trajetórias e alvos por parte dos axônios em regeneração, os quais ligam-se especificamente a substâncias na matriz extracelular ou na superfície celular, constituindo um efeito promotor ou inibidor do avanço dos cones de crescimento (LUNDBORG et al., 1994).

Diversos experimentos têm demonstrado que as propriedades físicas e químicas do substrato são de essencial importância ao avanço dos cones de crescimento. Os cones de crescimento preferem um substrato com certa adesividade, no qual podem aderir firmemente durante o crescimento (LETOURNEAU, 1975). Os fatores promotores de neuritos promovem a formação de cones de crescimento e estimulam a progressão dos axônios oferecendo sinais moleculares adequados e específicos. Os fatores promotores de neuritos representam substâncias nas quais os axônios são capazes de crescer, provendo uma viscosidade adequada ao substrato. Os cones de crescimento em progressão dependem da presença dos fatores promotores de neuritos *in vivo* e *in vitro*. Na

matriz extracelular e na lâmina basal que circunda as células de Schwann, as glicoproteínas laminina e fibronectina (principais glicoproteínas do sistema nervoso periférico adulto) provêm suporte permitindo o alongamento axonal, além do colágeno. As proteoglicanas, especialmente as que contêm heparan sulfato ou heparina, também atuam como substrato para o crescimento axonal (LUNDBORG et al., 1994). A interação direta entre axônios e células é mediada por moléculas de adesão celular, oferecendo viscosidade ao substrato e possibilitando o reconhecimento dos axônios e células não neuronais exibindo respostas que resultam na promoção ou inibição do crescimento. Tais moléculas têm sido denominadas moléculas de reconhecimento. Exemplo de tais moléculas de reconhecimento incluem N-CAM (molécula de adesão celular neural), Ng-CAM, contactina, N-Caderina, entre outras, e possuem papel no crescimento de neuritos durante o desenvolvimento e/ou regeneração (GRUMET, 1991). No crescimento axonal, os receptores na extremidade terminal do axônio - o cone de crescimento - podem detectar e determinar a existência de tais moléculas. A escolha na direção do crescimento é influenciada pela ação promotora ou inibitória do local (LUNDBORG et al., 1994).

O conceito de neurotrofismo foi introduzido por Ramón y Cajal (1928) que sugeriu que os componentes celulares do segmento distal do nervo lesado produziam substâncias difusíveis promotoras do crescimento axonal. Posteriormente, Rita Levi-Montalcini e Victor Hamburger em 1951 demonstraram a ocorrência do neurotrofismo. Eles observaram que uma determinada proteína ou um grupo de proteínas intimamente relacionadas aumentavam seletivamente o crescimento de neuritos de neurônios simpáticos e neurônios do gânglio dorsal de

embriões. Eles denominaram esta substância “nerve growth factor” (NGF). Os fatores neurotróficos foram reconhecidos como proteínas derivadas dos órgãos alvo, essenciais ao desenvolvimento, manutenção, crescimento e desempenho funcional de populações selecionadas de neurônios (LEVI-MONTALCINI, 1987).

Embora o NGF tenha sido inicialmente observado em sarcomas de camundongos, a maior fonte deste fator foi descoberta nas glândulas salivares submandibulares de camundongos (LEVI-MONTALCINI, 1987). A sua atividade biológica reside em um  $\beta$  dímero e a seqüência de aminoácidos desta proteína possui inúmeras analogias com a insulina (VARON et al., 1968). O NGF é essencial à diferenciação e sobrevivência de determinadas populações de neurônios sensitivos e simpáticos (LINDSAY, 1988). A extensão e manutenção de neuritos pelo NGF necessita de exposição direta da extremidade do cone de crescimento ao NGF (CAMPENOT, 1982). A sobrevivência neuronal, em contraste, pode ser atingida pela apresentação do NGF tanto para o soma ou a terminação nervosa (CAMPENOT, 1982). Estudos *in vitro* demonstraram outra propriedade importante do NGF no crescimento de neuritos, sua ação neurotrópica. Os neuritos das células-alvo do NGF podem ser guiados ao longo de um gradiente de concentração do NGF e o direcionamento dos neuritos pode ser desviado pela posição da fonte do NGF (GUNDERSEN; BARRET, 1980). Estas ações de direcionamento e estimulação de neuritos, associada a sua ação trófica, constituem elementos chave da regeneração axonal dos seus neurônios alvo no sistema nervoso periférico e central. A iniciação e alongamento dos neuritos requer a organização da tubulina em microtúbulos e envolve a sua interação com um grupo de proteínas conhecidas como proteínas associadas ao microtúbulo (MAPs). O NGF aumenta a

polimerização da tubulina em microtúbulos e estabiliza os microtúbulos (BLACK et al., 1986). O aumento da tubulina polimerizada resulta em aumento secundário na síntese de tubulina (DRUBIN et al., 1988). O NGF também estimula a síntese de várias MAPs (BLACK et al., 1986). A modulação do citoesqueleto, através do seu efeito na síntese de tubulina e das MAPs e na estabilização dos microtúbulos, não constitui o único mecanismo através do qual o NGF influencia a extensão dos neuritos. O NGF também age localmente no cone de crescimento (CAMPENOT, 1982). Tal efeito pode envolver ações nas proteínas envolvidas na motilidade do cone de crescimento. Além disto, O NGF pode modificar a interação do cone de crescimento com componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão celular (REICHARDT; TOMASELLI, 1991). Além de todos os efeitos no citoesqueleto, o NGF pode incitar respostas na expressão de genes, alterações no fluxo de íons, produção de mensageiros secundários como AMPc, aumento nas concentrações de cálcio intracelular e ativação de várias quinases, importantes mediadores no crescimento axonal (MARKUS et al., 2002; SNIDER et al., 2002; MEAROW ; KRIL, 1995).

Com a descoberta do NGF, diversas pesquisas foram desenvolvidas, resultando no isolamento de outras moléculas que influenciam o desenvolvimento e manutenção de neurônios. Os eventos envolvidos na proliferação e na sobrevivência celular durante o desenvolvimento e durante a regeneração passaram a ser melhor compreendidos (HEUMANN et al., 1987).

Outros peptídeos que afetam as células neuronais foram identificados, estudados e agrupados juntamente com o NGF em uma classe conhecida como neurotrofinas. Um grupo separado de peptídeos heterogêneos, como as

interleucinas, foram investigados por seus efeitos em células não neuronais e tornaram-se conhecidos como neurocitocinas à medida que os estudos revelaram interações importantes com o tecido neural (SENDTNER et al., 1990). Atualmente, a lista de fatores que promovem o crescimento de nervos continua a crescer juntamente com as informações a respeito dos tipos de receptores, concentração e localização no sistema nervoso periférico e central. A forte ação dos fatores promotores do crescimento sugeriu seu uso na prevenção ou redução da disfunção e morte de neurônios após uma lesão nervosa. Os fatores de crescimento atualmente são definidos com base nos seus receptores e classificados em três grandes grupos: (1) as neurotrofinas, que incluem o NGF, Brain-derived Neurotrophic-factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT 3), Neurotrophin 4/5 (NT 4/5), Neurotrophin 6 (NT-6) e Neurotrophin-7 (NT-7); (2) as citocinas neuropoiéticas, que incluem Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) e Interleukin-6 (IL-6) e (3) Fibroblast growth factors (acidic Fibroblast growth factor (aFGF) e basic Fibroblast growth factor (bFGF)). Existe um último grupo de fatores neurotróficos, constituído por Leukemia Inhibiting Factor (LIF), Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF) e Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (TERZIS et al., 1997) (tabela 1).

Uma vez que diferentes populações neuronais respondem a fatores de crescimento específicos, a lesão de um “pool” neuronal particular pode ser eficazmente tratada pela administração do fator de crescimento adequado (TERZIS et al., 1997)(tabela 2).

Os fatores neurotróficos exercem sua influência através da ligação a classes particulares de receptores tirosina quinase na superfície da célula responsiva. Após ativação do receptor pelo ligante, iniciam-se sinais intracelulares envolvendo fosforilação de proteínas e subsequente ativação gênica (TERZIS et al., 1997).

Tabela 1 - Classificação dos principais fatores neurotróficos

GRUPOS DE FATORES NEUROTRÓFICOS	EXEMPLOS
Neurotrofinas	NGF, BDNF, NT 3, NT 4/5, NT6, NT 7
Citocinas Neuropoiéticas	CNTF, IL 1,3,6
Fatores de Crescimento Fibroblásticos	aFGF, bFGF
Outros	GNDF, EGF, IGF, LIF

Fonte: Journal of Reconstructive Microsurgery, v.13, n.23, p.221, 1997.

O NGF é uma proteína derivada dos tecidos alvos e células de Schwann do coto distal, que age via receptores nos neurônios para produzir efeitos neurotróficos após transporte retrógrado (JOHNSON et al., 1986). Diversos estudos têm demonstrado o papel do NGF na regeneração de axônios sensitivos após a lesão. Após a axonotomia, ocorre aumento de NGF endógeno e de seus receptores de baixa afinidade nos neurônios motores (HEUMANN et al., 1997). O seu receptor de alta afinidade (trkA) age como mediador de eventos locais orientando o crescimento dos cones de crescimento dorsais (GALLO et al., 1987). De outro lado, os receptores de baixa afinidade (p75NGFR) induzem a morte celular na ausência de NGF (BARRET; GEORGIA, 1996). O nível de NGF aumenta rapidamente após a transecção do nervo, estabiliza por volta do terceiro dia e mantém-se estável por até

duas semanas (HEUMAN et al., 1987). O número de axônios mielínicos e não mielínicos aumenta nos nervos seccionados e tratados com NGF (DA-SILVA; LANGONE, 1989). A administração local e contínua do NGF em altas doses mostrou que ele aumenta a regeneração dos nervos periféricos intensificando os estágios iniciais da regeneração, nas primeiras quatro semanas, e também aumenta a taxa de regeneração axonal tardia (8 a 12 semanas) (SANTOS et al., 1999), além de influenciar o processo de mielinização induzido pelas células de Schwann (IDE, 1996).

Tabela 2 - Fatores neurotróficos e sua população neuronal responsiva

POPULAÇÃO NEURONAL RESPONSIVA	FATORES NEUROTRÓFICOS
Neurônios Sensitivos	NGF, BDNF, NT 3, NT 4/5, CNTF, IGF-I, IGF-II, PDGF, TGF, FGF1, FGF2, LIF, GDNF
Neurônios Autonômicos	NGF, BDNF, NT 3, CNTF, LIF, IGF-I, IGF-II, FGF1, FGF2
Neurônios Motores	BDNF, NT 3, NT 4/5, GDNF, TGF, IGF-I, IGF-II, FGF1, FGF2, FGF5, CNTF, LIF

FONTE: Journal of Reconstructive Microsurgery, v.13, n.23, p.222, 1997.

O brain-derived neurotrophic factor (BDNF), descoberto em 1982 à partir do cérebro de porco, apresenta 50% de homologia com o NGF (BARDE et al., 1983). Este fator previne a degeneração retrógrada de neurônios motores lesados. O BDNF é expresso nas regiões de placas motoras e aumenta após a separação do nervo (MITSUMOTO et al., 1994). O BDNF se liga a um receptor tirosina quinase (p145<sup>trkB</sup> o trkB), o qual é abundantemente expresso em alvos periféricos de

neurônios motores (UTLEY et al., 1996). O BDNF é sintetizado em pequenas quantidades sob condições fisiológicas. Após a axotomia ou denervação, a expressão do RNAm do BDNF aumenta cerca de três dias após a lesão, ascendendo até a segunda semana após o trauma (MEYER et al., 1992). Dentre os fatores neurotróficos, o BDNF tem surgido como um agente importante que pode reduzir a doença de neurônios motores e aumentar a regeneração de nervos periféricos (CHENG et al., 1998).

Outros dois fatores identificados são Neurotrophin-3 (NT-3) e Neurotrophin-4 (NT-4). Tais fatores possuem homologia com o NGF (IP et al., 1992). A proteína Neurotrophin 5 (NT-5), pertencente a família das neurotrofinas, possui seqüência de aminoácidos semelhante à do NT 4 e foi identificada no homem e no rato. Devido a homologia entre o NT-4 e NT-5, estas proteínas são designadas NT 4/5 (IP et al., 1992).

O CNTF é uma proteína descrita em 1976 como um fator de sobrevivência de culturas de neurônios parassimpáticos de galinhas. O CNTF é liberado das células de Schwann após o trauma, banha o nervo seccionado e é transportado retrogradamente ao corpo celular. Possui função neuroprotetora minimizando as conseqüências da lesão nervosa e permite uma regeneração precoce e mais completa (MITSUMOTO et al., 1994). A utilização deste peptídeo aumentou a sobrevivência de neurônios motores (APFEL et al., 1993). Seu principal receptor é expresso em todo o sistema nervoso periférico e central e também no músculo esquelético (NEWMAN et al., 1996). O CNTF é produzido em níveis elevados pelas células de Schwann, no nervo periférico intacto, mas, ao contrário do NGF e BDNF,



que são induzidos após a lesão, os níveis de RNAm do CNTF declinam rapidamente (NEWMAN et al., 1996).

O GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) promove a sobrevivência de neurônios sensitivos e motores (HENDERSON ET AL., 1994; MATHESON et al., 1997). O acidic fibroblast growth factor e basic fibroblast growth factor têm sido associados ao aumento na regeneração após as lesões dos nervos periféricos (CORDEIRO et al., 1989; DANIELSEN et al., 1988). Os fibroblast growth factors são grande promotores da angiogênese e podem, portanto, direta ou indiretamente auxiliar o processo de regeneração dos nervos lesados (FRIESEL; MACIAG, 1995).

## **2.6- Imunologia e neuroimunologia**

O sistema imune é projetado para reconhecer e eliminar antígenos estranhos do organismo. Um antígeno é qualquer proteína, lipídeo, carboidrato ou molécula orgânica que pode incitar a resposta imune (PRINS; LIAU, 2003). Para realizar este trabalho, o sistema imune é dividido em duas categorias: a imunidade natural (ou inata) e a imunidade específica (ou adquirida) (ABBAS, et al., 2000).

A resposta imune inata consiste primariamente de leucócitos que respondem rapidamente a sinais não específicos característicos da lesão tecidual e da infecção. As células imunes, como os macrófagos e os monócitos (micróglia no sistema nervoso central), os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e as células *natural killer*, são capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos presentes em bactérias, parasitas e vírus (FEARON, 2001). A detecção de tais moléculas ativa o mecanismo citotóxico destes leucócitos, podendo resultar na lise

de células infectadas por vírus, bactérias extracelulares ou células tumorais. A eliminação de antígenos estranhos ocorre tanto por fagocitose dentro de vesículas contendo proteases ou via fatores secretados que induzem a lise celular. Ambos os métodos são acompanhados da liberação de diversos hormônios protéicos denominados citocinas (interleucina: IL-1, IL-6, IL-12), fator de necrose tumoral- $\alpha$  e mediadores inflamatórios (radicais oxigênio, óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos). Na imunidade natural, as citocinas efetoras são produzidas principalmente por fagócitos mononucleares e costumam ser chamadas monocinas. Embora a secreção das monocinas possa ser estimulada diretamente por microrganismos, elas também podem ser secretadas em resposta a linfócitos T estimulados por antígenos, isto é, como parte da resposta específica. A imunidade natural é considerada como a primeira linha de defesa, sendo necessária a iniciação e direcionamento da resposta específica (ABBAS, et al. 2000).

A resposta imune adquirida é reconhecida por sua especificidade e memória aos antígenos estranhos. Tais repostas requerem um intervalo de tempo maior para serem geradas, pois as células participantes da resposta adquirida devem primeiro sofrer proliferação e diferenciação em células efetoras, capazes de eliminar o antígeno. A resposta imune adquirida envolve quatro fases distintas: reconhecimento e ativação, proliferação, fase efetora e memória. Os linfócitos constituem as células imunocompetentes da resposta imune adquirida e são as únicas células no corpo capazes de realizar o reconhecimento específico. Isto provem do fato de os linfócitos possuírem receptores específicos. Dependendo do tipo de receptor específico que o linfócito expressa, a imunidade adquirida pode ser dividida em resposta imune humoral ou celular (ABBAS et al., 2000).

O componente primário da resposta imune humoral é constituído pelas células B que possuem receptores de superfície para um antígeno específico. Quando as células B são ativadas pelas células T helper tipo 2 e os receptores da célula B reconhecem seu antígeno cognato, elas diferenciam-se em células plasmáticas secretoras de anticorpos, denominados plasmócitos. Os anticorpos podem induzir a lise através de três mecanismos: 1) lise dependente de complemento (o sistema complemento compreende uma série de proteínas do soro que interagem produzindo a lise osmótica); 2) opsonização de partículas recobertas por antígenos (as células fagocíticas possuem receptores para porções específicas dos anticorpos, quando os anticorpos cobrem os antígenos, esta porção do anticorpo interage com a porção específica dos receptores nas células fagocíticas); 3) citotoxicidade celular mediada dependente de anticorpo (monócitos, neutrófilos e células *natural killer* possuem receptores específicos capazes de reconhecer células recobertas por anticorpos, tal reconhecimento ativa os leucócitos que lisam os alvos) (ABBAS et al., 2000).

A imunidade celular é composta por células T que reconhecem especificamente antígenos estranhos. Existem dois tipos de células T, as quais podem ser distinguidas pela expressão de co-receptores CD4 e CD8. Estas células T possuem funções diferentes. As células CD8<sup>+</sup> são frequentemente denominadas linfócitos T citotóxicos (Tc ou CTL) porque podem adquirir potencial citolítico para lisar células infectadas ou tumorais. As células CD4<sup>+</sup> são denominadas células T “helper” (Th) pois elas secretam várias citocinas que regulam a função de outras células imunes (ABBAS et al., 2000).

Ao contrário das células B que reconhecem antígenos naturais, as células T somente podem reconhecer antígenos que foram processados em peptídeos e apresentados juntamente com proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície celular. O receptor em cada célula T reconhece um peptídeo específico complexado com o MHC. Estes peptídeos podem ser subprodutos da síntese protéica normal, subprodutos de bactérias fagocitadas ou peptídeos virais. As células T  $CD4^+$  reconhecem peptídeos de comprimento variado (12 a 20 aminoácidos) especificamente no contexto das moléculas do MHC classe II, que estão usualmente associadas a antígenos exógenos, levados e processados por células apresentadoras de antígenos ou macrófagos. Em contraste, as células T  $CD8^+$  reconhecem epítomos (peptídeos com 8 a 12 aminoácidos) no contexto das moléculas do MHC classe I, preferencialmente associado aos antígenos endógenos sintetizados dentro da células (ABBAS et al., 2000).

O elo de ligação entre as duas respostas (inata e adquirida) é, em parte, realizado pelas citocinas que constituem um grupo de proteínas de baixo peso molecular, secretadas por leucócitos, principalmente macrófagos e linfócitos, em resposta a diferentes estímulos antigênicos tais como bactérias, fungos, protozoários ou toxinas (HENDERSON et al., 1997). Tais proteínas promovem a interação e cooperação entre as células efetoras da resposta imune inata e específica, originando uma cascata de eventos biológicos cujo objetivo é erradicar o microrganismo invasor e restaurar a homeostase do hospedeiro infectado (WILSON et al., 1998). A maior parte das citocinas relacionadas com a imunidade específica são produzidas por linfócitos T ativados e tais moléculas são comumente

designadas linfocinas. Os linfócitos T produzem diversas citocinas que regulam o crescimento e a diferenciação de subpopulações de linfócitos, desempenhando papel importante na fase de ativação das respostas imunes dependentes de linfócitos T. Outras citocinas derivadas de linfócitos T funcionam principalmente ativando e regulando as células inflamatórias, como os fagócitos mononucleares, os neutrófilos e os eosinófilos. Estas citocinas derivadas dos linfócitos T são moléculas efetoras da imunidade celular, sendo responsáveis pela interação entre as células do sistema imune e as células inflamatórias (ABBAS et al., 2000).

Atualmente, as citocinas são classificadas em quatro grupos, de acordo com as suas principais funções. O primeiro grupo inclui as citocinas que medeiam a resposta natural e inclui os interferons antivirais do tipo I e as citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, interleucina-1, interleucina-2 e quimocinas). O segundo grupo é em grande parte derivado de linfócitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-estimulados e regula a ativação e diferenciação de linfócitos T e B. Este grupo inclui a interleucina-2 (principal ativador de linfócitos T), a interleucina-4 (reguladora da síntese de IgE) e o fator-β, transformador do crescimento celular que inibe as respostas linfocitárias. O terceiro grupo inclui as citocinas produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antígeno-ativados. Ativa os leucócitos inflamatórios e coloca estas células efetoras sob regulação dos linfócitos T. Este grupo inclui o interferon-γ (principal ativador de fagócitos mononucleares), a linfotoxina (ativador de neutrófilos), a interleucina-10 (regulador negativo da função fagocitária mononuclear), a interleucina-5 (ativador de eosinófilos), a interleucina-12 (produzida por fagócitos mononucleares) e um estimulador de células *natural Killer* (NK) e de linfócitos T. O quarto grupo inclui citocinas ou fatores estimuladores de

colônias, que estimulam o crescimento de clones de células da medula óssea, proporcionando uma fonte adicional de leucócitos (ABBAS et al., 2000; TIZARD, 2002).

Enfim, são as citocinas que regulam a iniciação e a manutenção da resposta imune e, além disto, determinam o tipo de resposta imune e o tipo de mecanismo efetor envolvidos na resistência aos patógenos (FRESNO et al., 1997).

As quimiocinas compreendem uma grande família de citocinas, com capacidade de estimular a motilidade (quimioquese) e os movimentos dirigidos (quimiotaxia) e a ativação dos leucócitos (ASENSIO; CAMPBELL, 1999). Tais moléculas induzem a migração de leucócitos através de gradientes de concentração com atração seletiva para um tipo celular a proteína inflamatória  $1-\alpha$  de macrófagos (MIP- $1\alpha$ ) e a proteína 1 quimiotática de macrófagos (MCP-1) e promovem quimiotaxia de monócitos e células T (ABBAS et al., 2000; OUSMAN; DAVID, 2001). MCP-1 (macrophage chemotatic protein-1) é um potente indutor da quimiotaxia para monócitos, enquanto o MIP- $1\alpha$  (macrophage inflammatory protein- $1\alpha$ ) induz a quimiotaxia para células T e monócitos no sistema nervoso central (OUSMAN; DAVID, 2000). As possíveis fontes destas quimiocinas são as células T ativadas, micróglia e monócitos (ASENSIO; CAMPBELL, 1999).

Os macrófagos fazem parte do sistema imunológico dos animais. Tais células são capazes de aumentar ou suprimir as reações imunes. Observam-se transformações na sua estrutura e função, envolvendo eventos endógenos e secretórios, durante a estimulação destas células (KARNOVSKY; LAZDING, 1978). Existem dois mecanismos pelos quais os macrófagos podem ser ativados: a) em consequência da interação com microrganismos e seus produtos, tais como

endotoxinas e componentes da parede celular; b) pela ação de linfocinas produzidas por linfócitos CD4, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (MOONIS et al., 1992; NATHAN et al., 1983; REED et al., 1987).

Uma das alterações metabólicas, ocorridas após ativação do macrófago, é o aumento das atividades microbicida, fagocítica e citotóxica (RABINOVITCH, 1975). Tais alterações também envolvem modificações bioquímicas (KARNOVSKY; LAZDING, 1978), aumento na capacidade de aderência e espraiamento em superfícies de vidro e expressão de moléculas classe II (MOONIS et al. 1992).

Após a ativação macrofágica ocorre a ativação do *burst* respiratório que resulta no aumento da produção de metabólitos do oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MOONIS et al., 1992). O superóxido e o peróxido de hidrogênio além da atividade citotóxica, microbicida e anti-tumoral (NATHAN et al., 1979), também são mediadores nos processos imunorregulatórios e inflamatórios, induzindo a expressão de citocinas (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , GM-CSF) e alterando a expressão de moléculas de adesão (EGUI et al., 1994; LO et al., 1993). Dentre os agentes capazes de desencadear o *burst* respiratório estão microrganismos opsonizados, componentes do complemento, o lipopolissacaride de bactérias Gram negativas (LPS) e algumas citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF (CHESON et al., 1977).

Outro importante mecanismo microbicida dos macrófagos ativados por citocinas é o óxido nítrico (NO). Ele é formado pela enzima NO sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina (MONCADA, 1994). Nos macrófagos ativados, o NO auxilia na habilidade de matar células tumorais e bactérias (MAcMICKING et al.,

1997). O óxido nítrico exerce papel importante na degeneração walleriana e revascularização dos nervos periféricos após a transecção e no processo de regeneração (KEIHOFF et al., 2002). Existem três classes maiores de óxido nítrico sintase, todas encontradas no sistema nervoso: NOS neuronal (nNOS; NOS-1), NOS macrófagica ou induzida (iNOS; NOS-2) e NOS endotelial (eNOS; NOS-3) (ELLIASSON et al., 1999; MONCADA et al., 1997). O NO, gerado pela iNOS nas células inflamatórias invasoras, é necessário a remoção dos debris de mielina, permitindo o crescimento axonal. A eNOS local, através da produção de NO, produz vasodilatação dos microvasos dos nervos periféricos, que deve ser importante no suporte das necessidades metabólicas dos axônios em regeneração e outros elementos celulares (ELLIASSON et al., 1999; MONCADA et al., 1997). Além disto, o NO derivado do endotélio constitui mediador na formação de novos vasos sanguíneos e no controle da remodelação vascular na angiogênese (KEILHOFF et al., 2002). O nNOS é expresso em uma população neuronal discreta, incluindo uma subpopulação de neurônios dos gânglios dorsais. A transecção do nervo ciático promove aumento na expressão do nNOS no neurônios dos gânglios dorsais. Tal aumento atinge 25 a 30% do número total de neurônios, sugerindo que o nNOS deve exercer efeito favorável na regeneração e restituição funcional do nervo (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ; RUSTIONI, 1999).

A degeneração walleriana (RAMÓN y CAJAL, 1928) é a resposta do sistema nervoso à lesão axonal, primariamente imputável à produção de citocinas (SHAMASH et al., 2002). A visão clássica da inflamação sugere uma rede de produção de citocinas, na qual as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , inicialmente, aumentam a produção adicional de citocinas inflamatórias e, posteriormente, a



produção de citocinas antiinflamatórias. Conseqüentemente, a inflamação cessa. A produção harmoniosa de citocinas durante a degeneração walleriana é designada “rede de citocinas da degeneração walleriana” (ROTSHENKER, 1997).

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  possuem particular significância na degeneração walleriana. Tais citocinas podem iniciar a rede de citocinas da degeneração walleriana, como em outras redes de inflamação (ROTSHENKER, 1997). Tais citocinas também contribuem no recrutamento de macrófagos para o local da inflamação através da ativação das células endoteliais e da produção de quimiocinas (LIEFNER et al., 2000; ROTSHENKER, 1997). Do mesmo modo, elas podem contribuir para o recrutamento de macrófagos na degeneração walleriana e conseqüentemente para as funções dependentes dos macrófagos (remoção da mielina pela fagocitose). As citocinas podem regular indiretamente a sobrevivência neuronal e o crescimento axonal através da regulação de NGF (SHAMASH et al., 2002). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  são provavelmente as primeiras citocinas aumentadas nas células de Schwann residentes após a lesão de um nervo periférico (JANDER et al., 1996; SHAMASH et al., 2002). Segue-se então, a produção de IL-1 $\beta$  pelas células de Schwann cinco a 10 horas após a lesão (SHAMASH et al., 2002). Posteriormente, a IL-6 (dentro de duas horas após a lesão) e o GM-CSF (dentro de duas horas após a lesão) são produzidos pelos fibroblastos residentes (SAADA et al., 1996). Os fibroblastos não expressam ou produzem IL-6 ou GM-CSF nos nervos intactos. A produção de tais citocinas pode ser induzida pelo TNF- $\alpha$  e IL- $\alpha$ , produzidos pelas células de Schwann (SAADA et al., 1996).

Os macrófagos, que são escassos em nervos intactos, são recrutados, atingindo grande número em poucos dias. Eles produzem as citocinas inflamatórias

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 e a citocina antiinflamatória IL-10. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem a produção de NGF pelos fibroblastos (HATTORI et al., 1993) e de IL-6 e IL-10 pelos macrófagos (SAADA et al., 1996). A produção de IL-10 por fibroblastos ocorre rapidamente, porém em níveis baixos, pois os fibroblastos são produtores pobres de IL-10. A produção da IL-10 em altos níveis ocorre após o quarto dia de degeneração walleriana, determinada pelo recrutamento de macrófagos, que produzem IL-10 em grande quantidade. A IL-10 reduz a produção de todas as citocinas inflamatórias e dela própria regulando a degeneração walleriana (BE'ERI et al., 1998; SHAMASH et al., 2002). A produção eficiente de citocinas aponta para a natureza inflamatória da degeneração walleriana, sugerindo que as citocinas possuem papéis significantes na regulação dos eventos moleculares e celulares da degeneração walleriana (SHAMASH et al., 2002).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina inflamatória produzida principalmente pela micróglia e macrófagos (MASON, et al., 2001). A IL-1 $\beta$  pode favorecer a produção de IL-6, GM-CSF (MASON, et al., 2001; SHAMASH et al., 2002) e TNF- $\alpha$  (MASON, et al., 2001).

A IL-6 que inibe a produção de TNF $\alpha$ , pode ser responsável pela redução na produção desta citocina após o primeiro dia da degeneração walleriana (SHAMASH et al., 2002). Ela é uma proteína pleiotrópica que medeia respostas imunes e reações inflamatórias. Além disto, regula a sobrevivência e a manutenção da função neuronal (CAMPBELL, 1998). A IL-6 pertence à superfamília de citocinas neuropoiéticas que inclui IL-11, Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Leukemia

inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM) e cardiotrophin-1 (CT-1) (ZHONG et al., 1999). IL-6 é sintetizada em uma subpopulação de neurônios periféricos sensitivos e simpáticos e no sistema nervoso central em desenvolvimento (HIRANO et al., 1997). No sistema nervoso de animais adultos, os níveis de IL-6 são dificilmente detectáveis, porém a síntese de IL-6 parece estar aumentada durante a degeneração walleriana tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico (REICHERT, 1996).

O recrutamento deficiente de macrófagos e a ativação deficiente das células de Schwann durante a degeneração walleriana, resultam na remoção lenta da mielina através da fagocitose, dificultando a remielinização (KOTTER, et al., 2001; SEKIYA et al., 2001) .

Considerando-se que os axônios e as células de Schwann formam os principais constituintes do sistema nervoso periférico, uma quantidade considerável de macrófagos residem no interior do endoneuro dos nervos periféricos. Inicialmente reconhecidos devido a sua capacidade fagocitária (ARVIDSON, 1977), os macrófagos residentes compreendem dois a 9% dos componentes celulares do nervo periférico normal (GRIFFIN, 1993). Os macrófagos nos nervos normais são células alongadas encontradas próximas aos vasos endoneurais e também dispersas pelo endoneuro (KIEFER et al., 2001). Nos ratos, eles são ED2<sup>+</sup> (GRIFFIN et al., 1992) e possuem pouca capacidade em fagocitar a mielina (HIRATA et al., 1999). Os macrófagos residentes no sistema nervoso periférico são substituídos pelos macrófagos derivados do sangue (VASS et al., 1993). Quando ocorre inflamação ou lesão do sistema nervoso periférico, grandes quantidades de macrófagos hematógenos (ED1<sup>+</sup>) são atraídos e invadem o nervo. Isto se torna

particularmente evidente quando o nervo periférico é esmagado ou seccionado. O segmento distal à lesão em degeneração é inundado por macrófagos (PERRY et al., 1987). Os macrófagos recrutados dos vasos sanguíneos, a partir do segundo dia após a lesão (STOLL et al., 1989), são Mac1+ envolvidos na fagocitose da mielina (REICHERT et al., 1994; SEKIYA et al., 2001; STOLL et al., 1999). A barreira sangue-nervo é menos tesa que a barreira hemato-encefálica, permitindo o rápido influxo dos macrófagos após as lesões do sistema nervoso periférico (KIEFER et al., 2001). Dentro do nervo, os macrófagos regulam a inflamação através da secreção de várias citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1, IL-6, IL-2 e TNF- $\alpha$ . Posteriormente, eles contribuem para o término da inflamação, promovendo a apoptose das células T e expressando citocinas antiinflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10 (KIEFER et al., 2001).

## **2.7 - O N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutmina (MDP)**

A imunoterapia refere-se à utilização de agentes que aumentam a taxa da resposta imune, aumento na sua intensidade ou dos níveis da resposta, prolongação da resposta ou desenvolvimento da resposta a uma substância imunogênica. Existe uma grande variedade de substâncias que agem estimulando a resposta imune. Elas incluem as emulsões de água e óleo, (FREUND et al., 1945), polinucleotídeos sintéticos, hormônios, citocinas, fatores de crescimento, fármacos e endotoxinas (ABBAS et al., 2000).

Em 1974, E. Lederer e seus colaboradores, da Universidade de Paris, descreveram o N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) como o componente mínimo imunologicamente ativo da parede celular de bactérias. Os peptídeos murâmicos são derivados da parede celular, que constitui 90% da parede celular de bactérias Gram-positivas. O MDP é um peptídeo murâmico sintético. Esta substância atua em monócitos, células *natural killer*, células B e neutrófilos (COHEN et al., 1996; DARCISSAC et al., 1996; HEINZELMANN et al., 1997). Esta substância atua principalmente aumentando a capacidade microbicida (RINGENBACH et al., 1998) e fagocítica (PARANT et al., 1992) e é capaz de induzir a formação ou de estimular as células a produzirem diversas citocinas, incluindo IL-1 (NELSON et al., 2002), TNF- $\alpha$  (WOLFER et al., 2002), IL-6, fatores estimuladores de colônias (KOMIYA et al., 1992; SANCEAU et al., 1990), desencadeando a expressão de citocinas supressoras, como IL-10 (SCHRIJVER et al., 2001). O MDP possui sinergismo com citocinas na estimulação da diferenciação (via IL-2) e proliferação (via IL-4) de linfócitos (SOUVANNAVONG et al., 1990). O MDP aumenta a expressão de RNAm para iNOS, com posterior aumento na produção de NO (KAMERMAN; FULLER, 2000). Os mecanismos exatos da ativação celular do MDP e seus análogos ainda não estão esclarecidos (KALYUZHIN et al., 1997, WOLFER et al., 2002). Darcissac et al. (1996) demonstraram que o MDP modula a expressão de integrinas  $\beta$ 2, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em monócitos, sugerindo o seu envolvimento no processo de adesão celular e co-estimulação para a apresentação de antígenos.

A injeção do MDP após a lesão da medula espinhal resultou no aumento do número de macrófagos/micróglia ativados (ED1<sup>+</sup>) no local da lesão, sendo que a maioria era Mac1+, indicando que estavam ativamente envolvidos na fagocitose. Os animais que receberam MDP possuíam maior número de axônios mielínicos nos tratos motores laterais. Clinicamente, apresentaram coordenação freqüente, com suporte do peso durante a deambulação (PEARSE et al., 2001).

Diversas substâncias têm sido utilizadas para estimular as respostas imunes no sistema nervoso (ANDERSON et al., 1992; BELL; PERRY, 1995; PEARSE et al., 2001; PRINS; LIAU, 2003; SCHWARTZ et al., 1999), incluindo o MDP.



### 3.1 - Animais e aditivo

Foram utilizados 12 camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J, machos, adultos, com peso variando entre 27,3 a 29,4 g, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Durante o período de observação, os animais foram acondicionados em compartimentos individuais apropriados, sendo mantidos em biotério com ciclos de 12 horas de claro-escuro, com temperatura de 21°C, recebendo ração comercial para ratos e água *ad libitum*.

Os camundongos foram divididos aleatória e eqüitativamente em três grupos assim denominados: COL, COL/MDP e NOR. Os animais do grupo COL receberam implantes de tubos de polietileno (TP) preenchidos com solução de colágeno. Os quatro animais do grupo COL/MDP receberam implantes de tubos preenchidos com colágeno e MDP em partes iguais e os quatro animais remanescentes (NOR) não foram operados e serviram como controle de normalidade.

O colágeno purificado (2,4 mg/ml) foi associado a tampão fosfato de sódio em partes iguais. O colágeno utilizado, de origem bovina (Vitrogen®, Collagen Corporation, Fremont, CA, EUA), contém 95-98% de colágeno tipo I e 2-5% de colágeno tipo III.

O N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) foi diluído em 1 ml de solução salina, obtendo-se concentração de 2 mM. Após a adição de volume igual do colágeno, a concentração final do MDP foi de 1 mM. O MDP foi administrado em associação com solução de colágeno purificado para adquirir consistência de gel a temperatura ambiente, impedindo seu escoamento para o exterior dos tubos de polietileno implantados.



### **3.2 - Técnica cirúrgica para a tubulização**

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Após avaliação da massa corporal, todos os animais foram anestesiados com Avertin (500 mg de tribromoetanol e 250 mg de 2-metil-2-butanol, dissolvidos em 19,5 ml de água purificada), na dose de 0,02 ml por grama de massa, pela via intraperitoneal.

Uma vez anestesiados, os animais foram submetidos à tricotomia da face caudo-lateral do membro pélvico esquerdo. Os camundongos foram posicionados em decúbito ventral e os membros fixados ao plano da mesa com o auxílio de fitas adesivas.

O acesso postero-lateral à coxa foi realizado por incisão abrangendo a pele, o tecido subcutâneo e o plano muscular entre o músculo vasto lateral e o músculo bíceps femoral com exposição do nervo ciático esquerdo.

A partir desta etapa, os procedimentos foram realizados sob microscópio cirúrgico (Zeiss OPM 249 F) com aumento de campo operatório de 10X. O nervo ciático foi liberado, parcialmente, do leito conjuntivo e, a seguir, procedeu-se a transecção completa do nervo na sua porção média, com lâmina de barbear. Os cotos proximal e distal foram inseridos dentro de uma prótese tubular de polietileno (figura 1A) (Clay Adams; comprimento de 6 mm, diâmetro interno de 0,76 mm e diâmetro externo de 1,22 mm) e ancorados com um único ponto simples em cada extremidade, com fio de náilon monofilamentar n.º 10-0, mantendo-se, entre eles, intervalo de 4 mm (figura 1B). As próteses foram preenchidas com 2 µl do aditivo

(solução de MDP e colágeno purificado ou colágeno purificado) com o auxílio de uma micro-seringa de Hamilton, tomando-se o cuidado para evitar a entrada de bolhas de ar (figura 1B).

Ao final do procedimento cirúrgico, os planos anatômicos foram reconstituídos com sutura em pontos simples separados com fio de seda n.º 7-0 na musculatura. Os bordos da pele incisada foram unidos com o auxílio de grampos cirúrgicos de 7,5 mm.

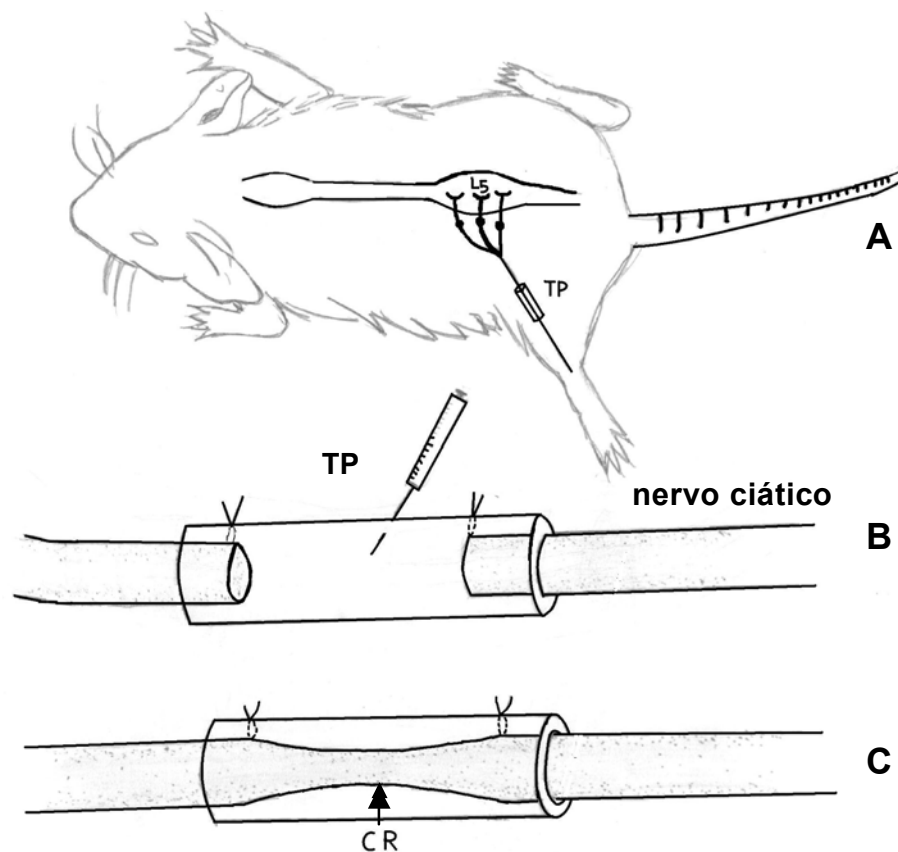


Figura 1 - Representação esquemática do modelo experimental utilizado. A) O tubo de polietileno (TP) na porção média do nervo ciático; estão representados os gânglios espinhais que contribuem para a formação do nervo ciático, destacando-se o gânglio espinhal L5. B) Detalhe do tubo implantado com os segmentos proximal e distal do nervo ciático, distantes 4 mm; o tubo sendo preenchido com colágeno ou colágeno e MDP. C) Quatro semanas após o ato operatório, observou-se a presença do cabo de regeneração (CR).

### 3.3 - Processamento para a microscopia óptica de luz

Após um período de quatro semanas, os animais foram anestesiados com Avertin, quando procedeu-se a tricotomia do membro pélvico esquerdo e da região lombar e exposição do nervo ciático.

Os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal para a abertura da cavidade torácica e perfundidos, através do ventrículo esquerdo, com 5 ml de solução salina (NaCl 0,9%) heparinizada, seguida de perfusão com 150 ml de solução fixadora de Karnovsky (paraformaldeído a 1%, glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M com pH 7,3).

A partir desta etapa os procedimentos foram realizados sob microscópio cirúrgico (Zeiss OPM 249 F) com aumento de campo operatório de 10X. O nervo ciático foi dissecado em toda a sua extensão, seccionado transversalmente acima e abaixo da prótese tubular. Foram coletados fragmentos do segmento regenerado do nervo (CR, figura 1C), presente no interior do tubo. Nos animais do grupo controle, coletou-se um fragmento do nervo ciático correspondente ao local de implantação da prótese tubular nos animais dos grupos COL e COL/MDP.

O gânglio espinhal L<sub>5</sub> (principal fonte de axônios sensitivos para o nervo ciático) correspondente ao antímero do membro que recebeu implante, foi também removido (figura 1A), bem como daqueles animais do grupo NOR.

Todos os fragmentos coletados foram mantidos em solução de Karnovsky (paraformaldeído a 1%, glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M com pH 7,3) durante 24 horas a 4°C.

Os gânglios espinhais dos animais foram desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e incluídos em histo-resina. Cortes seriados longitudinais (5  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos da extensão total do gânglio, e ,então, eram colocados em lâminas de vidro e corados com solução de azul de toluidina (0,25%) seguida de solução de fucsina básica (0,05%) para posterior observação em microscópio de luz.

Os fragmentos coletados do nervo ciático e do cabo de regeneração (CR) foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (2% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,3) por duas horas a 4°C. Os fragmentos foram desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, clareados em óxido de propileno, infiltrados e incluídos em resina epoxi (EPON 812, Tousimis).

Foram obtidos cortes transversais semifinos com 1 $\mu\text{m}$  de espessura da porção média do cabo de regeneração nos grupos COL e COL/MDP e da porção correspondente ao local de implantação da prótese tubular nervo ciático no grupo NOR. Estes cortes foram corados com solução de azul de toluidina 0,5% para posterior observação em microscópio de luz.

### **3.4 - Análise qualitativa**

Os cortes semifinos obtidos da porção média do cabo de regeneração foram observados quanto à disposição dos elementos neuronais e conjuntivos que constituem o nervo. Os cortes longitudinais dos gânglios espinhais L<sub>5</sub> foram analisados quanto ao seu aspecto e disposição dos neurônios sensitivos.

### **3.5 - Análise quantitativa**

A análise quantitativa das fibras nervosas regeneradas foi feita através da determinação do número de axônios mielínicos encontrados nos cortes transversais obtidos dos fragmentos do nervo ciático no grupo NOR e da porção média do cabo de regeneração nos grupos COL e COL/MDP, com o auxílio de um sistema semi-automático de análise de imagens (Biographics, Winston Salem, NC, EUA). As lâminas foram observadas em microscópio óptico de luz (Zeiss Axioskop) com aumento de 100 vezes, equipado com estágio monitorizado controlado por computador. As imagens captadas por uma câmara clara voltada para o monitor, foram digitalizadas e convertidas por um programa (Computer Aided Reconstruction Package) baseado no sistema operacional UNIX e manualmente marcadas.

A alteração da intensidade da luz do microscópio permitia observar a imagem do monitor (menor luminosidade), do corte no microscópio (maior luminosidade) ou ambas (luminosidade intermediária). Quando o cursor era acionado, a marcação correspondente podia ser visibilizada na câmara clara. O operador delimitava o contorno de cada corte do nervo e o computador dividia a área delimitada em quadrantes, posicionando o primeiro quadrante sob a objetiva (aumento 100X), para o início da contagem axonal. Cada axônio mielínico foi manualmente registrado com o cursor e sua posição era registrada no monitor. Desta forma foi possível saber quais axônios já haviam sido marcados, impedindo a contagem de um axônio mais de uma vez. Terminada a contagem das fibras mielínicas de um quadrante, o computador movia a platina para o quadrante seguinte, prosseguindo sucessivamente até o último quadrante, indicando o número total de axônios registrados no corte.

A análise quantitativa dos neurônios sensitivos sobreviventes à lesão axonal foi realizada através da amostragem dos neurônios presentes no gânglio espinhal L<sub>5</sub>, com o auxílio de um microscópio equipado com câmara clara. Foram contados todos os corpos celulares dos neurônios com nucléolo evidente, sob objetiva de 25X, em um de cada dez cortes, na extensão total do gânglio.

### **3.6 - Análise morfométrica**

Foi obtida a partir dos cortes transversais retirados do nervo ciático nos animais do grupo NOR e da porção média do cabo de regeneração nos grupos COL e COL/MDP. De cada corte transversal observado ao microscópio foram utilizados três campos aleatórios e distintos com aumento de 100 vezes e captados por uma câmara digital. Com o auxílio do programa analisador de imagens SigmaScan Pro (Jandel Corporation, versão 5.0, San Raphael, CA, EUA), foram traçados os contornos de todas as fibras mielínicas (axônio e envoltório da bainha de mielina) presentes no campo com cursor manual, determinando o seu perímetro. A partir dos perímetros obtidos, foram calculados os diâmetros das fibras mielínicas (DFM).

Para a análise morfométrica dos neurônios sensitivos dos gânglios espinhais L<sub>5</sub> sobreviventes à lesão axonal, foram utilizados os mesmos cortes longitudinais seriados utilizados na análise quantitativa (um em cada dez cortes, na extensão total do gânglio), sendo utilizado um campo por corte. A obtenção da imagem foi feita com câmara fotográfica digital. Com o auxílio do programa SigmaScan Pro e do cursor manual foi determinada a área dos corpos celulares dos neurônios que apresentavam nucléolo evidente.

### 3.7 - Tratamento estatístico

Para todas as variáveis em estudo verificou-se a condição de normalidade dos resíduos dos dados experimentais. Com base nestes resultados foram realizadas análises de variância para as variáveis número de axônio e número de neurônios de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

em que

$y_{ij}$  = é a variável resposta observada na  $j$ -ésima repetição, no  $i$ -ésimo tratamento;

$\mu$  = é a média geral;

$t_i$  = é o efeito fixo do tratamento  $i$ ,  $i = 1, 2$  e  $3$ ;

$e_{ij}$  = é o erro aleatório associado a cada observação  $\sim NID(0, \sigma^2)$

Para a comparação entre médias de tratamentos utilizou-se o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

DISCUSSÃO



## **4.1 - Dados qualitativos do cabo de regeneração e do nervo ciático**

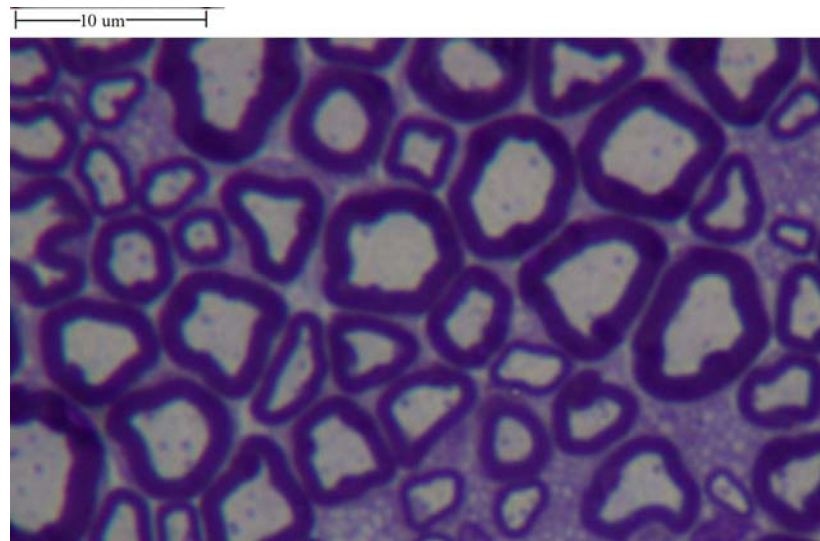
### **4.1.1 Aspecto macroscópico**

Decorridas quatro semanas do ato cirúrgico, os animais dos grupos COL e COL/MDP, apresentaram estrutura de aspecto similar no interior da prótese tubular. Tal estrutura, denominada cabo de regeneração (CR), unia os cotos proximal e distal do nervo ciático. O CR apresentava forma cilíndrica, com discreta redução no seu diâmetro distalmente. O diâmetro do cabo de regeneração apresentou-se sempre menor do que aqueles observados nos segmentos proximal e distal do mesmo nervo. O aspecto do CR era leitoso a avermelhado com vários vasos sangüíneos em sua superfície. O espaço entre a face interna do tubo de polietileno (TP) e a superfície do CR estava preenchido por líquido transparente.

### **4.1.2 Aspecto microscópico**

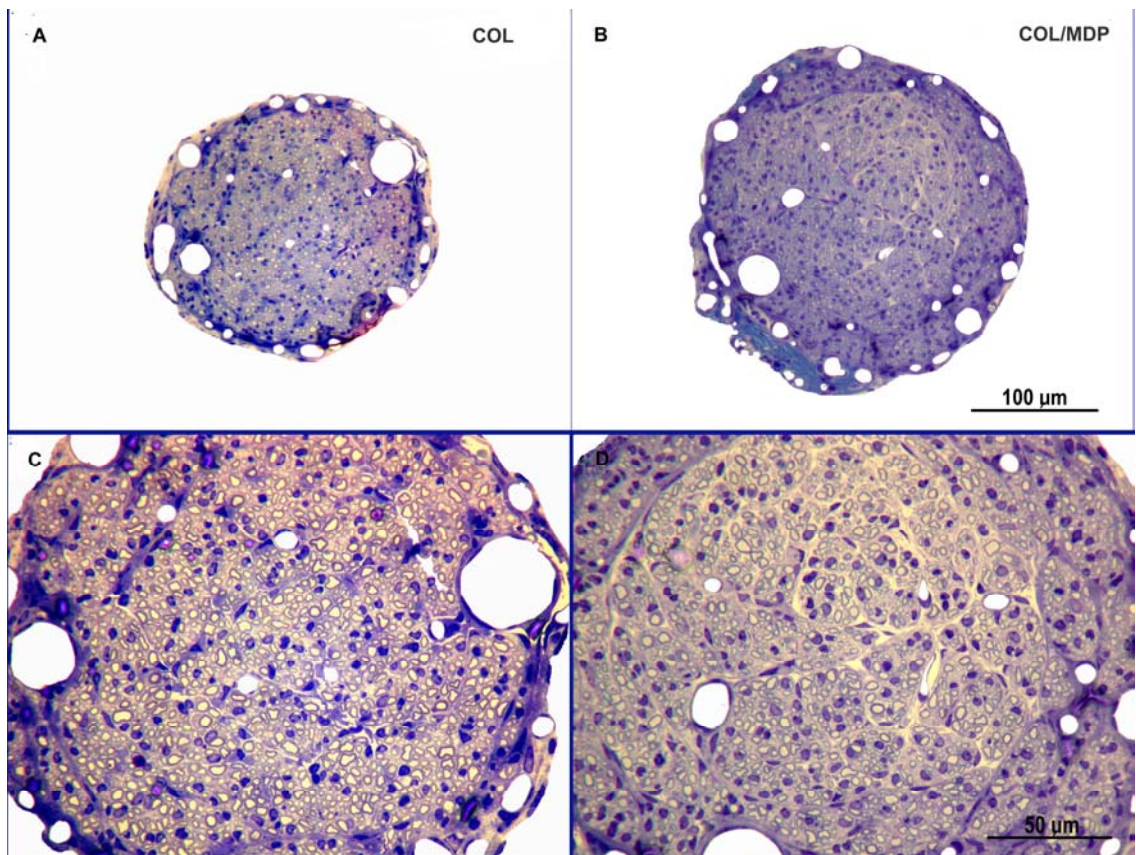
Os segmentos da porção média dos cabos de regeneração nos grupos COL e COL/MDP e do segmento do nervo ciático correspondente ao local de implantação da prótese tubular nos animais do grupo NOR cortados transversalmente foram examinados ao microscópio óptico de luz.

Os segmentos do nervo ciático coletados nos animais do grupo NOR apresentaram à microscopia óptica de luz o aspecto de nervo normal, com inúmeras fibras de diferentes diâmetros e espessuras da bainha de mielina. Da mesma forma, o perineuro e epineuro possuíam características normais (figura 2).



**Figura 2** – Fotomicrografia representativa dos cortes semifinos transversais obtidos do nervo ciático de camundongos do grupo controle (NOR). Observar o aspecto das fibras mielínicas com padrão normal. Barra de tamanho 10  $\mu\text{m}$ .

Os cortes transversais da porção média dos CR mostraram organização similar nos grupos COL e COL/MDP. Observou-se conjuntos de axônios organizados em minifascículos envoltos por perineuro, cada um deles contendo de cinco a 28 fibras mielínicas, evidenciando a ocorrência de processo típico da regeneração de um nervo periférico. Células de Schwann puderam ser observadas. Os axônios distribuídos pelo CR possuíam diâmetro reduzido observando-se axônios de maior diâmetro envoltos por fina bainha de mielina e axônios de menor diâmetro envoltos por bainhas mais espessas que as anteriores (figura 3). O tecido conjuntivo estava presente em grande quantidade.



**Figura 3** – Fotomicrografias representativas dos cortes semifinos transversais obtidos da região média dos cabos de regeneração (CR) de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (A e C) e colágeno e MDP (B e D). Observar a organização das fibras mielínicas regeneradas em minifascículos. Barras de tamanho 100  $\mu\text{m}$  em A e B e 50  $\mu\text{m}$  em C e D.

## 4.2 - Dados quantitativos dos axônios mielínicos

### 4.2.1 - Número de axônios mielínicos

A descrição da distribuição dos dados experimentais obtidos a partir da contagem do número de axônios mielínicos encontrados na porção média dos cabos de regeneração de camundongos com tubos preenchidos com solução de colágeno

(COL) e MDP (COL/MDP) e no nervo ciático de camundongos não operados (NOR) podem ser observadas na tabela 3 e no gráfico 1.

Os animais do grupo controle apresentaram em média maior número de axônios do que os grupos de animais operados. Os animais do grupo COL/MDP apresentaram maior número de axônios mielínicos quando comparados com os animais do grupo COL conforme se observa na tabela 3.

Tabela 3 – Médias, desvios-padrão e valores mínimos e máximos do número total de axônios mielínicos encontrados no cabo de regeneração nos grupos que receberam prótese tubular preenchida com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP) e no nervo ciático de camundongos não operados (NOR).

	<b>Número de axônios mielínicos</b>		
	<b>COL</b>	<b>COL/MDP</b>	<b>NOR</b>
<b>Média</b>	1.869,75	2.430,5	4.355
<b>Desvio-padrão</b>	289,46	223,86	32,57
<b>Mínimo</b>	1.504	2.198	4.330
<b>Máximo</b>	2.119	2.712	4.401

### MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DO NÚMERO DE AXÔNIOS MIELÍNICOS

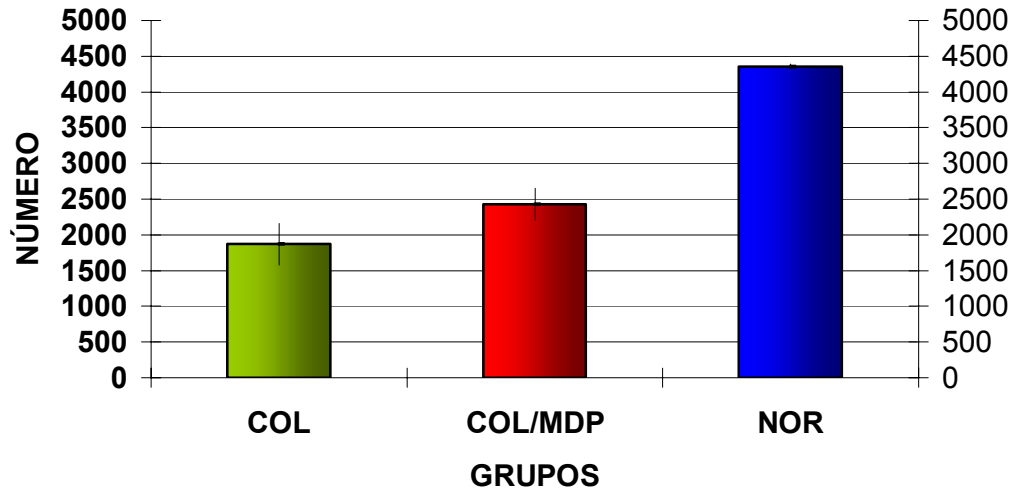


Gráfico 1 – Gráfico mostrando a média e o desvio padrão do número de axônios mielínicos encontrados na porção média dos cabos de regeneração de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP) quatro semanas após o ato operatório e no nervo ciático de camundongos não operados (NOR).

A análise estatística dos resultados obtidos, comparando, entre si, as médias do número de axônios mielínicos regenerados presentes no cabo de regeneração nos grupos COL e COL/MDP e no segmento do nervo ciático no grupo NOR, revelou diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,01$ ) para esta variável. Os resultados para as diferenças entre tratamentos para o número de axônios podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 – Diferenças entre os tratamentos para a média do número de axônios mielínicos encontrados no cabo de regeneração e no nervo ciático segundo o grupo estudado

<b>Tratamento</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Estatística</b>
<b>COL</b>	4	1869,75	c <sup>1</sup>
<b>COL/MDP</b>	4	2430,50	b
<b>NOR</b>	4	4355	a

<sup>1</sup> – Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

N – número de animais

#### 4.2.2 - Morfometria das fibras mielínicas

A mensuração do diâmetro das fibras mielínicas obtida a partir de três campos aleatórios e distintos dos cortes transversais retirados da porção média do cabo de regeneração nos grupos COL e COL/MDP e do nervo ciático nos animais do grupo NOR, permitiu a obtenção dos números discriminados na tabela 5 e nos gráficos 2 e 3.

Os diâmetros das fibras mielínicas (DFM) nos grupos estudados apresentaram média de 3,38  $\mu\text{m} \pm 1,16$  (COL), 3,54  $\mu\text{m} \pm 1,16$  (COL/MDP) e 6,19  $\mu\text{m} \pm 2,45$  (NOR).

Em todos os grupos observou-se maior número de fibras mielínicas com diâmetro entre 2 e 5  $\mu\text{m}$ , com frequência de 57,32% no grupo COL, 51,45% no grupo COL/MDP e 45,54% para o grupo NOR. Os grupos operados também

apresentaram grande contingente de fibras mielínicas com diâmetro até 2  $\mu\text{m}$  (COL = 44,34% e COL/MDP = 38,5%), enquanto o grupo NOR possuía poucas fibras de diâmetro reduzido (5,76%). O grupo controle possuía grande quantidade de fibras mielínicas com diâmetro entre 5 e 9  $\mu\text{m}$  (40,35%), fato não observado nos grupos COL e COL/MDP que apresentaram, respectivamente, 4,2 % e 4,25%. A ocorrência de fibras mielínicas com diâmetro acima de 9  $\mu\text{m}$  somente foi observada no grupo controle (8,37%), conforme verifica-se na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição das fibras nervosas mielínicas (em  $\mu\text{m}$ ) presentes no cabo de regeneração nos grupos COL e COL/MDP e no nervo ciático no grupo NOR, segundo o diâmetro.

<b>GRUPOS</b>	<b>DFM &lt; 2,00 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>2,00&lt;DFM&lt;5,00<math>\mu\text{m}</math></b>	<b>5,00&lt;DFM&lt;9,00<math>\mu\text{m}</math></b>	<b>DFM&gt;9,00<math>\mu\text{m}</math></b>
<b>COL</b>	44,34%	51,45%	4,25%	--
<b>COL/MDP</b>	38,5%	57,32%	4,2%	--
<b>NOR</b>	5,76%	45,54%	40,35%	8,37%

DFM – diâmetro das fibras mielínicas

Os histogramas de frequência das fibras mielínicas presentes no cabo de regeneração, mostrou que mais de 95% das fibras possuíam diâmetro abaixo de 5  $\mu\text{m}$  em ambos os grupos que receberam próteses tubulares, enquanto apenas 51,30% apresentaram este valor no grupo NOR. Nos segmentos coletados do nervo ciático no grupo NOR, entretanto, 48,72% das fibras mielínicas possuíam diâmetro

acima de 5  $\mu\text{m}$ . Por outro lado, nos grupos COL e COL/MDP, somente cerca de 4% das fibras possuíam diâmetro acima de 5  $\mu\text{m}$ .

A distribuição dos diâmetros axonais presentes na porção média do cabo de regeneração apresentou maior frequência entre 3 e 4  $\mu\text{m}$  nos grupos COL e COL/MDP. No grupo NOR a maior parte das fibras possuíam diâmetro entre 4 e 7  $\mu\text{m}$ .

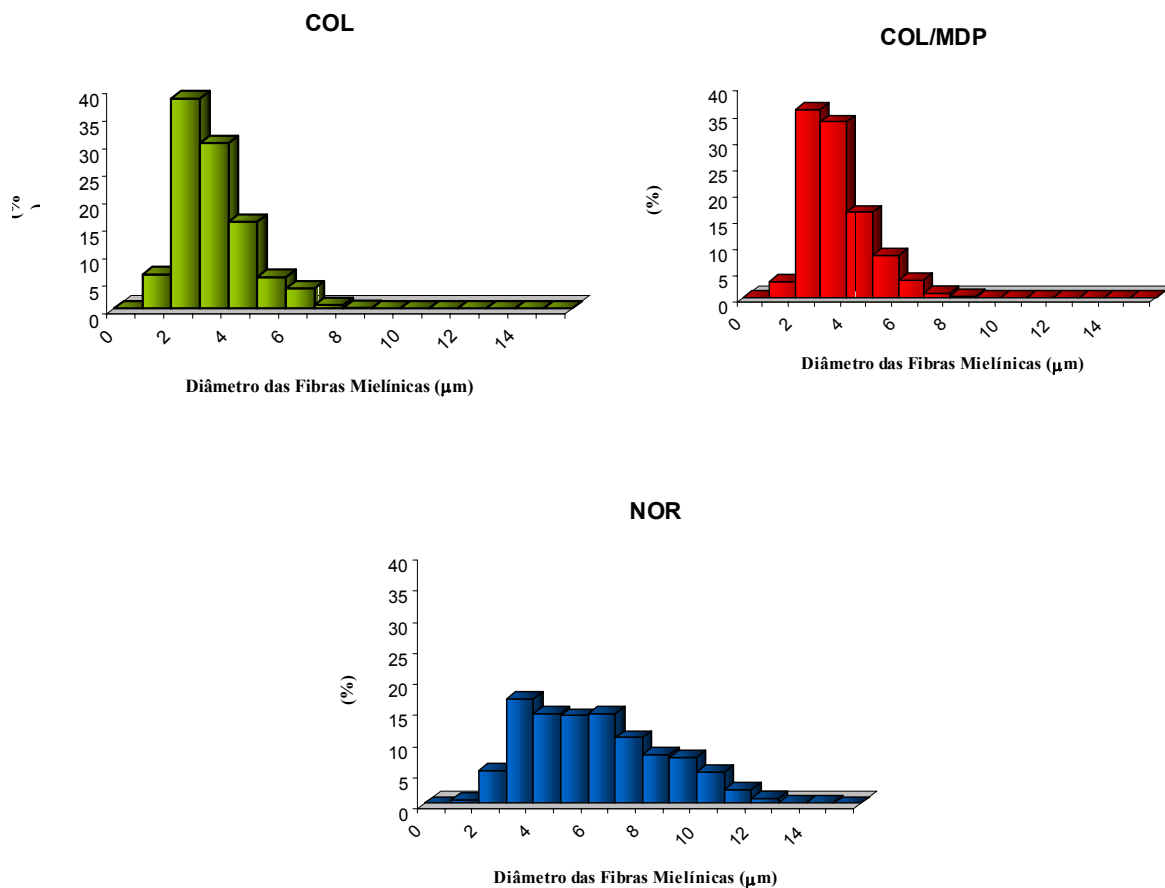
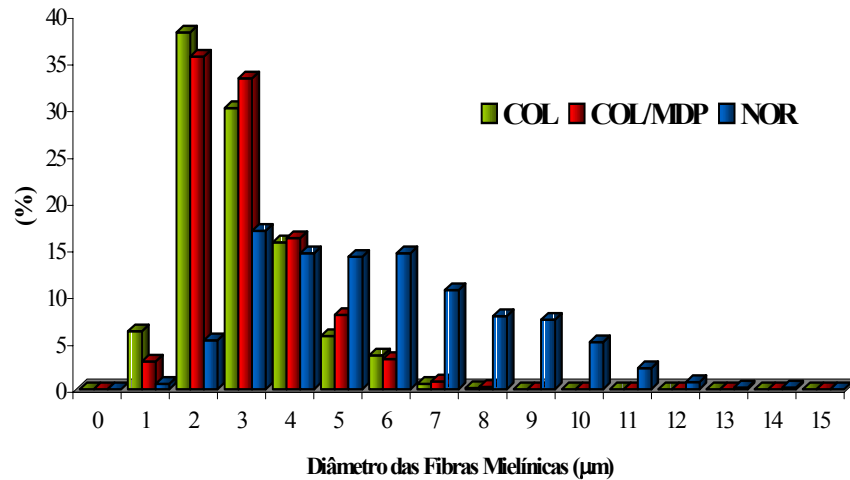


Gráfico 2 – Distribuição da frequência dos diâmetros das fibras mielínicas (em  $\mu\text{m}$ ) dos cortes transversais da porção média dos cabos de regeneração de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP (COL/MDP), quatro semanas após a implantação e do nervo ciático de camundongos não operados (NOR).



Distribuição de Frequência do Diâmetro das Fibras Mielínicas



Distribuição de Frequência do Diâmetro das Fibras Mielínicas

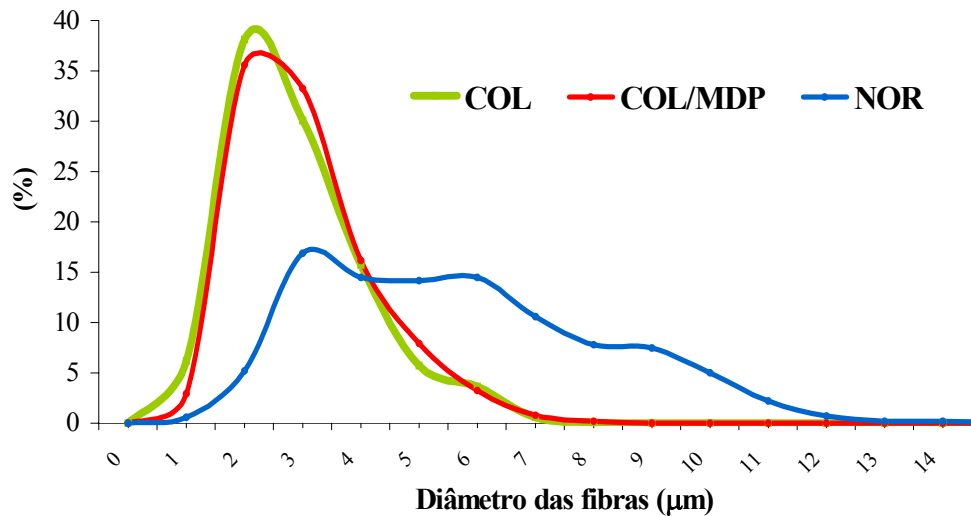


Gráfico 3 – Distribuição da frequência dos diâmetros das fibras mielínicas (em  $\mu\text{m}$ ) dos cortes transversais da porção média dos cabos de regeneração de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP (COL/MDP), quatro semanas após a implantação e do nervo ciático de camundongos não operados (NOR).

### 4.3 - Dados qualitativos do gânglio espinhal

A histologia dos cortes longitudinais dos gânglios espinhais L<sub>5</sub> correspondente ao antímero do membro que recebeu o implante nos grupos COL e COL/MDP e do gânglio espinhal L<sub>5</sub> esquerdo no grupo NOR, revelou estrutura semelhante em todos os grupos experimentais, ou seja a cápsula de tecido conjuntivo envolvia os gânglios, os corpos das células ganglionares e feixes de fibras nervosas mielínicas, além dos vasos sanguíneos. Os neurônios, de aspecto arredondado, de tamanho variado, com núcleo grande, dispunham-se preferencialmente na periferia do gânglio (figura 4). Os corpos das células ganglionares estavam envolvidos por uma camada de células achatadas, as células-satélite. Além disto, vasos sanguíneos estavam distribuídos por todo o gânglio.

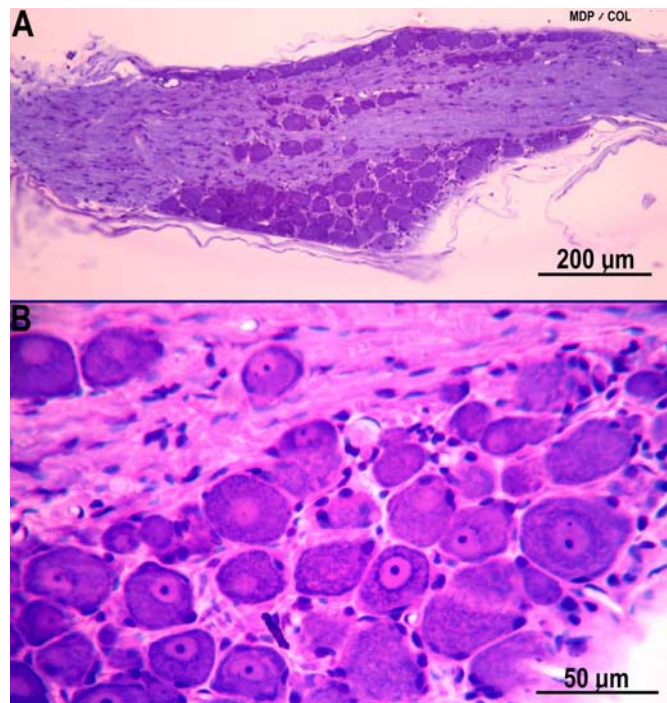


Figura 4 – Fotomicrografia representativa dos cortes longitudinais obtidos dos gânglios espinhais L<sub>5</sub> dos camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno e MDP quatro semanas após o ato operatório. Observar a presença dos neurônios, células arredondadas com núcleo evidente, dispostos preferencialmente na periferia. Barras de tamanho 200 µm em A e 50 µm em B.

#### 4.4 - Dados quantitativos dos neurônios sensitivos

##### 4.4.1 - Número de neurônios sensitivos

A contagem do número de neurônios sensitivos sobreviventes à lesão axonal realizada a partir dos cortes longitudinais dos gânglios espinhais L<sub>5</sub>, incluiu a contagem de todos os corpos celulares dos neurônios com nucléolo evidente, sob objetiva de 25X, em um de cada dez cortes, na extensão total do gânglio. Tal contagem revelou acentuada redução no número de neurônios sensitivos do gânglio espinhal L<sub>5</sub> nos grupos tubulizados (COL e COL/MDP) em relação aos animais não operados (NOR) (tabela 6, gráfico 4).

Tabela 6 – Médias, desvios-padrão e valores mínimos e máximos do número de neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> de camundongos que receberam tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP (COL/MDP) quatro semanas após o ato operatório e de camundongos não operados (NOR).

	Número de neurônios		
	COL	COL/MDP	NOR
<b>Média</b>	564,25	514,25	1.097,75
<b>Desvio-padrão</b>	51,47	56,16	142,78
<b>Mínimo</b>	488	453	901
<b>Máximo</b>	601	579	1.219

A análise estatística comparando as médias do número de neurônios presentes no gânglio espinhal L<sub>5</sub> nos grupos COL, COL/MDP e NOR mostrou que o grupo controle apresentou maior média estatisticamente significativa para o número de neurônios em relação aos grupos de animais operados. Estes, por sua vez, não diferiram estatisticamente entre si, indicando perda de neurônios nos gânglios

dorsais nos grupos operados. Os resultados das diferenças entre tratamentos para a variável podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7– Diferenças entre os tratamentos para o número de neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP) quatro semanas após o ato operatório e de camundongos não operados (NOR).

Tratamento	N	Média	Estatística
COL	4	564,25	b <sup>1</sup>
COL/MDP	4	514,25	b
NOR	4	1.097,75	a

<sup>1</sup> – Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

N – número de animais

**MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DO NÚMERO DE NEURÔNIOS SENSITIVOS NOS GÂNGLIOS L<sub>5</sub>**

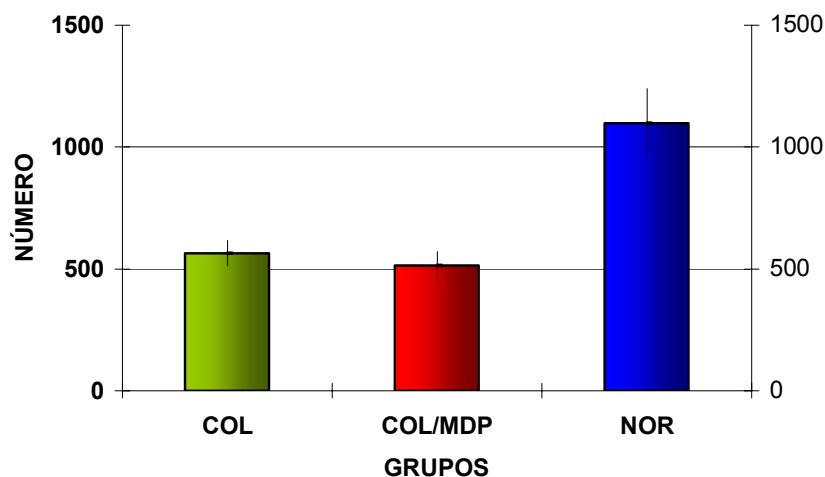


Gráfico 4 – Gráfico mostrando a média e desvio padrão do número de neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP), quatro semanas após o ato operatório e de camundongos não operados (NOR).

#### 4.4.2 - Morfometria dos neurônios sensitivos

A análise morfométrica dos neurônios sensitivos do gânglio espinhal L<sub>5</sub> sobreviventes à seção do nervo ciático e de nervos intactos foi realizada a partir dos cortes longitudinais dos gânglios espinhais L<sub>5</sub>. Foram utilizados os mesmos cortes longitudinais seriados utilizados na análise quantitativa (um em cada dez cortes, na extensão total do gânglio).

As médias e desvios-padrão da área dos neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> foram de  $518,62 \pm 145,71 \mu\text{m}^2$ , de  $543,86 \pm 143,73 \mu\text{m}^2$  e de  $487,97 \pm 146,35 \mu\text{m}^2$  para os grupos, COL, COL/MDP e NOR respectivamente, conforme observado na tabela 8.

Tabela 8 – Médias e desvios-padrão ( $\mu\text{m}^2$ ) da área dos neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> de camundongos que receberam tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP) quatro semanas após o ato operatório e de camundongos não operados (NOR).

TRATAMENTO	N	MÉDIA ( $\mu\text{m}^2$ )	DESVIO-PADRÃO ( $\mu\text{m}^2$ )
COL	4	518,62	145,71
COL/MDP	4	543,86	143,73
NOR	4	487,97	146,35

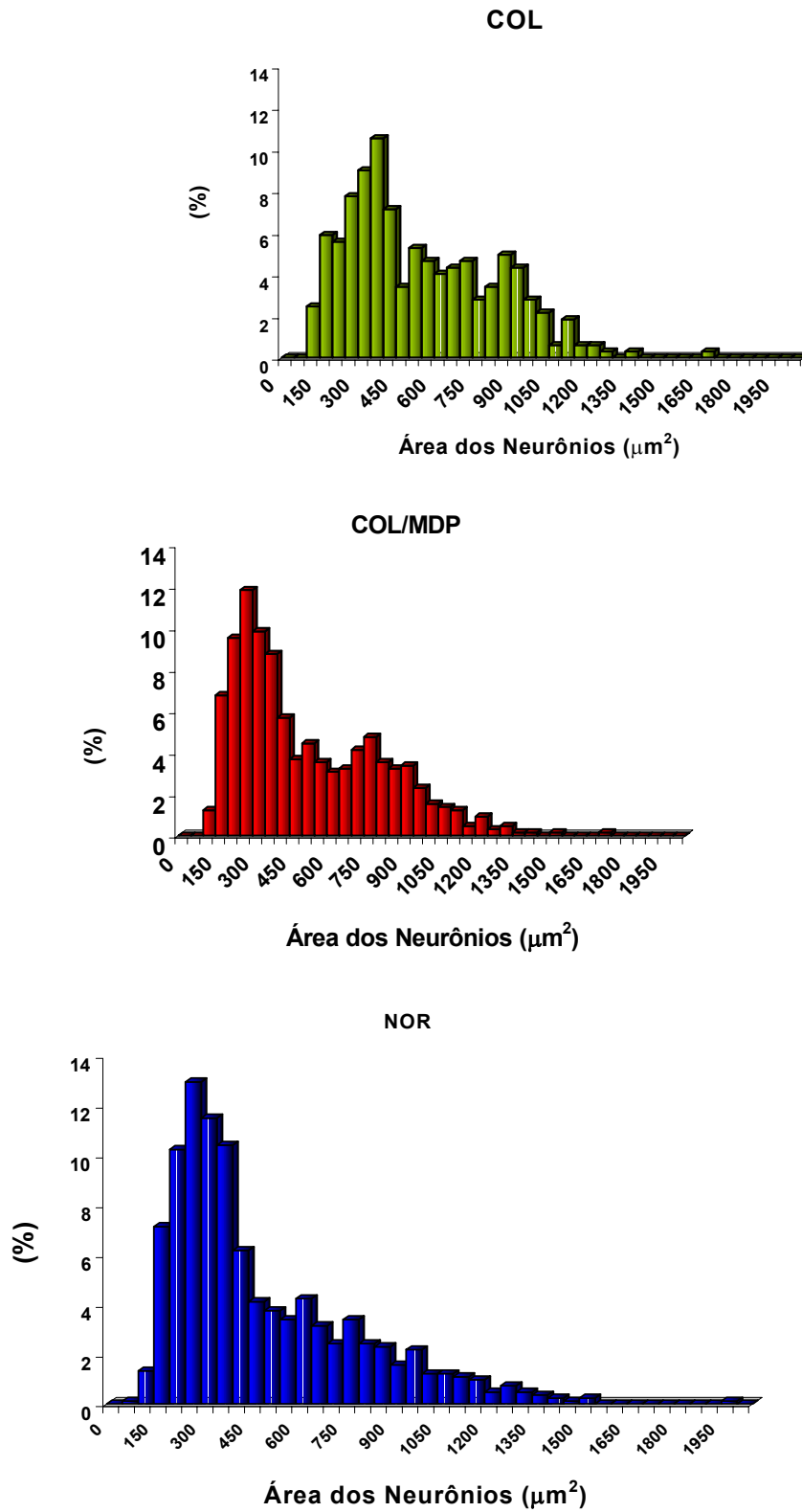
N- Número de animais

Os corpos celulares dos neurônios sensitivos do gânglio espinhal L<sub>5</sub> dos animais do grupo COL possuíam valores de área distribuídos entre 100 e 1350  $\mu\text{m}^2$ ; as áreas dos neurônios sensitivos nos animais do grupo COL/MDP estavam entre 100 e 1750  $\mu\text{m}^2$  e os animais do grupo NOR possuíam valores de área distribuídos entre 50 e 1600  $\mu\text{m}^2$ . No grupo que recebeu implante preenchido com solução de colágeno, observou-se que 61,78% dos neurônios possuíam área entre 200 e 700

$\mu\text{m}^2$ , enquanto no grupo COL/MDP a porcentagem de neurônios com esta área foi de 63,67% e no grupo não operado (NOR) a porcentagem de neurônios com área entre 200 e 700  $\mu\text{m}^2$  foi de 69,86% (tabela 9). Os gráficos de distribuição de frequência dos neurônios nos grupos estudados indicam presença de neurônios com área entre 700 e 1000  $\mu\text{m}^2$  nos grupos COL e COL/MDP em maior frequência que o grupo NOR. Os resultados ora obtidos, quanto ao tamanho dos neurônios, não permitiu estabelecer uma população específica de neurônios sensitivos afetada pelo trauma.

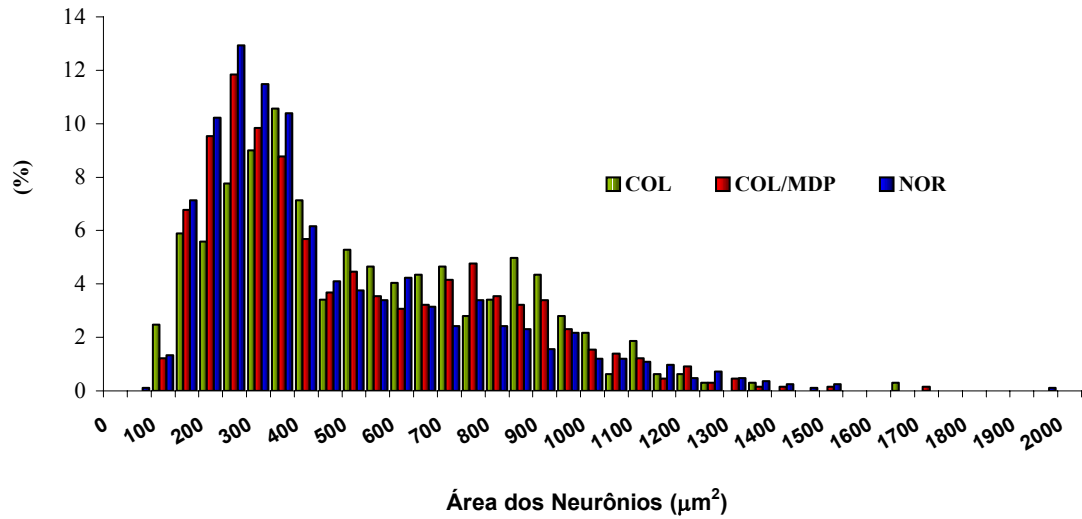
Tabela 9 – Distribuição por área ( $\mu\text{m}^2$ ) dos neurônios sensitivos, encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> de camundongos que receberam tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP) quatro semanas após o ato operatório e de camundongos não operados (NOR).

<b>ÁREA</b>	<b>COL</b>	<b>COL/MDP</b>	<b>NOR</b>
<b>Área&lt;100<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0	0	0,12%
<b>100&lt;área&lt;200<math>\mu\text{m}^2</math></b>	8,38%	8%	8,46%
<b>200&lt;área&lt;300<math>\mu\text{m}^2</math></b>	13,35%	21,38%	23,21%
<b>300&lt;área&lt;400<math>\mu\text{m}^2</math></b>	19,56%	18,61%	21,88%
<b>400&lt;área&lt;500<math>\mu\text{m}^2</math></b>	10,55%	9,38%	10,27%
<b>500&lt;área&lt;600<math>\mu\text{m}^2</math></b>	9,94%	8%	7,13%
<b>600&lt;área&lt;700<math>\mu\text{m}^2</math></b>	8,38%	6,3%	7,37%
<b>700&lt;área&lt;800<math>\mu\text{m}^2</math></b>	7,45%	8,92%	5,8%
<b>800&lt;área&lt;900<math>\mu\text{m}^2</math></b>	8,38%	6,76%	4,71%
<b>900&lt;área&lt;1000<math>\mu\text{m}^2</math></b>	7,14%	5,69%	3,74%
<b>1000&lt;área&lt;1100<math>\mu\text{m}^2</math></b>	2,8 %	2,9%	2,58%
<b>1100&lt;área&lt;1200<math>\mu\text{m}^2</math></b>	2,48%	1,69%	2,05%
<b>1200&lt;área&lt;1300<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0,93%	1,23%	1,21%
<b>1300&lt;área&lt;1400<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0,62%	0,61%	0,84%
<b>1400&lt;área&lt;1500<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0	0,15%	0,36%
<b>1500&lt;área&lt;1600<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0	0,15%	0,24%
<b>1600&lt;área&lt;1700<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0	0	0
<b>1700&lt;área&lt;1800<math>\mu\text{m}^2</math></b>	0	0,15%	0

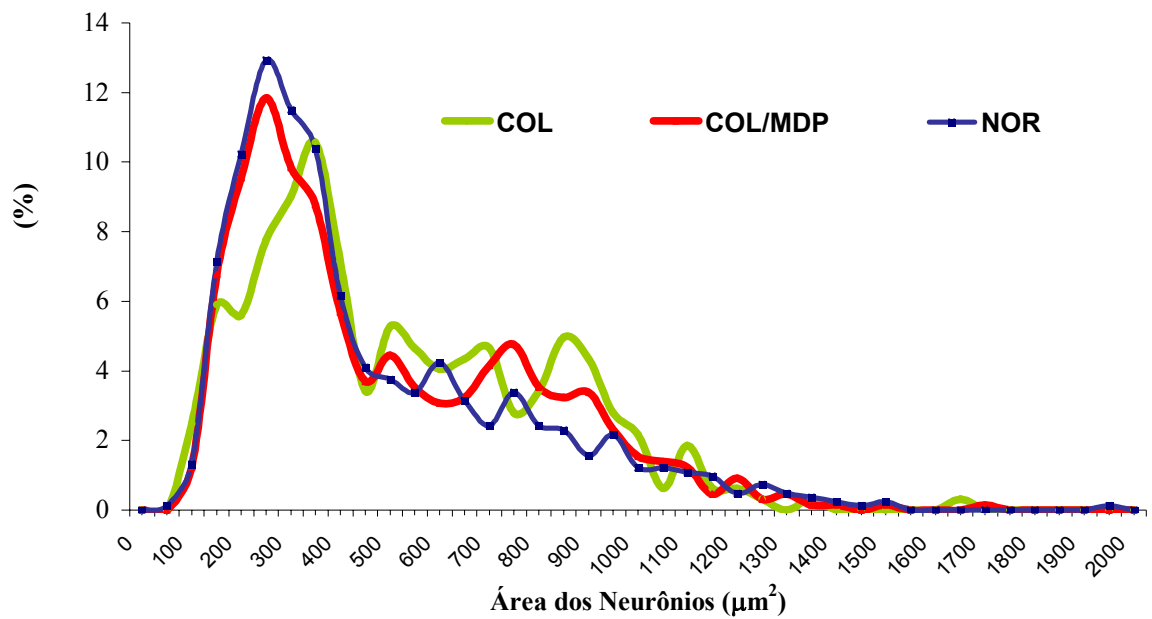


**Gráfico 5** – Gráfico mostrando a distribuição de frequência da área dos neurônios sensitivos (em  $\mu\text{m}^2$ ) encontrados no gânglio espinal L5 de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP(COL/MDP), quatro semanas após a implantação e de camundongos não operados (NOR).

Distribuição de Frequência da Área dos Neurônios



Distribuição de Frequência da Área dos Neurônios



**Gráfico 6** – Gráfico mostrando a distribuição de frequência da área dos neurônios sensitivos (em  $\mu\text{m}^2$ ) encontrados no gânglio espinal L5 de camundongos implantados com tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e com colágeno e MDP (COL/MDP), quatro semanas após a implantação e de camundongos não operados (NOR).



As observações pioneiras de Waller (1850) e Ramón y Cajal (1928), ainda inspiram pesquisas sobre os processos envolvidos na degeneração e regeneração dos nervos periféricos. Devido aos contínuos avanços na resolução microscópica, na bioquímica e na biologia molecular, as contribuições de Waller e Ramón y Cajal têm se expandido e resultado em maior compreensão da importância da degeneração walleriana no processo de regeneração (KOTTER et al., 2001; SEKIYA et al., 2001). Recentemente, a compreensão da relação entre a degeneração e a regeneração, avançaram no campo da neuroimunologia. Sabe-se que as interações neural e imune são essenciais no processo de degeneração walleriana (ANDERSON et al., 1992; BELL; PERRY, 1995; PRINS; LIAU, 2003; ROTSHENKER, 1997; SACHWARTZ ET AL., 1999; SHAMASH et al., 2002).

Nos mamíferos, o nervo periférico transeccionado possui a capacidade de regeneração e de atingir, embora de maneira limitada, a recuperação funcional. O processo de regeneração dos nervos periféricos envolve a restauração do volume axoplasmático perdido em meio a uma intensa proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais, células de Schwann) (LUNDBORG et al., 1982b). Ao contrário de outras células do corpo, os neurônios não sofrem replicação. Vista desta perspectiva, a regeneração de um nervo lesado é um processo deficiente e desapontador. Visando otimizar as taxas de recuperação funcional, vários experimentos no campo da cirurgia, neurologia e neurobiologia, têm sido desenvolvidos na esperança de aumentar o processo reparador do sistema nervoso (LUNDBORG, 1988b), como no caso era lesado a efeito.

A técnica de tubulização no reparo de nervos transeccionados possui a vantagem de atuar como câmara, permitindo a avaliação *in vivo* dos efeitos de várias substâncias, tais como fatores neurotróficos, fatores promotores de crescimento e componentes da matriz extracelular, envolvidos na regeneração dos nervos periféricos (DA-SILVA, 2001; DA-SILVA et al., 1985 e 1996; FIELDS et al., 1989; LAINETTI et al., 1993 e 1998; LUNDBORG et al., 1982a; MADISON et al., 1987; PEREIRA et al., 1998 E 2000). A tubulização constitui técnica valiosa nos estudos experimentais, uma vez que não existem métodos melhores que permitam testar substâncias que provoquem alterações celulares ou moleculares no microambiente do nervo em regeneração (FIELDS et al., 1989). Valeu-se, assim, no presente experimento, da referida técnica para avaliar o efeito do MDP em nervos ciáticos seccionados e tubulizados.

A metodologia, observada na literatura, para avaliar o processo da regeneração com a técnica da tubulização é variada. Os modelos utilizados incluem espécies diferentes, variados tempos de sobrevivência, falhas com extensões variadas, diferentes materiais de próteses e diversos aditivos no interior das mesmas. Assim, procurou-se, neste trabalho, estabelecer comparações com os dados de trabalhos que possuíssem metodologia semelhante à esta.

O camundongo tem se tornado um modelo *in vivo* cada vez mais popular no estudo da regeneração dos nervos periféricos (RODRIGUEZ et al., 2000). Diferentes linhagens e camundongos geneticamente manipulados também têm sido utilizados no estudo de fatores específicos da regeneração dos nervos periféricos (BISBY; CHEN, 1990; GALIANO et al., 2001; ZHONG et al., 1999; WERNER et al., 2000). O camundongo foi escolhido pelo baixo custo de manutenção e por ser um

animal de fácil manejo. Utilizou-se camundongos da linhagem C57BL/6J como modelo para avaliar os efeitos do MDP na regeneração dos nervos periféricos. Esta linhagem de camundongos tem sido utilizada em diversos experimentos, constituindo-se em modelo experimental plausível para avaliar o efeito de substâncias exógenas na regeneração dos nervos periféricos (DA-SILVA et al., 1985; LAINETTI; DA-SILVA, 1993; LAINETTI et al., 1995; MADISON et al., 1987; ).

O tamanho da amostra foi adequado e permitiu a análise estatística dos resultados obtidos, a semelhança do observado por Lainetti (1999) e Lainetti; Da-Silva (1993).

O modelo experimental adotado neste estudo, utilizando a secção do nervo ciático seguida da introdução do mesmo no interior da prótese tubular e ancoramento com um único ponto simples em cada extremidade com fio de náilon monofilamentar n.º 10-0, foi utilizado em diversos experimentos, constituindo técnica adequada (DA-SILVA et al., 1985; LAINETTI; DA-SILVA, 1993; LAINETTI et al., 1995; MADISON et al., 1987 e 1988 ). O fio de náilon monofilamentar foi escolhido para a sutura por incitar a menor reação tipo corpo estranho (BORA, 1978, TERRIS; FEE, 1993).

O intervalo de 4 mm mantido entre os cotos suturados no interior das próteses não exerceu influência negativa sobre o processo de regeneração axonal, permitindo o crescimento dos axônios em direção ao segmento distal. A regeneração de axônios através de um *gap* de 4 mm no nervo ciático de camundongos também foi referida por diversos autores (DA-SILVA et al., 1985; LAINETTI et al., 1995; MADISON et al., 1985 e 1987). A distância máxima entre os cotos, através da qual é possível a regeneração, depende da natureza do conduto,

dos aditivos utilizados e da espécie animal. Assim, Madison et al. (1988) relataram a tubulização em distâncias de 2 cm utilizando tubos preenchidos por colágeno ou gel contendo laminina.

Dentre os diversos tipos de materiais empregados na confecção dos tubos, está o polietileno. Este material vem sendo amplamente utilizado nas reparações dos nervos periféricos (LAINETTI, 1999; LAINETTI; DA-SILVA, 1993) a semelhança do tubo aplicado neste trabalho.

Diversas pesquisas têm se concentrado na adição de proteínas purificadas naturais da matriz extracelular e glicosaminoglicanas, que podem ser modificadas para servir como substrato ao crescimento axonal. Constatou-se a utilização de diversas substâncias como: solução salina (WILLIAMS; VARON, 1985), colágeno, laminina, fibronectina (CHEN et al., 2000; LAINETTI, 1999; LAINETTI; DA-SILVA, 1993; TERRIS et al., 2001), proteoglicanas (MADISON et al., 1985), ácido hialurônico (SECKEL et al., 1995; MOHAMMAD et al., 2000), fibrina (HERBERT et al., 1998) dentre outras. Os fatores promotores de neuritos promovem o crescimento ou a regeneração dos neuritos, possivelmente facilitando a interação apropriada entre os neuritos e o substrato (VARON; ADLER, 1980). O colágeno figura dentre os constituintes da matriz extracelular que possuem atividade na extensão de neuritos in vitro (FIELDS et al., 1989). O colágeno utilizado no interior das próteses tubulares teve como objetivo evitar que o MDP escoasse para o exterior do tubo. Este material também foi empregado em outros experimentos (LAINETTI, 1999; LAINETTI & DA-SILVA, 1993). A adição de componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno no interior de próteses de silicone,

aumentou a regeneração através de falha de 10 mm no nervo ciático de ratos, quando comparados ao controle (CHEN et al., 2000).

A escolha do período de observação de quatro semanas, para avaliar o processo de regeneração, baseou-se no fato de não haver variação no número de axônios mielínicos encontrados na porção média do cabo de regeneração do nervo ciático seccionado e reparado com a técnica de tubulização, às quatro e seis semanas após a tubulização (DA-SILVA et al., 1985). Lundborg et al. (1982a) relataram a reinervação do segmento distal dentro de quatro semanas, desde que a distância entre os cotos não excedesse 10 mm.

As variáveis freqüentemente adotadas para avaliar a regeneração de um nervo periférico incluem a morfologia (MACKINNON et al., 1984), a morfometria e análise quantitativa dos axônios regenerados (MACKINNON et al., 1990; STOPIGLIA, 1992), a eletrofisiologia (DELLON; MACKINNON, 1989), a morfometria e análise quantitativa dos neurônios sobreviventes à lesão (ALDSKOGIUS; RISLING, 1981; ARVIDSSON et al., 1986; LISS et al., 1996; MYLES et al., 1992; YGGE, 1989), e análise funcional da marcha (DE MEDINACELLI et al., 1982). Dentre os métodos de avaliação disponíveis, empregou-se a análise morfológica do cabo de regeneração e do gânglio dorsal L<sub>5</sub>, visando à avaliação qualitativa das alterações histológicas provocadas pela ação do MDP administrado no local da lesão no nervo ciático reparado com a técnica da tubulização. A contagem do número de axônios mielínicos e a mensuração do seu diâmetro também foram avaliados por serem parâmetros que medem os efeitos da maturação do axônio, conforme preconiza Lundborg (1988c). Estes parâmetros também

foram adotados por outros autores para avaliar a regeneração do nervo (FIELDS; ELLISMAN, 1986; KIYOTANI et al., 1996).

O estudo eletrofisiológico não foi realizado, porém, sabe-se que existe correlação entre os parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos, ou seja, da velocidade de condução com o diâmetro da fibra e da amplitude com o número de fibras (DELLON & MACKINNON, 1989).

A análise funcional da marcha provê avaliação quantitativa do nervo periférico em regeneração, uma vez que representa o grau de recuperação real da função do mesmo. Além disto, este é um método barato, não invasivo e de fácil execução. Os testes funcionais têm sido utilizados na avaliação da regeneração do nervo periférico reparado com a técnica de tubulização (UTLEY et al., 1996). Ineserra et al. (1998) foram os primeiros a utilizarem o teste funcional da marcha em camundongos para avaliar a função dos nervos ciático, tibial e fibular. George et al. (2003) utilizaram o índice funcional do nervo fibular, obtido através da função de Bain-Mackinnon-Hunter (1989), para estimar o grau de recuperação funcional dos músculos flexores plantares que são inervados pelo nervo tibial em camundongos. As medidas do corredor descritos por Bain et al. (1989) foram redimensionadas e os índices obtidos permitiram a avaliação da função do nervo. Devido à recente adaptação da análise funcional para os camundongos, este teste não foi realizado neste experimento, contudo a sua execução forneceria dados que poderiam ser confrontados com a análise morfométrica.

A degeneração walleriana (RAMÓN y CAJAL, 1928) é a resposta do sistema nervoso à lesão axonal que envolve eventos celulares e moleculares. A degeneração walleriana é coordenada por uma rede complexa de citocinas (ROTSHENKER, 1997). Tais citocinas também contribuem para o recrutamento e a ativação de macrófagos na degeneração walleriana e, conseqüentemente, para as funções dependentes dos macrófagos (remoção da mielina pela fagocitose) (ROTSHENKER, 1997). Os macrófagos exercem papel fundamental no processo de regeneração, transformando o nervo em degeneração em ambiente apropriado à regeneração axonal (PERRY; BROWN, 1992). Os macrófagos recrutados da circulação (PERRY et al., 1987) removem os debris de mielina (REICHERT et al., 1994; HIRATA et al., 1999; STOLL et al., 1999, SEKIYA et al., 2001) e liberam citocinas e fatores de crescimento (LINDHOLM et al., 1987; MALLAT et al., 1989; KIEFER et al., 2001).

Os macrófagos recrutados dos vasos sangüíneos, a partir do segundo dia após a lesão (ED1+) (STOLL et al., 1989), removem rapidamente os debris de mielina que contêm inibidores do crescimento de neuritos, como a glicoproteína associada à mielina, facilitando a regeneração do nervo (QIU et al., 2000).

Outro mecanismo de ativação de macrófagos ocorre através da ação do fator de necrose tumoral (MOONIS et al., 1992). O TNF- $\alpha$  é uma das primeiras citocinas sintetizadas pelas células de Schwann durante o processo de degeneração walleriana (SAADA et al., 1996; SHAMASH et al., 2002). O MDP é capaz de induzir a formação ou de estimular as células a produzirem diversas citocinas como TNF- $\alpha$  (WOLFER et al., 2002), contribuindo indiretamente para a

ativação macrofágica. O TNF- $\alpha$  além de estimular diretamente os macrófagos (MOONIS et al., 1992), induz a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) pelos fibroblastos, promovendo ativação dos macrófagos. Os macrófagos exercem papel importante na regeneração axonal. No sistema nervoso periférico, a redução da resposta destas células em nervos lesados tem sido associada à redução da regeneração axonal (DAHLIN et al., 1995; LAZAROV-SPIEGLER et al., 1998; KIEFER et al., 2001).

Dentro do nervo, os macrófagos regulam a inflamação através da secreção de várias citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e as citocinas antiinflamatórias TGF- $\beta$ 1 e IL-10 (KIEFER et al., 2001). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem a produção de NGF em baixos níveis pelos fibroblastos (HATTORI et al., 1993) e IL-6 e IL-10, pelos macrófagos (SAADA et al., 1996). A IL-10 reduz a produção de todas as citocinas inflamatórias e dela própria, regulando a degeneração walleriana (BE'ERI et al., 1998; SHAMASH et al., 2002). A IL-1 $\beta$  induz a síntese de NGF e a sua neutralização impediu a regeneração do nervo (GUENARD et al., 1991). Enfim, as citocinas podem regular indiretamente a sobrevivência neuronal e crescimento axonal através da regulação de NGF (SHAMASH et al., 2002). Elas exercem papel fisiológico essencial na reparação do nervo.

Assim, uma das principais ações do MDP é a ativação de macrófagos (RINGENBACH et al., 1998; PARANT et al., 1992). Pearse et al. (2001) ao utilizar o MDP após a lesão da medula espinhal, observaram aumento do número de macrófagos/micróglia ativados (ED1+) no local da lesão, a maioria era Mac1+, indicando que estavam ativamente envolvidos na fagocitose.



O recrutamento dos macrófagos está associado ao aumento da expressão de moléculas promotoras do crescimento axonal como o NGF (BROWN et al., 1991). Mallat et al. (1989) relatam que os macrófagos ativados sintetizam quantias significantes de NGF. Os macrófagos parecem estimular as células de Schwann a produzirem NGF, através da liberação de IL-1 (LINDHOLM et al., 1987). O NGF estimulou o alongamento axonal e brotamento nos terminais dos axônios lesados provenientes dos neurônios sensitivos de animais adultos (LAINETTI, 1999). Através dos mecanismos citados, o MDP poderia atuar favorecendo a regeneração axonal através da ativação direta ou indireta de macrófagos.

González-Hernández; Rustioni (1999) observaram que no segundo dia após a lesão, os macrófagos recrutados tornaram-se iNOS positivos, inicialmente no epineuro e posteriormente no espaço intraneural, onde se organizam em grandes agregados. A indução da iNOS requer a ativação de macrófagos por endotoxinas (MDP) e citocinas, dentre elas, o TNF e a IL-1 que estão presentes no nervo lesado e são secretados, em parte, pelas células de Schwann e pelos macrófagos (KIEFER et al., 2001; MASON, et al., 2001; SHAMASH et al., 2002). A iNOS sintetiza grandes quantias de NO, que está relacionado aos efeitos citotóxicos nas respostas imune e inflamatória (KERWIN et al., 1985; MONCADA et al., 1997). Dois eventos relevantes, ocorridos após a axotomia, podem ser mediados pela citotoxicidade do NO; a redução no conteúdo de RNAm para proteínas da mielina nas células de Schwann (TRAPP et al., 1988) e a depleção de organelas no segmento distal (SOMMER et al., 1993). Portanto, os efeitos citotóxicos do NO podem contribuir para a remoção da mielina. O MDP pode induzir a iNOS através da ativação direta dos macrófagos (MOONIS et al., 1992) ou através da indução da produção TNF- $\alpha$

(WOLFER et al., 2002), contribuindo para o processo de remoção da mielina e consequentemente, auxiliaria no processo de regeneração dos nervos periféricos.

Na literatura consultada, não observou-se relatos da utilização do MDP na regeneração dos nervos periféricos. Sabe-se que o MDP pode ser considerado um análogo funcional do lipopolissacarídeo (LPS) (HOFFMANN et al., 1999). Filogamo et al. (2002) ao estudarem as alterações ocorridas após a exposição do nervo ciático ao LPS, relataram aumento na produção de NO pelas células do gânglio dorsal, principalmente nos neurônios de tamanho pequeno.

O MDP, por suas características na estimulação do sistema imunológico, através da ação, principalmente sobre macrófagos, e da estimulação de citocinas, poderia acelerar o processo de degeneração walleriana e regeneração dos nervos periféricos. Um aspecto interessante a ser considerado é o de que a remoção eficiente da mielina através da fagocitose pelos macrófagos aceleraria o processo de regeneração com reinervação mais rápida da musculatura, evitando a atrofia e aumentando as chances de recuperação funcional.

Pearse et al. (2001) utilizaram este fármaco no local da lesão após a contusão da medula para estimular o processo regenerativo. Os autores relataram aumento na quantidade de axônios mielínicos nos tratos motores laterais, maior número de macrófagos/micróglia ativados (ED1<sup>+</sup>) no local da lesão, sendo a maioria Mac1<sup>+</sup>, indicando que estavam ativamente envolvidos na fagocitose. Algumas das propriedades benéficas citadas pelos autores incluem a estimulação da fagocitose por células imunocompetentes, facilitando a remoção da mielina sem afetar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e desencadeamento da expressão de

citocinas supressoras como IL-10. Embora mecanismos exatos da ativação celular do MDP e seus análogos ainda não estejam esclarecidos (KALYUZHIN et al., 1997, WOLFER et al., 2002), esta substância é capaz de induzir a formação ou de estimular as células a produzirem diversas citocinas, incluindo IL-1 (NELSON et al., 2002), IL-6, fatores estimuladores de colônias (SANCEAU et al., 1990; KOMIYA et al., 1992), TNF- $\alpha$  (WOLFER et al., 2002), desencadeando a expressão de citocinas supressoras, como IL-10 (SCHRIJVER et al., 2001).

O objetivo deste trabalho restringiu-se a avaliação do efeito do MDP na regeneração nervosa periférica, portanto, nenhum dos mecanismos supra citados foi verificado. Contudo, os diversos mecanismos através dos quais o MDP atuaria no processo de regeneração nervosa precisam ser melhor elucidados. Diante do exposto, utilizou-se, no presente trabalho, o MDP administrado localmente após transecção do nervo ciático de camundongos C57BL/6J machos, adultos, e reparo imediato com a técnica da tubulização.

A avaliação da morfologia com a utilização do microscópio óptico de luz não permitiu verificar a infiltração e proliferação dos macrófagos nos cortes transversais da porção média dos cabos de regeneração quatro semanas após o ato cirúrgico. A utilização de técnicas mais adequadas, como por exemplo a imunistoquímica e a microscopia confocal, seriam mais adequadas à visibilização de macrófagos. O tempo de sobrevivência de quatro semanas utilizado não permitiu avaliar a presença dos macrófagos, pois segundo Avellino et al. (1995) a avaliação temporal da resposta macrofágica revelou que seu início ocorre dentro de 24 horas após a lesão axonal e atingiu o pico em 14 a 21 dias. Hirata et al. (1999) valeram-se de

imunofenótipos: ED1 (antígeno citoplasmático para monócitos/macrófagos) e ED2 (antígeno de superfície para macrófagos residentes). Os tempos de sobrevivência utilizados pelos autores foram de dois, sete, 14 e 21 dias. Assim, a avaliação da porção média dos cabos de regeneração, valendo-se de técnicas e tempos de sobrevivência mais adequados à observação dos macrófagos, bem como análises quantitativas, forneceriam valiosas informações à respeito da ação do MDP sobre os macrófagos.

A barreira sangue-nervo é menos tesa que a barreira hemato-encefálica, permitindo o rápido influxo dos macrófagos após as lesões do sistema nervoso periférico (KIEFER et al., 2001). A própria lesão do nervo periférico quebra a barreira sangue-nervo, facilitando a passagem dos macrófagos para o local, facilitando o influxo destes, contribuindo para o processo de migração dos macrófagos.

Quanto ao aspecto histológico observado nos cabos de regeneração, observou-se a configuração do nervo foi substituída por coleções de pequenos fascículos unidos por tecido conjuntivo (perineuro), à semelhança do observado por Fields; Ellisman (1986) e Le Beau et al. (1988a). Este aspecto foi denominado de compartimentação por Morris et al. (1972 apud MACKINNON et al. 1984). Tais autores sugeriram que os componentes deste compartimento representam uma unidade funcional do nervo em regeneração que tenta reconstituir o ambiente endoneural. Admite-se que esta habilidade seja inerente ao nervo em regeneração, que forma estes compartimentos ao redor das projeções em regeneração, restaurando uma das barreiras sangue-nervo.

No material do presente estudo, a análise estatística dos resultados obtidos, comparando a média do número de axônios mielínicos regenerados nos animais implantados com tubos preenchidos com colágeno e com colágeno e MDP, foi inferior à média do número de axônios mielínicos nos animais não operados. Estes dados estão de acordo com os obtidos por outros autores que também observaram que a transecção do nervo ciático em camundongos C57BL/6J machos adultos, resultou em significativa redução do número de axônios mielínicos regenerados no interior de próteses tubulares (DA-SILVA, 1987; LAINETTI et al., 1995; PEREIRA et al., 1998).

A análise estatística dos dados obtidos, na contagem do número de axônios mielínicos, na porção média dos cabos de regeneração, mostrou que os animais que receberam MDP associado ao colágeno apresentaram aumento no número de axônios mielínicos regenerados, quando comparados aos animais que receberam apenas colágeno, evidenciando efeito estimulatório do MDP na regeneração dos nervos periféricos.

No tocante aos trabalhos que procuraram comparar os resultados obtidos com a técnica de tubulização com e sem a utilização de fármacos que visassem ao aumento da regeneração, verificamos que Lainetti; Da-Silva (1993); Madison et al. (1985), observaram maior número de axônios nos animais que receberam a adição dos diferentes fármacos. Chen et al. (1989) ao compararem o número de axônios regenerados no interior de próteses de silicone, observaram maior número no grupo que recebeu NGF em relação ao grupo que recebeu solução de Ringer no interior da prótese. Os grupos tubulizados tiveram menor número de axônios quando comparados ao grupo controle. Santos et al. (1998) observaram maior número de

axônios regenerados no interior de próteses preenchidas com solução de NGF quando comparados com próteses preenchidas com solução salina.

A análise morfométrica dos axônios mielínicos nos grupos tubulizados (COL e COL/MDP) evidenciou redução no diâmetro das fibras mielínicas quando comparados ao grupo não operado (NOR). Diversos autores observaram que os axônios mielínicos, regenerados no interior de próteses tubulares, possuem diâmetros inferiores aos observados nos nervos normais (LE BEAU et al., 1988a), mesmo após um período de observação de 10 meses (FIELDS; ELLISMAN, 1986).

Lainetti (1999) ao avaliar a distribuição do diâmetro das fibras mielínicas regeneradas no interior de próteses de polietileno preenchidas com colágeno, com NGF e colágeno, com BDNF e colágeno e com NT-3 e colágeno e de nervos não operados, verificou que em todos os grupos operados a maioria das fibras mielínicas exibiu diâmetro reduzido em relação ao controle. Apenas 13,8 a 21,3% das fibras regeneradas apresentaram diâmetro entre 5 e 9  $\mu\text{m}$ , enquanto no grupo controle 47,3% das fibras possuíam este diâmetro e 6,5% possuíam diâmetro acima de 9 $\mu\text{m}$ . Os dados da presente pesquisa mostraram que 4,25 e 4,2% dos axônios mielínicos regenerados no interior da prótese nos grupos COL e COL/MDP, respectivamente, possuíam diâmetro entre 5 e 9  $\mu\text{m}$ , enquanto o grupo NOR apresentou 40,35% das fibras com diâmetro entre 5 e 9  $\mu\text{m}$  e em 8,37% o diâmetro estava acima de 9 $\mu\text{m}$ . Embora haja algumas diferenças entre a distribuição de frequência encontrada por Lainetti (1999) e os dados aqui obtidos, fica evidente a redução no diâmetro dos axônios regenerados no interior das próteses tubulares.

O número de neurônios sensitivos do gânglio espinhal L<sub>5</sub> sofreu perda significativa nos grupos que sofreram transecção do nervo ciático. Tal resultado

está de acordo com outros estudos que avaliaram gânglios espinhais em diversas espécies animais (ALDSKOGIUS ; RISLING, 1981; ARVIDSSON et al., 1986; LAINETTI, 1999; LISS et al., 1996).

Após a lesão de um nervo periférico pode haver a morte neuronal devido à perda de suporte de fatores neurotróficos derivados do órgão alvo. As células de Schwann perdem contato com os axônios e passam a secretar NGF e BDNF após certo período (MEYER et al., 1992). A liberação destas proteínas não é rápida o suficiente para prevenir a morte de neurônios sensitivos que dependem de tais fatores para sobreviver (DA-SILVA ; LANGONE, 1989) . O CNTF é produzido e armazenado no citoplasma das células de Schwann, sendo liberado após o trauma para proteger os neurônios motores (APFEL et al., 1993; MITSUMOTO et al., 1994). Os neurônios motores possuem uma fonte de CNTF imediatamente após o trauma e podem sobreviver a ele; os neurônios sensitivos, por outro lado, devem ser mais suscetíveis ao trauma, uma vez que o suporte trófico é dependente da síntese tardia de fatores pelas células de Schwann (LAINETTI et al., 1995).

A transecção do nervo com amputação de parte do axônio resultou em perda significativa no número de neurônios sensitivos no gânglio espinhal L<sub>5</sub>, em ambos os grupos operados, que não diferiram entre si quanto a este parâmetro. A transecção do nervo ciático resulta em regeneração axonal pobre em camundongos da linhagem C57BL/6J (LU et al., 1994), provavelmente devido à perda de 40% das células do gânglio sensitivo após a lesão axonal, tornando-a modelo experimental conveniente à avaliação dos efeitos de substâncias exógenas na regeneração dos

nervos periféricos (LAINETTI et al., 1995). Os resultados aqui obtidos quanto ao número de neurônios sobreviventes à lesão no grupo que recebeu o MDP associado ao colágeno mostram grande perda celular, indicando a possibilidade de que o MDP não teve ação protetora nos neurônios sensitivos após a transecção do nervo ciático.

Aldskogius; Risling (1981) ao estudarem os efeitos da transecção do nervo ciático no número e na distribuição do tamanho dos neurônios no gânglio L7 de gatos jovens, observaram redução de mais de um terço no número de neurônios sensitivos. A determinação do número de neurônios sobreviventes ao trauma no gânglio espinhal L<sub>7</sub>, foi realizada através de cortes longitudinais seriados com 10  $\mu\text{m}$  de espessura. As contagens dos nucléolos neuronais eram realizadas a cada dez cortes, correspondendo a um intervalo de 100 $\mu\text{m}$ . Decorridos 80 dias do procedimento cirúrgico, observaram grande número de neurônios com cromatólise, principalmente os neurônios de tamanho pequeno. Houve aumento na quantidade de neurônios de tamanho médio, redução dos neurônios de tamanho grande e a porcentagem de neurônios pequenos permaneceu inalterada. Os autores concluíram que a transecção do nervo ciático em gatos jovens resulta em perda significativa de neurônios sensitivos em consequência do trauma e não estabeleceram uma população específica de neurônios sensitivos afetada pelo trauma. Presumiu-se que aumento do número de neurônios de tamanho médio associado à redução daqueles de tamanho grande foi resultado da atrofia dos neurônios de tamanho grande.



A ressecção do nervo ciático, em ratos adultos, resultou na perda de 15 a 30% das células do gânglios dorsais L<sub>4</sub> –L<sub>6</sub> (ARVIDSSON et al., 1986). Houve maior perda de células aos 60 dias de sobrevivência quando comparada aos 30 dias, subentendo-se que uma fração de células são perdidas mesmo após um longo período da lesão do nervo periférico.

Myles et al. (1992), referiram perda de células entre 29 a 36%, ressaltando que o volume da perda está relacionado ao processo de neurotomia e degeneração. Ygge (1989) mostrou maior perda de neurônios sensitivos nas ressecções proximais comparadas as ressecções distais do nervo. Nas lesões proximais, a resposta do ss é mais intensa, podendo exceder a sua capacidade de síntese, resultando em morte neuronal. Liss et al. (1996) destacaram a importância dos fatores neurotróficos, entre eles, o NGF como importante fator na manutenção dos neurônios sensitivos, na prevenção da morte celular.

Após a axotomia, o corpo celular reage na tentativa de repor o volume axoplasmático perdido, passando por uma série de alterações conhecidas como cromatólise. A resposta típica do corpo celular à lesão do seu axônio inclui o aumento no tamanho da célula associada ao aumento na síntese de proteínas importantes ao processo de regeneração axonal (LUNDBORG, 1988). Posteriormente, há redução na síntese de tais proteínas e estas células podem sofrer regressão no tamanho (PEYRONNARD et al., 1988). As alterações no tamanho do corpo celular dificultam o estabelecimento das populações afetadas pela transecção do nervo, pelos métodos de reparação, bem como pelo efeito dos fármacos utilizados.

O aumento na área do corpo celular pode ter ocorrido devido ao processo de cromatólise em resposta a transecção do nervo. O processo de cromatólise é caracterizado pelo aumento no volume do corpo celular, o núcleo se torna excêntrico e desenvolve nucléolo evidente, além de haver aumento no retículo endoplasmático rugoso o qual se dispersa pelo citoplasma (corpúsculo de Nissl), tornando-se basofílico. A cromatólise ocorre em diversas situações patológicas, inclusive após a lesão do axônio. Tais alterações morfológicas refletem aumento na atividade metabólica devido ao aumento na síntese de proteínas da estrutura celular. Esta reação tem início dentro de 24 horas após a lesão, tornando-se máxima em uma a três semanas. (JUBB; HUXTABLE, 1993). A avaliação morfológica dos cortes longitudinais dos gânglios dorsais não permitiu observar-se as alterações morfológicas características da cromatólise. Embora o azul de toluidina constitua corante adequado para evidenciar os corpúsculo de Nissl, a violeta de cresila proporciona melhores resultados (ONISHI, 2003). É provável que na época de avaliação, aqui utilizada, muitos dos componentes presentes no citoplasma dos neurônios que poderiam evidenciar o processo de cromatólise estavam em declínio, estando presentes em pequena quantidade. Assim, após corados, não foi possível evidenciar as alterações morfológicas da cromatólise. Associa-se a este fato a pequena porcentagem de neurônios que apresentavam aumento no tamanho da área, o que também dificultaria a observação dos fenômenos de cromatólise nos cortes observados. A avaliação morfológica pela microscopia óptica de luz é subjetiva e pode não ter sido suficientemente sensível para detectar o processo de cromatólise. Por outro lado, a avaliação morfométrica, trabalha com dados numéricos, sendo mais precisa no processo de avaliação.

Novos estudos que visem à elucidação dos mecanismos de ação do MDP sobre as fibras mielínicas e amielínicas, com diversos tempos de sobrevivência, são necessários a fim de melhor avaliar-se o seu papel no processo de regeneração nervosa periférica.

CONCLUSÕES

A análise dos dados quantitativos obtidos com a utilização do MDP após a lesão e reparo do nervo com a técnica da tubulização em animais adultos permitiu concluir que:

- A transecção do nervo seguida de reparo com a técnica da tubulização, resultou na redução do número de axônios mielínicos regenerados em relação ao nervo intacto.
- A utilização local do MDP imediatamente após a lesão estimulou o processo de regeneração axonal.
- Houve perda de neurônios sensitivos dos gânglios, não atingindo população específica quando considerada a área dos neurônios.
- MDP não teve ação protetora na sobrevivência dos neurônios sensitivos após a transecção dos seus axônios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000, 486p.

ALDSKOGIUS, H.; RISLING, M. Effect of sciatic neurectomy on neuronal number and size distribution in the L<sub>7</sub> ganglion of kittens. **Exp. Neurol.**, v. 74, p. 597-604, 1981.

ANDERSON, P.B.; PERRY, V.H.; GORDON, S. Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leucocyte chemotaxis induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 255-259, 1992.

APFEL, S.C.; AREZZO, J.C.; MORAN, M.; KESSLER, J.A. Effects of administration of ciliary neurotrophic factor on normal motor and sensory peripheral nerves in vivo. **Brain Res.**, v.604, p. 1-6, 1993.

ARVIDSSON, B. Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. **Acta Neuropathol. Berl.**, v. 37, p. 35-41, 1977.

ARVIDSSON, J.; YGGE, J.; GRANT, G. Cell loss in dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. **Brain Res.**, v. 373, p. 15-21, 1986.

ASENSIO, V.C.; CAMPBELL, I.L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 504-512, 1999.

ASHUR, H.; VILNER, Y.; FINSTERBUSH, A.; ROUSSO, M.; WEINBERG, H.; DEVOR, M. Extent of fiber regeneration after peripheral nerve repairs: silicone splint vs. suture, gap vs. graft. **Exp. Neurol.** v. 97, p.365-74, 1987.

AVELLINO, A.M.; HART, D.; DAILEY, A.T.; MACKINNON, M.; ELLEGALA, D.; KLIOT, M. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. **Exp. Neurol.**, v. 36, p. 183–198, 1995.

AYHAN, S.; YAVUZER, R.; LATIFOGLU, O.; ATABAY, K. The use of turnover epineural sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 16, p.371-377, 2000.

BABCOCK, W.W. A standard technique for operations on peripheral nerves with special reference to the closure of large gaps. **Surg. Gynecol. Obstetr.**, v.45, p.364-378, 1927.



BALLANCE, C.A.; BALLANCE, H.A.; STEWART, P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. **Br. Med. J.** v.2, p.1009-1013, 1903.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.83, p.129-36, 1989.

BARDE, Y.A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. New neurotrophic factors. **Ann. Rev. Physiol.** n.45, p.601-12, 1983.

BARRET, G. L.; GEORGIA. A. A low affinity nerve growth factor receptor P75NGFR mediates death of PC12 cells after nerve growth withdraw. **J. Neurosci. Res.**, v.45, p.117-128, 1996.

BE'ERI, H.; REICHERT, F.; SAADA, A.; ROTSHENKER, S. The cytokine network on wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 2707-2713, 1998.

BELL, M.D.; PERRY, V.H. Adhesion molecule expression on murine cerebral endothelium following the injection of a proinflammagen or during acute neuronal degeneration. **J. Neurocytol.**, v. 24, p. 695-710, 1995.

BENOWITZ, L.I.; SHASHOUA, V.E.; YOON, M.G. Specific changes in rapidly transported proteins during regeneration of goldfish optic nerve. **J. Neurosci.**, v.1, p.300-307, 1981.

BENNET, D. An anatomical and histological study of the sciatic nerve relating to peripheral nerve injuries in the dog and cat. **J. Small Anim. Pract.**, v.17, p.379-86, 1976.

BISBY, M.A.; CHEN, S. Delayed wallerian degeneration in sciatic nerves of C57BL/Ola mice is associated with impaired regeneration of sensory axons. **Brain Res.**, v. 530, p. 117-120, 1990.

BLACK, M.M., ALETTA, J.M.; GREENE, L.A. Regulation of MT composition and stability during NGF promoted neurite outgrowth. **J. Cell. Biol.**, v. 103, p. 545-557, 1986.

BORA JR., F.W. A comparison of epineurial, perineurial and epiperineurial methods of nerve suture. **Clin. Orthop.**, v.133, p.91-94, 1978.

BROWN, M.C.; PERRY, V.H; LUNN, E.R.; GORDON, S.; HEUMANN, R. Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: : Possible involvement of nerve growth factor. **Neuron**, v. 6, p. 359–370, 1991.

BROWN, P.W. Factors influencing the success of the surgical repair of peripheral nerves. **Surg. Clin. North Am.**, v.52, p. 1137-48, 1972

BRUSHART, T.M. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 1026-1031, 1988.

BRYAN, D.J.; WANG, K-K; CHAKALIS-HALEY, D.P. Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral nerve regeneration. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.12, n.7, p.439-445, 1996.

CALDER, J.S.; NORRIS, R.W.. Repair of mixed peripheral nerves using muscle auto grafts: a preliminary communication. **Br. J. Plast. Surg.**, v.46, p.557-64, 1993.

CAMPBELL, I.L. Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. **Brain Res. Rev.**, v. 26, p. 327-336, 1998.

CAMPENOT, R.B. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. **Dev. Biol.**, v. 93, p. 13-21, 1982.

CARBONETTO, S.; DAVID, S. Adhesive molecules of the cell surface and extracellular matrix in neural regeneration. In: GORIO, A. **Neuroregeneration**. Raven Press, Ltd, New York, 1993. p.77-100.

CHAMBERLAIN, L.J.; YANNAS, I. V.; HSU H-P; SPECTOR M. Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: The role of myofibroblasts. **J.Comp. Neurol.**, v.417, n.4, p.415-430, 2000.

CHAMBERLAIN, L.J.; YANNAS, I.V.; HSU, H.P.; STRICHARTZ, G.; SPECTOR, M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. **Exp Neurol.**, v. 154, p.315-329,1998.

CHAMBERS, J.N.; HARDIE, E.M. Localization and management of sciatic nerve injury due to ischial or acetabular fracture. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.22, n.4, p.539-44, 1986.

CHEN, Y.S.; WANG-BENNETT, L.T.; COKER, N. J. Facial nerve regeneration in the silicone chamber: the influence of nerve growth factor. **Exp. Neurol.**, v. 103, p. 52-60, 1989.

CHEN, Y.S.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CHENG, WC. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, v. 21, p. 1541-1547, 2000.

CHENG, E.T.; UTLEY, D.S.; HO, P-R.; TARN, D.M.; COAN, G.M.; VERITY, A. N.; SIERRA, D.H.; TERRIS, D.J. Functional recovery of transected nerves treated with systemic BDNF e CNTF. **Microsurg.**, v.41, p.35-41, 1998.

CHEDID, L.; AUDIBERT, F.; LEFRANCIER, P.; CHOAY, J.; LEDERER, E. Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.73, n.7, p.2472-5, Jul ,1976

CHESON, B.D.; CURNUTEJ.T.; BABIOR, B.M. The oxidative killing mechanisms of the neutrophil. **Prog. Clin. Immunol.**, v.3, p.1-65,1977.

CHIMELLI, L. Neuropatias periféricas: aspectos morfológicos e importância da correlação clínico-patológica. **Med. Rib. Preto**, v.26, p.5-19, 1993.

CHIU, D.T.; JANECKA, I.; KRIZEK, T.J.; WOLFF, M.; LOVELACE, R.E. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. **Surg.**, v.91, p.226-33, 1982.

COHEN, L.Y.; BAHR, G.M.; DARCISSAC, E.C.; PARANT, M.A. Modulation of expression of class II MHC and CD40 molecules in murine B cells by various muramyl dipeptides. **Cell. Immunol.**, v. 169, p.75–84, 1996.

CORDEIRO, P.G.; SECKEL, B.R.; LIPTON, S.A.; D'AMORE, P.A.; WAGNER, J. Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. **Plast Reconstr Surg.**, v. 83, p.1013-1019, 1989.

DANIELSEN, N.; PETTMANN, B.; VAHLSING, H.L.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. **J Neurosci Res.**, v.20, p.320-330, 1988.

DA-SILVA, C.F. Porcine ganglioside GN1 enhances peripheral nerve regeneration. In: 31<sup>st</sup> ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 2001, San Diego. Abstracts, v. 27, n. 2119, 2001.

DA-SILVA, C.F. Administration of exogenous phospholipid mixture increases peripheral nerve regeneration. In: 29<sup>th</sup> ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 1999, Miami. Abstracts, v. 25, n. 1002, 1999.

DA-SILVA, C.F.; LAINETTI, R.D.; PEREIRA, F.C., PIRES, R.S. Exogenous CNTF but neither NT-4 nor GDNF, enhances peripheral nerve regeneration in adult animals. In: 26<sup>th</sup> ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 1996, Washington. Abstracts, v. 22, n. 1963, 1996.

DA-SILVA, C.F.; LANGONE, F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration *in vivo*. **Braz. J. Med. Biol., Res.**, v. 22, p. 691-694, 1989.

DA-SILVA, C.F.; MADISON, R.; DIKES, P.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L. An *in vivo* model to quantify motor and sensory peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides. **Brain Res.**, v.342, p.307-315, 1985.

DAHLIN, L.B. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. **Brain Res.**, v.679, p. 274–280, 1995.

DAHLIN, L.B. Stimulation of regeneration of the sciatic nerve by experimentally induced inflammation in rats. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand. Surg.**, v.26, p.121-25, 1992.

DAHLIN, L.B.; McLEAN, W.G. Effects of graded experimental compression on slow and fast axonal transport in rabbit vagus nerve. **J. Neurol. Sci.**, v. 72, p.19-30, 1986.

DANIELSEN, N.; DAHLIN, L. B.; THOMSEN, P. Inflammatory cells and mediators in the silicone chamber model for nerve regeneration. **Biomaterials**, v.14, p.1180-1185, 1993.

DARCISSAC, E.C.; BAHR, G.M.; PARANT, M.A.; CHEDID, L.A.; RIVEAU, G.J. Selective induction of CD11a,b,crCD18 and CD54 expression at the cell surface of human leukocytes by muramyl peptides. **Cell. Immunol.**, v. 169, p. 294–301, 1996.

DE MEDINACELLI, F.W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.**, v.77, p.634-41, 1982.

DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.82, p.849-856, 1988.

DELLON, A. L.; MACKINNON, S.E. Selection of appropriate parameter to measure neural regeneration.. **J. Plast. Surg.**, v.23, n.3, p.197-202, 1989.

DEN DUNNEN, W.F.A.; VAN DER LEI, B.; SCHAKENRAAD, J.M.; BLAAUW, E.; BARTELS, H.; PENNING, A.J.; ROBINSON, P.H. Long-term evaluation of nerve regeneration in a biodegradable nerve guide. **Microsurg.**, v.14, p.508-515, 1993.

DEN DUNNEN, W.F.A.; VAN DER LEI, B.; SCHAKENRAAD, J.M.; BLAAUW, E.; BARTELS, H.; PENNING, A.J.; ROBINSON, P.H. Poly (DL-Lactide- $\epsilon$ -caprolactone) nerve guides perform better than autologous nerve grafts. **Microsurg.**, v.17, p.348-57, 1996.



DIAMOND, J.; COOPER, E.; TURNER, C.; MACINTYRE, L. Trophic regulation of nerve sprouting. **Science**, v. 193, p.371-377, 1976.

DOI, K; TAMARU, K.; SAKAI, K; KUWATA, N.; KURAFUJI,Y.; KAWAY, S. A comparison of vascularized and conventional sural nerve grafts. **J. Hand Surg.**, v.17A, p.670-676, 1992.

DONAT, J.R.; WISNIEWSKI, H.M. The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. **Brain Res.**, v. 53, p. 41-53, 1973.

DRUBIN, D.; KOBAYASHI, S.; KELLOGG, D.; KIRSCHNER, M. Regulation of microtubule protein levels during cellular morphogenesis in nerve growth factor-treated PC 12 cells. **J. Cell. Biol.**, v. 106, p.1583-1591, 1988.

DUBUISSON, A.S.; BEUERMANN, R.W.; KLINE, D.G. Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers: the influence of epidermal growth factor. **J. Reconstr. Microsurg.**, n.5, v.9, p.341-46, 1993.

DUCKER, T.B. Metabolic factors in surgery of peripheral nerves. **Surg. Clin. North Am.**, v.52, p.1109-1115, 1972.

DUCKER, T.B.; HAYES,G. Experimental improvements in the use of silastic cuff on peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, v.28, p.582-90, 1968.

DUCKER, T.B.; KEMPE, L.G.; HAYES, G.J. The metabolic background for peripheral nerve surgery. **J. Neurosurg.**, v.30, p.270-276, 1966.

DUNCAN, I.D. Peripheral nerve disease in the dog and cat. **Vet. Clin. North Am.**, v.10, p.177-196, 1980.

EGUI, E.M.; DELUSTRO, B.; ROUHAFZA, S.; ILLNICKA, M.; LEE, S.W.; WILHELM, R.; ALLISON, A. Some antioxidants inhibits, in a co-ordinate fashion, the production of tumor necrosis factor-alfa, IL beta, and IL-6 by human peripheral blood mononuclear cells. **Int. Immunol.**, v.6, p.409-22, 1994.

ELLIASSON, M.J.L.; HUANG, Z.; FERRANTE, R.J.; SASAMATA, M.; MOLLIVER, M.E.; SNYDER, S.H.; MOSKOWITZ, M.A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neuronal damage. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 14, p. 5910-5918, 1999.

EPPLEY, B.L.; DELFINO, J.J. Collagen tube repair of the mandibular nerve: a preliminary investigation in the rat. **J. Oral Maxillofacial Surg.**, v.46, n.1, p.411-47, 1988.

ESPOSITO, B.; SANTIS, A.; MONTEFORTE, G.; BACCARI, G.C. Mast cells in Wallerian degeneration: morphologic and ultrastructural changes. **J. Comp. Neurol.**, v. 455, p. 199-210, 2002.

FEARON, D.T.; MANDERS, P.; WAGNER, S.D. Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. **Science**, v.293, p. 248–250, 2001.

FERREIRA, M.A.; STOPIGLIA, A.J.; CORREIA DA SILVA, L.C.L. Avaliação da técnica de tubulização do nervo digital palmar de eqüinos, após neurectomia, com uso de prótese de silicone. **Veterinária Notícias**, v.8, p. 35-43, 2002.

FIELDS, D.R.; ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices II. Functional morphology. **Exp. Neurol.**, v.92, p.61-74, 1986.

FIELDS, D.R.; LE BEAU, JM; LONGO, F.M.; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Prog. Neurobiol.**, v.33: p.87-134, 1989.

FILOGAMO, G.; BIASOL, S.; RECLUTA, E.; VERCELLI, A. Increase in the number of NADPH-diaphorase-positive neurons in the lumbar dorsal root ganglia following lipopolysaccharide exposure of the sciatic nerve. **Morphologie**, v.86, p. 27-30, 2002.

FRANCEL, P.C.; FRANCEL, T.J.; MACKINNON, S.E.; HERTL, C. Enhancing nerve regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. **J. Neurosurg.**, v.87, p.887-892, 1997.

FRESNO, M.; KOPF, M.; RIVAS, L. Cytokines and infectious disease. **Immunol. Today**, v. 18, p. 56-8, 1997.

FREUND, J.; DELVIN, H.B.; WALTER, A.W. Immunization against malaria: vaccination of ducks with killed parasites incorporated with adjuvants. **Science**, v.102, p.200–202, 1945.

FRIEDMAN, H.C.; JELSMA, T.N.; BRAY, G.M.; AGUAIO, A.J. A distinct pattern of trophic factor expression in myelin-deficient nerves of trembler mice: implications for trophic support by Schwann cells. **J. Neurosci.**, v.16, p.5344-5350, 1996.

FRIESEL, R.E.; MACIAG, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. **Faseb J.**, v.9, p.919-925, 1995.

GALIANO, M.; LIU, Z.Q.; KALLA, R.; BOHATSCHEK, M.; KOPPIUS, A.; GSCHWENDTNER, A.; XU,S; WERNER, A.; KLOSS, C.U.A.; JONES, L.L.; BLUETHMANN, H.; RAIVICH, G. Interleucin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. **Eur. J. Neurosci.**, v.14, p. 327-341, 2001.

GALLO, G.; LEFCORT, F.B.; LETORNEAU, P.C. The trkA receptor mediates growth cone turning toward a localized source of nerve growth factor. **J. Neurosci.**, v. 17, n.14, p. 5445-54, 1997.

GEORGE, L.T.; MYCKATYN, T.M.; JENSEN, J. N.; MACKINNON, S.E. Functional Recovery and Histomorphometric Assessment Following Tibial Nerve Injury in the Mouse. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 19, p. 41-47, 2003.

GIBSON, K.L.; DANILOFF, J.K. Comparison of sciatic nerve regeneration through silicone tubes and nerve allografts. **Microsurg.**, v.10, p.126-129, 1989.

GILCHRIST, T.; GLASBY, M.A.; HEALY, C.M.; KELLY, G.; LENIHAN, D.V.; MCDOALL, K.L.; MILLER, I.A.; MYLES, L. M. In vitro nerve repair - in vivo. The reconstruction of peripheral glass tubes - a preliminary report. **Br. J. Plast. Surg.**, v.51, p. 231-237, 1998.

GILMORE, D. R. Sciatic nerve injury in twenty-nine dogs. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.20, n.3, p.403-07, 1984.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T.; RUSTIONI, A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. **J. Neurosci. Res.**, v. 55, p. 198-207, 1999.

GRIFFIN, J.W.; GEORGE, R.; HO, T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 52, p. 553-560, 1993.

GRIFFIN, J.W.; GEORGE, R.; LOBATO, C.; TYOR, W.R.; YAN, L.C.; GLASS, J.D. Macrophage responses and myelin clearance during wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. **J. Neuroimmunol.**, v. 40, p. 153-165, 1992.

GRUMET, M. Cell adhesion molecules and their subgroups in the nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 3, p. 370-376, 1991.

GSCHMEISSNER, S.E.; GATTUSO, J.M.; GLASBY, M.A. Morphology of nerve fibers regenerating through freeze-thawed autogenous skeletal muscle grafts in rats. **Clin. Anat.**, v.3, p.107-19, 1990.

GUENARD, V.; DINARELLO, C.A.; WESTON, P.J.; AEBISCHER, P. Peripheral nerve regeneration is impeded by interleukin-1 receptor antagonist released from a polymeric guidance channel. **J. Neurosci. Res.**, v. 29, p. 396–400, 1991.

GULATI, A.K. Axon regeneration through blood vessel allografts after cyclosporin treatment. **J. Neurosurg.**, v.70, p.115-20, 1989.

GULATI, A.K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in the repair of rat peripheral nerve. **J. Neurosurg.**, v.68: p.117-23, 1988.

GULATI, A.K.; RAI, D.R.; ALI, A.M. The influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts. **Brain Res.**, v.705, p.118-124, 1995.

GUNDERSEN, R.W.; BARRET, J.N. Characterization of the turning response of dorsal root neuritis toward nerve growth factor. **J. Cell. Biol.**, v. 87, p.546-554, 1980.

HADLOCK, T.; ELISSEEFF, J.; LANGER, R.; VACANTI, J.; CHENEY, M. A Tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.124, p 1081-1086, 1998.

HALL, S.M. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v.12: p.27-46, 1986.

HASEGAWA, J.; SHIBATA, M.; TAKAHASHI, H. Nerve coaptation with and without a gap in rabbits. **J. Hand Surg.**, v.21A, p.259-265, 1996.

HARTUNG, H.P.; KIEFER, R.; GOLD, R.; TOYKA, K.V. Autoimmunity in the peripheral nervous system. **Bull. Clin. Neurol.**, v. 5, p. 1-45, 1998.

HATTORI, A.; TANAKA, E.; MURASE, K.; ISHIDA, N.; CHATANI, Y.; TSUJIMOTO, M.; HAYASHI, K.; KHONO, M. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 2577-2582, 1993.

HEIJKE, G.C.M.; KOPPLER, P.J.; VAN DOORN, I.B.M.; BALJET, B. Processed porcine collagen tubulization versus conventional suturing in peripheral nerve reconstruction: an experimental study in rabbits. **Microsurg.**, v.21, n.3, p. 84-95, 2001.

HEINZELMANN, M.; MERCER-JONES, M.A.; GARDNER, S.A.; WILSON, M.A.; POLK, H.C. JR. Bacterial cell wall products increase monocyte HLA-DR and ICAM-1 without affecting lymphocyte CD18 expression. **Cell. Immunol.**, v.176, p.127–134, 1997.

HENDERSON, C.E.; PHILLIPS, H.S.; POLLOCK, R.A.; DAVIES, A.M.; LEMEULLE, C. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. **Science.**, v. 266, p.1062-1064, 1994.

HENDERSON, B.; WILSON, M.; WREN, B. Are bacterial exotoxins cytokine network regulators? **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 454-8, 1997.



HEMS, T.E.J.; GLASBY, M.A. Comparison of different methods of repair of long peripheral nerve defects: an experimental study. **Br. J. Plast. Surg.** n.45 p.497-502, 1992.

HENTZ, V.R.; ROSEN, J.M.; XIAO, S.J. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. **J. Hand. Surg.**, v.16A, p.251-261, 1991.

HERBERT, C.B.; NAGASWAMI, C.; BITTNER, G.D.; HUBBELL, J.A.; WEISEL, J.W. Effects of fibrin micromorphology on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in three-dimensional fibrin gels. **J Biomed Mater Res.**, v.40, p.551-559, 1998.

HEUMANN, R.; KORSCHING, S.; BANDTLOW, C.; THOENEN, H. Changes in nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection. **J. Cell Biol.**, v. 104, p. 1623-31, 1987.

HIMES, B.T.; TESSLER, A. Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. **J Comp Neurol**, v.284, p.215-230, 1989.

HINCKLEY, D.K.; LYLES, C.A.; MATTOX, D.E. Repair of peripheral nerves of unequal diameters. **Laryngosc.**, v.101, p.1150-54, 1991.

HIRATA, K.; MITOMA, H.; UENO, N.; HE, J.W.; KAWABUCHI, M. Differential response of macrophage subpopulation to myelin degradation in the injured rat sciatic nerve. **J. Neurocytol.**, v. 28, p.685-695, 1999.

HIRANO, T.; NAKAJIMA, K.; HIBI, M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 8, p. 241-252, 1997.

HO, P.R.; COAN, G.; CHENG, E.T.; NIELL, C.; TAM, D.; ZOU, H.; SIERRA, D.; TERRIS, D. Repair with tubules linked with brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in a rat sciatic nerve injury model. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.124, n.7, p.761-766, 1998.

HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY, C.A.; EZEKOWITZ, R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313–18, 1999.

IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, v.388, p.61-75, 1983.

INSERRA, M.M.; BLOCH, D.A.; TERRIS, D.J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v.18, p.119–124, 1998.

IP, N.T.; IBANEZ, C.F.; NYE, S.H.; McCLAIN, J.; JONES, P.F.; GIES, D.R.; BELLUSCIO, L.; LE BEAU, M.M.; ESPINOSA, R.; SQUINTO, S.P.; PERSSON, Y.; YANCOPOULOS, G.D. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal location, tissue distribution, and receptor specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.3060-4, 1992.

JANDER, S; POHL, J.; GILLEN, C.; STOLL, G. Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. **J. Neurosci. Res.**, v. 43, p.254–259, 1996.

JENQ, C.B.; JENQ, L.L.; COGGESHALL, R.E. Nerve regeneration changes with filters of different pore size. **Exp. Neurol.**, v.97, p.662-71, 1987.

JOHNSON, E.M.; RICH, K.M.; YIP, H.K. The role of NGF in sensory neurons in vivo. **Trends. Neurosci.**, v.9, p.33-37, 1986.

JONES, L.L.; LIU, Z.Q.; SHEN, J.; WERNER, A.; KREUTZBERG, G.W.; RAIVICH, G. Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 426, p. 468-492, 2000.

JUBB, K.V.F.; HUXTABLE, C.R. The nervous system. In: JUBB, K.V.F; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4.ed. Academic Press, 1993. p. 267-440.

KAMERMAN, P.; FULLER, A. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the febrile response to lipopolysaccharide and muramyl dipeptide in guinea pigs. **Life Sci.**, v. 67, p. 2639-2645, 2000.

KALYUZHIN, O.V.; ZEMLYAKOV, A.E.; FUCHS, B.B. Distinctive immunomodulating properties and interactivity with model membranes and cells of two homologous muramyl dipeptide derivatives differing by their lipophilicity. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 18, n. 11, p. 651-659, 1997.

KARNOVSKY, M.L.; LAZDING, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **J. Immunol.**, v.121, p. 809-13, 1978.

KEILHOFF, G.; WOLF, G.; FANSA, H. NOS-mediated differences in peripheral nerve graft revascularization and regeneration. **Neuroreport**, v. 13, p. 1463-1468, 2002.

KERWIN, J.F.; LANCASTER, J.R.; FELMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **J. Med.Chem.**, v. 38, p. 4343-4362, 1995.

KIEFER, R.; KIESEIER, B.C.; STOLL, G.; HARTUNG, H.P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Progr. Neurobiol.**, v. 64, p. 109-127, 2001.

KIM, D.H.; CONNOLLY, S.E.; GILLESPIE, J.T.; VOORHHIES, R.M.; KLINE,D.G. Electrophysiological studies of various graft lengths and lesion lengths in repair of nerve gaps in primates. **J. Neurosurg.**, v.75, p.440-46, 1991.

KIM, D.H.; CONNOLLY, S.E.; ZHAO,S.; BEUERMAN R.W.; VOORHIESS, R.M.; KLINE, D.G. Comparison of macropore, semi permeable, and non permeable collagen conduits in nerve repair. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.9, p.415-20, 1993.

KIYOTANI, T.; TERAMICHI, M.; TAKIMOTO, Y.; NAKAMURA,T.; SHIMIZU,Y.; ENDO, K. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. **Brain Res.**, v.740, p.66-74, 1996.

KOMIYA, I.; KURIYA, S.; AKAHANE, K.; NOMURA, T. In vitro and in vivo effects of MDP-Lys L18 on mouse megakaryocyte progenitor cells CFU-Meg. **Exp. Hematol.**, v.20, p. 517-522, 1992.

KOTTER, M.R.; SETZU, A.; SIM, F.J.; VAN ROOIJEN, N.; FRANKLIN, R..J.M. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. **Glia**, v. 35, p. 204-212, 2001.

KREKOSKI, C.A.; NEUBAUER, D.; GRAHAM, J.B.; MUIR, D. Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve graft. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 23, p.10408-10415, 2002.

KUMAR, V.; HASSAN, K. M. Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralyzed face: a comparative study of the single-stage and two-stage. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.109, n.2, p. 463-464, 2002.

LAINETTI, R. D. Neurotrofinas exógenas e regeneração nervosa periférica. 1999. 133f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LAINETTI, R.D.; DA-SILVA, C.F. Local addition of monosialoganglioside GM1 stimulates peripheral axon regeneration in vivo. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.841-845, 1993.

LAINETTI, R.D., PEREIRA, F.C.; DA-SILVA, C.F. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 781-785, 1995.

LAZAVOV-SPIEGLER, O.; SOLOMON, A.H.; SCHWARTZ, M. Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve. **Glia**, v. 24, p. 329-337, 1998

LE BEAU, J.M.; ELLISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **J. Neurocytol.**, v.17, p.161-72, 1988a.

LE BEAU, J.M.; LA CORBIERE, M.; POWELL, H.C.; ELLISMAN, M.H.; SCHUBERT, D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. **Brain Res.**, v.459, p.93-104, 1988b.

LEBLOND, C.P.; INOUE, S. Structure, composition, and assembly of basement membrane. **Am. J. Anat.**, v.185, p.367-90, 1989.

LENIHAN, D.V.; CARTER, A.J.; GILCHRIST, T.; HEALY, D.M.; MILLER, I.A.; MYLES, L.M.; GLASBY, M.A. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. **J. Hand Surg.**, v.23B, n.5, p. 588-593, 1998.

LETOURNEAU, P.C. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. **Developm. Biol.**, v.44, p.77-91, 1975

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor- 35 years later. **Science**, v.237, p.1154-62, 1987.

LEVINTHAL, R. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple lacerations. **J. Neurosurg.**, v.47, p.744-50, 1977.

LIEFNER, M.; SIEBERT, H.; SACHSE, T.; MICHEL, U.; KOLLIAS, G., BRÜCK, W .  
The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. **J. Neuroimmunol.**, v.108, p.147–152, 2000.

LINDHOLM, D.; HEUMANN, R.; MEYER, M.; THOENEN, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature**, v.330, p. 658-67, 1987.

LINDSAY, R.M. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. **J Neurosci**, v. 8, p. 2394-2405, 1988.

LISS, A.G.; EKENSTAM, F.W.; WIBERG, M. Loss of neurons in the dorsal root ganglia after transection of a peripheral sensory nerve. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v. 30, p.1-6, 1996.

LO, S.K.; JANAKIDEVI, K.; LAI, L.; MALIK, A.B. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness in dependent ICAM activation. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. L406-12, 1993.



LONGO, F.M.; HAYMAN, E.G.; DAVIS, G.E.; RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E.; MANTHORPE, M., VARON, S. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating *in vivo* within nerve regeneration chambers. **Brain Res.**, v.309 p.105-17,1984.

LONGO, F.M., MANTHORPE, M., SKAPER, S.D., LUNDBORG, G., VARON, S. Neuronotrophic activities accumulate *in vivo* within nerve regeneration chambers. **Brain Res.**, v. 262 p.109-116, 1983a.

LONGO, F.M., SKAPER, S.D., MANTHORPE, M., WILLIAMS, L.R., LUNDBORG, G., VARON, S. Temporal changes of neurotrophic activities accumulating *in vivo* within nerve regeneration chambers. **Exp. Neurol.**, v.81, p.756-69, 1983b.

LOVE, S. An experimental study of peripheral nerve regeneration after X-irradiation. **Brain**, v.106: p.39-54, 1983.

LU, X.; SKAMENE, E.; RICHARDSON, P.M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. **Brain Res.**, v. 652, p. 174-176, 1994.

LUBINSKA, L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow in the trophic factor. **Brain Res.**, v. 233, p. 227-240, 1982.

LUNDBORG, G. Cell-biological background In:\_\_\_\_\_ **Nerve injury and repair.** Churchill Livingstone, 1988a. p.1-31.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration In:\_\_\_\_\_ **Nerve injury and repair.** Churchill Livingstone, 1988c. p.149-195.

LUNDBORG, G. Neurotropism, frozen muscle grafts and other conduits. **J. Hand Surg.** , v.16B, p.473-76, 1991.

LUNDBORG, G. The nerve trunk In:\_\_\_\_\_ **Nerve injury and repair.** Churchill Livingstone, 1988b. p.42-63.

LUNDBORG, G. Structure and function of intraneural microvessels as related to trauma, edema formation and nerve function **J. Bone Joint Surg.** , v.57A, p.938-948, 1975.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, .B.; DANIELSEN, N.; JOHANNESSON, A.; HASSON, H.A.; LONGO, F.; VARON, S. Nerve regeneration across an extended gap: A neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. **J. Hand Surg.**, v.7, p.580-87, 1982a.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.; DANIELSEN, N.; ZHAO, Q. Trophism, tropism and specificity in nerve regeneration. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.10, p.345-354, 1994.

LUNDBORG, G.; LONGO, F.M.; VARON,S. Nerve regeneration model and trophic factors *in vivo*. **Brain Res.**, v.232, p.157-61, 1982b.

LUO, Z-J.; LU, S-B. Selective reinnervation of regenerating mixed nerve fibers across a silicone tube gap- further experimental evidence of neurotropism. **J. Hand Surg.**, v. 21B, n.5, p. 660-663, 1996.

MACKINNON, S.E., DELLON, A.L. A study of nerve regeneration across synthetic (MAXON) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm. in the primate. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.6, p.117-21, 1990.

MACKINNON, S.E., DELLON, A.L., HUDSON, A.; HUNTER, D. Nerve regeneration trough a pseudosinovial sheath in a primate model. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.75 p.833-39, 1985.

MACKINNON, S.E.; DELLON, A.L.; HUDSON, A.; HUNTER, D.A.; SEILER, WA. Chronic nerve compression: an experimental model in the rat. **Ann. Plast. Surg.**, v.95 p.112-20, 1984.

MACKINNON, S. E.; DOOLABH, V. B.; NOVAK, C. B.; TRULOCK, E. P. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.107, n.6, p.1419-1429, 2001.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MADISON, R.; DA-SILVA, C.F.; DIKKES, P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. **Brain Res.**, v.447, p.325-334, 1988.

MADISON, R.; DA-SILVA, C.F.; DIKKES, P.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. **Exp. Neurol.**, v.88, p.767-772, 1985.

MALLAT, M.; HOULGATE, R.; BRACHET, P.; PROCHIANTZ, A. Lypopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF *in vitro*. **Dev. Biol.**, v. 133, 309-311, 1989.

MARKUS, A.; ZHONG, J.; SNIDER, W.D. Raf and Akt Mediate distinct aspects of sensory axon growth. **Neuron**. v. 35, p. 65-76, 2002.

MASON, J.L.; SUZUKI, K.; CHAPLIN, D.D.; MATSUSHIMA, G.K. Interleukin-1 $\beta$  promotes repair of the CNS. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 7046-7052, 2001.

MATHESON, C.R.; CARNAHAN, J.; URICH, J.L.; BOCANGEL, D.; ZHANG, T.J. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. **J Neurobiol.**, v. 32, p.22-32, 1997.

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

MATSUMOTO, K; OHNISHI, K.; SEKINE, T.; UEDA, H., YAMAMOTO, Y.; KIYOTANI, T.; NAKAMURA, T.; ENDO, K.; SHIMIZU, Y. Use of a newly developed artificial nerve conduit to assist peripheral nerve regeneration across a long gap in dogs. **ASAIO Journal**, v. 46, p. 415-420, 2000b.

MATTAR JR., R.; STARCK, R.; GUARNIERI, M.V.; AZZE R.J.; MITTELDORF, C.S.; FERREIRA, M.C. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos. Estudo experimental. **Rev. Bras. Ortop.**, v.25, n.8, p.287-92, 1990.

McCALLISTER, W.V.; COBER, S.R.; NORMAN, A.; TRUMBLE, T.E. Using intact nerve to bridge peripheral nerve defects: an alternative to the use of nerve grafts. **J Hand Surg**, v.26A, n.2, 315-325, 2001.

McLEAN, W.G.; McKAY, A.L.; Electrophoretic analysis of axonally transported proteins in rabbit vagus nerve. **J. Neurobiol**, v. 14, p. 227-236, 1983.

MEAROW, K.M.; KRIL, Y. Anti-NGF treatment blocks the upregulation of NGF receptor mRNA expression associated with collateral sprouting of rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 1884, p. 55-58, 1995.

MELENDEZ, M.; BRANDT, K.; EVANS, G.R. Sciatic nerve reconstruction: limb preservation after sarcoma resection. **Ann. Plast. Surg.**, v.46, p.375-81, 2001.

MERLE, M.; DAUTEL, G. Vascularized nerve grafts. **J. Hand. Surg.**, v.16B, n.5, p.483-88, 1991.

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

MILLESI, H.; MEISSL, G.; BERGER, A. The interfascicular nerve grafting of the median and ulnar nerves. **J. Bone Joint Surg [Am]**, v.54, p.727-50, 1972.

MITSUMOTO, H.; IKEDA, K.; KLINKOSZ, B.; CEDARBAUM, J.M.; WONG, V.; LINDSAY, R.M. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. **Science**, v. 265, p. 1107-1110, 1994.

MIYAMOTO, Y. Experimental study of results of nerve suture under tension vs. nerve grafting. **Plast Reconstr. Surg.**, v.64, p.540-49,1979.

MOHAMMAD, J.; SHENAG, J.; RABINOVSKY, E.; SHENAG, S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.105, p.660-6, 2000a.

MOHAMMAD, J.; WARNKE, P.H.; PAN, Y.-C.; SHENAG, S. Increased axonal regeneration through a biodegradable amnionic tube nerve conduit: effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor; hyaluronic acid media. **Ann. Plast. Surg.**, v.44, p.59-64,2000b.

MONCADA, S. Nitric oxide. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 12, p. S35-S39, 1994.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p.137-142, 1997.

MOONIS, M.; AHMAD, I.; BOCHHOWOT, B.W. Macrophages in host defense – an overview. **Ind. J. Biochem. Biophys.**, v. 29, p. 115-22, 1992.

MOURAD, P. D.; LAZAR, D. A.; CURRA, F. P.; MOHR, B. C.; ANDRUS, K.N C.; AVELLINO, A. M. ; MCNUTT, L. D.; CRUM, L. A.; KLIOT, M. Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. **Neurosurg.**, v.48, p.1136-1141, 2001.

MYLES, L.M.; GILMOUR, J.A.; GLASBY, M.A. Effects of different methods of peripheral nerve repair on the number and distribution of muscle afferent neurons in rat dorsal root ganglion. **J. Neurosurg.**, v. 77, p. 457-462, 1992.

NATHAN, C.F.; BRUNJNER, L.H.; SLIVERSTEIN, S.C.; COHN, Z.A. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes-I Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. **J. Exp. Med.**, v. 149, p. 84-99, 1979.

NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B.J. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, v. 158, p. 670-89, 1983.



NELSON, E. A.S.; WONG, Y.; YU, L. MEE; F., TAI FAI; LI, K. Effects of hyperthermia and muramyl dipeptide on IL-1[beta], IL-6, and mortality in a neonatal rat model.

**Pediatr. Res.**, v. 52, p. 886-891, 2002.

NEWMAN, J.P.; VERITY, A.N.; HAWATMEH, S.; FEE, W.E.; TERRIS, D.J. Ciliary neurotrophic factor enhances peripheral nerve regeneration. **Arch. Otolaryngol.**

**Head Neck Surg.**, v.122, p.399-403, 1996.

NEUMANN, S.; BRADKE, F.; TESSIER-LAVIGNE, M.; BASBAUM, A.I. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. **Neuron**, v. 34, p. 885-893, 2002

NYILAS, E.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L.; HENSEY, E.W.; BRUSHART, T.M.; KIKKER, P.; MADISON, R. Peripheral nerve repair with bioresorbable prosthesis.

**Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs**, v.29, p.307-13, 1983.

OGDEN M.A.; FENG, F.Y.; MYCKATYN, T.M.; JENSEN, J.N.; GRAND, A.G.; WOOD, P.W.; HUNTER, D.A.; MACKINNON, S.E. Safe injection of cultured Schwann

cells into peripheral nerve allografts. **Microsurg.**, v.20, p. 314-323, 2000.

OLSSON, Y.; REESE, T.S. Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 30, p.105–119,1971.

ONISHI, B. K.A. **Coloração de Nissl por violeta de cresila**. Disponível em: <<http://www.fcm.unicamp.br/departamentos/anatomia/bineuhistogeral.html#cromatólise>>. Acesso em 20 agosto 2003.

OUSMAN, S.S.; DAVID, S. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cords. **Glia**, v. 30, p. 92-104, 2000.

OUSMAN, S.S.; DAVID, S. MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF, and TNF- $\alpha$  control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. **J. Neurosci.**, v.21, n. 13, p. 4649-4656, 2001.

PARANT, M.A.; PARANT, F.J.; LE CONTEL, C.; LEFRANCIER, P.; CHEDID, L. MDP derivatives and resistance to bacterial infections in mice. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 319, p.175–184, 1992.

PATRICK, C. W. JR.; ZHENG, B.; SCHMIDT, M.; HERMAN, S.; CHAUVIN, P.; FAN, Z.; STARK, B.; EVANS, G. D. Dermal fibroblasts genetically engineered to release nerve growth factor. **Ann. Plast. Surg.**, v.47, p.660-665, 2001.

PEACOCK, E.E., VANWINKLE, W. **Wound Repair**. Philadelphia, WB Saunders, 1972.

PEARSE, D.D.; PEREIRA, F.C.; BUNGE, M.B. Injection of N-acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamine (MDP) improves histological and behaviorial outcome after contusive spinal cord injury. In: 31<sup>st</sup> ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 2001, San Diego, CA. Abstracts, 2001, v. 27, n. 2042.

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

PEREIRA, F. C.; GAMA, S. A.; LAINETTI, R. D.; DA-SILVA, C. F.. Exogenous cardiotrophin-1 (CT-1) and oncostatin M (OsM) promote peripheral nerve regeneration. In: 30<sup>th</sup> ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 2000, New Orleans, LO. Abstracts, v.26, n.1-2, 792.2, 2000.

PEREIRA, F. C.; LAINETTI, R. D.; DA-SILVA, C. F. Exogenous gangliosides enhance peripheral nerve regeneration. In: 28<sup>th</sup> ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 1998, Los Angeles, CA. Abstracts, 1998. V.24, n.1-2, 1053.

PERRY, V.H.; BROWN, M.C. Macrophages and nerve regeneration. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 2, p. 679-682, 1992.

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

PEYRONNARD, J.M.; CHARRON, L.; LAVOIE, J.P. A comparative study of the effects of chronic axotomy, crush lesion and re-anastomosis of the rat sural nerve on horseradish peroxidase labeling of primary sensory neurons. **Brain Res.**, v. 443, p. 295-309, 1988.

PHAM, H.N.; PADILLA, J.A.; NGUYEN, K.D. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.7, p.31-36, 1991.

PODUSLO, J.F.; BERG, C.T.; ROSS, S.M.; SPENCER, P.S. Regulation of myelination: axons not required for the biosynthesis of basal levels of the major myelin glycoprotein by Schwann cells in denervated distal segments of the adult cat sciatic nerve. **J. Neurosci. Res.**, v. 14, p. 177-185, 1985

POWELL, H.C.; MYERS, R.R.; MIZISIN, A.P.; OLEE, T.; BROSTOFF, S.W. Response of the axon and barrier endothelium to experimental allergic neuritis induced by autoreactive T cell lines. **Acta Neuropathol.**, v.82, p. 364-377, 1991.

PRINS, R.M.; LIAU, L.M. Immunology and immunotherapy in neurosurgical disease.

**Neurosurg.**, v. 53, n. 1, p. 144-153, 2003.

QIU, J.; CAI, D.; DAÍ, H.; McATEE, M.; HOFFMAN, P.N.; BREGMAN, B.S.; FILBIN, M.T. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. **Neuron**, v. 34, p.

895-903, 2002.

QIU, J.; CAI, D.; FILBIN, M.T. Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. **Glia**, v.29, p.166–174, 2000.

RABINOVITCH, M. Macrophages spreading *in vitro* In: \_\_\_\_\_. **Molecular phagocytes, characteristics, physiology & function**. Oxford: Vam Furth, 1975.

RAIVICH, G.; MORENO-FLORES, M.T.; MÖLLER, J.C.; KREUTZBERG, G.W. Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. **Eur. J. Neurosci.**, v.6, p. 1615-1618, 1994.

RAMÓN y CAJAL, S. **Degeneration and regeneration of the nervous system**. Oxford University Press, London, 1928.

REED. S.G.; NATHAN, C.F.; PIHL, D.L.; RODRICKS, P.; SHANENBECK, K.; CONDON, P.J.; GRABSTEIN, K.H. Recombinant granulocyte/macrophage colony-

stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. **J. Exp. Med.**, v. 166, p. 1734-46, 1987.

REICHERT, F.; LEVITZKY, R.; ROSTSHENKER, S. Interleukin-6 in intact and injured mouse peripheral nerves **Eur. J. Neurosci.**, v.8, p. 530-535, 1996.

RENDE, M.; GRANATO, A.; LO MONACO, M. et al. Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10 mm gap within an impermeable chamber. **Exp. neurol.**, v.111, p.332-339, 1991.

REICHARDT, L.F.; TOMASELLI, K.J. Extracellular matrix molecules and their receptors in neural development. **Annu Rev. Neurosci.**, v. 14, p. 531-570, 1991.

RINGENBACH, L.; BOHBOT, A.; TIBERGHIE, P.; OBERLING, F.; FEUGEAS, O. Polyethylenimine-mediated transfection of human monocytes with the interferon- $\gamma$  gene: an approach to cancer adoptive immunotherapy. **Gene Therapy**, v. 5, p. 1508-1516, 1998.

RODRIGUEZ, F.J.; VERDU, E.; CEBALLOS, D.; NAVARRO, X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. **Exp. Neurol.**, v. 161, p. 571-584, 2000.

ROTSHENKER, S. The cytokine network of wallerian degeneration. **Curr. Topics Neurochem.**, v. 1, p. 147-156, 1997.

SAADA, A.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerve induces up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. **J. Cell Biol.**, v. 133, p. 159-167, 1996.

SANCEAU, J.; FALCOFF, R.; BERANGER, F.; CARTER, D.B.; WIETZERBIN, J. Secretion of interleukin-6 IL-6 by human monocytes stimulated by muramyl dipeptide and tumor necrosis factor alpha. **Immunol.**, v.69, p. 52-56, 1990.

SANTOS, X.; RODRIGO, J.; HONTANILLA, J.B.; BILBAO, G. Regeneration of the motor component of the rat sciatic nerve with local administration of neurotrophic growth factor in silicone chamber. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.15, p.207-213, 1999.

SCHAEPFER, W.; MICKO, S. Calcium-dependent alterations of neurofilament proteins of rat peripheral nerve. **J Neurochem**, v, 32, p. 211-219, 1979.

SCHMIDTT, F.O.; BEAR, R.S. The optical properties of vertebrate nerve axons as related to fiber size. **J. Cell Biol. Suppl.**, v.15, p.103-9, 1991.

SCHRIJVER, I.A.; VAN MEURS, M.; MELIEF, M.J.; ANG, C. W.; BULJEVAC, D.; RAVID, R.; HAZENBERG, M. P.; LAMAN, J. D., Bacterial peptidoglycan and immune reactivity in the central nervous system in multiple sclerosis. **Brain**, v. 124, n. 8, p. 1544-1554, 2001.

SCHRÖDER, JM; MAY,R; WEIS,J. Perineurial cells are the first to traverse gaps of peripheral nerve in silicone tubes. **Clin. Neurol. Neurosurg.**; v.95, p.78-83, 1993.

SCHWARTZ, M.; LAZAROV-SPIEGLER, O.; RAPALINO, O.; AGRANOV, I.; VELAN, G.; HADANI, M. Potential repair of rat spinal cord injuries using stimulated homologous macrophages. **Neurosurg.**, v. 44, p. 1041-1045, 1999.

SECKEL, B.R.; JONES, D.; HEKIMIAN, K.J.; WANG, K.K.; CHAKALIS, D.P. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. **J. Neurosci. Res.**, v.40, p.318-324, 1995.

SEKIYA, T.; TANAKA, M.; SHIMAMURA, N.; SUZUKI, S. Macrophages invasion into injured cochlear nerve and its modification by methylprednisolone. **Brain Res.**, v. 905, p. 152-160, 2001.

SENDTNER, M.; KREUTZBERG, G.W.; THOENEN, H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature.**, v.45, p. 440-441, 1990.



SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of wallerian degeneration: tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin- $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ . **J. Neurosci.**, v. 22, p. 0352-3060, 2002.

SHERREN, J. Some points in the surgery of peripheral nerves. **Edinb. Med. J.**, Edinburgh, v.20, p.297-332, 1906.

SIEMIONOW, M.; TETIK, C.; OZER, K.; AYHAN, S.; SIEMIONOW, K.; BROWNE, E. Epineural sleeve neurorrhaphy: surgical technique and functional results- a preliminary report. **Ann. Plast. Surg.**, v.48, n.3, p.281-285, 2002.

SMAHEL, J.; MEYER, V.E.; MORGENTHALER, W. Silicone cuffs for peripheral nerve repair: experimental findings. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.9, n.4, p.293-7, 1993.

SNIDER, W.D.; ZHOU, F-Q; ZHONG, J; MARKUS, A. Signaling the pathway to regeneration. **Neuron**, v. 35, p. 13-16, 2002.

SOMMER, C.; GALBRAITH, J.A.; HECKMAN, H.M.; MYERS, R.R. Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 52, p. 223-232, 1993.

SOUVANNAVONG, V.; BROWN, S.; ADAM, A. Muramyl dipeptide MDP synergizes with interleukin 2 and interleukin 4 to stimulate, respectively, the differentiation and proliferation of B cells. **Cell. Immunol.**, v.126, p.106–116, 1990.

STOLL, G.; GRIFFIN, J.W. LI, C.Y.; TRAPP, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **J. Neurocytol**, v. 18, p. 671-683, 1989.

STOPIGLIA, A.J. Estudo experimental comparativo da regeneração nervosa com o emprego de auto-enxerto a fresco e de tubo de silicone na reparação cirúrgica de falhas do nervo ulnar de cão (*canis familiaris*). 1992. 116f. Tese (livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

STOPIGLIA, A.J.; ERHART, E.A. Utilização da técnica microcirúrgica na neurorrafia de animais domésticos. Estudo experimental da reparação fascicular do nervo ulnar de cão (*canis familiaris*). **Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. São Paulo**, v.24, p. 193-208, 1987.

STOPIGLIA, A.J.; LAINETTI, R.D.; PIRES, R.S. DA SILVA, C.F. Avaliação morfométrica das fibras nervosas do nervo ulnar após a reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 35, p. 80-83, 1998.

STRAUCH, B.; FERDER, M.; LOVELLE-ALLEN, S.; MOORE, K.; KIM, D.J.; LLENA, J. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.12, n.8, p.521-27, 1996.

SUD, V.; CHANG, J.; LINEAWEAVER, W. Acute nerve grafting in traumatic injuries: two case studies. **Ann. Plast. Surg.**, v.47, n.5, p.555-561, 2001.

SUNDERLAND, S.; BRADLEY, K.C. Endoneurial tube shrinkage in the distal segment of a severed nerve. **J. Comp. Neurol.**, v.93, p.411-20, 1950.

SUNDERLAND, S. Peripheral nerve trunks. In: \_\_\_\_\_ **Nerves and nerve injuries**. London: Churchill Livingstone, 1978. p.31-60.

SWAIN, S.F. Peripheral nerve surgery in the dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.161, p. 905-17, 1972.

TERRIS, D.J.; FEE, W.E. Current issues in nerve repair. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.119, p.725-31, 1993.

TERRIS, D.J.; TOFT, K.M.; MOIR, M.; LUM, J.; WANG, M. Brain-Derived Neurotrophic Factor–Enriched Collagen Tubule as a Substitute for Autologous Nerve Grafts. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 127, p. 294-298, 2001.

TERZIS, J. K. Clinical microsurgery of the peripheral nerve: the state of the art. **Clin. Plast. Surg.**, v.6, p.247-67, 1979.

TERZIS, J. K.; FAIBSOFF, B.; WILLIAMS, H.B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.56, p.166-70, 1975.

TERZIS, J.K., SUN, D.D., THANOS, P.K. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 13, p.215-25, 1997.

THOMAS, P.K. The disposition of collagen in relation to Schwann cell basement membrane during peripheral nerve regeneration. **J. Cell Biol.**, v.14, p.375-382, 1964.

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

TIZARD, I. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002.

TOH, E.; FRIEDMAN, R. A. Current management of facial neuroma. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.9, p 296-298, 2001

TOS, P.; BATTISTON, B.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G.; HILL, M.A.; LANZETTA, M.; OWEN, E.R. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. **Microsurg.**, v.20, p.65-71, 2000.

TRAPP, B.D.; HAUER, P.; LEMKE, G. Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 3515-3521, 1988.

TUPPER, J.W.; CRICK, J.C.; MATTECK, L.R. Fascicular nerve repairs: a comparative study of epineurial and fascicular (perineurial) techniques. **Orthop. Clin. North Am.**, v.19, p.57-69, 1988.

UTLEY, D.S.; CHENG, E.T.; LEWIN, S.L.; VERITY, A.N.; SIERRA, D.H.; TERRIS, D.J. Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.112, p.407-413, 1996.

UYEMURA, K. Functional glycoproteins expressed in Schwann cell membrane. **Neurosci. Res.**, v.16, p.9-14, 1993.

VARON, S; ADLER, R. Nerve growth factors and control of nerve growth. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 16, p.207-252, 1980.

VARON,S.; NOMURA, J.; SHOOTER, E.M; Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. **Biochem**, v. 7, p. 1296-1303, 1968.

VASS, K.; HICKEY, W.F.; SCHMIDT, R.E.; LASSMANN, H. Bone marrow-derived elements in the peripheral nervous system. **Lab. Invest.**, v. 69, p.275-282, 1993.

VITERBO, F. Neurorrafia Látero-terminal, estudo experimental no rato. Botucatu: 1992. 198f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

VITERBO, F. Novo método para o tratamento da Paralisia facial: o “cross-face nerve” com neurorrafia término-lateral. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast. Est. Reconst.** v.8, p.36-38, 1993.

VITERBO, F.; PALHARES A.; FRANCIOSI, L.F. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve- a new application of lateral-terminal neurorraphy (case report). **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast. Est. Reconst.** , v. 8, p. 85-87, 1993.

WALLER, A. V. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observation of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.**, n. 140, p. 423-429, 1850.

WEINBERG, H.J.; SPENCER, P.S. The fate of Schwann cells isolated from axonal contact. **J Neurocytol**, v. 7, p. 555-569, 1978.

WEINZWEIG, N.; CHIN, G., STONE, A.; NAGLE, D.; GONZALEZ, M.; KOERBER, A. Recovery of sensibility after digital neurorrhaphy: a clinical investigation of prognostic factors. **Ann. Plast. Surg.**, v.44, n.6, p.610-7, 2000.

WERNER, A.; WILLEM, M.; JONES, L.L.; KREUTZBERG, G.W.; MAYER, U.; RAVICH, G. Impaired axonal regeneration in  $\alpha 7$  integrin-deficient mice. **J. Neurosci.**, v.20, p. 1822-1830, 2000.

WHITWORTH, I. H.; DORE, C. J.; GREEN, C. J.; TERENGI, G. Increased axonal regeneration over long gaps using autologous nerve-muscle sandwich grafts. **Microsurg.**, v.16, p.772-778, 1995.

WILLIAMS, L.R.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. **J. Comp. Neurol.**, v.218, p. 460-470, 1983.

WILLIAMS, LR; VARON, S. Modification of fibrin matrix formations "in situ" enhances nerve regeneration in silicone chamber. **J. Comp. Neurol.**, v.231, p. 209-20, 1985.

WILSON, M.; SEYMOUR, R.; HENDERSON, B. Bacterial perturbation of cytokine network. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2401-2409, 1998.

WOLFER, M.A.; MURRAY, T.F.; BOONS, G.J.; MOORE, J.N. The origin of synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 42, p. 39179-39186, 2002.

WONG, A.Y.C., SCOTT, J.J.A. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. **Exp. Neurol.**, v.114, p.364-66, 1991.

WONG, J.; OBLINGER, M. A comparison between peripheral and central axotomy effects on neurofilament and tubulin gene expression of rat DRG neurons. **J. Neurosci**, v. 10, p. 2215-2222, 1989.

WOOD, R.J.; ADSON, M.H.; VAN BEEK, A.L.; PELTIER, G.L.; ZUBKOF, M.M.; BUBRICK, M.P. Controlled expansion of peripheral nerves: comparison of nerve grafting and nerve expansion / repair to canine sciatic nerve defects. **J. Trauma**, n.31, p.686-90, 1991.

YAMAUCHI, T.Ç YAJIMA, H.; TAMAI, S.; OHGUSHI, H.; TAMAI, M.; MAEDA, M., KIZAKI, K.; KOBATA, Y.; FUKUI, A.Ç TAKAKURA, Y. Neurohistochemical analysis of regeneration in rat peripheral nerve after end-to-side neurorrhaphy. **J. Orthop. Sci.**, v.6, p.82-7, 2001



YAVUZER, R; AYHAN, S.; LATIFOGLU, O; ATABAY, K. Turnover epineural sheath tube in primary repair of peripheral nerves. **Ann. of Plast. Surg.**, v.48, n.4, p.392-400, 2002.

YGGE, J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. **Brain Res.**, v. 478, p. 193-195, 1989.

ZELLEM, R.T.; MILLER, D.W.; KENNING, J.A. Experimental peripheral nerve repair: environmental control directed at the cellular level. **Microsurg.**, v.10, p.290-301, 1989.

ZHONG, J.; DIETZEL, I.D.; WAHLE, P.; KOPF, M.; HEUMANN, R. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. **J. Neurosci.**, v.19, p. 4305-4313, 1999.



**APÊNDICE A-** Número de axônios mielínicos encontrados na porção média do cabo de regeneração nos animais do grupo COL e COL/MDP 4 semanas após o ato operatório e no nervo ciático nos animais do grupo NOR.

<b>Grupo</b>	<b>Animal</b>	<b>Número de axônios mielínicos</b>
COL	1	1504
COL	2	1772
COL	3	2084
COL	4	2119
COL/MDP	1	2198
COL/MDP	2	2317
COL/MDP	3	2495
COL/MDP	4	2712
NOR	1	4330
NOR	2	4334
NOR	3	4401
NOR	4	4355

**APÊNDICE B** - Número de neurônios sensitivos encontrados no gânglio espinhal L<sub>5</sub> de camundongos que receberam tubos preenchidos com solução de colágeno (COL) e colágeno e MDP (COL/MDP) quatro semanas após o ato operatório e de camundongos não operados (NOR).

<b>Grupo</b>	<b>Animal</b>	<b>Número de neurônios</b>
COL	1	488
COL	2	601
COL	3	585
COL	4	583
COL/MDP	1	485
COL/MDP	2	453
COL/MDP	3	540
COL/MDP	4	579
NOR	1	901
NOR	2	1185
NOR	3	1219
NOR	4	1086