FRANCISCO CARLOS PEREIRA

ESTUDO EXPERIMENTAL E QUANTITATIVO DA
REINERVAÇÃO MUSCULAR APÓS REGENERAÇÃO DE
NERVOS NO INTERIOR DE PRÓTESES TUBULARES

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Mestre em Anatomia

SÃO PAULO
1993

FRANCISCO CARLOS PEREIRA

**ESTUDO EXPERIMENTAL E QUANTITATIVO DA
REINERVAÇÃO MUSCULAR APÓS REGENERAÇÃO DE
NERVOS NO INTERIOR DE PRÓTESES TUBULARES**

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Mestre em Anatomia**

**Orientador:
Prof. Dr. Ciro Ferreira da Silva**

**SÃO PAULO
1993**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Pereira, Francisco Carlos.
Estudo experimental e quantitativo da reiner-
vação muscular após regeneração de nervos no
interior de próteses tubulares / Francisco
Carlos Pereira. -- São Paulo, 1993.

Dissertação (mestrado)--Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo. De-
partamento de Anatomia.

Área de concentração: Anatomia.

Orientador: Da Silva, Ciro Ferreira.

Descritores: 1.Sistema nervoso 2.Nervos 3.Re-
generação nervosa 4.Placa motora 5.Músculo
6.Histoquímica.

USP/ICB-SDI.006/93

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 18 / 6 / 1993 , considerou o(a) candidato(a) aprovado(a).

1º) Examinador: _____

2º) Examinador: _____

3º) Examinador: _____

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro das seguintes instituições:

**FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
(FAPESP)**

**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E
TECNOLÓGICO (CNPq)**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. CIRO FERREIRA DA SILVA, pela dedicada orientação, presença constante e estímulo na elaboração deste trabalho, e principalmente pela grande amizade que se consolidou nestes anos de convívio.

Aos Colegas da pós-graduação em especial SANDRA KAYANO, RAQUEL SIMONE PIRES e RAQUEL DIAS LAINETTI pelo apoio e incentivo durante estes anos.

À Sra. JENNIFER APARECIDA BIAGINONI RIBEIRO, técnica do Departamento de Histologia e Embriologia do ICB da USP, pelo auxílio na parte prática deste trabalho.

Aos Funcionários da Biblioteca do ICB da USP, pelo apoio e dedicação sempre prestados no auxílio em busca das referências bibliográficas para elaboração deste trabalho.

A CRISTINE A. COLELLA, SILVANA ARNÁ MASSONI LUCCHINI e C. ROSANA DUARTE PRISCO do Serviço de Informática e Análise de Dados do ICB da USP, pela extremada dedicação e competência na editoração final deste trabalho.

Aos Funcionários e colegas do Departamento de Anatomia do ICB da USP pela atenção dedicada nestes anos de convívio.

SUMÁRIO

Resumo	
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DA LITERATURA	05
1. Desenvolvimento das Fibras Musculares	06
2. Crescimento dos Axônios	08
3. Desenvolvimento da Junção Neuromuscular	11
4. Estrutura da Placa Motora	16
5. Lesão Nervosa Periférica	19
5.1 Alterações na Porção Distal à Lesão	19
5.2 Alterações na Porção Proximal à Lesão	22
6. Brotamento Axonal	26
7. Técnica de Tubulização	31
MATERIAL E MÉTODOS	36
1. Animais	37
2. Procedimentos Cirúrgicos	37
3. Processamento Histológico	38
3.1 Técnica para Demonstração da Colinesterase	38
3.2 Técnica para Impregnação com Prata das Fibras Nervosas	39
4. Análise Morfométrica	41
5. Tratamento Estatístico	42
RESULTADOS	44
1. Aspectos Qualitativos	45
1.1 Estrutura do Músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL)	45
1.1.1 Músculo Normal	45
1.1.2 Músculo com Nervo Regenerado	45
1.1.2.1 Regeneração após Esmagamento do Nervo Ciático	45
1.1.2.2 Regeneração após Secção do Nervo Ciático e Tubulização	46
2. Aspectos Quantitativos	47
2.1 Padrão de Inervação	47
2.2 Dados Morfométricos	51
2.2.1 Músculos Normais	52
2.2.2 Esmagamento do Nervo Ciático	52
2.2.3 Secção do Nervo Ciático e Reparo por Tubulização	53

DISCUSSÃO	56
1. Regeneração do Nervo no Interior da Prótese Tubular	57
2. Inervação do Músculo EDL Normal	57
3. Degeneração das Placas Motoras	58
4. Reinervação das Placas Motoras	63
5. Remodelação das Placas Motoras durante a Reinervação	65
6. Morfometria das Junções Neuromusculares durante a Regeneração	73
7. Análise Geral e Comparativa da Reinervação Muscular após Tubulização	75
CONCLUSÕES	78
FIGURAS	80
Anexo	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
Abstract	

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar o restabelecimento das junções neuromusculares utilizando a técnica de reparo por tubulização como modelo de estudo da regeneração nervosa periférica. Dezesseis camundongos adultos machos da linhagem C57BL/6J tiveram o nervo ciático transecionado na região média da coxa e os cotos nervosos distais e proximais resultantes foram suturados no interior de um tubo de polietileno (DI = 0,76 mm), deixando-se um intervalo de 4 mm entre os mesmos. Decorridas 2 a 40 semanas da cirurgia, os animais foram perfundidos com fixador e o músculo EDL do lado operado foi removido e processado histoquimicamente para visualização de sítios colinesterásicos e fibras nervosas, de acordo com o protocolo de Prestonk & Drachman (Muscle & Nerve, 1:70, 1978). Dezesseis animais adicionais tiveram o nervo ciático esmagado e foram tratados da mesma maneira para comparação. Um total de 2800 áreas sinápticas escolhidas ao acaso foram classificadas de acordo com os seus padrões de inervação. Para a análise morfométrica, foram feitos desenhos de câmara clara dos terminais nervosos impregnados onde, com o auxílio de um sistema de computação, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de pontos de bifurcação das arborizações terminais e comprimento total da arborização terminal a partir do primeiro ponto de bifurcação. Duas semanas após a transecção e reparo nervoso, o músculo EDL estava inteiramente desnervado; axônios estavam ausentes do músculo e os locais das placas motoras originais foram localizados pela presença do produto da reação histoquímica. Decorridas 6 semanas, o músculo estava reinervado e o brotamento axonal entre as fibras musculares levou à poli-inervação do músculo EDL. Brotamento e formação de sinápses foram seguidos pela repressão parcial da inervação redundante que, após 40 semanas da tubulização, resultou na mono-inervação de 80% das fibras musculares. Neste mesmo tempo, 80% das placas motoras eram mono-inervadas por axônios originados do tronco nervoso (situação encontrada em todas as fibras do músculo EDL de animais não operados). Dados da análise morfométrica não mostraram diferenças no padrão de ramificação dos terminais nervosos entre os animais tubulizados e não operados. Destaque-se que a mesma proporção de fibras mono e poli-inervadas (4:1) foi também encontrada em animais com o mesmo tempo de sobrevivência (40 semanas) nos quais o nervo ciático foi lesado por simples esmagamento. Estes resultados evidenciam um padrão similar de reinervação muscular a longo prazo dos animais com transecção nervosa seguida de tubulização e daqueles com lesão nervosa por esmagamento.

INTRODUÇÃO

Está cada vez mais distante o conceito de que o sistema nervoso seria imutável e que, após lesão, não apresentaria qualquer capacidade de regeneração de seus elementos. Evidências cada vez mais numerosas surgidas nos últimos anos têm deixado claro que a célula nervosa possui uma capacidade intrínseca de regeneração, que pode ser expressa ou não na dependência de influências externas ao neurônio lesado. Essas influências formam, no seu conjunto, o micro-ambiente de regeneração.

Condições favoráveis para a expressão do potencial de regeneração dos neurônios são encontradas no sistema nervoso periférico. Os fenômenos teciduais básicos da regeneração de nervos periféricos são conhecidos há várias décadas, tendo sido sistematizados por Santiago Ramon y Cajal em sua extraordinária obra publicada nos anos vinte (Cajal, 1928). Os aspectos celulares e moleculares da regeneração das fibras nervosas periféricas, no entanto, começaram a vir a luz somente nos últimos anos.

A técnica de tubulização (que consiste na introdução das extremidades de um nervo seccionado no interior de um tubo), reintroduzida por Lundborg no final dos anos setenta (Lundborg et alii, 1979), tem fornecido um grande número de informações sobre os mecanismos básicos da regeneração nervosa periférica. Nosso laboratório, em particular, tem utilizado o implante de tubos sintéticos para o estudo da regeneração de nervos periféricos em roedores.

Em nosso modelo experimental, Da-Silva (1987) verificou que os nervos regenerados no interior de próteses tubulares apresentavam uma diminuição do número de fibras mielínicas em relação aos animais não operados, independente do tempo de sobrevivência após a cirurgia. Estudos posteriores com traçadores neuronais demonstraram que essa queda do número de fibras era devida a uma deficiência de regeneração dos neurônios

sensitivos, provavelmente causada pela morte de populações de neurônios dos gânglios da raiz dorsal imediatamente após a transecção de seus axônios (Da-Silva & Langone, 1989).

Embora Da-Silva (1987) tivesse constatado que os neurônios motores somáticos sobreviviam ao trauma inicial de seus axônios, restavam ainda questões fundamentais, e com consequências funcionais importantes, sobre o processo regenerativo desses neurônios. Assim, Chadi (1991) estudou o arranjo somatotópico dos motoneurônios no interior do sistema nervoso central, após a transecção de seus axônios e regeneração no interior de próteses tubulares. Os resultados obtidos demonstraram uma desorganização parcial do mapa motor decorridos três meses do implante tubular; uma recuperação funcional adequada exigiria então uma reorganização das projeções centrais motoras descendentes para os motoneurônios regenerados, para que houvesse um controle adequado da musculatura envolvida.

Uma outra questão a ser abordada em relação à regeneração dos motoneurônios refere-se ao padrão de reinervação motora periférica ao nível dos órgãos-alvo, isto é, das fibras musculares esqueléticas, após secção nervosa e reparo por entubulização. Estudo **qualitativo** ultra-estrutural realizado por Marques (1992) demonstrou uma reinervação adequada das junções neuromusculares após colocação das próteses tubulares. Este estudo, no entanto, não permitiu uma análise quantitativa do padrão de reinervação muscular.

Deste modo, pretendemos neste trabalho quantificar o padrão de reinervação do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de camundongos C57BL/6J, após transecção do nervo ciático e reparo imediato pela técnica de tubulização. Concomitantemente, serão

estabelecidos, para análise comparativa, os padrões quantitativos de inervação do músculo EDL de animais não operados e de animais com esmagamento do nervo ciático, sendo esta última considerada como a condição mais propícia de reinervação nervosa periférica, por resultar na integridade das bainhas conjuntivas e neurolemas do nervo após o trauma.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Desenvolvimento das Fibras Musculares.

As fibras musculares são originadas de células não diferenciadas localizadas no mesoderma e que, após rápida proliferação celular, vão dar origem às células musculares mais primitivas, os mioblastos (Tello, 1917).

Nos vertebrados, as fibras musculares esqueléticas se originam por diferenciação de células mesenquimais derivadas da placa lateral e mesoderma somático (Kelly & Zacks, 1969a; Dennis et alii, 1981; Ontell & Kozeka, 1984).

Em ratos, os miotubos primários que servem como base estrutural a partir dos quais haverá a geração dos miotubos secundários, aparecem entre o 13º e 16º do período embrionário (E13-E16) e os agrupamentos formados são envolvidos pela lâmina basal após o 15º dia (Kelly & Zacks, 1969a; Dennis et alii, 1981), enquanto os miotubos secundários que se formam abaixo da lâmina basal das fibras primárias começam a aparecer em E18-19 (Thompson et alii., 1990).

A fusão dos mioblastos e a formação dos agrupamentos de miotubos primários e secundários parecem depender de vários fatores; entre eles estaria a presença da molécula de adesão neural (N-CAM) presente em miotubos e mioblastos (Rutishauser, 1984; Covault & Sanes, 1986), bem como sinais colinérgicos, pois a fusão dos mioblastos também pode ser temporariamente impedida pelo bloqueio dos receptores de acetilcolina (RACH) pela alfa bungarotoxina (α -BTX) (Entwistle et. alii 1988 a,b).

Os primeiros sinais da síntese de miosina são observados no estágio E9 de camundongos (Jockusch et alii, 1984). Os miotubos recém-formados em roedores expressam miosina dos tipos cadeia embrionária de miosina (E-MHC), cadeia adulta de miosina tipo lenta (S-MHC) e alguns expressam uma cadeia distinta à neonatal MCH (Weydert et alii, 1987). Os

primeiros miotubos formados continuam a produzir S-MHC, enquanto os miotubos formados posteriormente no mesmo músculo podem interromper a produção da S-MHC para, eventualmente, produzir a cadeia pesada de miosina tipo rápida (F-MHC). O número final de fibras lentas e rápidas e sua distribuição são caracteristicamente diferentes para cada músculo (Narusawa et alii, 1987; Thompson et alii, 1990).

A diferenciação dos estágios iniciais de miotubo acontece na ausência de fibras nervosas (Butler et alii, 1982; Condon et alii, 1988).

Os nervos motores alcançam os primórdios musculares por volta do 12º dia de desenvolvimento em camundongos (E12); assim, a ativação das fibras primárias, a união da população secundária de miotubos e o número de fibras secundárias geradas, requerem a inervação do músculo para o desenvolvimento normal (Betz et alii, 1980a; Harris, 1981a; McLennan, 1983; Ross et alii, 1987a,b).

Embora o número de fibras seja reduzido nos músculos em desenvolvimento, fibras rápidas e lentas apresentam distribuição quase normal. Nas fibras musculares maduras, os agrupamentos dividem-se e cada fibra permanece envolvida por sua própria membrana basal (Jansen & Fladby, 1990).

As propriedades funcionais e os tipos de miosina expressas nas fibras musculares de roedores podem ser influenciados por fatores epigenéticos. Como exemplo, fibras lentas do músculo sóleo de ratos podem ser transformadas, através da estimulação de alta frequência, para o tipo de fibra rápida que expressa predominantemente F-MHC (Gorza et alii, 1988; Ausoni et alii, 1989).

Miogênese e diferenciação muscular são controladas por processos dependentes da linhagem e uma complexa combinação de fatores epigêneticos. Entre os últimos, aqueles dependentes de atividade são

fundamentais para a diferenciação das fibras nos últimos estágios do desenvolvimento. Os detalhes da interação entre os vários fatores e suas importâncias relativas ainda não estão estabelecidos.

2. Crescimento dos Axônios.

Sabe-se da literatura que os músculos dos membros são inervados por grupamentos de motoneurônios que, após serem gerados, migram para fora do epitélio ventricular tornando-se parte de uma coluna motora morfológicamente homogênea. Ao mesmo tempo em que são gerados, os motoneurônios começam a emitir os seus axônios para a periferia. Os neurônios começam a gerar axônios quando cessa o processo de divisão celular (Cajal, 1929; Romanes, 1951; Hollyday & Hamburger, 1977; Heaton et alii, 1978; Morris, 1978).

Apesar dos primeiros axônios entrarem nos brotos dos membros de aves e ratos quando estes são ainda formados por uma porção central de pré-cartilagem que separa duas massas pré-musculares (dorsal e ventral), os estudos eletrofisiológicos, assim como anatômicos pelo uso da marcação retrógrada com HRP, em animais de diferentes idades, têm permitido supor que os padrões esteriotipados de inervação dos membros nos animais adultos já estão estabelecidos no início do processo de inervação (Landmesser, 1978; Landmesser & Morris, 1975; Hollyday, 1980a,b; Honig, 1982; Scott, 1982; Smith & Hollyday, 1984; Rubin, 1985b).

Assim, a formação dos plexos nervosos pelos axônios dos membros de vertebrados, o longo trajeto que estes axônios percorrem dentro dos troncos nervosos e os pontos de ramificação específicos para alcançarem o músculo apropriado, parecem ser obtidos através de uma orientação precisa do cone de crescimento axonal, provavelmente pela

adesividade seletiva aos componentes da matriz extracelular (MEC) (Letourneau, 1982).

Straznicky (1967) demonstrou que, se um segmento da medula cervical ou torácica é transplantado para o nível braquial em embriões de galinhas, os axônios que crescem da raiz ventral reproduzem a inervação da asa formando um plexo braquial normal, sugerindo que o crescimento dos axônios para os brotos dos membros seguem vias não-específicas que fornecem um substrato necessário para todos os axônios, independente de suas origens (Jansen & Fladby, 1990).

Do mesmo modo, a existência de vias específicas para o padrão ordenado de inervação foi demonstrada experimentalmente em embriões de aves, nos quais a capacidade dos axônios de alcançar os alvos apropriados se mantém, mesmo que se faça a reversão no eixo antero-posterior ou a retirada de pequenos segmentos da medula espinhal antes dos axônios alcançarem os brotos dos membros. Assim, na reversão de pequenos segmentos da medula espinhal os axônios corrigem suas trajetórias dentro do plexo nervoso e atingem seus alvos, enquanto que após a retirada de segmentos da medula, os axônios dos segmentos vizinhos aos retirados inervam seus alvos e ignoram aqueles dos segmentos retirados (Lance-Jones & Landmesser, 1980a,b, 1981a,b).

O cone de crescimento dos axônios, assim como outros tipos de células, se locomovem de acordo com uma constante hierárquica da matriz extracelular na qual a adesividade ao substrato é o fator determinante. Dentre os componentes moleculares da matriz extracelular que têm sido relacionados à orientação e crescimento axonal a **laminina** é a mais forte candidata a promover o crescimento dos axônios independente de suas origens (Sanes, 1989).

A presença de substâncias ainda desconhecidas, provavelmente proteínas e/ou moléculas de glicoconjugados localizadas na superfície das células ou na matriz extracelular e sobre as quais os cones de crescimento não se locomovem, podem estar relacionadas ao impedimento da entrada em regiões inapropriadas, e a não ramificação do nervo em pontos indesejáveis do trajeto nervoso (Keynes & Stern, 1988; Tosney 1988).

As vias específicas são bem menos conhecidas, sendo várias diferenças necessárias para especificar os pontos de ramificação dos nervos motores; no entanto, ainda está em aberto se estas especificações são acompanhadas por muitas substâncias ou diferentes combinações de algumas poucas (Sanes 1989).

Ao lado das vias fixas de orientação para o cone de crescimento, a existência de um "fator de crescimento" secretado por músculo desnervado ou embrionário que tenha a capacidade de aumentar a sobrevivência de neurônios, estimular o crescimento dos axônios motores, bem como estimular a formação de sinapses, poderia orientar o cone de crescimento para o miotubo ou fibra muscular desnervada (Gundersen & Barrett, 1979; Kuffler, 1987). A ocorrência de erros ocasionais de nervos impróprios para determinados músculos em experimentos com embriões sugere o envolvimento de um possível fator de crescimento também durante o desenvolvimento fetal (Lance-Jones & Landmesser, 1981a).

A identificação dos três primeiros motoneurônios de cada segmento espinhal no embrião de peixe zebra no momento em que são gerados, a trajetória idêntica de crescimento axonal em todos os segmentos e a inervação de secção exclusiva dos músculos miotomais por cada um desses três motoneurônios primários, levam a concluir que a precisão inicial na inervação de músculos individuais é provavelmente devida à pré-formação de vias marcadas no início da fase embrionária (Eisen et alii, 1986). A

observação de erros nas projeções em *Xenopus* (Lamb, 1979) e em membro posterior de rato (Bennett et alii, 1983) com uma frequência pequena, não obscurece a conclusão de que a maior parte da especificidade na inervação dos músculos esqueléticos dos vertebrados é devida a uma precisa orientação do cone de crescimento durante o alongamento axonal.

3. Desenvolvimento da Junção Neuromuscular.

Durante o desenvolvimento embrionário, os neurônios motores assim como as suas células alvos, os músculos esqueléticos, apresentam um desenvolvimento independente. A partir do momento que estas estruturas fazem contato elas tornam-se interdependentes.

Os processos de formação das junções neuromusculares têm sido examinados durante o desenvolvimento (Kullberg et alii, 1977; Dennis et alii, 1981), em culturas celulares (Anderson et alii, 1977; Fischbach et alii, 1979; Kidokoro et alii, 1980) e durante a reinervação de músculos em animais adultos (Letinsky et alii, 1976; Sanes et alii, 1978; Gorio et alii, 1983).

Somente neurônios colinérgicos podem formar sinapses funcionais com os músculos esqueléticos. Em cultura de tecidos, por exemplo, foi demonstrado que axônios sensitivos ou simpáticos crescem ao longo da superfície dos miotubos sem induzir a diferenciação pós-sináptica (Cohen & Weldon, 1980).

Na primeira fase da formação sináptica, a terminação nervosa deve reconhecer a fibra muscular como um alvo pós-sináptico adequado. Fatores próprios da membrana, frequentemente glicoproteínas, parecem ser os elementos essenciais neste processo.

Dentre os fatores próprios da membrana, a glicoproteína N-CAM (molécula de adesão celular neural) é a mais forte candidata segundo Covault & Sanes (1986). Esta molécula é um componente da membrana

plasmática dos mioblastos e dos miotubos recém-formados, sendo também expressa nos neurônios motores e em suas terminações, tendo a capacidade de aumentar a adesão entre as células e atuando como seu próprio receptor (Edelmann, 1983). Assim, ela promove um íntimo contato entre o cone de crescimento do axônio motor e o miotubo receptivo à inervação. Após a inervação, a expressão de N-CAM sobre a miofibrila é suprimida, permanecendo somente na região juncional e proximidades. A substância reaparece na região extrajuncional somente após paralisia ou desnervação da fibra muscular, sendo novamente suprimida extra-juncionalmente após reinervação (Covault & Sanes, 1986). Outras evidências para o envolvimento da N-CAM na inervação do músculo esquelético foram obtidas por Rutishauser et alii (1983) que, em culturas de células, relataram que anticorpos anti N-CAM inibem o crescimento dos axônios motores ao longo dos miotubos. Do mesmo modo, Tosney et alii (1986) sugeriram que a N-CAM contribuiria para a inervação do músculo esquelético em embriões de galinha nos seus estágios iniciais de desenvolvimento. Este conjunto de observações sugere que a N-CAM é um importante fator nos estágios iniciais da formação sináptica no músculo esquelético.

O local de contato entre os cones de crescimento dos axônios motores e os miotubos em desenvolvimento, onde irão se formar as junções neuromusculares, não mostra nenhuma característica morfológica que o distinga de outras regiões dos miotubos. Este contato é observado nos músculos intercostais de ratos no 16º dia de vida embrionária, havendo um maior acúmulo de vesículas sinápticas dois dias após, sendo este acúmulo de vesículas na extremidade axonal o primeiro sinal de especialização pré-sináptica (Teravainen, 1968; Kelly & Zacks, 1969a,b; Zacks, 1973; Moody-Cobertt, 1986).

Vários dos componentes necessários para o desenvolvimento das junções neuromusculares devem estar presentes no momento em que ocorre o contato entre o cone de crescimento e os miotubos em desenvolvimento. Por exemplo, o cone de crescimento axonal tem um aparelho para a liberação espontânea e induzida de quantum de acetilcolina (**ACh**), sendo a eficiência de liberação alcançada após o estabelecimento do contato deste com a fibra muscular em desenvolvimento (Kullberg et alii, 1977; Xie & Poo, 1986); do mesmo modo, os receptores de acetilcolina (**RACH**) já se encontram presentes em pequenos agrupamentos dispersos sobre a superfície dos mioblastos, e aumentam a sua concentração com a fusão destes para formação dos miotubos (Diamond & Miledi, 1962), observando-se em estágios posteriores dos miotubos agrupamentos ainda mais densos sobre suas superfícies (Vogel et alii, 1972). Finalmente, a acetilcolinesterase (**AChE**) está presente nas células mononucleadas não diferenciadas e que são precursoras dos mioblastos na formação dos miotubos, aumentando a sua concentração nas junções neuromusculares dos músculos intercostais por volta do 17º dia de gestação em ratos (Kelly & Zacks, 1969a; Umesu et alii, 1990).

Os RACH sofrem várias alterações durante o desenvolvimento da junção neuromuscular (**jnm**). Dentre elas estão: 1) a diminuição na concentração dos receptores nos locais extrajuncionais e simultâneo aumento na região da junção neuromuscular (Moody-Corbett & Cohen, 1982; Merlie & Sanes, 1985; Fontaine et alii, 1988; Harris et alii, 1989; Pavlath et alii, 1989); 2) os receptores extrajuncionais e os primeiros receptores juncionais têm um tempo de abertura médio de aproximadamente 4 ms, ao contrário dos novos receptores sintetizados na junção que apresentam tempos de abertura de quase 1 ms (Brenner et alii, 1987; Brehm, 1989); 3) o aumento de 20 a 30 vezes na meia vida dos receptores localizados na jnm totalmente

desenvolvida em comparação aos receptores no início do desenvolvimento e aqueles situados fora da jnm após desnervação (Fambrough, 1979; Pumphrey & Fambrough, 1982).

A reinervação de músculos em animais adultos tem fornecido vias adicionais para o melhor entendimento da sinaptogênese. Os sítios originais de placas motoras são os alvos prediletos para os axônios em regeneração (Gutmann & Young, 1944; Letinsky et alii, 1976; Sanes et alii, 1978).

Axônios regenerados voltam a ocupar sítios sinápticos originais nas antigas regiões de jnm, formando zonas ativas e acumulando vesículas sinápticas mesmo na ausência de fibra muscular (Sanes et alii, 1978). Do mesmo modo, miotubos regeneram na ausência dos axônios ou de células de Schwann, acumulando RCh, sintetizando AChE, e formando pregas juncionais em oposição a antigos sítios sinápticos (Anglistter & McMahan, 1985). A partir destes experimentos tem sido possível identificar e purificar vários componentes da lâmina basal juncional que promovem o crescimento e diferenciação das terminações motoras bem como aqueles que aumentam a agregação dos RCh e AChE em culturas de miotubos (Wallace, 1986; Hunter et alii, 1989a).

A molécula "agrin" produzida por motoneurônios pode estar envolvida na agregação dos elementos críticos da jnm, já que a mesma induz, em cultura de mioblastos, a formação de agrupamentos de RCh, AChE e componentes da lâmina basal como a proteoglicana heparansulfato (Nitkin & Rothschild, 1990). Um provável mecanismo de ação dessa molécula durante a regeneração, sugere que a "agrin" liberada pela terminação nervosa permaneceria fixa à lâmina basal, ajudando a manter o aparelho pós-sináptico e induzindo a sua diferenciação nas miofibrilas em regeneração na ausência da terminação nervosa; a liberação da "agrin" por axônios em regeneração ou

em desenvolvimento explicaria a capacidade de induzir um aparelho pós-sináptico em sítios ectópicos em miofibrilas desnervadas ou mesmo induzir a sinaptogênese durante o desenvolvimento normal (Niktin et alii, 1987; McMahan & Wallace, 1989).

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) foi identificado em motoneurônios da medula espinhal de várias espécies e nas terminações nervosas das junções neuromusculares de roedores (New & Mudge, 1986; Takami et alii, 1985a,b). Quando produzido em motoneurônios em desenvolvimento, o CGRP tem a capacidade de aumentar a porcentagem de síntese de RACH em culturas de miotubos de galinha em concentrações normais (New & Mudge, 1986), sugerindo que o mesmo possa funcionar como fator neuronotrófico do nervo para o músculo (Laufer & Changeux, 1987).

Na maioria dos mamíferos as jnm são únicas e estão localizadas no ponto médio de cada fibra muscular. Esta localização parece estar relacionada ao crescimento simétrico que os músculos embrionários apresentam, talvez pela adição de novos mioblastos às extremidades dos miotubos em desenvolvimento (Willians & Goldspink, 1971; Bennett & Pettigrew, 1976).

A distribuição dos sítios juncionais nos músculos não é totalmente entendida, mas parece estar relacionada ao fato de que, logo após a junção ter sido formada, a membrana extrajuncional perderia sua receptividade à inervação. Este fenômeno foi demonstrado em experimentos no qual: a) um nervo implantado em músculo com inervação intacta mantém a capacidade de crescimento, mas não forma sinápses até que o nervo original seja lesado; b) um bloqueio reversível na condução de impulsos nos nervos motores originais leva à formação de placas ectópicas pelo nervo implantado, sendo a formação das mesmas impedida pela manutenção da atividade no

músculo desnervado; c) a reinervação dos sítios juncionais originais não é impedida pela atividade muscular. Estes resultados permitiram concluir que a atividade da fibra muscular parece ser um fator crucial na receptividade à inervação (Jansen et alii, 1973; Frank et alii, 1975)

Assim, após a formação da sinapse no início da inervação dos miotubos em desenvolvimento, o único local para inervação das fibras musculares fica restrito ao local das primeiras junções formadas na miofibrila (Jansen & Fladby, 1990).

4. Estrutura da Placa Motora.

A microscopia eletrônica revela que toda a superfície da fibra muscular é revestida pelo sarcolema, sendo este formado por 4 camadas concêntricas (Sanes et alii, 1978). A mais interna, uma típica camada de lipídeos, é a **membrana plásmatica**. Cobrindo a membrana plásmatica há uma camada de **polissacarídeos** rica em carboidratos e que pode ser distinguida em microscopia eletrônica (ME) pela sua elétron densidade, sendo também demonstrada por um grande número de corantes (Kambourg & Leblond, 1967); separada da camada de polissacarídeos por pequenas pontes elétron luzentes há a **lâmina basal (LB)**, que se cora intensamente com rutênio vermelho e tem um aspecto de filtro com uma espessura que varia de 10 a 15 nm, sendo semelhante às lâminas basais de outros tecidos (Spiro, 1972). Finalmente, revestindo toda a LB, há a 4ª. camada denominada de **lâmina reticular (LR)**, que apresenta espessura muito variada, contendo uma grande quantidade de pacotes de fibrilas colágenas dentro de uma matriz amorfa. A LB e a LR juntas foram chamadas de **membrana basal (MB)** por Sanes et alii (1978). Em todos os músculo de mamíferos existe uma pequena área que representa menos de 0,1% do tamanho da fibra muscular e que não é revestida por todas as camadas do sarcolema, mas apenas pelas 3

camadas mais internas; este local é denominado de junção neuromuscular ou placa motora.

Os principais componentes da placa motora são: 1) a terminação nervosa (membrana pré-sináptica), 2) a superfície especializada da fibra muscular (membrana pós-sináptica) e 3) a LB que separa as precedentes.

Os ramos terminais dos nervos motores são amielínicos, mas apresentam-se cobertos pela bainha da célula de Schwann da placa motora em toda a sua extensão, exceto no local de oposição à fibra muscular (Carlson, 1989). As **terminações nervosas** sobre a superfície muscular apresentam-se com contorno ovalado. Em nível ultraestrutural pode-se observar uma grande quantidade de pequenas vesículas que contém o neurotransmissor acetilcolina (**ACh**). Elas dispoem-se em agrupamentos com intervalos regulares, próximos à membrana e em oposição à fibra muscular, sendo denominadas de **zonas ativas**, local provável de liberação do transmissor. Nas preparações de crio-fratura a membrana da **terminação nervosa** destas regiões apresenta partículas com 10-12 nm de diâmetro (Dreyer et alii, 1973; Rash & Ellisman, 1974).

As terminações nervosas repousam nas pregas sinápticas primárias, que estão impressas sobre a superfície da fibra muscular. Ao longo da superfície das pregas sinápticas primárias a membrana plasmática da fibra muscular é modelada em uma série de pequenas pregas, as pregas sinápticas secundárias, separadas umas das outras por fendas pós-sinápticas que, na maioria dos músculos são profundas, como nos músculos de contração rápida de rãs e ratos, enquanto que em poucos casos, como por exemplo os músculos miotomais de *Xenopus*, apresentam fendas rasas (MacKay et alii, 1960; Kullberg et alii, 1977); em outros músculos essas fendas podem ainda estar ausentes, como nos músculos latíssimo dorsal anterior e

posterior da galinha (Atsumi, 1977; Burden, 1977b). Quando as fendas estão presentes elas estão em concordância às chamadas zonas ativas do terminal pré-sináptico. O uso de marcadores para demonstração de RACH demonstrou que estes estão presentes em altas concentrações junto às áreas mais espessadas da membrana pós-sináptica (Fertuck & Salpeter, 1974, 1976; Matthews-Bellinger & Salpeter, 1978). A densidade de RACH cai abruptamente além dos limites das placas motoras (Porter & Barnard, 1975; Fertuck & Salpeter, 1976), observação também confirmada por uma diminuição na sensibilidade à ACh em regiões não juncionais (Miledi, 1960; Peper & McMahan, 1972; Dreyer & Peper, 1974; Kuffler & Yoshikami, 1975). Preparações de crio-fratura das regiões espessadas da membrana plasmática revelaram que os RACH correspondem a partículas de 10-12 nm (Heuser et alii, 1974, Rash & Ellisman, 1974; Peng & Nakajima, 1978). Material filamentosso proteico também foi descrito em placas motoras de rãs e ratos adultos (Ellisman et alii, 1976; Kullberg et alii, 1977; Couteaux, 1981; Burden, 1982).

A **lâmina basal** que circunda a fibra muscular continua-se através da placa motora, separando a terminação nervosa (porção pré-sináptica) da fibra muscular (porção pós-sináptica); o espaço entre a terminação nervosa e a fibra muscular na placa motora é de aproximadamente 50 nm. A LB emite pequenos prolongamentos que penetram nas pregas sinápticas secundárias; associada à LB da placa motora existe uma rede de glicoproteínas que inclui a laminina, entactina, proteoglicana heparansulfato (Sanes, 1982), agrina (uma molécula com 150 e 95 kD de peso molecular relacionada a ao agrupamento dos RACH) (McMahan & Wallace, 1989), glicoproteínas em alta concentração com peso molecular de 185 kD (Hunter et alii, 1988) e a enzima acetilcolinesterase (AChE), a molécula mais abundante associada à lamina basal e que tem por

função hidrolizar o neurotransmissor ACh (Hall & Kelly, 1971; Betz & Sakmann, 1973; McMahan et alii, 1978; Anglister, 1991). Em músculos desnervados a AChE ainda persiste por longos períodos de tempo, apresentando uma diminuição gradativa de sua presença na placa motora até 180 dias após a desnervação (Csillik, 1967).

5. Lesão Nervosa Periférica.

Sempre que um nervo periférico é traumatizado, seja por transecção, esmagamento, compressão ou qualquer outro meio, segue-se uma série de alterações tanto proximais como distais ao local do ferimento, e que podem levar tanto à regeneração como à degeneração total da fibra nervosa e de seu corpo celular (Fiori et alii, 1988).

As alterações degenerativas que ocorrem nas fibras nervosas distalmente ao local do ferimento do nervo foram descritas por Waller em 1850, que demonstrou que a ocorrência de contato entre a porção distal do axônio lesado com o alvo periférico não era suficiente para manter o primeiro vivo, sendo necessária a sua continuidade com o centro trófico do neurônio (corpo do celular).

As alterações observadas nas fibras nervosas distalmente ao local do ferimento são coletivamente denominada de "degeneração Waleriana". Ao mesmo tempo, a porção proximal destas fibras lesadas e seus respectivos corpos celulares sofrem alterações funcionais e morfológicas referidas como "reação axonal" ou "efeito retrógrado" (Gragg, 1970; Lieberman, 1971; Fiori et alii, 1988).

5.1 Alterações na Porção Distal à Lesão.

A degeneração Walleriana está limitada ao coto distal dos axônios separados do seus centros tróficos (corpos celulares), estendendo-

se até o nó de Ranvier mais próximo à lesão nos axônios do coto proximal (Waller, 1850).

As junções neuromusculares mantêm-se funcionais por várias horas após o trauma das fibras nervosas; somente após o esgotamento dos nutrientes dentro do coto distal ocorre a perda da função da placa motora (Lubinska, 1975; Sunderland, 1978). Assim, a degeneração dos axônios parece estar relacionada ao esgotamento de materiais necessários para a manutenção do "turnover" normal dos axônios e à não reposição dos mesmos pelo corpo neuronal (Webster, 1962)

As primeiras alterações observadas após a lesão nervosa compreendem o acúmulo de organelas no axoplasma paranodal (Donat & Wisniewski, 1973) e perda dos microtúbulos e neurofilamentos axoplasmáticos (Schlaepfer & Micko, 1978), sendo efeitos primários da lesão.

Outras alterações envolvem as células de Schwann e a bainha de mielina; são efeitos secundários que têm início nas primeiras 12 horas após a lesão e prolongam-se por pelo menos mais 3 dias. Nelas observam-se uma hipertrofia das células de Schwann com alterações em seu citoplasma e membrana plasmática (Abrahams et alii 1980; Lubinska, 1982), aumento nas incisuras de Schmidt-Lanterman, afrouxamento das lamelas de mielina e retração das alças de mielina junto aos nós de Ranvier (Ballin & Thomas, 1969).

A fagocitose da bainha de mielina e de seus fragmentos é feita em sua maior parte pelos macrófagos que invadem o coto distal durante o processo de degeneração nervosa (Beuche & Friede, 1984; Scheidt & Friede, 1987), sendo também uma pequena parte da mielina fagocitada pelas próprias células de Schwann, como demonstrado *in vivo* (Allt, 1976) e *in vitro* (Bigbee et alii, 1987; Crang & Blakemore, 1987).

Os macrófagos parecem ser também responsáveis pela proliferação das células de Schwann durante a degeneração nervosa periférica *in vivo*, uma vez que estas só começam a se dividir após a invasão e início da fagocitose pelos macrófagos, que parecem propiciar com suas ações um meio mitogênico para as células de Schwann (Thomas, 1966; Williams & Hall 1971; Allt, 1976; Perry et alii, 1987; Baichwal et alii, 1988). Outra consequência da invasão dos macrófagos é a produção pelos mesmos da apolipoproteína E, uma proteína de peso molecular de 37 kDa, sintetizada em resposta ao trauma nervoso e que parece ser importante na mobilização de lípidos produzidos pela degeneração axonal, podendo estar envolvida na promoção do crescimento axonal pela participação na reutilização de lipídeos (especialmente na redistribuição do colesterol para os neurônios que dele necessitam para o crescimento axonal) e na re-mielinização pelas células de Schwann (Skene & Shooter, 1983; Boyles et alii, 1985; Ignatius et alii, 1986, 1987).

Foi também demonstrado que as membranas axonais e fragmentos de mielina estimulam a proliferação das células de Schwann *in vitro* (Salzer & Bunge 1980; Salzer et alii, 1980).

Após a degeneração dos axônios e bainhas de mielina, permanecem íntegros, no coto distal, os tubos de lâmina basal que envolviam os axônios originais. Dentro destes tubos as células de Schwann em proliferação alinham-se formando colunas. As colunas de células de Schwann circundadas pelos tubos de lâmina basal foram denominadas de tubos endoneurais ou bandas de Büngner (Lundborg, 1987; Fawcett & Keynes, 1990). Processo semelhante também ocorre com as fibras amielínicas .

5.2 Alterações na Porção Proximal à Lesão.

A degeneração Walleriana no coto proximal está limitada à área adjacente à lesão (Waller, 1850; Morris et alii, 1972); o restante da porção proximal das fibras nervosas lesadas e seus respectivos corpos celulares sofrem alterações funcionais e morfológicas referidas como "reação axonal" ou "efeito retrógrado" (Lieberman, 1971; Watson, 1974).

Entre as reações axonais com alterações de caráter morfológico, a mais precoce é a cromatólise, caracterizada pela dissociação da substância de Nissl (consequência da desintegração de grandes porções do retículo endoplasmático rugoso e dispersão dos ribossomos dentro do citoplasma), aumento de volume do corpo celular e deslocamento do núcleo para periferia. Dentre as alterações relacionadas ao metabolismo celular predomina uma progressiva diminuição de componentes do citoesqueleto transportados do corpo celular para o axônio.

Muitas das alterações estruturais e morfológicas que ocorrem no corpo do neurônio não estão esclarecidas fisiologicamente, mas parecem estar intimamente relacionadas a eventos celulares ligados à síntese proteica e transporte axonal, e que podem conduzir tanto à regeneração como à morte neuronal (Hydén, 1960; Lieberman, 1971, 1974; Torvik & Soreide 1976; Fawcett & Keynes, 1990).

Estas interpretações são sustentadas por evidências de estudos sobre o conteúdo proteico e de RNA em neurônios axotomizados, que demonstraram um aumento na síntese de proteínas associadas ao crescimento (GAP), tubulina e actina; a re-indução de genes para tubulina (α 1T e β classe II) está aumentada durante a regeneração nervosa periférica (Hoffmas & Cleveland, 1988; Miller et alii, 1989), sendo um fenômeno característico também dos axônios em fase de desenvolvimento.

Os neurônios que sobrevivem à lesão começam a regenerar decorridas poucas horas após o trauma. Seguindo-se à reorganização de suas membranas plasmáticas, cada um dos axônios mielínicos e amielínicos pode gerar dezenas de brotamentos axonais, ou neuritos de regeneração (Cajal, 1928; Lubinska, 1952; Yawo & Kuno, 1983). Nos axônios mielínicos os brotamentos têm origem junto ao nó de Ranvier mais próximo ao local da lesão, no espaço deixado pela retração parcial das células de Schwann (McQuarrie, 1985; Meller, 1987).

Para que os axônios em regeneração cresçam e cruzem o espaço entre os cotos nervosos e penetrem no coto distal para atingir seus alvos, é necessário que os elementos nervosos, conjuntivos e vasculares do nervo readquiram as suas relações morfofuncionais primitivas (Langone, 1991).

O sucesso da regeneração nervosa periférica depende de vários fatores, destacando-se a interação do cone de crescimento dos brotamentos axonais com as substâncias do meio extracelular por ele atravessada até atingir seu alvo. Vários trabalhos experimentais têm demonstrado a ação estimulatória de moléculas localizadas na matriz extracelular e que têm forte influência sobre o crescimento e orientação dos axônios, tanto na fase de formação como na regeneração do sistema nervoso (Sanes, 1989; Fawcett & Keynes 1990).

No início da regeneração dos axônios no sistema nervoso periférico, o microambiente de regeneração é constituído por fragmentos axonais, bainhas de mielina em degeneração, células fagocitárias, fibroblastos, fibras colágenas e células de Schwann com suas membranas basais. Destes componentes, as células de Schwann são as que têm um papel crítico na promoção da regeneração axonal (Fawcett & Keynes, 1990).

As relações entre o cone de crescimento dos axônios em regeneração com a superfície externa da membrana plasmática das células de Schwann por um lado e a membrana basal das mesmas por outro, foram primeiro descritas por Holmes & Young (1942) em estudos de microscopia de luz, e confirmados por estudos posteriores com microscopia eletrônica (Wechsler & Hager, 1962; Barton, 1962; Ide, 1983).

Estas relações, somadas às observações de estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a natureza das interações entre as células de Schwann e os axônios em crescimento, levaram muitos pesquisadores a concluir que as moléculas presentes na membrana basal dessas células atuam como fatores promotores de neuritos e como substrato preferencial, agindo tanto no crescimento e direcionamento dos axônios em regeneração como nas fases desenvolvimento do sistema nervoso (Sanes, 1989; Fawcett & Keynes, 1990).

Entre as moléculas da membrana basal das células de Schwann a **laminina** é a mais abundante, estando também presente sobre a membrana basal de outros tipos de células (Timpl et alii, 1983).

A laminina é considerada como um dos principais fatores promotores de neuritos; substratos cobertos com laminina purificada mostraram-se mais eficaz na promoção de neuritos quando comparados com outros associados a outras moléculas presentes na matriz extracelular (fibronectina, colágeno e proteoglicanas), tanto para neurônios centrais como periféricos (Manthorpe et alii, 1983, Rogers et alii, 1983; Adler et alii, 1985; Engvall et alii, 1986).

Por outro lado, foi demonstrado que a ausência de células de Schwann vivas em ambiente de regeneração provoca a inibição ou diminuição no crescimento dos axônios, efeito esse não revertido pela presença de membranas basais dessas células. Estes resultados foram observados em experimentos com enxertos de nervos e músculos (enxertos congelados para

matar as células no seu interior) usados para unir os cotos proximais e distais de nervos seccionados; os axônios do hospedeiro só cresciam para dentro dos enxertos se acompanhados por células de Schwann que migravam do coto proximal do hospedeiro, não acontecendo caso a invasão do enxerto pelas células de Schwann fosse impedida por agentes citotóxicos (Ide et alii, 1983; Hall, 1986a; Gulati, 1988).

Outra molécula que parece ter importância na regeneração nervosa periférica é o fator de crescimento nervoso ou NGF (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951). Os níveis de NGF e de seu RNAm estão aumentados no coto distal de nervos lesados (Heumann et alii, 1987; Raivich & Kreutzberg, 1987; Taniuchi et alii, 1986), sendo provavelmente provocado pela interleucina-1 secretada por macrófagos que invadem o local da lesão (Lindholm et alii, 1987; Da-Silva et alii, 1990). O NGF é uma molécula produzida por células não neuronais que, difundindo-se pelo meio extracelular e atuando sobre os neurônios, estimula de alguma forma o seu metabolismo, tanto no desenvolvimento normal como na regeneração. Alguns autores também têm atribuído ao NGF uma função de direcionamento dos axônios em crescimento, em virtude de sua distribuição e concentração no ambiente extracelular do coto distal (Johnson et alii, 1988).

Além disso, uma variedade de moléculas que são conjuntamente denominadas de moléculas de adesão celular é demonstrada na superfície da membrana plasmática das células de Schwann e dos axônios em crescimento, cuja importância vem sendo destacada no desenvolvimento e na regeneração nervosa periférica, bem como na fasciculação dos axônios. Anti-corpos contra três destas moléculas já identificadas (L1/Ng-Cam, N-Cadherin e integrinas), quando aplicados conjuntamente, inibem qualquer crescimento de axônios sobre culturas de células de Schwann combinadas com neurônios; estes anti-corpos, no entanto, não inibem o crescimento dos

axônios quando aplicados isoladamente (Bixby et alii, 1988, Seilheimer & Schachner, 1988).

A localização, quantidade e modo de associação das moléculas de adesão celular têm ampla variação. A L1/NgCam por exemplo está presente nos axônios e células de Schwann, sendo sua concentração aumentada após lesão nervosa; seu modo de associação é homofílico, podendo ligar-se ainda a outros receptores (Daniloff et alii, 1988; Grumet & Edelman, 1988; Martini & Schachner, 1988). A N-Cadherin foi demonstrada em neurônios, associando-se também homofilicamente (Hatta et alii 1987, 1988). Outra molécula de adesão celular presente nos cones de crescimento dos axônios em regeneração e células de Schwann, e que podem também ter um importante papel no crescimento e fasciculação dos axônios é a N-CAM (Martini & Schachner, 1988).

6. Brotamento Axonal.

Brotamentos axonais podem ser definidos como constituindo o estágio inicial do crescimento de novos processos de neurônios intactos ou lesados (Gorio, 1984).

Desde que Exner (1884) descreveu pela primeira vez que um músculo não degeneraria se seu suprimento nervoso fosse parcialmente removido, muito se tem acrescentado no estudo da capacidade dos neurônios intactos ou lesados em formar brotamentos axonais (Van Harreveld 1945; Hines et alii, 1945; Wehrmacher & Hines, 1945; Edds, 1950; Aguilar et alii, 1973; Purves e Lichtman, 1978; Wernig et alii, 1980a; Gorio, 1984; Pestronk & Drachman, 1988).

A capacidade das fibras nervosas em responder a estímulos que promovam brotamentos de axônios, levando ou não à formação de um novo contato sináptico, tem sido estudada em: 1. músculos parcial ou

totalmente desnervados (Van Harreveld, 1945; Weiss & Edds, 1946; Edds, 1950; Gorio et alii, 1983; Toft & Fugleholm, 1988), 2. experimentos com utilização de bloqueadores químicos do transporte axonal (Aguilar et alii, 1973; Pestronk & Drachman, 1978; Guth et alii, 1980), 3. experimentos com utilização das toxinas do botulismo, tétano ou tetrodotoxina (Duchen & Strich, 1968; Pestronk & Drachman, 1976; Brown et alii, 1982a,b; Cotman et alii, 1981).

A capacidade de gerar brotamentos não é exclusiva de neurônios que tiveram o seu campo de inervação alterado, uma vez que foi observado uma contínua renovação do terminal pré-sináptico com crescimento e retração das terminações nervosas em junções neuromusculares normais de camundongos, ratos e rãs em diferentes tempos de vida do mesmo animal (Lichtman et alii, 1987; Hill et alii, 1991; Herrera et alii, 1990a,b).

Os brotamentos axonais, de acordo com os locais de origem, podem ser classificados em três diferentes grupos: 1) aqueles que se originam nas próprias terminações nervosas pré-sinápticas, denominados de **brotamentos ultra-terminais** e que, nos estágios iniciais, possuem as mesmas características do local de origem, não apresentando citoesqueleto e exibindo uma grande quantidade de vesículas; 2) os de origem no nó de Ranvier denominados de **brotamentos nodais** ou **colaterais**, e que são os mais comuns; 3) aqueles que têm origem nas áreas pré-terminais dos axônios onde termina a bainha de mielina e denominados de **brotamentos pré-terminais**, cuja origem sugere uma similaridade com os brotamentos colaterais (Duchen, 1971; Gorio, 1984).

A capacidade de produzir brotamentos está relacionada ao tipo de ferimento (esmagamento ou secção), à idade do animal, ao nervo lesado e ao número de unidades motoras sobreviventes à lesão (Thompson &

Jansen, 1977; Betz et alii, 1979, 1980; Dennis & Harris, 1980; Lowrie et alii, 1982). Em ratos adultos, por exemplo, o tamanho da unidade motora pode aumentar até 5 vezes após desnervação parcial, sendo bem menor em animais recém-nascidos (Brown et alii, 1976; Thompson & Jansen, 1977). Com relação ao tipo de ferimento, foi descrito que animais recém-nascidos têm a capacidade de reinervar um músculo somente se a lesão nervosa for por esmagamento, não ocorrendo após secção do nervo (Dennis & Harris, 1980; Lowrie et alii, 1982). Em ratos com 2 meses de idade, a toxina do botulismo induz a um processo de brotamento muito mais acentuado quando comparados com animais com idades entre 10 e 18 meses, observando-se uma ausência total de brotamentos em animais com 28 meses de idade (Pestronk et alii, 1980).

Há também um limite para o número de brotos que um neurônio motor pode originar na tentativa de expandir seu campo periférico de inervação durante o desenvolvimento e no animal adulto após lesão (Gorio, 1984).

A diferença descrita na capacidade dos neurônios em produzir brotamentos tem recebido várias explicações, como por exemplo as barreiras de tecido conjuntivo que impedem o crescimento de axônios, o limite do corpo celular em suprir materiais para os novos brotamentos, uma diminuição na capacidade dos axônios em formar novas sinapses nas fibras desnervadas e uma diminuição dos níveis dos supostos estímulos que elicitariam a formação de brotamentos (Brown et alii, 1976; Thompson & Jansen, 1977; Betz et alii, 1979, 1980; Lowrie et alii, 1982; Dennis & Harris, 1980; Gorio et alii, 1983; Kugelberg et alii, 1970).

Os brotamentos colaterais teriam origem somente em locais próximos aos pontos de ramificação das bainhas endoneurais, estando os mesmos ausentes quando grandes distâncias (400 a 600 μm) separam os

pontos de ramificação da bainha endoneural do nó de Ranvier (Slack et alii, 1979; Hopkins & Slack, 1981). Estas observações sugerem uma forte influência das estruturas não neuronais que formam os troncos nervosos na formação de brotamentos e que, após a desnervação sofreriam modificações que favoreceriam seu aparecimento.

Além da influência dos tipos de ferimentos, da idade dos animais e das estruturas não neuronais, há substâncias que podem contribuir para o aparecimento de brotamentos nos axônios, como a colchicina, a tetrodotoxina e a toxina do botulismo, cujas interferências com as atividades pré-sinápticas (como transporte axonal, excitabilidade e liberação de transmissores) podem causar brotamentos de fibras nervosas tratadas previamente por toxinas ou de fibras intactas adjacentes a elas (Duchen & Strich, 1968; Aguilar et alii, 1973; Pestronk & Drachman, 1976, 1978; Guth et alii, 1980; Cotman et alii, 1981; Brown et alii, 1982).

As interferências com as atividades pós-sinápticas também podem ser causas do aparecimento de brotamentos; apesar dos efeitos dos bloqueios pós-sináptico serem controvertidos, Holland & Brown (1980) descreveram um aumento dos índices de brotamentos após injeção de alfa-bungarotoxina (age bloqueando os RACH) em animais previamente tratados com a toxina do botulismo, enquanto Pestronk & Drachman (1978) não encontraram brotamentos após o mesmo tipo de tratamento.

O bloqueio das atividades pré e pós-sináptica parece induzir a um aumento dos brotamentos, apesar da ausência de nervos em degeneração, sugerindo que a inatividade muscular é por si só um estímulo efetivo para o surgimento de brotos (Brown & Ironton, 1977; Betz et alii, 1980).

A influência da atividade muscular sobre o surgimento dos brotamentos foi demonstrada nos experimentos em que a estimulação nervosa de músculos desnervados inibia os brotamentos ultra-terminais e

diminuía a sensibilidade a ACh na superfície da fibra muscular (Lomo & Rosenthal, 1972; Ironton et alii, 1978).

Dentre os fatores que podem estimular o aparecimento de brotamentos colaterais ou ultra-terminais, vários têm sido propostos: a) o produto da degeneração nervosa dos axônios com consequente aparecimento de moléculas que teriam a capacidade de estimular o aparecimento de brotamentos (Jones & Vrbova, 1974; Cangiano & Lutzemberger, 1977), b) componentes das membranas basais de fibras musculares desnervadas propiciariam um substrato eficaz para fixação e crescimento de brotamentos (Hopkins & Brown, 1985), c) modificações na superfície da membrana basal muscular e produção pelo músculo desnervado de um fator de crescimento difusível, que prepararia o ambiente para a formação e crescimento dos brotamentos (Brown et alii, 1981), d) fatores produzidos e liberados pelas células de Schwann com capacidade para produzir brotamentos (Hopkin & Brown, 1985).

Uma explicação possível para o local de liberação dos estímulos de brotamentos seriam as placas motoras desnervadas, uma vez que ao se destruir regiões de alta concentração de placas motoras, observa-se uma diminuição nos índices de brotamentos nodais em músculos tratados com drogas que provocam necrose das placas motoras, o que impediria a produção de sinais de brotamentos por estas placas (Keynes, 1982).

Tem sido sugerido também que modificações do estado metabólico dos corpos celulares dos motoneurônios que sofreram axotomia possam ser a causa de brotamentos em motoneurônios intactos; uma possível explicação seria que os corpos dos neurônios em cromatólise originariam estímulos de brotamento que se difundiriam para neurônios intactos adjacentes ou que com eles tenham alguma comunicação, o que explicaria a presença de brotamentos e placas poli-inervadas em músculos

contra-laterais aos músculos desnervados em rãs e ratos (Rotshenker & Tal, 1985; Pachter & Eberstein, 1991).

7. Técnica de Tubulização.

Os processos envolvidos durante a regeneração do sistema nervoso têm-se constituído em campo de amplo interesse na área neurobiológica. Muitos dos estudos nessa área têm sido realizados no sistema nervoso periférico, envolvendo o estudo experimental de nervos lesados (Lundborg, 1982a,b,c; Gorio et alii, 1984).

Ao contrário das células de outros órgãos do corpo, o neurônio não tem a capacidade de se dividir completada a sua diferenciação; assim, o processo de regeneração terá como função a reposição das estruturas degeneradas e a formação de processos axonais que procurarão restabelecer as conexões sinápticas originais (Fields et alii, 1989).

Um dos modelos utilizados para o estudo da regeneração nervosa periférica tem sido a técnica de tubulização, que consiste em fixar em aposição as extremidades dos cotos proximal e distal de um nervo seccionado no interior de uma prótese tubular (PT) e que tem ganho grande impulso nos últimos 15 anos (Lundborg, 1987).

Sob o ponto de vista clínico a técnica de tubulização de nervos apresenta algumas vantagens em relação aos outros tipos de reparo nervoso pois, ao isolar o microambiente de regeneração, ela reduz a invasão de células do tecido conjuntivo no local de cicatrização, protege as estruturas em regeneração, orienta longitudinalmente a neo-vascularização e os axônios em regeneração, além de fornecer um local para a administração de aditivos que estimulem a regeneração nervosa (Da-Silva, 1987; Langone, 1991). O microambiente formado pela prótese possibilita ainda um meio para a análise dos aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos em diferentes tempos

da regeneração nervosa periférica (Lundborg et alii, 1982a; Longo et alii, 1983a,b; Williams et alii, 1983, 1984).

A utilização da técnica de tubulização no reparo de nervos remonta ao século passado, quando Glück (1880) utilizou pela primeira vez uma prótese tubular confeccionada com drenos cirúrgicos de natureza óssea, mas sem obter sucesso na regeneração. Baseados nestes estudos, uma série de outros experimentos foram executados por Vanlair (1882), que utilizou os mesmos tipos de próteses para unir os cotos nervosos do nervo ciático de cães (os cotos ficaram separados por uma distância de 3 cm). Vanlair observou pela primeira vez que o tubo ósseo havia sido reabsorvido e substituído por um tecido contendo fibras nervosas, que chegaram a invadir o coto distal.

Foi a partir destes trabalhos, que uma série de materiais começaram a ser utilizados para a confecção de próteses. Entre as próteses tubulares confeccionadas com material biológico destacam-se as **artérias** (von Büngner, 1891; Weiss, 1944b; Weiss & Davis, 1943; Weiss & Taylor, 1944), **veias** (von Büngner, 1891; Werd, 1909; Weiss, 1943; Chiu, 1982; Rice & Berstein, 1984b), **fáscia muscular** (Denk, 1914; Huber, 1920; Kraus & Reisner, 1940), **músculo** (Kraus & Reisner, 1940), **tubos mesoteliais** (Lundborg & Hansson, 1979; Lundborg et alii 1981; Danielsen et alii, 1983; Dahlin et alii, 1988), **colágeno** (Weiss & Taylor, 1946; Rosen et alii, 1979, Toyota et alii, 1988), **tubos colágeno/extrato de membrana basal** (Da-Silva & Madison 1986; Pereira & Da-Silva, 1992).

Das próteses confeccionadas com materiais sintéticos destacam-se aquelas confeccionadas com **polietileno** (Garrity, 1955; Chi & Dahl, 1983; Da-Silva & Langone, 1989; Langone, 1991; Marques, 1992) e **silicone** (Conley, 1955; Freeman, 1965; Hudson et alii, 1971; Rosen et alii,

1980; Lundborg et alii, 1982a,b,c; Fields & Ellisman, 1984, 1986a,b; Le Beau et alii, 1988a; Chadi, 1991).

As origens ectodérmica e mesodérmica das células que entram na composição do nervo demonstram que os processos regenerativos em próteses tubulares possuem características próprias, dependendo do nervo estudado, da distância deixada entre os cotos e do tipo de prótese empregada (Fiori et alii, 1989).

As respostas ao trauma nervoso como reação inflamatória, morte e reparo celular e fagocitose de fragmentos celulares são semelhantes às de outros tecidos (Sunderland, 1978).

Observa-se nas primeiras 24 horas após a colocação do tubo, o preenchimento do espaço deixado entre os cotos proximal e distal do nervo por plasma sanguíneo e outros fluídos intra e extracelulares (Longo et alii, 1983b; Williams et alii, 1983). Uma semana após o trauma uma ponte de fibrina contendo fibroblastos, fibronectina, macrófagos, leucócitos e eritrócitos, une os cotos proximal e distal e parece servir como estrutura para orientação e migração de fibroblastos, células de Schwann e processos axonais que começam a cruzar o local da lesão (Weiss, 1944b; Longo et alii, 1984, Le Beau et alii, 1988b). Entre as primeiras células a invadir o tubo estão os fibroblastos e células vasculares, que apresentam um papel crítico na preparação do ambiente para o crescimento axonal (Weiss, 1944b; Williams et alii, 1983). As células de Schwann apresentam uma intensa atividade mitótica com pico a partir do final da 1ª. semana após a lesão do nervo e prolongando-se até o final da 3ª. semana; estes efeitos coincidem com a migração destas células para dentro do tubo e a detecção de laminina na matriz extracelular dentro do tubo (Williams et alii, 1983; Le Beau et alii, 1988b).

Nos estágios iniciais da regeneração, os fibroblastos sintetizam fibras de colágeno que, junto com a fibronectina e laminina, formam a matriz extracelular, de importância vital para o sucesso da regeneração e cuja função é destacada nos processos de reconhecimento intercelular e de adesão celular (Hakes & Wang, 1982; Sanes, 1983; Longo et alii, 1984; Le Beau et alii, 1988b).

Ao mesmo tempo em que se observa as células de Schwann invadindo a matriz de fibrina pelas extremidades dos cotos nervosos, os primeiros cones de crescimento dos axônios em regeneração começam a surgir no coto proximal, em íntima relação com células de Schwann (dispostas à semelhança das bandas de Büngner) e membrana basal associada. Axônios ou feixes de axônios são vistos nesta fase envolvidos por processos das células de Schwann, apresentando aspectos de fibras nervosas embrionárias nos estágios iniciais de desenvolvimento (Friede & Samorajski, 1968; Fields & Ellisman, 1986b; Le Beau et alii, 1988b).

Somente a partir da 3ª e 4ª semanas começa a ser observada uma morfologia diferenciada do nervo em regeneração, sendo toda a sua extensão ocupada por elementos celulares e vasos sanguíneos. Pode-se observar ainda na porção proximal do tubo, axônios de grande calibre nos estágios iniciais de mielinização (Williams et alii, 1983; Le Beau et alii, 1988b). Por volta da 5ª e 6ª semanas os axônios mielínicos e amielínicos já invadiram o coto distal, com compartimentalização de axônios em fascículos delimitados por uma bainha conjuntiva semelhante à de um nervo normal (Scaravilli, 1984; Le Beau et alii, 1988a). Três meses após a tubulização (Fields & Ellisman, 1986b; Le Beau et alii., 1988a; Langone, 1991) observa-se um amadurecimento na organização de cada um dos elementos regenerados, embora com diferenças em relação ao número e diâmetro das fibras mielínicas. Com tempos de regeneração mais longos (mais de 10

meses) os diâmetros das bainhas de mielína das fibras regeneradas ainda são significativamente menores que os observados nos nervos normais (Fields & Ellisman, 1986b; Le Beau et alii., 1988a; Langone, 1991).

Nervos regenerados em próteses tubulares de animais com períodos prolongados de sobrevivência apresentam alguns axônios em degeneração e acúmulo de neurofilamentos; estas alterações são coincidentes com o número maior de axônios que invadem o coto distal e podem ser resultado dos efeitos constritivo da prótese tubular após longos períodos de regeneração (Da-Silva, 1987; Le Beau et alii, 1988a; Langone, 1991).

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram operados 32 camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com aproximadamente 8 semanas de idade, na época da cirurgia. Outros 4 animais normais foram utilizados para o grupo controle (não operado), totalizando 36 animais.

2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com Avertin (1). O nervo ciático esquerdo de 16 animais foi exposto e transeccionado, com o auxílio de microscópio cirúrgico (2), na região média da coxa e os segmentos proximal e distal do nervo, após retração, foram fixados com ponto único de sutura 10-0 (3), no interior de tubos de polietileno vazios com 6 mm de comprimento, 0,76 mm de diâmetro interno e 1,22 mm de diâmetro externo. O nervo ciático esquerdo de outros 16 animais foi também exposto na região média da coxa e comprimido por 4 vezes seguidas (20 segundos cada) com uma pinça de relojoeiro (Fig. 1). Com o término dos procedimentos cirúrgicos a camada muscular e pele dos animais foram fechadas com fio de seda 7-0 e grampos cirúrgicos (7,5 mm), respectivamente. A seguir os animais foram colocados em gaiolas e, durante todo o período pós-operatório, foram mantidos em biotério em ciclo de 12 horas de claro-escuro.

(1) 500 mg de tribromoetanol e 250 mg de 2-metil-2-butanol dissolvidos em 19,5 ml de água destilada (0,02 ml/g de peso corporal intraperitoneal).

(2) Microscópio cirúrgico DF-Vasconcelos (mod. MC-19)

(3) Fio monofilamento nylon 10-0 (22 μ m) Ethicon.

3. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após tempos de sobrevivência de 2, 6, 12 e 40 semanas (4 animais em cada grupo) os camundongos foram perfundidos, através do ventrículo esquerdo, com 20 ml de solução de NaCl a 0,9%, seguida por 100 ml de solução fixadora resfriada a 4°C, contendo formol a 10% e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 1% (todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH de 7,3). O músculo extensor longo dos dedos (EDL) foi rapidamente removido e congelado em isopentano resfriado a -40°C com gelo seco. Cortes seriados longitudinais de congelação com 40 μm de espessura foram obtidos com auxílio de um criostato (4) e coletados em lâminas histológicas usuais, recobertas com gelatina. Após coloração das secções com o método de Pestronk & Drachman (1978), as observações foram feitas com microscópio de luz. Procedimento semelhante foi utilizado para os animais do grupo controle, onde, após perfusão, o músculo EDL esquerdo foi removido e processado histológica e histoquimicamente como acima.

Técnica para Demonstração da Colinesterase (Segundo Pestronk & Drachman, 1978):

1. Os cortes, após serem montados em lâminas, foram deixados em temperatura ambiente por 20 minutos.

2. Após este tempo, foram banhados em solução aquosa de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 20% por 3 minutos, seguida por banho em água destilada, repetido após cada etapa do procedimento de coloração.

3. Em seguida, os cortes foram reagidos para demonstração da AChE na seguinte solução: 6 mg de 5-bromoindoxil acetato em 0,4 ml de etanol absoluto, dissolvidos em solução tampão de Tris-HCl (0,1 M e pH 7,2,

(4) Reichert-Jung, mod. 2800 Frigocut E.

solução estoque) acrescida de 84 mg de ferrocianeto de potássio, 66 mg de ferricianeto de potássio e 44 mg de cloreto de cálcio. Esta solução foi mantida em banho-maria à temperatura de 37°C, com as lâminas no seu interior por período de 8 a 20 minutos. Findo este tempo os cortes foram imediatamente processados para demonstração de fibras nervosas segundo o protocolo abaixo.

Técnica para Impregnação com Prata das Fibras Nervosas (Segundo Pestronk & Drachman, 1978):

1. Os cortes foram desidratados em etanol a 70% e 100% (2 minutos cada) e mergulhados em solução de celoidina a 0,5% em mistura de éter-etanol (1:1) por 20 segundos (para impedir que os cortes desprendessem das lâminas). Em seguida, o excesso de celoidina foi removido do dorso da lâmina e a celoidina que recobria os cortes foi endurecida em etanol a 70% por 30 segundos.

2. A pós-fixação dos cortes foi feita por 30 minutos, à temperatura ambiente, na seguinte solução: 10 ml de formol a 37% e 90 ml de tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH de 7,3.

3. Seguiu-se um pré-tratamento por 30 minutos a 37°C com solução de hidrato de cloral a 10% acrescida de piridina a 1%. A adição da piridina na solução de hidrato de cloral visou suprimir a coloração de núcleos de fibras musculares e aumentar o contraste dos axônios em relação aos núcleos na região das placas.

4. Após lavagem em água destilada, os cortes foram incubados por 40 minutos a 37°C em solução com 8 g de nitrato de prata dissolvidos em 40ml de água destilada; 40 mg de carbonato de cálcio e 40 mg de sulfato cúprico foram adicionados à solução, com o carbonato de cálcio auxiliando na dissolução do sulfato cúprico. Esta solução deve ser feita a

cada reação. Após a impregnação pela prata, todas as outras passagens foram feitas à temperatura ambiente.

5. A revelação foi feita em dois banhos consecutivos de 10 segundos e 4 minutos, respectivamente, em solução de hidroquinona a 1% e sulfito de sódio a 5% em água destilada.

6. A fixação foi feita em solução de tiosulfato de sódio a 5% em água destilada por 2 a 5 minutos.

7. Seguiu-se uma nova lavagem em água destilada, antes da "viragem" por 5 minutos em solução de tetracloreto de ouro a 0,2% contendo uma gota de ácido acético para cada 100ml de solução. Esta solução pode ser usada várias vezes, caso não haja formação de precipitado.

8. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de ácido oxálico a 1% por período de 20-120 segundos (opcional), para escurecimento dos axônios.

9. Finalmente, os cortes foram novamente fixados em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 3 a 5 minutos.

10. Após desidratação em etanol a 70% e 100% (5 minutos cada), a celoidina foi removida por imersão em solução de éter-etanol (1:1) por 5 minutos, seguida por dois banhos consecutivos de xilol (5 minutos cada).

11. As lâminas foram recobertas com lamínulas em meio de montagem Permout (Fisher).

Este método permitiu bons resultados, com uma perfeita resolução dos troncos nervosos intramusculares, das ramificações dos brotamentos nervosos (fora dos troncos nervosos), das arborizações terminais nas placas motoras (brotamentos ultra-terminais que deixam os limites da placa), que ficaram impregnados em preto pela prata, enquanto a

região da placa motora era corada em azul transparente como resultado do produto da reação entre a AChE e o substrato da reação, o 5-bromoindoxil acetato.

4. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Com o auxílio de um microscópio Zeiss "standard" com objetiva de 40X foram contadas, em cada músculo EDL dos animais operados, 100 áreas de placas motoras (totalizando 2800 placas motoras). As placas foram classificadas de acordo com o seus padrões de inervação, sendo as áreas inervadas por uma única fibra nervosa denominadas de mono-inervadas e as placas com mais de uma fibra nervosa denominadas de poli-inervadas. O padrão de inervação da placa avaliada foi também classificado quanto à origem da fibra ou fibras nervosas que nelas chegavam: 1) para as placas motoras mono-inervadas, (a) brotamento troncular, quando a fibra nervosa deixava o tronco nervoso e, sem ramificação, ia diretamente para a placa motora; (b) brotamento pré-terminal ou nodal ou colateral, quando a fibra nervosa originava-se de ramificação entre o tronco nervoso e a região da placa motora; (c) brotamento ultraterminal, quando a fibra nervosa tinha origem no interior de uma placa motora e seguia adiante para inervar uma outra placa adjacente; 2) para as placas motoras poli-inervadas, (a) brotamento troncular, quando as fibras nervosas que inervavam a placa motora tinham origem no tronco nervoso intramuscular; (b) brotamento pré-terminal, quando uma das fibras tinha origem no tronco nervoso e a outra era um brotamento pré-terminal ou nodal ou colateral; (c) brotamento ultraterminal, quando uma das fibras tinha origem no tronco nervoso e a outra era um brotamento ultra-terminal.

Numa segunda etapa e com o auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio Zeiss "standard" (com aumento final de 630 vezes)

foram feitos 560 desenhos de áreas das placas motoras que se apresentavam totalmente em foco num único plano. Para cada músculo EDL foram desenhadas 20 placas motoras. Para estes desenhos foram escolhidas somente placas que exibissem uma alta qualidade de impregnação das fibras nervosas pela prata, e um ótimo produto de reação da AChE com o substrato escolhido. Estes desenhos foram utilizados para a análise morfométrica, feita com o auxílio de um sistema computadorizado constituído de um microcomputador AT-386 e mesa digitalizadora, e empregando-se um programa de morfometria ("SigmaScan Measurement", Jandel Co., Sausalito, Ca., EUA), no qual foram avaliados os seguintes parâmetros (Fig. 2): (1) número de pontos de brotamentos total da arborização terminal (PB) e (2) comprimento total da arborização terminal a partir do final da bainha de mielina (Ct). Na análise destes parâmetros foi também possível calcular o número médio de pontos de brotamentos por placa motora ($PB_m = \text{somatório dos pontos de brotamentos das placas} / \text{número de placas motoras}$) e comprimento total médio ($Ctm = \text{somatório dos comprimentos totais das arborizações terminais} / \text{número de placas motoras}$) por arborização terminal.

Procedimento morfométrico semelhante foi utilizado para a quantificação do padrão de inervação do músculo EDL de animais não operados. No total, 80 placas motoras foram avaliadas nesses animais.

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para a avaliação estatística dos dados quantitativos e morfométricos foi realizada uma análise de variância dos valores obtidos em cada parâmetro das situações experimentais e tempo de sobrevida.

Após a análise de variância, foi testada a diferença entre as médias de cada tratamento e tempo de sobrevivência, empregando-se o teste de Student-Newman-Keuls para se obter o grau de significância em cada uma das situações experimentais, assumindo-se um nível de significância igual a 0,05.

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa de computação "Primer of Biostatistics" (versão 1.0), 1988.

RESULTADOS

1. ASPECTOS QUALITATIVOS

1.1 Estrutura do Músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL)

1.1.1 Músculo Normal

Ramos do nervo fibular no interior do músculo extensor longo dos dedos (EDL) apresentaram-se sob a forma de tronco nervoso composto de vários axônios que se ramificavam no interior do músculo. Estes troncos dividiam-se em troncos menores que davam origem a axônios individuais que innervavam fibras musculares únicas. No animal adulto jovem a fibra nervosa, após abandonar o tronco nervoso, não mais se ramificava até atingir a região da fibra muscular por ela innervada (Fig. 3A e 3B). Em raras ocasiões foi possível observar sítios positivos de colinesterase no interior de placas motoras não ocupados por prolongamentos de fibras nervosas, possivelmente devido ao contínuo processo de remodelação descrito na literatura.

Assim, o músculo EDL normal apresentou um padrão de mono-inervação onde um único axônio innervava uma única fibra muscular. Outra característica da innervação deste músculo foi o padrão de distribuição homogêneo das placas motoras por todo o músculo.

1.1.2 Músculo com Nervo Regenerado

As observações mostraram que cada grupo experimental comportou-se temporariamente de maneira diferente, frente ao tipo de lesão nervosa.

1.1.2.1 Regeneração após Esmagamento do Nervo Ciático

A lesão por esmagamento do nervo é considerada como a condição ideal para a regeneração de nervos, pois todas suas bainhas (com exceção da bainha de mielina) permanecem intactas após o trauma.

Após este tipo de lesão nervosa e tempos de sobrevivência pós-cirúrgico de 2 a 40 semanas, pôde-se observar que a partir da 2ª. semana o músculo EDL exibía em seu interior troncos de fibras nervosas regeneradas que se dividiam em troncos menores com padrão semelhante ao encontrado nos músculos de animais normais. Por outro lado, o calibre das fibras nervosas regeneradas era menor quando comparado com o de fibras normais (Fig. 4A). Placas motoras mono-inervadas (uma única fibra nervosa por placa) e poli-inervadas (duas ou mais fibras nervosas por placa) (Fig. 4B) foram observadas (ver dados quantitativos). Foram encontradas também fibras nervosas ramificando-se além do tronco nervoso intramuscular e antes da terminação nervosa, constituindo-se em característica que difere estes animais dos não operados (Fig. 5A e 5B). Com tempos de sobrevivência superiores a 2 semanas pôde-se observar uma diminuição do número de placas poli-inervadas, embora fosse ainda possível encontrar placas poli-inervadas com tempos de sobrevivência de até 40 semanas (Fig. 6 e 7B). Com tempos de sobrevivência mais longos verificou-se um aumento do calibre das fibras nervosas regeneradas, aproximando-se do padrão dos animais não operados; no entanto foram ainda encontrados brotamentos nervosos entre o tronco nervoso e as terminações nervosas (Fig. 7A).

1.1.2.2 Regeneração após Secção do Nervo Ciático e Tubulização

Em todos os animais estudados foi constatada a presença de um cabo de regeneração no interior dos tubos de polietileno unindo os cotos proximal e distal do nervo seccionado. Na análise do grupo com 2 semanas de sobrevivência, constatou-se uma ausência completa de fibras nervosas no interior do músculo EDL, sendo evidenciado o trajeto do antigo tronco nervoso degenerado pela presença de núcleos de células de Schwann que formavam verdadeiras trilhas no interior do músculo (bandas de Büngner). Do

mesmo modo, os antigos locais de placas motoras foram evidenciados pelas zonas positivas de colinesterase que apareciam como um produto azul-transparente resultante da reação da acetilcolinesterase com o substrato empregado (Fig.8). Somente após 6 semanas de sobrevida foram encontradas fibras nervosas formando troncos nervosos intramusculares e placas motoras no interior do músculo EDL (Fig. 9A). Também neste grupo experimental foi possível evidenciar ramos colaterais originados de fibras nervosas em seus trajetos entre o tronco nervoso e a placa motora (Fig. 9B) e ramos ultraterminais originados no interior das placas motoras (Fig. 10A). Em várias placas motoras as fibras nervosas ainda não ocupavam todo o sítio juncional, sendo possível evidenciar porções do sítio sináptico desprovidas de fibras nervosas (Fig. 10B). Placas motoras mono e poli-inervadas foram também observadas nos animais com tempo de sobrevida de 40 semanas (Fig. 11A e 11B).

2. ASPECTOS QUANTITATIVOS

2.1 Padrão de Inervação (Figuras 12 e 13)

Nos grupos experimentais foram quantificados os seguintes parâmetros: porcentagem de placas motoras mono e poli-inervadas (Fig. 12) e porcentagem dos tipos de ramificação para as placas motoras reinervadas (Fig. 13). A análise dos dados quantitativos mostrou que, seguindo-se à lesão nervosa (esmagamento ou secção), houve a degeneração da totalidade das fibras nervosas dentro do músculo e que a reinervação subsequente das placas motoras mostrou um padrão diferente com tempos pós-operatórios diversos, dependente do tipo de lesão.

Após 2 semanas do **esmagamento do nervo**, 77% das placas motoras reinervadas apresentavam-se mono-inervadas e 23% poli-inervadas. Nos animais em que foi feita a **secção do nervo**, pôde-se observar

apenas regiões positivas de AChE desprovidas de fibras nervosas; neste período as fibras nervosas já haviam cruzado o intervalo entre os cotos nervosos, mas não haviam invadido ainda o músculo EDL e bandas de Büngner eram visíveis no interior dos músculos desnervados. Após 6 semanas do **esmagamento do nervo**, a porcentagem de placas mono-inervadas foi de 79%, observando-se apenas 21% de placas com poli-inervação. No mesmo período, os animais com **secção do nervo** e reparo pela técnica de tubulização apresentaram 70% das placas mono-inervadas e 30% poli-inervadas. Decorridas 12 semanas, os animais com **secção e tubulização** do nervo apresentaram 80% das placas motoras mono-inervadas e 20% poli-inervadas; no mesmo período o grupo com **esmagamento** mostrou 78% das placas mono-inervadas e 22% poli-inervadas. Com o tempo de sobrevida mais longo, 40 semanas, o grupo de animais **tubulizados** apresentou 80% das placas mono-inervadas e 20% poli-inervadas, enquanto que aqueles com **esmagamento do nervo** ciático mostraram um total de 79% das placas mono-inervadas e 21% poli-inervadas (Fig 12).

A análise quantitativa dos tipos de origem dos brotamentos que innervavam as placas motoras nas diferentes condições experimentais revelou que:

(1) no grupo com **esmagamento do nervo** ciático com placas motoras **mono-inervadas** (Fig.13C) e com 2 semanas de sobrevida, 74% das placas eram innervadas por brotamentos tronculares, 23% por brotamentos pré-terminais e apenas 3% por brotamentos ultra-terminais. Decorridas 6 semanas, 87% das placas eram innervadas por brotamentos tronculares, 10% por brotamentos pré-terminais e 3% por brotamentos ultra-terminais. Após 12 semanas, 83,5% das placas eram innervadas por brotamentos tronculares, 16% por brotamentos pré-terminais e 0,5% por brotamentos ultra-terminais.

Com 40 semanas, 84% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 14% por brotamentos pré-terminais e 2% por brotamentos ultra-terminais.

(2) para as placas motoras **poli-inervadas** (Fig.13D) nos animais com 2 semanas após o **esmagamento**, 41% das placas eram poli-inervadas por brotamentos tronculares, 42% por brotamentos pré-terminais e 17% por brotamentos ultra-terminais. Decorridas 6 semanas, 62% das placas eram poli-inervadas por brotamentos tronculares, 31% por brotamentos pré-terminais, 7% por brotamentos ultra-terminais. Após 12 semanas, 64% das placas eram poli-inervadas por brotamentos tronculares, 29% por brotamentos pré-terminais e 7% por brotamentos ultra-terminais. Finalmente, decorridas 40 semanas, 56% das placas eram poli-inervadas por brotamentos tronculares, 39% por brotamentos pré-terminais e 5% por brotamentos ultra-terminais.

(3) no grupo com secção do nervo e **implante de tubo** de polietileno com placas motoras **mono-inervadas** (Fig. 13A), decorridas 6 semanas (em período anterior não havia ainda reinervação das placas), 75% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 20% por brotamentos pré-terminais e 5% por brotamentos ultra-terminais. Após 12 semanas, 78% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 20% por brotamentos pré-terminais e 2% por brotamentos ultra-terminais. Decorridas 40 semanas de sobrevida, 79,5% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 20% por brotamentos pré-terminais e 0,5% por brotamentos ultra-terminais.

(4) para o grupo com **implante de tubos** e placas motoras **poli-inervadas** (Fig.13B), após 6 semanas de sobrevida, 34% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 48% por brotamentos pré-terminais e 18% por brotamentos ultra-terminais. Decorridas 12 semanas, 61% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 27% por brotamentos pré-terminais e

12% por brotamentos ultra-terminais. Após 40 semanas, 46% das placas eram inervadas por brotamentos tronculares, 39% por brotamentos pré-terminais e 15% por brotamentos ultra-terminais.

Na análise estatística dos padrões de **mono** e **poli-inervação**, quando comparados animais com mesmo tempo de sobrevida após cirurgia e diferentes condições experimentais (**esmagamento** ou **secção mais reparo por tubulização**), foi constatado que o número de placas **mono-inervadas** nos animais com esmagamento do nervo ciático, **6 semanas** após a cirurgia era significativamente maior que o observado no grupo com secção do nervo e reparo por tubulização. Já para os animais analisados com **12** e **40 semanas** de sobrevida após cirurgia, não foi constatada diferença estatisticamente significativa para este padrão entre os grupos experimentais. Por outro lado, após **6 semanas** da cirurgia havia um número significativamente maior de placas motoras **poli-inervadas** no grupo de animais com secção do nervo e reparo imediato pela técnica de tubulização, quando comparados com os animais do grupo com lesão por esmagamento. Na comparação dos demais tempos de sobrevida não houve diferença significativa para esse padrão entre os grupos estudados.

Quando analisamos os animais com o mesmo tipo de lesão (**esmagamento**) mas com diferentes tempos de sobrevida não houve diferença para o padrão de **mono-inervação**. Para os animais com secção do nervo e analisados **6 semanas** após a cirurgia observou-se que estes apresentavam um número significativamente menor de placas **mono-inervadas** quando comparados aos animais com **12** e **40 semanas** de sobrevida. Para os animais com **12** e **40 semanas** não foi observada diferença significativa para esse padrão. Quando comparados os animais com lesão por esmagamento do nervo e diferentes tempos de sobrevida não

houve diferença significativa para o padrão de **poli-inervação**. Para os animais com secção do nervo, o número de placas **poli-inervadas** foi significativamente maior para os animais analisados **6 semanas** após a cirurgia quando comparados aos animais com **12 e 40 semanas**. Não foi observada diferença significativa para os animais com **12 e 40 semanas** de cirurgia.

Na análise estatística dos dados sobre a origem das ramificações das fibras nervosas para as placas motoras **mono-inervadas**, entre os animais dos dois grupos experimentais, verificou-se que, decorridas **6 semanas** da cirurgia, os animais com nervo esmagado apresentavam um número significativamente maior de placas inervadas por brotamentos tronculares em relação aos animais com nervo tubulizados. Com tempos de sobrevivência maiores essa diferença desaparecia para esse tipo de brotamento. Com as placas inervadas por brotamentos ultraterminais e pré-terminais não foi constatada diferença significativa entre os dois grupos experimentais para qualquer tempo de sobrevida.

A mesma análise com relação às placas **poli-inervadas** nos animais dos dois grupos operados revelou apenas uma diferença estatisticamente significativa em relação aos brotamentos pré-terminais decorridas **6 semanas** da cirurgia, com um número maior para os animais com tubulização em relação aos animais com esmagamento.

2.2 Dados Morfométricos (Figuras 14 a 17 e Tabelas 1 a 4)

Na análise morfométrica das placas motoras do músculo EDL, foram medidos o Ct (comprimento da arborização terminal a partir do final da bainha de mielina de cada uma das placas motoras) e PB (número de pontos de brotamentos em cada placa motora), em 80 placas motoras dos animais controles, não operados, e 80 placas motoras para cada um dos tempos de

sobrevida nos animais operados (esmagamento ou secção e tubulização do nervo ciático), totalizando 640 áreas de placas motoras analisadas. Os resultados foram:

2.2.1 Músculos Normais

Para os músculos normais, o somatório do Ct das arborizações terminais das fibras nervosas das placas motoras examinadas foi 10.589 μm , com comprimento total médio (Ctm) de $132 \pm 3,56 \mu\text{m}$ (média $\pm$ erro padrão da média), com variação de 76 a 231 μm (comprimentos mínimo e máximo). O somatório de PB nas placas examinadas foi de 422, com número médio (PBm) de $5,27 \pm 0,16$ e variação de 2 a 9 (mínimo e máximo).

2.2.2 Esmagamento do Nervo Ciático

Com **2 semanas** de sobrevida o ΣCt foi de 7.981 μm , com Ctm de $99,76 \pm 2,69 \mu\text{m}$ (média $\pm$ erro padrão da média) e variação de 52 a 182 μm (comprimentos mínimo e máximo), enquanto o ΣPB foi de 266, com PBm de $3,33 \pm 0,11$ com variação de 2 a 6 (mínimo e máximo). Com **6 semanas** de sobrevida o ΣCt foi de 9.990 μm e Ctm de $125 \pm 4,18 \mu\text{m}$, variando de 66 a 250 μm (mínimo e máximo); o ΣPB foi de 354, enquanto o número de PBm por área de placa motora foi de $4,43 \pm 0,18$, com PB variando de 2 a 10 (mínimo e máximo por placa). Após **12 semanas**, o ΣCt das arborizações terminais das placas motoras foi de 8.553 μm , com Ctm de $107 \pm 4,18 \mu\text{m}$ e variação de 34 a 222 μm (mínimo e máximo); o ΣPB para este mesmo tempo de sobrevida foi de 313, com PBm de $3,91 \pm 0,15$, variando de 2 a 8 (mínimo e máximo). No maior tempo de sobrevida, **40 semanas**, o ΣCt foi 10.337 μm , com Ctm de $129 \pm 6,07 \mu\text{m}$ e variação de 57 a 373 μm . O ΣPB foi de 354, com PBm de $4,43 \pm 0,21$, variando de 2 a 10.

2.2.3 Secção do Nervo Ciático e Reparo por Tubulização

Com **6 semanas** de sobrevida o Σ Ct das terminações nervosas do EDL foi de $8.444 \mu\text{m}$, com Ctm de $105 \pm 3,54 \mu\text{m}$ e variando de 52 a $215 \mu\text{m}$; o Σ PB foi de 277 e o PBm de $3,46 \pm 0,13$, variando 1 a 6. Após **12 semanas** o Σ Ct foi de $7.954 \mu\text{m}$, com Ctm de $99 \pm 3,48 \mu\text{m}$ e variação de 47 a $200 \mu\text{m}$; o Σ PB foi de 275, com PBm de $3,44 \pm 0,12$, variando de 1 a 7. Após **40 semanas** de sobrevida o Σ Ct foi de $9.803 \mu\text{m}$, Ctm de $123 \pm 5,57 \mu\text{m}$, com variação de 58 a $299 \mu\text{m}$; o Σ PB destas placas motoras foi de 412, com PBm de $5,15 \pm 0,18$, variando de 1 a 10.

A análise estatística dos **Ctm** (Fig. 15 e Tabela 2) não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os animais do grupo **não operado** com animais do grupo operado (**esmagamento**) com **6 semanas** e com animais dos grupos operados (**esmagamento** e **tubulização**) com **40 semanas** de sobrevida. Foi observado um Ctm significativamente maior nos animais do grupo operado (**esmagamento**) com **6 semanas** quando comparados aos animais com **tubulização** do nervo e mesmo tempo de sobrevida. Não foi encontrada diferença significativa nos Ctm entre animais dos grupos operados com **12 semanas** de sobrevida.

Quando comparados os animais com diferentes tempos de sobrevida e mesma situação experimental, os animais com **esmagamento** do nervo, com **2** e **12 semanas** não apresentaram diferença significativa para os Ctm; do mesmo modo, não apresentaram diferença os animais analisados com **6** e **40 semanas**. Por outro lado, os animais que tiveram o nervo **seccionado** e reparado pela **técnica de tubulização** não mostraram diferença após **6** e **12 semanas** de sobrevida, enquanto os animais com **40 semanas** apresentavam Ctm significativamente maior que os outros dois tempos de sobrevida.

A análise estatística dos **PBm** (Fig. 17 e Tabela 4) mostrou que, após **6 semanas** de sobrevida, houve diferença significativa para os três grupos de animais (**não operados**, **esmagamento** e **tubulização**). Os animais **não operados** apresentavam um número de PBm por placa significativamente maior que os animais dos **grupos operados**. Para os grupos de animais **operados** e analisados com **12 semanas** de sobrevida não houve diferença significativa. Quando estes animais foram comparados com animais do grupo **não operado**, observou-se um número significativamente menor de PBm por placa nos animais **operados**. Para o mais longo tempo de sobrevida (**40 semanas**) os animais **tubulizados** e os do grupo **não operado** não apresentaram diferença significativa, mas seus números de PBm foram significativamente maiores do que os observados nos animais com **esmagamento do nervo**.

Com relação aos diferentes tempos de sobrevida para o mesmo procedimento experimental, os animais **tubulizados** com **6** e **12 semanas** após a cirurgia não apresentaram diferença e tinham números de PBm por placas significativamente menores que os animais com **40 semanas** de sobrevida. Já nos animais operados (**esmagamento**) com **6** e **40 semanas** não foram observadas diferenças significantes, entretanto eles apresentavam número significativamente maior de PBm quando comparados aos animais operados com **2** e **12 semanas**. Na comparação entre as médias obtidas entre os animais com **2** e **12 semanas** de sobrevida, aqueles com **12 semanas** apresentavam número de PBm significativamente maior que os animais com **2 semanas**.

Os gráficos dos ΣCt e ΣPB com as relações de suas médias são mostrados nas figuras 14 e 16 e tabelas 1 e 3. A análise destes parâmetros obedecem as mesmas relações de suas médias descritas nas análises estatísticas dos parâmetros morfométricos Ctm e PBm .

DISCUSSÃO

1. Regeneração do Nervo no Interior da Prótese Tubular.

Em todos os animais pertencentes ao grupo tubulizado, foi encontrado um cabo de regeneração no interior dos tubos, conectando os cotos proximal e distal do nervo seccionado. O aspecto macroscópico desses cabos foi semelhante ao descrito por diversos autores com o emprego de diferentes materiais para a confecção das próteses tubulares: silicone (Lundborg et alii, 1982a,b,c; Longo et alii, 1983a,b; Williams et alii, 1983, 1984, 1987; Fields & Ellisman, 1985; 1986a,b; Le Beau, 1987, 1988a,b; Madison et alii, 1988; Chadi, 1991; Stopiglia, 1992), polietileno (Da-Silva, 1987; Da-Silva & Langone, 1989; Langone & Da-Silva, 1990; Langone, 1991; Marques, 1992), poliéster (Da-Silva et alii, 1984; Madison et alii, 1984; Madison et alii, 1985), fibras de "nylon" (Mattson et alii, 1948), Millipore (Ducker & Hayes, 1968; Basset et alii, 1959), politetrafluoroetileno (Cuadros & Granatir, 1987), polivinil e derivados (Garrity, 1955; Scaravilli, 1984a,b; Aebischer et alii, 1987), poliglactina (Reid et alii, 1978; Molander et alii, 1982; Keeley et alii, 1991), copolímeros de polilactato (Nyilas et alii, 1983; Madison et alii, 1984; Da-Silva et alii, 1985; Madison et alii, 1987), copolímeros acrílicos (Uzman & Villegas, 1983; Aebischer et alii, 1988, 1989; Knoop et alii, 1990a) e carbonato de trimetileno (Mackinnon & Dellon, 1990), entre outros.

2. Inervação do Músculo EDL Normal.

O padrão morfológico de inervação do músculo EDL normal no camundongo seguiu o padrão descrito por Gorio et alii (1983) para o músculo do rato.

No entanto, no músculo EDL de camundongos normais observamos, em raras ocasiões, sítios positivos de ChE no interior de placas motoras não ocupadas por prolongamentos de fibras nervosas. Fenômenos de remodelação sináptica poderiam ser responsáveis por esses achados. A

remodelação de terminações nervosas motoras tem sido observada em músculos esqueléticos adultos *in vivo*, com o emprego de corantes fluorescentes. Alterações morfológicas foram descritas na maioria das junções neuromusculares de rãs e em cerca de 40% das junções neuromusculares do músculo sóleo do camundongo adulto (Wigston, 1989; Herrera & Werle, 1990). Contrastando com esses relatos, nenhuma alteração da forma das junções neuromusculares foi constatada no músculo esternomastoideo do camundongo adulto observado continuamente por vários meses, embora um crescimento total da junção tenha ocorrido (Lichtman et alii, 1987). O crescimento da terminação motora e da região pós-sináptica parece ser determinado pela expansão da membrana muscular a medida que as fibras do músculo crescem (Balice-Gordon & Lichtman, 1990). Aparentemente a extensão da remodelação varia entre diferentes junções do mesmo músculo e entre diferentes músculos, embora a causa dessa variação seja desconhecida até o presente. As evidências obtidas em músculos estudados *in vivo* são consistentes com as observações feitas em tecido fixado, que mostram plasticidade na junção neuromuscular normal (Barker & Ip, 1966; Tuffery, 1971; Kemplay & Stolkin, 1980).

3. Degeneração das Placas Motoras.

Na segunda semana após a tubulização o músculo EDL apresentou-se desnervado, observando-se somente os sítios colinesterásicos antigos, evidenciados pelo produto da reação do substrato com a ChE associada à lâmina basal da placa motora. Nos animais com esmagamento, ao contrário, após duas semanas da cirurgia a maioria das placas motoras já se apresentava reinervada. Resultados semelhantes foram obtidos por Marques (1992) à microscopia eletrônica, empregando modelo experimental semelhante ao nosso. Essa disparidade na velocidade de reinervação poderia

ser explicada pela preservação da arquitetura do nervo após o seu esmagamento, com a manutenção da integridade de suas bainhas conjuntivas e neurolemas (Sunderland, 1978), o que facilitaria o redirecionamento das fibras nervosas em crescimento para os seus alvos na periferia. Em contrapartida, é relatado que a progressão dos processos degenerativos no coto distal se faz de maneira mais lenta quando do esmagamento do nervo, sendo mais rápida nas lesões por transecção (Sunderland, 1978; Lunn et alii, 1990). De qualquer maneira, nossos resultados sugerem que a resultante final desses dois fatores opostos leve a um aumento da velocidade de regeneração das fibras nervosas na situação de esmagamento do nervo, quando comparada à transecção e tubulização. Quando o nervo é seccionado e seus cotos introduzidos no interior de um tubo, uma sequência de eventos leva à formação de uma matriz interligando os cotos nervosos (Williams et alii, 1983; Fields et alii, 1989). A migração de células e processos celulares para o interior do tubo, levando à criação de um meio adequado para o alongamento axonal, somente está completa no final da primeira semana pós-implante (Lundborg et alii, 1982a,b,c; Williams et alii, 1983; Longo et alii, 1984; Le Beau et alii, 1988a,b), levando a um retardo da inervação do coto distal. No esmagamento, ao contrário, não existem intervalos a serem transpostos, e os cones de crescimento dos axônios em regeneração podem invadir o coto distal decorridas poucas horas da lesão (Cajal, 1928).

Neste trabalho verificamos também que os fenômenos degenerativos ao nível da placa motora estavam completos ao final da segunda semana após o implante da prótese tubular. Da mesma maneira Marques (1992) observou que, decorridas duas semanas do implante, não foram encontrados restos de terminais motores em todos os sítios juncionais

examinados à microscopia eletrônica, os quais já se encontravam substituídos pelas células de Schwann.

Tanto o esmagamento como a secção do nervo levam à degeneração da placa motora, com o envolvimento das terminações nervosas por processos das células de Schwann em menos de três dias (Birks et alii, 1960). Os mecanismos pelos quais a célula de Schwann envolve e remove os fragmentos do terminal motor não estão claros (Robbins, 1988).

Várias hipóteses foram aventadas na tentativa de explicar esse fenômeno. A atrofia das terminações nervosas não parece desempenhar um papel importante no processo. Assim, em diafragma desnervado de rato, os processos de envolvimento do terminal pelas células de Schwann têm início decorridas somente 6 horas da axotomia (Robbins, 1988). Em fibras musculares de contração rápida, o englobamento da terminação nervosa pode estar concluído 12 horas após o trauma do nervo, sendo precedido por uma redução dos terminais nervosos para aproximadamente 17% do tamanho normal após 6 horas da desnervação; o entumescimento das mitocôndrias é uma das alterações degenerativas mais evidente observada neste período de tempo no terminal nervoso (Winlow & Usherwood, 1975; Pullian & April, 1979a).

Uma das hipóteses sugere que o início do processo de envolvimento do terminal pela célula de Schwann seria devido à interrupção da reciclagem de vesículas sinápticas após a desnervação, levando a alterações na membrana da terminação nervosa que, por sua vez, desencadeariam o estímulo necessário para que a célula de Schwann iniciasse o processo de englobamento (Winlow & Usherwood, 1975). No entanto, em animais em que foram permitidos cotos distais com maior comprimento, houve um retardo no processo de envolvimento do terminal

não acompanhado por um aumento no tempo de surgimento das alterações na reciclagem de vesículas sinápticas (Pullian & April, 1979b).

Uma outra hipótese sugere que alterações inespecíficas da membrana do terminal motor seriam responsáveis pela ativação da célula de Schwann. Assim, imagens de criofratura mostraram sinais de desintegração da membrana axolemal nas zonas ativas antes que as células de Schwann envolvessem os terminais motores (Ko, 1981).

Uma terceira hipótese implica alterações da adesividade entre a terminação nervosa e a matriz extracelular, na ativação das células de Schwann, para a remoção dos terminais motores em degeneração (Robbins, 1988). Há evidências de que a degradação da matriz extracelular, observada após a desnervação, conduziria a uma rápida diminuição dos feixes de fibras colágenas associadas à AChE, o que poderia reduzir a adesividade entre a terminação nervosa e a lâmina basal (Fernandez et alii, 1979). Haveria deste modo a expressão e predomínio da adesividade existente entre a terminação nervosa e a célula de Schwann, o que conduziria ao envolvimento parcial ou total do terminal (Robbins, 1988). Sinais originados do próprio nervo poderiam estimular as células de Schwann a secretar componentes da lâmina basal, aumentando a adesão do terminal motor à célula de Schwann (Bunge et alii, 1980).

Vale ainda ressaltar que o envolvimento das terminações nervosas pelas células de Schwann está frequentemente associado a um aumento da incidência de desnervação focal, demonstrada pelo aumento no número de sulcos sinápticos abandonados em uma mesma junção (Cardasis, 1983; Pachter & Eberstein, 1984).

Complementando nossos resultados, Marques (1992), utilizando modelo experimental idêntico ao nosso, verificou que, decorridas

duas semanas após o implante da prótese tubular, as células de Schwann ocupavam as fendas sinápticas em praticamente todas as junções examinadas. Deste modo, a célula de Schwann passa a ocupar o local da terminação nervosa, opondo-se à lâmina basal sináptica desnervada e liberando quantidades limitadas de ACh (Miledi & Slater, 1968; Bevan et alii, 1976). A ocupação da fenda sináptica primária pela célula de Schwann parece ser fundamental no mecanismo de reinervação muscular, pois essas células formam as bandas neurolemas ou de Bungner (Cajal, 1928) que atuam como guia e suporte para o alongamento axonal; a presença da célula de Schwann no sítio juncional pode representar um indício da regeneração da junção (Marques, 1992).

Após a degeneração da terminação nervosa, vários de seus componentes permanecem intactos (Miledi & Slater, 1970; Manolov, 1974). Além da célula de Schwann, a lâmina basal sináptica mantém os prolongamentos para o interior das pregas sinápticas secundárias, e a ChE permanece associada à lâmina basal sináptica (Sanes et alii, 1978).

Por outro lado, os RACH na região da placa motora apresentam-se em concentrações bastante diminuídas após a degeneração do terminal motor, permanecendo associados às pregas sinápticas da membrana plasmática da fibra muscular. Ao mesmo tempo, há um aumento na quantidade de RACH nas áreas extra-juncionais, acompanhado pelo aumento da sensibilidade à ACh em toda a superfície do músculo (Burden et alii, 1979; Gorio, 1980; Gorio & Carmignoto, 1981).

Após a desnervação da placa motora há um aumento do número das células intersticiais e de processos celulares localizados nas áreas peri-sinápticas (Marques, 1992). A grande maioria desses elementos são morfológica e imunohistoquimicamente identificáveis como fibroblastos, e

atingem um pico de concentração por volta do quarto dia pós-desnervação (Gatchalian et alii, 1989). A presença de fibroblastos nas áreas peri-sinápticas está de acordo com o aumento observado nas concentrações de moléculas adesivas, como a tenascina (J1), N-CAM, fibronectina e proteoglicanas heparansulfato, nos espaços intersticiais (Gatchalian et alii, 1989). Um aumento do colágeno e da celularidade intersticial, especialmente nas regiões justapostas às dobras sinápticas, foi observado por Marques (1992) após duas semanas do implante da prótese tubular. Este aumento da fibrose intersticial poderia ser um dos fatores responsáveis pelo retardo da chegada dos axônios em regeneração até a fibra muscular, nos animais tubulizados (Gutmann & Young, 1944; Marques, 1992).

4. Reinervação das Placas Motoras.

No presente estudo observamos que o músculo EDL era invadido por fibras nervosas, que restabeleciam contato com as fibras musculares, após duas semanas do esmagamento do nervo. Nos animais com secção e tubulização do nervo ciático foram evidenciadas apenas regiões positivas de ChE no mesmo tempo pós-operatório. Placas motoras reinervadas nestes últimos animais foram observadas somente seis semanas após o implante da prótese tubular. No rato, o músculo EDL começa a ser reinervado duas semanas após o esmagamento do nervo ciático, restabelecendo-se a atividade muscular logo após o início do contato entre o nervo e o músculo (Gorio et alii, 1983).

Embora em nosso estudo o padrão de inervação dos animais regenerados estivesse alterado em relação aos animais normais, o contato íntimo da fibra nervosa com a fibra muscular foi visto principalmente nos locais dos sítios sinápticos originais. O local do antigo sítio da placa motora pôde ser reconhecido através do produto da reação do bromoindoxilacetato com a

ChE associada à lâmina basal da junção. Estas regiões podem ser reconhecidas na ausência tanto da fibra nervosa como da fibra muscular (Sanes et alii, 1978; Anglister, 1991).

Estudos em rãs têm comprovado que, após períodos curtos de desnervação, as junções neuromusculares são refeitas nas regiões das placas motoras originais, uma vez que a quase totalidade das membranas sub-sinápticas originais estavam cobertas por terminações nervosas em regeneração (Miledi, 1960; Bennett et alii, 1973; Dennis & Miledi, 1974; Letinsky et alii, 1976)

Do mesmo modo, estudos de microscopia de luz e eletrônica em ratos e camundongos que tiveram o nervo ciático esmagado ou seccionado, demonstraram que o contato entre o nervo e o músculo foi feito, em sua maioria, nas regiões das antigas placas motoras (Gorio et alii, 1983; Marques, 1992).

Esta habilidade de reconhecimento do antigo local sináptico pela terminação nervosa motora persiste por várias semanas (Letinsky et alii, 1976), e requer o reconhecimento de algum fator associado à membrana da fibra muscular e à lâmina basal da placa motora (Sanes et alii, 1978).

Fatores que poderiam desempenhar um importante papel na regeneração das junções neuromusculares compreenderiam: a lâmina basal sináptica e seus constituintes, tais como proteoglicana heparansulfato, laminina, fibronectina e "agrin"; moléculas associadas à membrana muscular, como os RACH; a própria fibra muscular, que poderia produzir algum fator trófico derivado do músculo semelhante ao NGF; a célula de Schwann associada à placa motora e que ocupa o sítio juncional da placa desnervada (Sanes, 1989, Sanes et alii, 1990).

De fato, a transformação do cone de crescimento do axônio em regeneração em uma estrutura liberadora de neurotransmissor poderia ser induzida por alguma substância presente na fenda sináptica, que estaria associada à lâmina basal da placa motora, uma das estruturas possivelmente responsáveis pela especificidade da reinervação das junções neuromusculares em rãs (Marshall et alii, 1977; McMahan et alii, 1978; Sanes et alii, 1978). De fato, esta parte da membrana basal muscular parece ser capaz de reorganizar o sítio pós-sináptico, mesmo na ausência do nervo (Burden et alii, 1979). Esta região da lâmina basal apresenta moléculas reconhecidas por anti-corpos específicos, que evidenciaram uma diminuição da concentração das mesmas em regiões da fibra muscular fora dos locais de contato sináptico. Trabalhos recentes implicaram a laminina-s, um dos homólogos da laminina, neste processo de reconhecimento (Sanes, 1989; Sanes et alii, 1990).

5. Remodelação das Placas Motoras durante a Reinervação.

Uma das observações que mais chamou a atenção neste trabalho foi a constatação de que o músculo EDL reinervado em ambas as situações experimentais, ao contrário do grupo não operado, apresentou um padrão parcial de poli-inervação, que persistiu após tempos consideráveis das lesões iniciais.

Vários trabalhos morfológicos e fisiológicos têm fornecido evidências de que durante a reinervação de músculos adultos, assim como no desenvolvimento, placas motoras normalmente inervadas por um único axônio tornam-se poli-inervadas (Tuffery, 1971; Tate & Westerman, 1973; Jansen & Van Essen, 1975; McArdle, 1975; Letinsky et alii, 1976; Rotshenker & McMahan, 1976; Gorio et alii, 1983; Werle & Herrera, 1986; Rich & Lichtman,

1989). Esses mesmos estudos demonstraram também que, quando as fibras musculares são poli-inervadas durante a reinervação, os axônios convergem para os mesmos sítios iniciais das placas motoras. Recentemente, Rich & Lichtman (1989), utilizando método extremamente fidedigno de visualização de placas motoras em diferentes tempos no mesmo animal, demonstraram que o local da placa motora original era o sítio de reinervação em 100% das observações feitas. Nossas observações são compatíveis com os relatos desses investigadores, ao indicarem a ausência de sítios ectópicos de placas motoras durante a reinervação do músculo EDL nas duas condições experimentais estudadas.

Vários autores relataram que, após o estabelecimento da poli-inervação durante a regeneração, há uma redução da inervação múltipla com tempos progressivos de reinervação muscular, sugerindo a ocorrência de uma forma de eliminação sináptica semelhante à encontrada durante o desenvolvimento da junção neuromuscular (McArdle, 1975; Benoit & Changeux, 1978; Brown & Ironton, 1978; Thompson, 1978; Gorio et alii, 1983; Tact, 1983; Hopkins et alii, 1986; Rich & Lichtman, 1989; Herrera & Werle, 1990). Em nosso material observamos, da mesma forma, uma queda da taxa de poli-inervação das fibras musculares reinervadas no músculo EDL. Assim, nos animais com secção do nervo ciático seguida por entubulização, 30% das fibras musculares examinadas apresentaram-se poli-inervadas após 6 semanas da cirurgia; decorridas 40 semanas, 20% das fibras permaneceram poli-inervadas. Neste grupo a estabilização do padrão quantitativo da poli-inervação foi observada na 12ª semana pós-operatória. Nos animais com esmagamento do nervo, 23% das fibras musculares examinadas estavam poli-inervadas na 2ª semana após a lesão; esse número caiu para 21% após 40 semanas, tendo-se estabilizado já a partir da 6ª semana. Deste modo, a

definição do padrão de inervação do músculo EDL aconteceu mais rapidamente nos animais com esmagamento do nervo, o que está de acordo com uma reinervação mais precoce do músculo nesta situação experimental, quando comparada com a condição de secção e tubulização do nervo.

Uma elevada frequência de poli-inervação foi observada em nosso material quando comparada com os resultados descritos por vários autores. McArdle (1975) e Gorio et alii (1983), utilizando registros eletrofisiológicos, relataram, após o esmagamento do nervo ciático do rato, uma queda da incidência de poli-inervação para níveis próximos ao controle após 8 meses da reinervação. Rich & Lichtman (1989), do mesmo modo, observaram em camundongos que, 9 dias após o esmagamento do nervo próximo ao seu local de entrada no músculo esternomastoideo, era atingido o nível máximo (10%) de poli-inervação de suas fibras musculares; 15 dias após a lesão, 2% das fibras eram poli-inervadas, não havendo alteração desse padrão com tempos mais longos de sobrevivência. Com a secção do nervo no mesmo local, no entanto, Rich & Lichtman (1989) observaram uma taxa de 56% de poli-inervação após 30 dias da lesão; decorridos 99 dias, aproximadamente 12% das fibras musculares permaneceram poli-inervadas. Herrera & Werle (1990), após o esmagamento de nervo em rã relataram, decorridos 14 a 21 dias da lesão inicial, uma taxa de poli-inervação cinco vezes maior que a encontrada em músculos normais; no decorrer dos meses seguintes a inervação múltipla diminuiu gradativamente, até alcançar um nível estável e próximo, mas ainda significativamente maior, ao dos músculos normais. A disparidade entre nossos dados de frequência de poli-inervação em relação a relatos da literatura, por outro lado, pode ser apenas aparente se levarmos em consideração que as estimativas numéricas de poli-inervação baseadas em registros intracelulares de potenciais sinápticos são, algumas

vezes, menores que as obtidas pela visualização dos axônios pré-sinápticos (O'Brien et alii, 1978; Rich & Lichtman, 1989; Wigston, 1990). Além disso, estudos em mamíferos sugerem que a eliminação da poli-inervação durante a reinervação seria dependente da idade do animal e teria uma probabilidade maior de ocorrência em músculos lentos em relação a músculos rápidos (Hopkins et alii, 1986; Soha et alii, 1987; Callaway et alii, 1989).

Nossos dados sobre os locais de origem dos diferentes tipos de fibras nervosas regeneradas revelaram um quadro dinâmico de remodelação das junções neuromusculares nas duas condições experimentais. Deve ser salientado que o padrão típico do músculo EDL não operado, onde 100% das fibras nervosas que se destinam às placas motoras têm origem no tronco nervoso intramuscular, não foi alcançado em qualquer tempo de sobrevivência nas duas condições experimentais estudadas. Assim, o número máximo de fibras nervosas tronculares chegou a 80 e 84% do total de fibras regeneradas nas placas mono-inervadas, após o esmagamento e secção do nervo ciático, respectivamente. A remodelação observada nas placas poli-inervadas foi intensa, como pode ser verificado pelos gráficos da Figura 13, com alteração das proporções dos tipos de fibras nervosas em todos os tempos estudados. Quadro dinâmico semelhante foi relatado por Rich & Lichtman (1989) ao estudarem a reinervação do músculo esternomastoideo do camundongo após a lesão de seu nervo próximo ao local de entrada no músculo: após 9 dias de esmagamento do nervo, 38% das placas poli-inervadas recebiam brotamentos ultra-terminais, 38% eram innervadas por brotamentos tronculares e 24% por brotamentos pré-terminais; após 35 dias do esmagamento, apenas 3% das placas poli-inervadas recebiam brotos ultra-terminais.

Durante a reinervação há uma recapitulação ontogenética da transição de poli para mono-inervação, indicando que os fatores que governam a eliminação sináptica continuam operantes na junção neuromuscular adulta. Durante a reinervação, há a convergência de axônios em regeneração para os mesmos locais sinápticos inervados antes da lesão. A competição entre axônios levaria à eliminação da inervação múltipla em alguns locais (Rich & Lichtman, 1989). Esta competição sináptica teria lugar, do mesmo modo que durante o desenvolvimento, dentro dos limites da placa motora. No entanto, o padrão de poli-inervação das fibras musculares no desenvolvimento é diferente do observado durante a regeneração. Na ontogênese, múltiplos axônios parecem convergir para uma placa motora através da mesma coluna de células de Schwann, sendo raramente observados brotos deslocando-se de uma placa a outra (Riley, 1977; O'Brien et alii, 1978; Morrison-Graham, 1983). Durante a reinervação, por outro lado, as fibras musculares frequentemente se tornam poli-inervadas pelo crescimento de brotos ultra-terminais entre locais de placas adjacentes.

Tem sido amplamente aceito que a eliminação da poli-inervação sináptica em junções neuromusculares normais ou regeneradas pode, em parte, ser explicada pela competição entre os axônios que a ela convergem (Brown et alii, 1976; Betz et alii, 1980; Purves & Lichtman, 1985).

Vários mecanismos têm sido propostos para tentar explicar a eliminação da inervação supranumerária. A competição entre dois motoneurônios, que inervam um determinado alvo comum, por fatores tróficos liberados localmente, poderia ser responsável pela manutenção de suas terminações; somente o neurônio capaz de captar uma quantidade suficiente desses fatores permaneceria inervando a fibra muscular, enquanto

o outro retrairia o seu prolongamento (Brown et alii, 1976; Van Essen, 1982; Changeux & Dauchin, 1976; Purves & Lichtman, 1985; Bennett & Robinson, 1989).

Uma outra hipótese sugere que a célula pós-sináptica liberaria uma protease envolvida na remoção dos terminais nervosos (Connold et alii, 1986). O'Brien et alii (1978) encontraram enzimas proteolíticas secretadas em músculos tratados com ACh, aventando que a liberação de tais enzimas levaria à eliminação sináptica pela digestão dos terminais nervosos; somente as terminações mais resistentes e metabolicamente mais ativas sobreviveriam. Foi também descrito que o desaparecimento das terminações nervosas supranumerárias é muito rápido, assemelhando-se à degeneração neuronal (Rosenthal & Taraskevich, 1977). No entanto, Korneliussen & Jansen (1976) não observaram sinais morfológicos de degeneração de axônios ou de terminações nervosas durante a eliminação sináptica em junções neuromusculares, sugerindo que o processo de eliminação poderia ocorrer pela retração das terminações dos axônios que lhes deram origem.

Esta outra hipótese é favorecida pelo trabalho de Gorio et alii (1983), onde não foram encontrados sinais de degeneração axonal durante a fase de eliminação da inervação polineuronal durante a reinervação muscular. Sugeriram então que a eliminação sináptica ocorreria pela retração axonal semelhante à observada em cultura de tecido, onde os axônios podem apresentar fases de crescimento e retração alternadas, embora os mecanismos responsáveis por essas alternâncias de fase não estejam esclarecidos.

Uma outra hipótese foi aventada por Rich & Lichtman (1989a,b) que, utilizando a alfa-bungarotoxina como marcador de RACH e

corantes fluorescentes para a visualização de terminações motoras, estudaram placas motoras regeneradas no músculo esternomastoideo de camundongos adultos em diferentes tempos de sobrevida e no mesmo animal, assim como em animais recém-nascidos, com o objetivo de avaliar a eliminação de terminações supranumerárias em placas poli-inervadas. Obtiveram evidências de que os RACH em placas reinervadas por mais de um axônio se coravam mais fracamente antes da retração da terminação nervosa, concluindo que a eliminação da terminação era precedida pelo desaparecimento de RACH da placa motora. Assim, axônios competiriam por moléculas associadas à superfície da célula pós-sináptica, entre elas RACH. Um axônio dominante poderia deslocar essas moléculas vitais para longe dos axônios em competição que estariam contactando a mesma fibra muscular, levando-os à regressão (Lichtman & Balice-Gordon, 1990; Wigston, 1990). Foi demonstrado que terminais nervosos são capazes de desencadear a dispersão de agregados distantes de RACH em miotubos em desenvolvimento, tanto *in vitro* como *in vivo*, imobilizando-os no local de contato nervoso (Kuromi & Kidokoro, 1984; Ziskind-Conhaim et alii, 1984; Liu & Westerfield, 1989). No entanto, fenômeno semelhante não foi ainda evidenciado durante a reinervação.

Hipótese adicional foi sugerida por Gorio et alii (1983) que, na análise quantitativa da reinervação muscular em ratos, mostraram que a manutenção das placas motoras estava relacionada à origem da terminação nervosa. Noventa dias após o esmgamento do nervo ciático (um longo período após a fase de regressão ter sido completada, como estimado eletrofisiologicamente), somente 15% das placas motoras examinadas eram innervadas por axônios originados de brotamentos colaterais, enquanto que os 85% restantes vinham diretamente do tronco nervoso. Tanto a pequena

distância do tronco nervoso até a placa motora como o padrão de inervação eram muito semelhantes à situação encontrada nos músculos normais. A partir desses resultados, Gorio et alii (1983) sugeriram que a capacidade de um brotamento resistir à repressão sináptica poderia estar ligada à sua origem no tronco nervoso, situando-o próximo à região da placa e propiciando o seu trajeto pelo interior de um tubo endoneural, situação não compartilhada pelo brotamento colateral. Sugeriram então um papel importante das células de Schwann e das bainhas dos troncos nervosos nos processos de manutenção das placas. Os resultados obtidos em nosso trabalho estão de acordo com as observações de Gorio et alii (1983), pois observamos uma predominância progressiva dos brotamentos originados nos troncos nervosos nas fases mais intensas de remodelação sináptica no interior das placas poli-inervadas, isto é, entre a 2ª e a 6ª semanas nos animais com esmagamento e entre a 6ª e 12ª semanas nos animais com tubulização.

Outras hipóteses que tentam explicar os mecanismos de eliminação sináptica estão baseadas no estado funcional das terminações axonais envolvidas dentro de uma mesma placa motora. Como a eliminação sináptica das terminações nervosas não é completa nas junções neuromusculares de rãs adultas, o estudo destes animais tem oferecido importantes subsídios para a compreensão dos mecanismos da competição sináptica durante a reinervação e o desenvolvimento (Werle & Herrera, 1987, 1988; Herrera & Werle, 1990).

Werle & Herrera (1987, 1988) verificaram que a eliminação sináptica em placas poli-inervadas ocorria somente nas junções em que os terminais nervosos apresentavam potenciais de placas motoras (EPP) diferentes; nas placas motoras em que o tamanho do EPP por unidade de

comprimento de terminal era o mesmo, a inervação polineuronal persistia. Herrera & Werle (1990) interpretaram esses achados assumindo que as medidas da eficiência fisiológica refletiam a habilidade dos terminais em competir por conexões sinápticas, uma suposição baseada em dados anteriores da literatura (revisados em Werle & Herrera, 1987 e Herrera & Werle, 1990). Concluíram, então, que as aferências supranumerárias seriam deslocadas de uma junção somente quando elas competissem com outras de atividade funcional maior; a competição entre aferências com atividades equivalentes levariam a um impasse, com persistência da inervação polineuronal.

Baseados nessas considerações, Herrera & Werle (1990) propuseram a hipótese de que a competição neuronal surgiria na situação em que houvesse interação heteroneuronal, isto é, quando terminais originados de neurônios diferentes estivessem localizados em uma mesma placa ou em placas situadas em uma mesma fibra muscular (situação encontrada na rã). Pelo mesmo raciocínio, diferentes partes do mesmo axônio motor não competiriam entre si. Embora seja atraente especular que esse tipo de mecanismo pudesse explicar a persistência parcial de poli-inervação em nosso presente estudo, a análise do material não permitiu distinguir se os brotamentos nervosos responsáveis pela inervação de uma determinada placa pertenciam ou não ao mesmo axônio. A resposta a essa questão poderia ser obtida pela reconstrução tridimensional de fibras nervosas regeneradas a partir de cortes seriados dos músculos reinervados.

6. Morfometria das Junções Neuromusculares durante a Regeneração.

A análise dos resultados obtidos na avaliação dos parâmetros morfométricos das fibras nervosas revelou um quadro dinâmico de alteração dos padrões pré-sinápticos durante a reinervação do músculo EDL. Esses

resultados são compatíveis com os dados obtidos na quantificação do padrão de inervação das fibras musculares durante a reinervação (discutidos no item anterior), que evidenciaram mudanças contínuas na composição das fibras constituintes das placas regeneradas mono e poli-inervadas com os diferentes tempos de sobrevida.

O nível de complexidade das terminações nervosas regeneradas nos animais com secção do nervo ciático seguida da tubulização atingiu valores equivalentes aos animais não operados na 40ª semana pós-cirurgia, indicando uma estabilização dos parâmetros pré-sinápticos (avaliados pelo comprimento das arborizações terminais e número de pontos de brotamentos) entre a 12ª e 40ª semana após a lesão inicial. Surpreendentemente, os animais com esmagamento do nervo ciático, embora atingissem valores de comprimento total e médio das arborizações terminais equivalentes aos dos animais não operados na 40ª semana pós-operatória, apresentaram valores de números de pontos de brotamento inferiores aos dos animais não operados em todas os tempos após a lesão inicial. Essa diferença, no entanto, foi de apenas 15% decorridas 40 semanas do esmagamento.

Tomas et alii (1990) encontraram uma diminuição dos parâmetros morfométricos de complexidade pré-sináptica decorridos dois meses após a reinervação do músculo esternomastoideo do rato. Infelizmente a análise desses autores não foi estendida a tempos mais longos de sobrevivência.

Dados da literatura divergem sobre as consequências funcionais de alterações da extensão e complexidade das arborizações terminais em placas motoras reinervadas. Nudell & Grinnell (1982, 1983) sugeriram a existência de uma relação inversa entre o tamanho do terminal e a liberação de neurotransmissor. Banner & Herrera (1986), por outro lado,

relataram grandes variações na eficiência sináptica de um terminal não acompanhadas por alterações correspondentes na sua morfologia à microscopia de luz.

Embora não seja possível afirmar em nosso material que o restabelecimento do padrão quantitativo de complexidade pré-sináptica dos animais tubulizados signifique o retorno de uma eficácia sináptica equivalente à situação pré-lesão, os dados obtidos na análise dos padrões morfométricos das arborizações terminais das fibras regeneradas serão importantes em futuros estudos comparativos da reinervação muscular em situações onde, por exemplo, a aplicação local de substâncias exógenas cause um aumento da taxa de arborização das fibras nervosas em regeneração no interior de próteses tubulares (Langone & Da-Silva, 1990; Da-Silva & Langone, 1991; Da-Silva et alii, 1992).

7. Análise Geral e Comparativa da Reinervação Muscular após Tubulização.

Os parâmetros quantitativos utilizados neste trabalho demonstraram que o padrão morfológico de reinervação muscular após secção do nervo ciático e reparo pela técnica de tubulização era equivalente ao encontrado após simples esmagamento do nervo ciático, considerando-se tempos de recuperação mais longos (superiores a 3 meses). Embora uma análise funcional do músculo EDL reinervado nos animais experimentais não tenha sido feita, dados da literatura nos permitem supor que essa identidade de reinervação morfológica entre as duas situações estudadas reflita uma recuperação fisiológica semelhante. Assim, estudos eletromiográficos comparando a recuperação da atividade elétrica muscular entre falhas de nervos reparadas por tubulização ou enxerto, demonstraram não haver diferenças significantes entre os dois métodos (Molander et alii, 1983;

Restrepo et alii, 1983; Archibald et alii, 1991); condição mais extrema foi avaliada no presente estudo, ao compararmos a tubulização com a situação de esmagamento do nervo, onde as bainhas conjuntivas do nervo pinçado permanecem íntegras após o trauma.

Os dois grupos experimentais estudados, no entanto, apresentaram diferenças estruturais quantitativas em relação ao grupo dos animais não operados, mesmo com os tempos mais longos de sobrevivência. Em particular, foi observada uma taxa de poli-inervação ao redor de 20% das fibras musculares examinadas nos animais com tubulização ou esmagamento do nervo. No músculo EDL normal, por outro lado, 100% das fibras musculares eram mono-inervadas. Comparações da eficácia sináptica, avaliada pela variação de amplitude dos EPP em músculos mono e poli-inervados, demonstraram que a competição sináptica altera a função sináptica (Angaut-Petit & Mallart, 1979; Grinnell et alii, 1979; Haiman et alii, 1981; Weakly & Yao, 1983; Trussel & Grinnell, 1985). Herrera & Werle (1990), por exemplo, ao estudarem a reinervação do músculo cutâneo peitoral da rã, encontraram uma diminuição de 16% na eficácia sináptica em junções duplamente nervadas, quando comparadas com junções com inervação simples. No entanto, essas alterações, observadas com o emprego de registros intracelulares, não foram detectadas em outros estudos que avaliaram potenciais de ação muscular durante a reinervação após a seção ou esmagamento de nervos (Eisen et alii, 1974; Molander et alii, 1983; Restrepo et alii, 1983; Archibald et alii, 1991, entre outros). Deste modo, poderíamos especular que, em nosso estudo, a persistência de uma taxa relativamente baixa de poli-inervação nas junções neuromusculares dos animais operados, relacionada também a uma diminuição previsivelmente pequena dos EPP em cada uma dessas junções, provavelmente não levaria a alterações

significativas do padrão eletromiográfico dos músculos reinervados desses animais em relação aos não operados. Em termos funcionais, portanto, seria plausível supor a ausência de diferenças importantes entre o músculo EDL dos animais operados e dos não operados. Esta hipótese, no entanto, deve ser testada com métodos eletrofisiológicos adequados antes de ser aceita.

CONCLUSÕES

O estudo quantitativo e temporal do padrão de inervação do músculo extensor longo dos dedos (EDL), após transecção do nervo ciático em camundongos e reparo imediato pela técnica de tubulização, permitiu concluir que:

1. O músculo EDL apresentou-se desnervado na 2ª semana após a tubulização.
2. Todas as fibras musculares do EDL estavam reinervadas na 6ª semana após o implante da prótese tubular.
3. Entre a 6ª e a 40ª semanas pós-implante a proporção de fibras musculares do EDL com mono e poli-inervação aumentou de 3:1 para 4:1.
4. Na 40ª semana após o implante do tubo foi atingida a porcentagem máxima (80%) de inervação troncular das placas motoras do EDL mono-inervadas.
5. Mesmo com tempos prolongados de sobrevivência após implante, não houve estabilização do padrão de origem das fibras nervosas que convergiam para as placas poli-inervadas do EDL.
6. A mono-inervação troncular foi readquirida por 65% das fibras musculares do EDL dos animais tubulizados, padrão encontrado em 100% das fibras musculares do EDL dos animais não operados.
7. Os padrões morfométricos de reinervação do músculo EDL foram idênticos, a partir do 3º mês, entre o grupo de animais com secção e tubulização do nervo ciático e o grupo com simples esmagamento do nervo.

FIGURAS

FIGURA 1. Desenhos representando os modelos experimentais utilizados no trabalho. Em **A**, implante do tubo de polietileno após secção do nervo ciático; em **B**, esmagamento do nervo ciático com pinça de relojoeiro.

EDL = músculo extensor longo dos dedos.

FIGURA 2. Desenho de câmara clara representativo de uma placa motora do músculo EDL normal, ilustrando os parâmetros definidos em material e métodos; número de pontos de brotamento (**PB**) e comprimento total (**Ct**) dos ramos nervosos que formam a arborização terminal na superfície da fibra muscular. A área pontilhada representa região positiva de ChE.

20 μm

Ct = Σ ○ —

PB = Σ ○

FIGURA 3. Cortes longitudinais do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de animal **não operado**. Em azul o produto da reação da colinesterase com o substrato escolhido, delimitando a região da placa motora; em preto as fibras nervosas impregnadas pela prata. A mesma técnica foi usada nas demais micrografias.

Figura 3A. Fotomicrografia de pequeno aumento mostrando a distribuição de ramos do nervo fibular no interior do músculo EDL em animal **não operado**. Nota-se a presença de um tronco nervoso intramuscular (TN) que se divide em ramos menores, até que axônios individuais o abandonam para inervar fibras musculares únicas (padrão típico de mono-inervação). 1520X.

Figura 3B. Junção neuromuscular, em grande aumento, de animal **não operado**, evidenciando padrão de ramificação da porção terminal do axônio na região da placa motora. 2285X.

FIGURA 4. Secções de músculo EDL após **2 semanas** de **esmagamento** do nervo ciático.

Figura 4A. Fotomicrografia de pequeno aumento evidenciando reinervação do músculo EDL; observam-se placas motoras mono-inervadas (setas).1143X

Figura 4B. Fotomicrografia onde se evidenciam placas motoras mono (seta) e poli-inervadas (seta curva), fibras nervosas de pequeno calibre e núcleos de células de Schwann ao redor das fibras nervosas (setas pequenas).1440X

FIGURA 5. Secções do músculo EDL de animais com **esmagamento** do nervo ciático e tempo de sobrevivência de **6 semanas**.

Figura 5A. Fotomicrografia de pequeno aumento evidenciando uma fibra nervosa abandonando o tronco nervoso intramuscular. Esta fibra ramifica-se no interior de uma placa motora que é mono-inervada (seta). Desta placa origina-se um brotamento ultraterminal que se dirige para uma fibra muscular adjacente, innervando-a (cabeça de seta); esta última placa exibe um padrão de poli-inervação. 929X

Figura 5B. Fotomicrografia mostrando duas placas motoras que apresentam um padrão de mono (seta) e poli-inervação (cabeça de seta), sendo a placa poli-inervada suprida por um ramo troncular (seta dupla) e por um brotamento colateral (seta pequena). 1814X

FIGURA 6. Fotomicrografia de pequeno aumento, de animal com **esmagamento** do nervo ciático e tempo de sobrevivência de **12 semanas**, evidenciando uma fibra nervosa saindo do tronco nervoso intramuscular (seta) e inervando 4 placas motoras, duas delas são mono-inervadas por brotamentos colaterais (cabeça de seta) e uma terceira mono-inervada pelo ramo troncular (seta dupla); na região da última placa a fibra emite um brotamento ultraterminal (seta pequena) que se bifurca, com um dos ramos contribuindo para inervar uma quarta placa mono-inervada por dois ramos do mesmo axônio (cabeça dupla de seta) e outro perdendo-se no interior do corte.1134X

FIGURA 7. Músculo EDL 40 semanas após esmagamento do nervo ciático.

Figura 7A. Esta fotomicrografia mostra o tronco nervoso intramuscular e uma fibra nervosa que o abandona para inervar 2 placas motoras com padrão de mono-inervação, sendo uma por brotamento colateral (seta) e outra por ramo troncular (cabeça de seta). 1189X

Figura 7B. Placa poli-inervada exibindo densa reinervação; várias fibras nervosas convergem para a mesma placa motora, formando um enovelado no seu interior. 1125X

FIGURA 8. Fotomicrografia de secção do músculo EDL de um animal sacrificado após **2 semanas** de secção do nervo ciático e reparo por **entubulização**. Apenas os antigos sítios de placas motoras são evidenciados pelo produto azulado da reação para colinesterase. Nenhuma fibra nervosa é vista no campo. O trajeto das fibras nervosas degeneradas é evidenciado pelos núcleos das células de Schwann que formam as bandas de Büngner (setas).1134X

FIGURA 9. Fotomicrofia de secção do músculo EDL após **6 semanas** de implantação do **tubo de polietileno**.

Figura 9A. Micrografia de pequeno aumento mostrando um tronco nervoso intramuscular (seta) dividindo-se em troncos menores que dão origem a fibras nervosas que inervam várias placas motoras.717X

Figura 9B. Fotomicrografia evidenciando duas placas motoras inervadas por ramos de uma mesma fibra nervosa. O local de bifurcação dessa fibra é visível (seta).2250X

FIGURA 10. Fotomicrografias de secções do músculo EDL decorridas **12 semanas** do implante da **prótese tubular**.

Figura 10A. Observa-se um grande tronco nervoso intramuscular de onde saem vários axônios que se destinam a várias placas motoras. Padrões de mono-inervação (seta) e de poli-inervação (seta curva) e um brotamento ultraterminal (seta pequena) são observados.1147X

Figura 10B. Placa motora mono-inervada por ramo nervoso troncular que ocupa quase que totalmente o antigo sítio da placa motora; uma pequena porção deste sítio de ChE (evidenciado pelo produto azulado de reação) não é ocupada pela fibra nervosa (seta).2286X

FIGURA 11. Fotomicrografias de secções do músculo EDL decorridas **40 semanas** de sobrevida após implante de **tubo de polietileno**.

Figura 11A. Observa-se um tronco nervoso intramuscular emitindo várias fibras nervosas que se destinam a placas mono (seta) e poli-inervadas (cabeça de seta).731X

Figura 11B. Secção de músculo EDL evidenciando padrões de mono-inervação das placas motoras.1428X

FIGURA 12. Gráficos mostrando as porcentagens de placas motoras mono e poli-inervadas em animais com secção do nervo ciático e reparo imediato por **tubulização (superior)** e animais com **esmagamento** do nervo ciático (**inferior**). Na 2ª semana após a tubulização não foram observadas fibras nervosas no interior do músculo EDL. A partir da 12ª semana não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos experimentais em relação à proporção de placas mono e poli-inervadas.

Tubulização

Esmagamento

Gráfico e tabela mostrando o **comprimento total das arborizações terminais (ΣCt)** e resumo da análise estatística.

Figura 14. Comprimento total das arborizações terminais (ΣCt) nas placas motoras de animais operados (lesão por esmagamento e lesão por secção do nervo mais reparo por tubulização) e de animais não operados.

Tabela 1. Comparação estatística do comprimento total das arborizações terminais (ΣCt), baseados nas médias obtidas. As letras maiúsculas representam as comparações entre as diferentes situações experimentais com mesmo tempo de sobrevivência e com os animais não operados; as letras minúsculas representam as comparações na mesma situação experimental em diferentes tempos de sobrevivência. Letras iguais não apresentam diferença dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste de Student-Newman-Keuls.

Observação - Os erros padrões das médias não estão indicados no gráfico desta página e das páginas subsequentes por serem muito pequenos, o que impossibilita as suas representações gráficas. Seus valores estão indicados no **Anexo**.

Comprimento total das arborizações terminais (ΣCt)

	Esmagamento	Tubulização	Não Operado
02 Semanas	A a		B
06 Semanas	B b	A a	B
12 Semanas	A a	A a	B
40 Semanas	B b	B b	B

Gráfico e tabela mostrando o **comprimento médio das arborizações terminais (Ctm)** e resumo da análise estatística.

Figura 15. Comprimento médio das arborizações terminais (Ctm) por placa motora em animais dos grupos experimentais (lesão por esmagamento e lesão por secção do nervo mais reparo por tubulização) e animais não operados.

Tabela 2. Comparação das médias do comprimento médio das arborizações terminais (Ctm). As letras maiúsculas representam as comparações entre as diferentes situações experimentais com mesmo tempo de sobrevida e com os animais não operados; as letras minúsculas representam as comparações na mesma situação experimental em diferentes tempos de sobrevida. Letras iguais não apresentam diferença dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste de Student-Newman-Keuls.

Comprimento médio das arborizações terminais (Ctm)

	Esmagamento	Tubulização	Não Operado
02 Semanas	A a		B
06 Semanas	B b	A a	B
12 Semanas	A a	A a	B
40 Semanas	B b	B b	B

Número Total de Pontos de Brotamentos (Σ PB)

	Esmagamento	Tubulização	Não Operado
02 Semanas	A a		B
06 Semanas	A b	B a	C
12 Semanas	A c	A a	B
40 Semanas	A b	B b	B

Gráfico e tabela mostrando o **número médio de pontos de brotamentos (PBm)** e resumo da análise estatística.

Figura 17. Número médio de pontos de brotamentos (PBm) por placa motora em animais dos grupos experimentais (lesão por esmagamento e lesão por secção do nervo mais reparo por tubulização) e animais não operados.

Tabela 4. Comparação das médias do número médio de pontos de brotamentos (PBm). As letras maiúsculas representam as comparações entre as diferentes situações experimentais com mesmo tempo de sobrevida e com os animais não operados; as letras minúsculas representam as comparações na mesma situação experimental em diferentes tempos de sobrevida. Letras iguais não apresentam diferença significativa dentro do nível de significância de 0,05 adotado no teste de Student-Newman-Keuls.

Número médio de Pontos de Brotamentos (PBm)

	Esmagamento	Tubulização	Não Operado
02 Semanas	A a		B
06 Semanas	A b	B a	C
12 Semanas	A c	A a	B
40 Semanas	A b	B b	B

Anexo. Quadro geral dos parâmetros sinápticos analisados nas 3 condições estudadas (animais não operados, animais com esmagamento do nervo ciático e animais com secção do nervo ciático seguida de implante de tubo de polietileno). Σ **Ct**, somatório dos comprimentos totais das fibras nervosas no interior das placas motoras; **Ctm**, comprimento total médio das fibras nervosas no interior das placas motoras (somatório do comprimento total/número de placas analisadas); Σ **PB**, somatório do número de pontos de brotamentos das fibras nervosas no interior das placas motoras; **PBm**, número médio de pontos de brotamentos das fibras nervosas no interior das placas motoras (somatório do número de pontos de brotamentos/número de placas analisadas); **SE**, erro padrão da média; **Min** e **Max**, comprimentos mínimo e máximo das fibras nervosas no interior das placas motoras e números de pontos de brotamentos mínimo e máximo.

Não Operado

	Somatório					Somatório				
	Ct(μ m)	Ctm(μ m)	SE	Min	Max	PB	PBm	SE	Min	Max
NO1	3177,64	158,88	$\pm 7,66$	108,15	231,16	107	5,35	$\pm 0,32$	3,00	8,00
NO2	2488,35	124,42	$\pm 5,98$	90,61	191,36	103	5,15	$\pm 0,32$	3,00	8,00
NO3	2389,96	119,50	$\pm 5,28$	87,68	155,99	99	4,95	$\pm 0,27$	2,00	7,00
NO4	<u>2532,82</u>	126,64	$\pm 6,28$	76,21	178,54	<u>113</u>	5,65	$\pm 0,30$	3,00	9,00
	$\Sigma 10588,77$	132,36	$\pm 3,57$	76,21	231,36	$\Sigma 422$	5,27	$\pm 0,16$	2,00	9,00

Esmagamento**02 Semanas**

CR1.2	1822,08	91,10	$\pm 3,58$	53,65	117,57	65	3,25	$\pm 0,14$	2,00	4,00
CR2.2	2428,28	121,41	$\pm 5,41$	90,84	182,47	72	3,60	$\pm 0,21$	2,00	6,00
CR3.2	1922,73	96,14	$\pm 5,44$	52,02	138,55	69	3,45	$\pm 0,28$	2,00	6,00
CR4.2	<u>1808,08</u>	90,40	$\pm 3,90$	62,48	120,47	<u>60</u>	3,00	$\pm 0,19$	2,00	5,00
	$\Sigma 7981,17$	99,76	$\pm 2,69$	52,02	182,47	$\Sigma 266$	3,33	$\pm 0,11$	2,00	6,00

06 Semanas

CR1.6	2469,53	123,48	$\pm 9,66$	69,13	241,55	95	4,75	$\pm 0,32$	3,00	7,00
CR2.6	2784,23	139,11	$\pm 9,77$	74,73	250,23	99	4,95	$\pm 0,42$	2,00	10,00
CR3.6	2263,12	113,16	$\pm 7,05$	81,08	180,92	77	3,85	$\pm 0,24$	2,00	6,00
CR4.6	<u>2473,19</u>	123,66	$\pm 5,77$	66,04	178,03	<u>83</u>	4,15	$\pm 0,26$	3,00	6,00
	$\Sigma 9990,08$	124,88	$\pm 4,18$	66,04	250,23	$\Sigma 354$	4,43	$\pm 0,18$	2,00	10,00

12 Semanas

CR1.12	2766,81	138,34	$\pm 9,28$	78,00	222,36	99	4,95	$\pm 0,33$	2,00	8,00
CR2.12	2017,90	100,89	$\pm 7,66$	46,61	160,75	74	3,70	$\pm 0,26$	2,00	6,00
CR3.12	1961,27	98,06	$\pm 6,12$	61,09	164,48	64	3,60	$\pm 0,27$	2,00	6,00
CR4.12	<u>1806,75</u>	90,34	$\pm 6,00$	34,55	172,51	<u>76</u>	3,80	$\pm 0,25$	2,00	6,00
	$\Sigma 8552,73$	106,91	$\pm 4,18$	34,55	222,36	$\Sigma 313$	3,91	$\pm 0,15$	2,00	8,00

40 Semanas

CR1.40	2277,08	113,85	$\pm 8,96$	56,86	223,20	72	3,60	$\pm 0,29$	2,00	7,00
CR2.40	3583,86	179,19	$\pm 15,53$	73,98	372,78	124	6,20	$\pm 0,49$	2,00	10,00
CR3.40	2440,23	122,01	$\pm 8,02$	64,38	199,14	82	4,10	$\pm 0,31$	2,00	7,00
CR4.40	<u>2046,06</u>	102,30	$\pm 6,43$	63,24	180,04	<u>76</u>	3,80	$\pm 0,26$	2,00	6,00
	$\Sigma 10337,18$	129,34	$\pm 6,07$	56,86	372,78	$\Sigma 354$	4,43	$\pm 0,21$	2,00	10,00

Tubulização**06 Semanas**

PT1.6	2073,62	103,68	$\pm 6,61$	52,04	162,61	65	3,25	$\pm 0,23$	2,00	6,00
PT2.6	2222,82	111,14	$\pm 7,89$	59,61	215,39	78	3,90	$\pm 0,25$	2,00	6,00
PT3.6	2337,84	116,89	$\pm 8,26$	67,93	211,09	72	3,60	$\pm 0,22$	2,00	5,00
PT4.6	<u>1809,77</u>	90,49	$\pm 3,65$	69,45	122,46	<u>62</u>	3,10	$\pm 0,28$	1,00	6,00
	$\Sigma 8444,05$	105,55	$\pm 3,54$	52,04	215,39	$\Sigma 277$	3,46	$\pm 0,13$	1,00	6,00

12 Semanas

PT1.12	2420,98	121,05	$\pm 8,07$	67,42	200,20	85	4,25	$\pm 0,25$	2,00	7,00
PT2.12	2026,96	101,35	$\pm 4,92$	56,66	127,01	67	3,35	$\pm 0,25$	2,00	5,00
PT3.12	1932,46	96,62	$\pm 6,54$	49,20	173,02	67	3,35	$\pm 0,15$	2,00	4,00
PT4.12	<u>1573,84</u>	78,69	$\pm 4,59$	47,14	116,95	<u>56</u>	2,80	$\pm 0,20$	1,00	4,00
	$\Sigma 7954,24$	99,43	$\pm 3,48$	47,14	200,20	$\Sigma 275$	3,44	$\pm 0,12$	1,00	7,00

40 Semanas

PT1.40	2724,12	136,21	$\pm 10,81$	65,63	241,86	97	4,85	$\pm 0,27$	3,00	7,00
PT2.40	2700,18	135,01	$\pm 8,77$	83,54	211,05	122	6,10	$\pm 0,35$	3,00	10,00
PT3.40	2139,20	106,96	$\pm 7,48$	71,31	170,54	105	5,25	$\pm 0,30$	3,00	8,00
PT4.40	<u>2240,13</u>	112,01	$\pm 15,14$	58,35	299,04	<u>88</u>	4,40	$\pm 0,41$	1,00	8,00
	$\Sigma 9803,64$	122,54	$\pm 5,57$	58,35	299,04	$\Sigma 412$	5,15	$\pm 0,18$	1,00	10,00

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABRAHAM, P.H.; DAY, A.; ALLT, G. Schwann cell plasma membrane changes induced by nerve crush. A freeze-fracture study. **Acta Neuropathol. (Berlin)**, **50**: 85-90, 1980.
- ADLER, R.; JERDAN, J.; HEWITT, A.T. Responses of cultured neural retinal cells to substratum bound laminin and other extracellular matrix molecules. **Dev. Biol.**, **112**: 100-14, 1985.
- AEBISCHER, P.; GENARD, V.; WINN, S.R.; VALENTINI, R.F.; GALLETTI, P.M. Blind-ended semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of a distal nerve stump. **Brain Res.** **454**: 179-87, 1988.
- AEBISCHER, P.; VALENTINI, R.F.; DAVRIO, P.; DOMENICIE, C.; GALLETTI, P.M. Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. **Brain Res.** **436**: 179-87, 1987.
- AEBISCHER, P.; VALENTINI, R.F.; WINN, S.R.; GALLETTI, P.M. The use of a semi-permeable tube as a guidance channels transected rabbit optic nerves. **Prog. Brain Res.**, **78**: 599-603, 1989.
- AGUILAR, C.E.; BISBY, M.A.; COOPER, E.; DIAMOND, J. Evidence that axoplasmic transport of trophic factors is involved in the regulation of peripheral nerve fields in salamanders. **J. Physiol. (Lond.)** **234**: 449-64, 1973.
- ALDERSON, K.; YEE, W.C.; PESTRONK, A. Reorganization of intrinsic components in the distal motor axon during outgrowth. **J. Neurocytol.**, **18**: 541-52, 1989.
- ALLT, G. Pathology of the peripheral nerve. In: **THE PERIPHERAL nerve**. Ed. D.N. Landon. London, Chapman & Hall, 1976. p. 666-739.
- ANDERSON, M.J.; COHEN, M.W.; ZORYCHTA, E. Effects of innervation on the distribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. **J. Physiol. (Lond)**, **268**: 731-56, 1977.

* DE ACORDO COM:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências bibliográficas: NB-66. In: NORMAS ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-20.
 SERIAL sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, 1989.

- ANGAUT-PETIT, D. & MALLART, A. Dual innervation of endplate sites and its consequences for neuromuscular transmission in muscles of adult *Xenopus laevis*. **J. Physiol (Lond.)**, **289**: 203-18, 1979.
- ANGLISTER, L. Acetylcholinesterase from the motor nerve terminal accumulates on the synaptic basal lamina of the myofiber. **J. Cell Biol.**, **115**: 755-64, 1991.
- ANGLISTER, L. & MCMAHAN, U.J. Basal laminina directs acetylcholinesterase accumulation at the synaptic sites in regenerating muscle. **J. Cell Biol.**, **101**: 735-43, 1985.
- ARCHIBALD, S.J.; KRARUP, C.; SHEFNER, J.; LI, S-T.; MADISON, R.D. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. **J. Comp. Neurol.**, **306**: 685-96, 1991.
- ATSUMI, S. Development of neuromuscular junctions of fast and slow muscles in the chick embryo: A light and electron microscope study. **J. Neurocytol.**, **6**: 691-709, 1977.
- AUSONI, S.; GORZA, L.; SCHIAFFINO, S.; GUNDERSEN, K.; LOMO, T. Expression of myosine heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. **J. Neurosci.**, **12**: 1-11, 1989.
- BAICHWAL, R.R.; BIGBEE, J.W.; DEVRIES, G.H. Macrophages-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **85**: 1701-5, 1988.
- BALLIN, R.H.M. & THOMAS, P.K. Changes at the node of Ranvier during Wallerian degeneration: an electron microscope study. **Acta Neuropathol.** **14**: 237-49, 1969.
- BANNER, L.R. & HERRERA, A.A. Differences in synaptic efficacy at neuromuscular junctions in frog twitch, muscles. **J. Physiol. (Lond.)**, **379**: 205-15, 1986.
- BARKER, D. & IP, M.C. Sprouting and degeneration of mammalian motor axons in normal and deafferentated skeletal muscle. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, **163**: 538-54, 1966.

- BARTON, A.A. An electron microscopic study of degeneration and regeneration of nerve. **Brain**, **85**: 799-808, 1962.
- BASSETT, C.AL.; CAMPBELL, J.B.; HUSBY, J. Peripheral nerve and spinal cord regeneration: factors leading to success of a tubulation technique employing millipore. **Exp. Neurol.**, **1**: 386-406, 1959.
- BENNETT, M.R. & PETTIGREW, A.G. The formation of neuromuscular synapse. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, **40**: 409-24, 1976
- BENNETT, M.R. & ROBINSON, J. Growth and elimination of nerve terminals at synaptic sights during polyneuronal innervation of muscle cells: a trophic hypothesis. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, **235**: 299-320, 1989.
- BENNETT, M.R.; MCLACHLA, E.M.; TAYLOR, R. The formation of synapses in reinervated mammalian striated muscles. **J. Physiol. (Lond.)**, **233**: 481-500, 1973.
- BENNETT, M.R.; MCGRATH, P.A.; DAVET, D.F.; HUTCHINSON, I. Death of motoneurons during the postnatal loss of polyneuronal innervation of rat muscles. **J. Comp. Neurol.**, **218**: 351-63, 1983.
- BENOIT, P. & CHANGEUX, J.-P. Consequences of blocking the nerve with a local anesthetic on the evolution of multi-innervation at the regenerating neuromuscular junction of the rat. **Brain Res.**, **149**: 89-96, 1978.
- BETZ, W. & SAKMANN, B. Effects of proteolytic enzymes on function and structure of frog neuromuscular junction. **J. Physiol. (Lond.)**, **230**: 673-88, 1973.
- BETZ, W.J.; CALDWELL, J.H.; RIBCHESTER, R.R. The size of motor units during postnatal development of rat lumbrical muscle. **J. Physiol. (Lond.)**, **297**: 463-78, 1979.
- BETZ, W.J.; CALDWELL, J.H.; RIBCHESTER, R.R. The effects of partial denervation at birth on the development of muscle fibres and motor units in rat lumbrical muscle. **J. Physiol. (Lond.)**, **303**: 265-79, 1980a.
- BETZ, W.J.; CALDWELL, J.H.; RIBCHESTER, R.R. Sprouting of active nerve terminals in partially inactive muscle of the rat. **J. Physiol. (Lond.)**, **303**: 281-97, 1980b.

- BEUCHE, W. & FRIEDE, R.L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, **13**: 767-96, 1984.
- BEVAN, S.; GRAMPP, W.; MILEDI, R. Properties of spontaneous potentials at denervated motor end-plates of the frog. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, **194**: 195-210, 1976.
- BIGBEE, J.W.; YOSHINO, J.E.; DEVRIES, G.H. Morphological and proliferative responses of cultured Schwann cells following rapid phagocytosis of a myelin enriched fraction. **J. Neurocytol.**, **16**: 487-96, 1987.
- BIRKS, R.; KATZ, B.; MILEDI, R. Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. **J. Physiol. (Lond.)**, **150**: 145-68, 1960.
- BIXBY, J.L.; LILI N. J.; REICHARDT, L.F. Identification of major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. **J. Cell Biol.**, **107**: 353-61, 1988.
- BOYLES, J.K.; PITAS, R.E.; WILSON, E.; MAHLEY, R.W. & TAYLOR, J.M. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. **J. Clin. Invest.**, **76**: 1501-13, 1985.
- BREHM, P. Resolving the structural basis for developmental changes in muscle ACh receptor function: It takes nerve. **Trends Neurosci.**, **12**: 174-7, 1989.
- BRENNER, H.R.; LOMO, T.; WILLAMSON, R. Control of end-plate channel properties by neurotrophic effects and by muscle activity in rat. **J. Physiol. (Lond.)**, **388**: 367-81, 1987.
- BROWN, M.C. & IRONTON, R. Motor nerve sprouting induced by prolonged tetrodotoxin block of nerve action potentials. **Nature**, **265**: 459-61, 1977.
- BROWN, M.C. & IRONTON, R. Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles. **J. Physiol. (Lond.)**, **278**: 325-48, 1978.
- BROWN, M.C.; HOLLAND, R.L.; HOPKINS, W.G. Excess neuronal inputs during development. In: DEVELOPMENT in the nervous system. Eds D.R. Garrod & J.D. Feldman. London, Cambridge University Press, 1981. p. 254-62.

- BROWN, M.C.; HOPKINS, W.G.; KEYNES, R.J. Comparasion of effects of denervated and botulinum toxin paralyzis on muscles properties in mice. **J. Physiol. (Lond.)**, **327**: 29-37, 1982a.
- BROWN, M.C.; HOPKINS, W.G.; KEYNES, R.J.; WHITE, I. A comparasion of early morphological changes at denervated and paralyzed end plates in fast and slow muscles of the mouse. **Brain Res.**, **248**: 382-6, 1982.
- BROWN, M.C.; JANSEN, J.K.S.; VAN ESSEN, D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. **J. Physiol. (Lond.)**, **261**: 387-422, 1976.
- BUNGE, M.B.; WILLIAMS, A.K.; WOOD, P.M.; UITTO, J.; JEFFREY, J.J. Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures , with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. **J. Cell Biol.**, **84**: 184-202, 1980.
- BURDEN, S.J. Acetylcholine receptors at the neuromuscular junction: Developmental change in receptor turnover. **Dev. Biol.** **61**: 79-85, 1977b.
- BURDEN, S.J. Identification of an intracellular postsynaptic antigen at the frog neuromuscular junction. **J. Cell Biol.**, **94**: 521-30, 1982.
- BURDEN, S.J.; SARGENT, P.B., MCMAHAN, U.J. Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. **J. Cell Biol.** **82**: 412-425, 1979.
- BUTLER, J.; COSMOS, E.; BRIERLEY, J. Differentiation of muscle fiber types in aneurogenic brachial muscles of the chick embryo. **J. Exp. Zool.**, **224**: 65-80, 1982.
- CAJAL, R. S. Studies on vertebrate neurogenesis. Springfield, Charles Thomas, 1929.
- CAJAL, R.S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London, Oxford University Press. 1928. p. 459.
- CALLAWAY, E.; SOHA, J.M.; VAN ESSEN, D.C. Differential loss of neuromuscular connections according to activity level and spinal position of neonatal rabbit soleus motor neurons. **J. Neurosci.**, **9**: 1806-24, 1989.

- CANGIANO, A. & LUTZEMBERGER, L. Partial denervation affects both denervated and innervated fibers in the mammalian skeletal muscle. **Science**, **196**: 542-5, 1977.
- CARDASIS, C.A. Ultrastructural evidence of continued reorganization at the aging (11-26 months) rat soleus neuromuscular junction. **Anat Rec.**, **207**: 399-415, 1983.
- CARLSON, B.M. Neuromuscular regeneration in mammals. In: **NEURAL Regeneration and Transplantation**. New York, Alan R Liss, 1989. p. 1-14.
- CHADI, G. Estudo da regeneração do nervo hipoglosso no interior de próteses tubulares de silicone. São Paulo, 1991. 235p. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. São Paulo].
- CHANGEUX, J.-P. & DAUCHIN, A. Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. **Nature**, **264**: 705-12, 1976.
- CHI, N.H. & DAHL, D. Autologous peripheral nerve grafting into murine brain as model for studies of regeneration in the central nervous system. **Exp. Neurol.**, **79**: 245-64, 1983.
- CHIU, D.T.W.; JANECKA, I.; KRIZED, T.J.; WOLF, M.; LOVELACE, R.E. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. **Surgery**, **19**: 226-33, 1982.
- COHEN, M.W. & WELDON, P.R. Localization of acetylcholine receptors and synaptic ultrastructure at nerve-muscle contacts in culture: Dependence on nerve type. **J. Cell Biol.**, **86**: 388-401, 1980.
- CONDON, K.; THOMPSON, W.J.; SIBERSTEIN, L.; BLAU, H.M. Fiber type differentiation during rat hindlimb myogenesis does not depend on innervation. **Soc. Neurosci. Abstract.**, **14**: 163, 1988.
- CONLEY, J.J. Facial nerve grafting in treatment of paratoid gland tumors. **Arch. Surg.**, **70**: 359-66, 1955.
- CONNOLD, A.L.; EVERS, J.V.; VRBOVA, G. Effect of low calcium and protease inhibitors on synapse elimination during postnatal development in the rat soleus muscle. **Dev. Brain Res.**, **28**: 99-107, 1986.

- COTMAN, C.W.; NIETO-SAMPEDRO, M.; HARRIS, E.W. Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. **Physiol. Rev.**, **61**: 684-784, 1981.
- COUTEAUX, R. Structure of the subsynaptic sarcoplasm in the interfolds of the frog neuromuscular junction. **J. Neurocytol.**, **10**: 947-62, 1981.
- COVAULT, J. & SANES, J.R. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, **102**: 716-30, 1986.
- CRAGG, B.G. What is the signal for chromatolysis? **Brain Res.**, **23**: 1-21, 1970.
- CRAGG, B.G. & THOMAS, P.K. Changes in conduction velocity and fibre size proximal to peripheral nerve lesion. **J. Physiol. (Lond.)**, **157**: 315-27, 1961.
- CRANG, A.J. & BLAKEMORE, W.F. Observations on the migratory behaviour of Schwann cells from adult peripheral nerve explant cultures. **J. Neurocytol.**, **16**: 423-31, 1987.
- CSILLIK, B. Functional structure of the post-synaptic membrane in the myoneural junction. Ed. J. North. Budapest, House of the Hungarian Academy Sciences, 1967. p. 156.
- CUADROS, C.L. & GRANATIR, C.E. Nerve regeneration through a synthetic microporous tube (expanded polytetrafluoroethylene): experimental study in the sciatic nerve of the rat. **Microsurgery**, **8**: 41-6, 1987.
- DA-SILVA, C.F. Estudo experimental da regeneração de nervos no interior de próteses tubulares. São Paulo, 1987. 58p. [Tese Livre-Docente - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo].
- 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.**, **22**: 691-4, 1989.
- DA-SILVA, C.F. & MADISON, R. Nerve regeneration through collagen/laminin gel tubes: a quantitative HRP study. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **12**: 190.11, 1986.
- DA-SILVA, C.F.; DIKKES, P.; MADISON, R.; GREATOREX, D.; SIDMAN, R.L. Laminin gel stimulates axonal regeneration "in vivo". **Soc. Neurosci. Abstr.**, **10**: 85-91, 1984.

- DA-SILVA, C.F.; LIMA, G.M.C.A.; TREZENA, A.G. Local administration of interleukin-1 increases sensory neuron regeneration *in vivo*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **23**: 981-4, 1990.
- DA-SILVA, C.F.; MADISON, R.; DIKKES, P.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L. An *in vivo* model to quantify motor and sensory peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guide tubes. **Brain Res.**, **342**: 307-15, 1985.
- DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; OCHI, M.; LUNDBORG, G. Axonal growth in mesothelial chambers: Effects of a proximal preconditioning lesion and/or predegeneration of distal nerve stump. **Exp. Neurol.**, **99**: 655-63, 1988.
- DANIELSEN, N.; DAHLIN, L.B.; LEE, Y.F.; LUNDBORG, G. Axonal growth in mesothelial chambers. The role of distal segment. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, **17**: 119-25, 1983.
- DANILOFF, J.K.; LEVI, G.; GRUMET, M.; RIEGER, G.; EDELMAN, G.M. Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. **J. Cell Biol.**, **103**: 929-45, 1988.
- DENK, W. Ueber shussverletzungen der nerven. **Beitr. Klin. Chir.**, **91**: 217-21, 1914.
- DENNIS, M.J. & HARRIS, A.J. Transient inability of neonatal rat reinnervate muscle. **Dev. Biol.**, **74**: 173-83, 1980.
- DENNIS, M.J. & MILEDI, R. Non-transmitting neuromuscular junctions during an early stage of endplate reinnervation. **J. Physiol. (Lond.)**, **239**: 553-70, 1974.
- DENNIS, M.J.; ZISKIND-CONHAIM, L.; HARRIS, A.J. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. **Dev. Biol.**, **81**: 266-79, 1981.
- DIAMOND, J. & MILEDI, R. A study of fetal and newborn rat muscle fibres. **J. Physiol. (Lond.)**, **162**: 393-408, 1962.
- DONAT, J.R. & WISNIEWSKI, H.M. The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. **Brain Res.**, **53**: 41-53, 1973.
- DREYER, F. & PEPPER, K. The acetylcholine sensitivity of the neuromuscular junction of the frog. **Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.**, **398**: 273-86, 1974.

- DREYER, F.; PEPPER, K.; AKERT, K.; SANDRI, C.; MOOR, H. Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction. **Brain Res.**, **62**: 373-80, 1973.
- DUCHEN, L.W. An electron microscopic study on the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. **J. Neurol. Sci.**, **14**: 47-60, 1971.
- DUCHEN, L.W. & STRICH, S.J. The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. **Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.**, **53**: 84-9, 1968.
- DUCKER, T.B. & HAYES, G.J. Experimental improvements in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, **28**: 582-7, 1968b.
- EDDS, M.V. Collateral regeneration of residual motor axons in partially denervated muscles. **J. Exp. Zool.**, **113**: 517-52, 1950.
- EDELMANN, G.M. Cell adhesion molecules. **Science**, **219**: 450-57, 1983.
- EISEN, A.; GEORGE, K.; CARPENTER, S.; DANON, J. The motor unit proliferate on the rat soleus in experimental myopathy and reinnervation. **Neurology**, **24**: 878-84, 1974.
- EISEN, J.S.; MYERS, P.Z.; WESTERFIELD, M. Pathway selection by growth cones identified motoneurons in live zebra fish embryos. **Nature**, **320**: 269-71, 1986.
- ELLISMAN, M.H.; RASH, J.E.; STAEHLIN, L.A.; PORTER, K.R., Studies of excitable membranes. II A comparison of specializations at neuromuscular junctions and non-junctional sarcolemma of mammalian fast and slow twitch muscle fibers. **J. Cell Biol.**, **68**: 752-74, 1976.
- ENGVAL, E.; DAVIS, G.E.; DICKERSON, K.; RUOSLAHTI, E.; VARON, S.; MANTHORPE, M. Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: Localization of the neurite-promoting site. **J. Cell Biol.**, **103**: 2457-65, 1986.
- ENTWISTLE, A.; ZALIN, R.J.; BEVAN, S.; WARNER, A.E., The control of chick myoblast fusion by ion channels operated by prostaglandins and acetylcholine. **J. Cell Biol.**, **106**: 1693-702, 1988a.

- ENTWISTLE, A.; ZALIN, R.J.; WARNER, A.E.; BEVAN, S. A role of acetylcholine receptors in the fusion of chick myoblasts. **J. Cell Biol.**, **106**: 1703-12, 1988b.
- EXNER, S. Die innervation des kielkopfes. **Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math. Naturwiss. Kl., Abt. 1** **89**: 63-118, 1884.
- FAMBROUGH, D.M. Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. **Physiol. Rev.**, **59**: 165-227, 1979.
- FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Annu. Rev. Neurosci.**, **13**: 43-60, 1990.
- FERNANDEZ, H.L.; DUELL, M.J.; FESTOFF, B.W. Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. **J. Neurobiol.**, **10**: 441-54, 1979.
- FERTUCK, H.C. & SALPETER, M.M., Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after ¹²⁵I-alpha-bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. **J. Cell Biol.**, **69**: 144-58, 1976.
- FERTUCK, H.C. & SALPETER, M.M., Localization of acetylcholine receptors by ¹²⁵I-alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **71**: 1376-8, 1974.
- FIELDS, R.D. & ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction properties. **Expl. Neurol.**, **92**: 48-60, 1986a.
- FIELDS, R.D. & ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. **Expl. Neurol.**, **92**: 61-74, 1986b.
- FIELDS, R.D. & ELLISMAN, M.H. Physiology and morphology of nerves regenerating through silicone chambers. **J. Cell Biol.**, **99**: 421a, 1984.
- FIELDS, R.D.; LE BEAU, J.M.; LONGO, F.M. ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progr. Neurobiol.**, **13**: 87-134, 1989.
- FIORI, M.G.; DI GREGORIO, F.; FABRIS, M.; MARINI, P.; TRIBAN, C.; TOFFANO, G. Processes of peripheral nerve and neuromuscular repair. **Ann. Ist. Super. Sanita**, **24**: 143-58, 1988.

- FISCHBACH, G.D.; FRANK, E.; JESSEL, T.M.; RUBIN, L.L.; SCHUETZE, S.M. Accumulation of acetylcholine receptors and acetylcholinesterase at newly formed nerve-muscle synapses. **Pharmacol. Rev.**, **30**: 411-28, 1979.
- FONTAINE, B.; SASSOON, D.; BUCKINGHAM, M.; CHANGEUX, J.-P. Detection of the acetylcholine receptor α -subunit mRNA by *in situ* hybridization at neuromuscular junctions of 15-day-old chick striated muscles. **EMBO J.**, **7**: 1-12, 1988.
- FRANK, S.E.; JANSEN, J.K.S.; LOMO, T.; WESTGAARD, R.H. The interaction between foreign and original motor nerves innervating the soleus muscle of rats. **J. Physiol. (Lond)**, **247**: 725-43, 1975.
- FREEMAN, B.S. Adhesive neural anastomosis. **Plast. Reconstr. Surg.**, 167-76, 1965.
- FRIEDE, R.L. & SAMORAJSKI, T. Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. **J. Comp. Biol.**, 223-32, 1968.
- GARRITY, R.W. The use of plastic and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. **Surg. Forum**, **6**: 517-20, 1955.
- GATCHALIAN, C.L.; SCHACHNER, M.; SANES, J.R. Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin (J1), N-CAM, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan. **J. Cell Biol.**, **108**: 1873-90, 1989.
- GLÜCK, T. Ueber Neuroplastik auf dem Wege der Transplantation. **Archiv Klin. Chir.**, **25**: 606-16, 1880.
- GORIO, A. Muscle innervation and reinnervation as a model for development and specificity of neuronal connections. In: A MULTIDISCIPLINARY approach to brain development. Eds. C. Benedetta, R. Balazs, G. Gombos, G. Porcellati. Amsterdam, Elsevier, 1980. p. 439-52.
- GORIO, A. Sprouting and regeneration of peripheral nerve. In: THE NODE of Ranvier. Eds J.C. Zagoren, S. Federoff. New York, Academic Press, 1984. p. 353-88.

- GORIO, A. & CARMIGNOTO, G. Reformation, maturation and stabilization of neuromuscular junctions in peripheral nerve regeneration: the possible role of exogenous gangliosides on determining motoneuron sprouting. In: POSTRAUMATIC peripheral nerve regeneration. Eds. A. Gorio, H. Millesi, S. Mingrino. New York, Raven Press, 1981. p. 481-92.
- GORIO, A.; CARMIGNOTO, G.; FINESSO, M.; POLATO, P.; NUNZI, M.G. Muscle reinnervation. II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, **8**: 403-16, 1983.
- GORIO, A.; MARINI, P.; ZANONI, R. Muscle reinnervation. III. Motoneuron sprouting capacity, enhancement by exogenous gangliosides. **Neuroscience**, **8**: 417-29, 1983.
- GORZA, L.; GUNDERSEN, K.; LOMO, T.; SCHIAFFINO, S.; WESTGRRARD, R.H. Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high-frequency stimulation in the rat. **J. Physiol. (Lond.)**, **402**: 627-49, 1988.
- GRINNELL, A.D.; LETINSKY, M.S.; RHEUBEN, M.B. Competitive interaction between foreign nerves innervating frog skeletal muscle. **J. Physiol. (Lond.)**, **289**: 241-62, 1979.
- GRUMET, M. & EDELMAN, G.M. Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. **J. Cell Biol.**, **106**: 487-504, 1988.
- GULATI, A.K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. **J. Neurosurg.**, **68**: 117-23, 1988.
- GUNDERSEN, R.W. & BARRETT, J.N. Neuronal chemotaxis: Chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. **Science**, **206**: 1079-80, 1979.
- GUTH, L.L.; SMITH, A.; DONATI, E. J.; ALBUQUERQUE, E.X. Induction of intramuscular collateral nerve sprouting by neurally applied colchicine. **Exp. Neurol.**, **67**: 513-23, 1980.
- GUTMANN, E. & YOUNG, J.Z. The reinnervation of muscle after various periods of atrophy. **J. Anat.** **78**: 15-52, 1944.

- HAIMANN, C.; MALLART, A.; TOMAS I FERRI, J.; ZILBER-GACHELIN, N.F. Patterns of motor innervation in the pectoral muscle of adult *Xenopus laevis*: evidence for possible synaptic remodeling. **J. Physiol. (Lond.)**, **310**: 241-56, 1981.
- HAKES, S. & WANG, J.L. Extracellular matrix. New York, Academic Press, 1982.
- HALL, S.M. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **12**: 27-46, 1986a.
- HALL, Z.W. & KELLY, R.B. Enzymatic detachment of endplate acetylcholinesterase from muscle. **Nature New Biol.**, **232**: 62-3, 1971.
- HARRIS, A.J. Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscle. I. Neural regulation of muscle fibre numbers. **Phil. Trans. R. Soc. London**, **293**: 257-77, 1981a.
- HARRIS, D.A.; FALLS, D.A.; FISCHBACH, G.D. Differential activation of myotube nuclei following exposure to an acetylcholine receptor-inducing factor. **Nature**, **337**: 173-6, 1989.
- HATTA, K.; NOSE, A.; NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M. Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecules: Its identity to cadherin gene family. **J. Cell Biol.**, **106**: 873-81, 1988.
- HATTA, K.; TAKAGI, S.; FUJISAWA, H.; TAKEICHI, M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic process of chicken embryos. **Dev. Biol.**, **120**: 215-27, 1987.
- HEATON, M.B.; MOODY, S.A.; KOISER, M.E. Peripheral innervation by migrating neuroblasts in the chick embryo. **Neurosci. Lett.**, **10**: 55-9, 1978.
- HERRERA, A.A. & WERLE, M.J. Mechanisms of elimination, remodeling, and competition at frog neuromuscular junctions. **J. Neurobiol.**, **21**: 73-98, 1990.
- HERRERA, A.A. & BANNER, L.R. The use and effects of vital fluorescent dyes: observation of motor nerve terminals and satellite cells in living frog muscles. **J. Neurocytol.**, **19**: 67-83, 1990a.

- HERRERA, A.A.; BANNER, L.R.; NAGAYA, N. Repeted, *in vivo* observation of neuromuscular junctions: remodelling involves concurrent growth and retraction. **J. Neurocytol.**, **19**: 85-99, 1990b.
- HEUMANN, R.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; MEYER, M.; RADEKE, M.J.; MISKO, T.P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: Role of macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **84**: 8735-9, 1987.
- HEUSER, J.E.; REESE, T.S.; LANDIS, D.M.D. Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. **J. Neurocytol.**, **3**: 109-31, 1974.
- HILL, R.R.; ROBINS, N.; FANG, Z.P. Plasticity of presynaptic and postsynaptic elements of neuromuscular junctions repeatedly observed in living adult mice. **J. Neurocytol.**, **20**: 265-82, 1991.
- HINES, H.M.; WEHRMACHER, W.H.; THOMPSON, J.D. Functional changes in nerve muscle after partial denervation. **Am. J. Physiol.**, **145**: 48-53, 1945.
- HOFFMAS, P.N. & CLEVELAND, D.W. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the development program during axonal regeneration: Induction of a especific beta-tubulin isotype. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, **85**: 4530-3, 1988.
- HOLLAND, R.L. & BROWN, M.C. Postsynaptic transmission block can cause motor nerve terminal sprouting. **Science**, **207**: 649-51, 1980.
- HOLLYDAY, M. Motoneuron histogenesis and the development of limb innervation. **Curr. Top. Dev. Neurobiol.**, **15**: 181-215, 1980a.
- HOLLYDAY, M. Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. **J. Comp. Neurol.**, **194**: 143-70, 1980b.
- HOLLYDAY, M. & HAMBURGER, V. An autoradiographic study of the formation of the lateral motor column in the embryo. **Brain Res.**, **132**: 197-208, 1977.
- HOLMES W. & YOUNG, J.Z. Nerve regeneration after or immediate delayed suture. **J. Anat. (Lond.)**, **77**: 63-96, 1942.

- HONIG, M.G. The development of sensory projection patterns in embryonic chick hind limb. **J. Physiol. (Lond.)** **330** : 175-202, 1982.
- HOPKINS, W.G. & BROWN, M. C. Growth and Remodeling of the Neuromuscular Synapse. In: **SYNAPTIC Plasticity**. Ed. C.W. Cotman. New York, The Guilford Press, 1985. p. 169-99.
- HOPKINS, W.G. & SLACK, J.R. The sequential devevelopment of nodal sprout in mouse muscle in response to nerve degeneration. **J. Neurocytol.**, **10**: 537-56, 1981.
- HOPKINS, W.G.; LIANG, J.; BARRETT, E.J. Effects of age and muscle type on regeneration of neuromuscular synapses in mice. **Brain Res.**, **372**: 163-6, 1986.
- HUBER, G.C. Repair of peripheral nerve injuries. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **30**: 464-71, 1920.
- HUDSON, A.; MORRIS, J.; REDMAN, F.; WEDDELL, G. An electron microscopic study of regeneration in severed rat sciatic nervs anas tomosed with silastic cuffs. **Curr. Top. Surg. Res.**, 187-90, 1971.
- HUNTER, D.D.; MERLIE, J.P.; SANES, J.R. JS-1, a component of synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. **Soc. Neurosci. Abstr.** **14**: 894, 1988.
- HUNTER, D.D.; SHAH, V.; MERLIE, J.P.; SANES, J.R. A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. **Nature**, **338**: 229-34, 1989a.
- HYDÉN, H. **Cell**. Eds J. Brachet, A.E. Mirsky. New Yok, Academic Press, 1960. p. 215-323.
- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T.; ONODERA, S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. **Brain Res.**, **288**: 61-75, 1983.
- IGNATIUS, M.J.; GEBICKE-HAERTER, P.J.; SKENE, J.H.P.; SCHILLING, J.W.; WEINGRABER, K.H.; MAHLEY, R.W.; SHOOTER, E.M. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **83**: 1125-9, 1986.

IGNATIUS, M.J.; SHOOTER, E.M.; PITAS, R.E.; MAHLEY, R.W. Lipoprotein uptake by neuronal growth cones in vitro. **Science**, **263**: 969-62, 1987.

IRONTON, R.; BROWN, M.C.; HOLLAND, R.L. Stimuli to intramuscular nerve growth. **Brain Res.**, **156**: 351-54, 1978.

JANSEN, J.K.S. & FLADBY, T. The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. **Prog. Neurobiol.**, **34**: 39-90, 1990.

JANSEN, J.K.S. & VAN ESSEN, D.C. Re-innervation of rat skeletal muscle in the presence of alfa-bungarotoxin. **J. Physiol. (Lond.)**, **250**: 651-67, 1975.

JANSEN, J.K.S.; LOMO, T.; NICOLAYSEN, K.; WESTGAARD, R.H. Hyperinnervation of skeletal muscle fibers: Dependence on muscle activity. **Science**, **181**: 319-27, 1973.

JOCKUSCH, H.; MULLER, U.; JOCKUSCH, B.M. Accumulation and spatial distribution of structural proteins in developing mammalian muscle. **Expl. Biol. Med.**, **9**: 121-5, 1984.

JOHNSON, E.M.JR.; TANIUCHI, M.; DISTEFANO, P.S. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. **Trends Neurosci.**, **11**: 299-304, 1988.

JONES, R. & VRBOVA, G. Two factors responsible for the development of denervation hypersensitivity. **J. Physiol. (Lond.)**, **236**: 517-38, 1974.

KAMBOURG, A & LEBLOND, C.P. Electron microscopic observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. **J. Cell Biol.**, **32**: 27-53, 1967.

KEELEY, R.D.; NGUYEN, K.D.; STHEPHANIDES, M.J.; PADILLA, J.; ROSEN, J.N. The artificial nerve graft: a comparison of blended elastomer-hydrogel with polyglycolic acid conduits. **J. Reconstr. Microsurg.**, **75**: 93-100, 1991.

KELLY, A.M. & ZACKS, S.I. The fine structure of motor endplate morphogenesis. **J. Cell Biol.** **42**: 154-69, 1969.

KELLY, A.M. & ZACKS, S.I. The histogenesis of rat intercostal muscle. **J. Cell Biol.**, **42**: 135-153, 1969a.

- KEMPLAY, S. & STOLKIN, C. Endplate classification and spontaneous sprouting in the sternocostalis muscle of the rat: a new whole mount preparation. **Cell Tissue Res.**, **212**: 333-9, 1980.
- KEYNES, R.J. The effects of pyronin on sprouting and regeneration of mouse motor nerves. **Brain Res.**, **253**: 13-8, 1982.
- KEYNES, R.J. & STERN, C.D. The development of neural segmentation in vertebrate embryos. In: **THE MAKING of the Nervous System**. Eds. J.G.Parnavelas, C.D. Stern and R.V. Stirling. Oxford, Oxford University Press, 1988. p. 84-100.
- KIDOKORO, Y.; ANDERSON, M.J.; GRUENER, R. Changes in synaptic potential properties during acetylcholine receptor accumulation and neurospecific interactions in **Xenopus** nerve-muscle cell culture. **Dev. Biol.**, **78**: 464-83, 1980.
- KNOOPS, B.; HURTADO, H.; VAN DENBOSCH DE AGUILAR, P. Rat sciatic nerve regeneration within an acrylic semipermeable tube and comparison with a silicone impermeable material. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **49**: 438-48, 1990a.
- KO, C.-P. Electrophysiological and freeze-fracture studies of changes following denervation at frog neuromuscular junctions. **J. Physiol. (Lond.)**, **321**: 627-39, 1981.
- KORNELIUSSEN, H. & JANSEN, J.K.S. Morphological aspects of the elimination of polyneuronal innervation of skeletal muscle fibres in newborn rats. **J. Neurocytol.**, **5**: 591-604, 1976.
- KRAUS, H. & REISNER, H. Behandlungsergebnisse von verletzungen pripherer nerven mit besonderer berücksichtigung der schussverletzungen der jahre 1919, 1927 und 1934. **Arch. Klin. Chir.**, **199**: 318-36, 1940.
- KUFFLER, D.F. Long-distance regulation of regenerating frog axons. **J. Exp. Biol.**, **132**: 151-60, 1987.
- KUFFLER, S.W. & YOSHIKAMI, D., The distribution of acetylcholine sensitivity at the postsynaptic membrane of vertebrates skeletal twitch muscles: Iontophoretic mapping in the micron range. **J. Physiol. (Lond.)**, **244**: 703-30, 1975.

- KUGELBERG, L.; EDSTROM, L.; ABRUZZESE, M. Mapping of motor units in experimentally reinnervated rat muscle. **J. Neurosurg. Psychiatr.**, **33**: 319-29, 1970.
- KULLBERG, R.W.; LENTZ, T.L.; COHEN, M.W. Development of the myotomal neuromuscular junction in *Xenopus laevis*: An electrophysiological and fine-structural study. **Dev. Biol.**, **60**: 101-29, 1977.
- KUROMI, H. & KIDOKORO, Y. Nerve disperses preexisting acetylcholine receptor clusters prior to induction of receptor accumulation in *Xenopus* muscle cultures. **Dev. Biol.**, **103**: 53-61, 1984.
- LAMB, A.H. Evidence that some developing limb motoneurone die for reason other than peripheral competition. **Dev. Biol.**, **71**: 8-21, 1979.
- LANCE-JONES, C. & LANDMESSER, L. Motoneurone projection patterns in embryonic chick limbs following partial deletions of the spinal cord. **J. Physiol. (Lond.)**, **302**: 559-80, 1980a.
- LANCE-JONES, C. & LANDMESSER, L. Motoneurone projection patterns in the chick hind limb following early partial reversals of the spinal cord. **J. Physiol. (Lond.)**, **302**: 581-602, 1980b.
- LANCE-JONES, C. & LANDMESSER, L. Pathway selection by chick lumbosacral motoneurons during normal development **Proc. R. Soc. (Lond.)**, **214**: 01-18, 1981a.
- LANCE-JONES, C. & LANDMESSER, L. Pathway selection by embryonic chick motoneurons in an experimentally altered environment. **Proc. R. Soc. (Lond.)**, **214**: 19-52, 1981b.
- LANDMESSER, L. The development of motor projection patterns in the chick hind limb. **J. Physiol., (Lond.)**, **284**: 391-414, 1978.
- LANDMESSER, L. & MORRIS, D.G. The development of functional innervation in the hind limb of the chick embryo. **J. Physiol., (Lond.)**, **249**: 301-326, 1975.
- LANGONE, F. Estudo ultra-estrutural e morfométrico de nervos regenerados no interior de próteses tubulares. São Paulo, 1991. 201p. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. São Paulo].

- LANGONE, F. & DA-SILVA, C.F. Exogenous ganglioside stimulation of axonal regeneration after nerve transection and entubulation repair. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **23**: 823-6, 1990.
- LANGONE, F. & DA-SILVA, C.F. Local administration of insulin enhances peripheral nerve regeneration in mice. In: THIRD IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE. Montréal, 1991. Abstract. p. 27.
- LAUFER, R. & CHANGEUX, J.P. Calcitonin gene-related peptide elevates cyclic AMP levels in chick skeletal muscle: Possible neurotrophic role for a coexisting neuronal messenger. **EMBO J.**, **6**: 321-42, 1987.
- 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.**, **17**: 161-72, 1988a.
- LE BEAU, J.M.; LA CORBIERE, M.; ELLISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration, and proliferation. **Brain Res.**, **459**: 93-104, 1988b.
- LE BEAU, J.M.; POWELL, H.C.; ELLISMAN, M.H. Node of Ranvier formation along fibres regenerating through silicone tube implants: a freeze fracture and thin-section electron microscopic study. **J. Neurocytol.**, **16**: 347-58, 1987.
- LETINSKY, M.S.; FISHBECK, K.H.; McMAHAN, U.J. Precision of reinnervation of original postsynaptic sites in frog muscle after a nerve crush. **J. Neurocytol.**, **5**: 691-718, 1976.
- LETOURNEAU, P.C. Nerve growth and its regulation by extrinsic factors. In: Neuronal Development. Ed. N.C. Spitzer. New York, Plenum Press, 1982. p. 213-45.
- LEVI-MONTALCINI, R. & HAMBURGER, V. Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. **J. Exp. Zool.**, **116**: 321-62, 1951.
- LICHTMAN, J.W. & BALICE-GORDON, R.J. Understanding synaptic competition in theory and in practice. **J. Neurobiol.**, **21**: 99-106, 1990.

- LICHTMAN, J.W.; MAGRASSI, L.; PURVES, D. Visualization of neuromuscular junctions over periods of several months in living mice. **J. Neurosci.** 7: 1215-22, 1987.
- LIEBERMAN, A.R. Some factors affecting neuronal responses to axonal lesions. In: ESSAYS on the nervous system. Eds R. Bellairs & E.G. Gray. Oxford, Oxford Univ.Press, 1974. p. 71-105.
- LIEBERMAN, A.R. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. **Int. Rev. Neurobiol.**, 14: 49-124, 1971.
- 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**, 330: 658-9, 1987.
- LIU, D.W. & WESTERFIELD, M. Primary motoneurons instruct muscle acetylcholine receptor placement, but receptors don't instruct moneuronal synapse placement, in live zebrafish. **Soc. Neurosci. (Abstr.)**, 15, p 1262, 1989.
- LOMO, T. & ROSENTHAL, J. Control of acetylcholine sensitivity by muscle activity in the rat. **J. Physiol., (Lond.)**, 221: 493-513, 1972.
- 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.**, 309: 105-17, 1984.
- LONGO, F.M.; MANTHORPE, M.; SKAPER, S.D.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Neuronotrophic activities accumulate *in vivo* within silicone nerve regeneration chambers. **Brain Res.**, 262: 109-16, 1983a.
- LONGO, F.M.; SKAPER, S.D.; MANTHORPE, M.; WILLIAMS, L.R.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Temporal changes in neuronotrophic activities accumulating *in vivo* within silicone nerve regeneration chambers. **Expl. Neurol.**, 81: 756-69, 1983b.
- LOWRIE, B.M.; SUBRAMANIAN, K.; VRBOVA, G. Recovery of slow and fast muscles following nerve injury during early postnatal development in the rat. **J. Physiol. (Lond.)**, 331: 51-66, 1982.

- LUBINSKA, L. On axoplasmic flow. **Int. Rev. Neurobiol.**, **17**: 241-96, 1975.
- LUBINSKA, L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. **Brain Res.**, **233**: 227-40, 1982.
- LUBINSKA, L. The influence of the state of the peripheral stump on early stages of nerve regeneration. **Acta Biol Exp. (Warsaw)**, **16**: 55-63, 1952.
- LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. **Acta Orthop. Scand.**, **58**: 145-69, 1987.
- LUNDBORG, G. & HANSSON, H.A. Regeneration of peripheral nerve through a preformed tissue space. Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibers in perineurium. **Brain Res.**, **178**: 573-6, 1979.
- LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. **Exp. Neurol.**, **76**: 361-75, 1982b.
- LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.P.; HANSSON, H.A.; LARSSON, K. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium and epineurium in preformed mesothelial tubes-an experimental study on the sciatic nerve of rats. **J. Neurosci. Res.**, **6**: 265-81, 1981.
- LUNDBORG, G.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. *In vivo* regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **41**: 412-22, 1982c.
- LUNDBORG, G.; LONGO, F.M.; VARON, S. Nerve regeneration model and trophic factors *in vivo*. **Brain Res.**, **232**: 157-61, 1982a.
- LUNN, E.R.; BROWN, M.C.; PERRY, V.H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neuroscience**, **35**: 157-65, 1990.
- MACKAY, B.; MUIR, A.R.; PETERS, A. Observations on the terminal innervation of segmental muscle fibers in amphibia. **Acta Anat.**, **40**: 1-12, 1960.

- MACKINNON, S.E. & DELLON, A.L. A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (Collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 10 mm in the primate. **J. Reconstr. Microsurg.**, **6**: 117-21, 1990.
- MADISON, R.; DA-SILVA, C.F.; DIKKES, P.; SIDMAN, R.L.; CHIU, T.-H. Peripheral nerve regeneration with entubulation repair: comparison of biodegradable nerve guides versus polyethylene tubes and the effects of a laminin-containing gel. **Exp. Neurol.**, **95**: 378-90, 1987.
- MADISON, R.D.; DA-SILVA, C.F.; DIKKES, P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. **Brain Res.**, **447**: 325-34, 1988.
- MADISON, R.D.; 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.**, **88**: 767-72, 1985.
- MADISON, R.D.; SIDMAN, R.L.; NYILAS, E.; CHIU, T.H.; GREATOREX, D. Nontoxic nerve guide tubes support neovascular growth in transected rat optic nerve. **Exp. Neurol.**, **86**: 448-61, 1984.
- MANOLOV, S. Initial changes in the neuromuscular synapses of denervated rat diaphragm. **Brain Res.**, **65**: 303-16, 1974.
- MANTHORPE, M.; ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E.; LONGO, F.M.; DAVIS, G.E.; VARON, S. Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. **J. Cell Biol.**, **97**: 1882-90, 1983.
- MARQUES, M.J. Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares. São Paulo, 1992. 140p. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. São Paulo].
- MARSHALL, L.M.; SANES, J.R.; MCMAHAN, U.J. Reinnervation of original synaptic sites on muscle fiber basement membrane after disruption of the muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **74**: 3073-7, 1977.
- MARTINI, R. & SCHACHNER, M. Immuno-electron microscopic localization of neural cell adhesion molecules. (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. **J. Cell Biol.**, **106**: 1735-46, 1988.

- MATTHEWS-BELLINGER, J. & SALPETER, M.M. Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. **J. Physiol. (Lond.)**, **279**: 197-213, 1978.
- MATTSON, D.D.; ALEXANDER, E.; WEISS, P. Experiments on bridging of gaps in severed peripheral nerves. **J. Neurosurg.**, **5**: 230-48, 1948.
- MCARDLE, J.J. Complex endplate potentials at regenerating neuromuscular junctions of the rat. **Exp. Neurol.**, **49**: 629-38, 1975.
- MCLENNAN, I.S. Neural dependence and independence of myotube production in chicken hindlimb muscles. **Dev. Biol.**, **98**: 287-94, 1983.
- MCMAHAN, U.J. & WALLACE, B.G. Molecules in basal lamina that direct the formation of synaptic specializations at neuromuscular junctions. **Dev. Neurosci.**, **11**: 227-47, 1989.
- MCMAHAN, U.J.; SANES, J.R.; MARSHALL, L.M. Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. **Nature**, **271**: 172-4, 1978.
- MCQUARRIE, I.G. Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of Ranvier. **J. Comp. Neurol.** **231**: 239-49, 1985.
- MELLER, K. Early structural changes in the axoplasmic cytoskeleton after axotomy studied by cryofixation. **Cell Tissue Res.**, **250**: 663-72, 1987.
- MERLIE, J.P. & SANES, J.R. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. **Nature**, **317**: 66-8, 1985.
- MILEDI, R. Junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibers. **J. Physiol. (Lond.)**, **151**: 24-30, 1960.
- MILEDI, R. & SLATER, C.R. Electrophysiology and electron microscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, **169**: 289-306, 1968.
- MILEDI, B. & SLATER, C.R. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. **J. Physiol. (Lond.)**, **207**: 507-28, 1970.

- MILLER, F.D.; TETZLAFF, W.; BISBY, M.A.; FAWCETT, J.W.; MILNER, R.J. Rapid induction of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha 1, during nerve regeneration in adult rats. **J. Neurosci.**, **9**: 1452-63, 1989.
- MOLANDER, H.; ENKVIST, O.; HAGGLUND, J.; OLSSON, Y.; TOREBJÖRK, E. Nerve repair using a polyglactin tube and nerve graft: An experimental study in the rabbit. **Biomaterials**, **4**: 276-80, 1983.
- MOLANDER, H.; OLSSON, Y.; ENKVIST, O.; BOWALD, S.; ERIKSSON, I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. **Muscle & Nerve**, **5**: 54-7, 1982.
- MOODY-CORBETT, F. Formation of the vertebrate neuromuscular junction. In: DEVELOPMENTAL biology. Ed. L.W. Browder. New York, 1986. p 605-35.
- MOODY-CORBETT, F. & COHEN, M.W. Influence of nerve on the formation and survival of acetylcholine receptor and choline esterase patches on embryonic *Xenopus* muscle cells in culture. **J. Neurosci.**, **2**: 636-46, 1982.
- MORRIS, D.G. Development of functional motor innervation in supernumerary hindlimbs of the chick embryo. **J. Neurophysiol.**, **41**: 1450-65, 1978.
- MORRIS, J.H.; HUDSON, A.R.; WENDDELL, G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. I. The traumatic degeneration of myelin in the proximal stump of the divided nerve. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, **124**: 76-102, 1972.
- MORRISON-GRAHAM, K. An anatomical and electrophysiological study of synapse elimination at the developing frog neuromuscular junction. **Dev. Biol.**, **99**: 298-311, 1983.
- NARUSAWA, M.; FITZSIMONS, R.B.; IZUMO, S.; NADAL- GINARD, B.; RUBINSTEIN, N.A.; KELLY, A.M. Slow myosin in developing rat skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, **104**: 447-59, 1987.
- NEW, H.V. & MUDGE, A.W. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. **Nature**, **323**: 809-11, 1986.
- NITKIN, R.M. & ROTHSCCHILD, T.C. Agrin-induced reorganization of extracellular matrix components on cultured myotubes: relationship to AChR aggregation. **J. Cell Biol.**, **111**: 1161-70, 1990.

- NITKIN, R.M.; SMITH, M.A.; MAGILL, C.; FALLON, J.R.; YAO, Y.-M.M.; WALLACE, B.G.; MCMAHAN, U.J. Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. **J. Cell Biol.**, **105**: 2471-8, 1987.
- NUDELL, B.M. & GRINNELL, A.D. Inverse relationship between transmitter release and terminal length in synapses on frog muscle fibres of uniform input resistance. **J. Neurosci.**, **2**: 216-24, 1982.
- NUDELL, B.M. & GRINNELL, A.D. Regulation of synaptic position, size, and strength in anuran skeletal muscle. **J. Neurosci.**, **3**: 161-76, 1983.
- NYILAS, E.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L.; HENSEY, E.W.; BRUSCHART, T.M.; KIKKER, P.; MADISON, R. Peripheral nerve repair with bioresorbable prosthesis. **Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs**, **29**: 307-13, 1983.
- O'BRIEN, R.A.D.; OSTBERG, A.J.; VRBOVA, G. Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. **J. Physiol. (Lond.)**, **282**: 571-82, 1978.
- ONTELL, M. & KOZEKA, K. The organogenesis of murine striated muscle: A cytoarchitectural study. **Am. J. Anat.**, **171**: 133-48, 1984.
- PACHTER, B.R. & EBERSTEIN, A. Neuromuscular plasticity following limb immobilization. **J. Neurocytol.**, **13**: 1013-25, 1984.
- PACHTER, B. & EBERSTEIN, A. Nerve sprouting and endplate growth induced in normal muscle by contralateral partial denervation of rat plantaris. **Brain Res.**, **560**: 311-4, 1991.
- PAVLATH, G.K.; RICH, K.; WEBSTER, S.G. & BLAU, H.M. Localization of muscle gene products in nuclear domains. **Nature**, **337**: 570-3, 1989.
- PENG, B. & NAKAJIMA, Y. Membrane particle aggregates in innervated and non-innervated cultures of *Xenopus* embryonic muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **75**: 500-4, 1978.
- PEPER K. & MCMAHAN, U.J. Distribution of acetylcholine receptors in the vicinity of nerve terminals on skeletal muscle of the frog. **Proc. R. Soc. London B.**, **181**: 431-40, 1972.

- PEREIRA, F.C. & DA-SILVA, C.F. Regeneração de nervos no interior de próteses tubulares de colágeno e extrato de membrana basal. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7. Caxambu, 26 a 29 de agosto, 1992. Resumo 1.144. p. 38.
- 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.**, **165**: 1218-23, 1987.
- PESTRONK, A. & DRACHMAN, D.B. Effect of botulinum toxin on trophic regulation of acetylcholine receptors. **Nature**, **264**: 787-89, 1976.
- PESTRONK, A. & DRACHMAN, D.B. Motor nerve sprouting and acetylcholine receptors. **Science**, **199**: 1223-5, 1978.
- PESTRONK, A. & DRACHMAN, D.B. A new stain for quantitative measurement of sprouting at neuromuscular junctions. **Muscle & Nerve**, **1**: 70-4, 1978.
- PESTRONK, A. & DRACHMAN, D.B. Motor nerve outgrowth: reduced capacity for sprouting in the terminals of longer axons. **Brain Res.**, **463**: 218-22, 1988.
- PESTRONK, A.; DRACHMAN, D.B.; GRIFFIN, J.W. Effect of angling on nerve sprouting and regeneration. **Exp. Neurol.**, **70**: 65-82, 1980.
- PORTER, C.W. & BARNARD, E.A., The density of cholinergic receptors at the endplate postsynaptic membrane: Ultrastructural studies in two mammalian species. **J. Membrane Biol.**, **20**: 31-49, 1975.
- PULLIAN, D.L. & APRIL, E.W. Degenerative changes at the neuromuscular junction of red, white and intermediate muscle fibers. I. Response to short stump nerve section. **J. Neurol. Sci.**, **43**: 205-22, 1979a.
- PULLIAN, D.L. & APRIL, E.W. Degenerative changes at the neuromuscular junction of red, white and intermediate muscle fibers. I. Response to long stump nerve section and colchicine treatment. **J. Neurol. Sci.**, **43**: 223-41, 1979b.
- PUMPLIN, D.W. & FAMBROUGH, D.M. Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. **Annu. Rev. Physiol.**, **44**: 319-36, 1982.

PURVES, D. & LICHTMAN, J.W. Rearrangement of developing neuronal connections. In: PRINCIPLES of neural development. Sunderland, Sinauer, 1985. p 271-300.

PURVES, D. & LICHTMAN, J.W. The formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. **Physiol . Rev.**, **58**: 821-62, 1978.

RAIVICH, G. & KREUTZBERG, G.W. Expression of growth factor receptors in injured nervous tissue. I. Axotomy leads to a shift in the cellular distribution of specific beta-nerve growth factor binding in the injured and regeneration PNS. **J. Neurocytol.**, **16**: 689-700, 1987.

RASH, J.E. & ELLISMAN, M.H. Studies of excitable membranes. I. Macromolecular specialization of the neuromuscular junction and the nonjunctional sarcolemma. **J. Cell Biol.**, **63**: 567-86, 1974.

REID, R.L.; CUTRIGHT, D.E.; GARRISON, J.S. Biodegradable cuff as an adjunct to peripheral nerve repair: a study in dogs. **Hand**, **10**: 259-66, 1978.

RESTREPO, Y.; MERLE, M.; MICHON, J.; FOLLIGUET, B.; PETRY, A. Fascicular nerve graft using an empty perineurial tube: An experimental study in the rabbit. **Microsurgery**, **4**: 105-12, 1983.

RICE, D.H. & BERSTEIN, F.D. The use of autogenous vein for nerve grafting. **Otol. Head Neck Surg.**, **92**: 410-2, 1984.

RICH, M.M. & LICHTMAN, J.W. *In vivo* visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. **J. Neurosci.**, **9**: 1781-805, 1989.

RICH, M.M. & LICHTMAN, J.W. Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers. **Neuron**, **3**: 677-88, 1989.

RILEY, D.A. Multiple innervation of fiber types in the soleus muscles of postnatal rats. **Exp. Neurol.**, **5**: 400-9, 1977.

ROBBINS, N. Plasticity of adult neuromuscular junctions. In: NERVE-MUSCLE cell trophic communication. Ed. H.L. Fernandez. Boca Raton, CRC Press, 1988. p. 200-15.

- ROGERS, S.L.; LETOURNEAU, P.C.; PALM, S.L.; MCCARTHY, J.; FURCHT, L.T. Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. **Dev. Biol.**, **98**: 212-20, 1983.
- ROMANES, G.J. The motor cell columns of the lumbrosacral spinal cord of the cat. **J. Comp. Neurol.** **94**: 313-64, 1951.
- ROSEN, J.M.; KAPLAN, E.N.; JEWETT, D.L. Fascicular sutureless and suture repair of the peripheral nerves. A comparison study in laboratory animals. **Orthop. Rev.**, **8**: 85, 1979.
- ROSEN, J.M.; KAPLAN, E.N.; JEWETT, D.L. Suture and sutureless methods of repairing experimental nerve injuries. In: NERVE repair and regeneration: its clinical and experimental basis. Eds. D.L. Jewet, H.R. McCarrol. St Louis, Mosby, 1980. p. 235-42.
- ROSENTHAL, J.L. & TARASKEVICH, P.S. Reduction of multi-axonal innervation at the neuromuscular junction of the rat during development. **J. Physiol. (Lond.)**, **270**: 299-310, 1977.
- ROSS, J.J.; DUXSON, M.J.; HARRIS, A.J. Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. **Development**, **100**: 383-94, 1987a.
- ROSS, J.J.; DUXSON, M.J.; HARRIS, A.J. Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles. **Development**, **100**: 395-409, 1987b.
- ROTSHENKER, S. & MCMAHAN, U.J. Altered patterns of innervation in frog muscle after denervation. **J. Neurocytol.**, **5**: 719-30, 1976.
- ROTSHENKER, S. & TAL, M. The transneuronal induction of sprouting and synapse formation in intact mouse muscles. **J. Physiol. (Lond.)**, **360**: 387-96, 1985.
- RUBIN, E. Development of the rat superior cervical ganlion: Ingrowth of preganglionic axons. **J. Neurosci.**, **5**: 685-96, 1985b.
- RUTISHAUSER, U. Developmental biology of a neural cell adhesion molecule. **Nature**, **310**: 549-54, 1984.

- RUTISHAUSER, U.; GRUMET, M.; EDELMAN, G.M. Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cell in culture. **J. Cell Biol.**, **97**: 145-52, 1983.
- SALZER J.L.; WILLIAMS, A.K.; GLASER, L.; BUNGE, R.P. Studies of Schwann cell proliferation. II. Characterization of the stimulation and specificity of the response to a neurite membrane fraction. **J. Cell Biol.**, **84**: 753-66, 1980.
- SALZER, J.L. & BUNGE, R.P. Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration and direct injury. **J. Cell Biol.**, **84**: 739-51, 1980.
- SANES, J.R. Laminin, fibronectin and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. **J. Cell Biol.**, **93**: 442-51, 1982.
- SANES, J.R. Roles of extracellular matrix in neural development. **Annu. Rev. Physiol.**, **45**: 581-600, 1983.
- SANES, J.R. Extracellular matrix molecules that influence neural development. **Ann. Rev. Neurosci.**, **12**: 491-516, 1989.
- SANES, J.R. & HALL, Z.W. Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. **J. Cell Biol.**, **83**: 357-70, 1979.
- SANES, J.R.; MARSHALL, L.M.; MCMAHAN, U.J. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. **J. Cell Biol.**, **78**: 176-98, 1978.
- SANES, J.R.; ENGVALL, E.; BUTKOWSKI, R.; HUNTER, D.D. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. **J. Cell Biol.**, **111**: 1685-99, 1990.
- SANES, J.R.; HUNTER, D.D.; GREEN, T.L.; MERLIE, J.P. S-Laminin. **Cold Spring Harbor Symp. Quant.**, **55**: 419-30, 1990.
- SCARAVILLI, F. Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in a nerve encased in a plastic tube. **J. Anat.**, **139**: 411-24, 1984a.
- SCARAVILLI, F. The influence of distal environment on peripheral nerve regeneration across a gap. **J. Neurocytol.**, **13**: 1027-41, 1984b.

- SCHEIDT P. & FRIEDE, R.L. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration. Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. **Acta Neuropathol.**, **75**: 77-84, 1987.
- SCHLAEPFER, W.W. & MICKO, S. Chemical and structural changes of neurofilaments in transected rat sciatic nerve. **J. Cell Biol.** **78**: 369-78, 1978.
- SCOTT, S.A. The development of the segmental pattern of skin sensory innervation in the embryonic chick hindlimb. **J. Physiol. (Lond.)**, **303**: 203-20, 1982.
- SEILHEIMER, B. & SCHACHNER, M. Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. **J. Cell Biol.**, **107**: 341-51, 1988.
- SKENE, J.H.P. & SHOOTER, E.M. Denervated sheath cells secrete a new protein after nerve injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **80**: 4169-73, 1983.
- SLACK, J.R.; HOPKINS, W.G.; WILLIAMS, M.N. Nerve sheaths and motoneurone collateral sprouting. **Nature**, **282**: 506-7, 1979.
- SMITH, C.G. & HOLLYDAY, M. The development of postnatal organization of motor nuclei in the rat spinal cord. **J. Comp. Neurol.**, 1983, 1984.
- SOHA, J.M.; YO, C.; VAN ESSEN, D.C. Synapse elimination by fiber type and maturational state in rabbit soleus muscle. **Dev. Biol.**, **123**: 136-44, 1987.
- SPIRO, R.G. Basement membranes and collagens. In: GLYCOPROTEINS. Ed. A. Gottschalk. Amsterdam, Elsevier, 1972. p. 964-99.
- 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*). São Paulo, 1992. 117p. [Tese Livre-Docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Univ. de São Paulo].
- STRAZNICKY, K. The development of the innervation and the musculature of wings innervated by thoracic nerves. **Acta Biol. Acad. Sci. Hung.**, **18**: 437-48, 1967.

- SUNDERLAND, S. Degeneration of the axon and associated changes. In: NERVES and nerve injuries. 2 ed. Ed. S. Sunderland. Edinburgh, Churchill Living-stone, 1978. p. 82-107.
- TAKAMI, K.; KAWAI, Y.; SHIOSAKA, S.; LEE, Y.; GIRSIS, S.H.; HILLYARD, C.J.; MACINTYRE, I.; EMSON, P.C.; TOHYAMA, M. Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide- and choline acetyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei. **Brain Res.**, **328**: 386-9, 1985b.
- TAKAMI, K.; KAWAI, Y.; UCHIDA, S.; TOHIYAMA, M.; SHIOTANI, Y.; YOSHIDA, H.; EMSON, P.C.; GIRSIS, S.H.; HILLYARD, C.J.; MACINTYRE, I. Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. **Neurosci. Lett.**, **60**: 227-30, 1985a
- TANIUCHI, M.; CLARK, H.B.; SCHWEITZER, J.B.; JOHNSON, E.M.JR. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. **J. Neurosci.**, **8**: 664-81, 1986.
- TATE, K. & WESTERMAN, R.A. Polyneuronal self-reinnervation of a slow twitch muscle (soleus) in the cat. **Proc. Aust. Phys. Pharm. Soc.**, **4**: 174-5, 1973.
- TAXT, T. Local and systemic effects of tetrodo-toxin on the formation and elimination of synapses in reinnervated adult rat muscle. **J. Physiol. (Lond.)**, **340**: 175-94, 1983.
- TELLO, J. F. Genesis de las terminaciones nerviosas motices y sensitivas. I En el sistema locomotor de los vertebratos superiores histogenesis muscular. **Trab. Lab Invest. Biol. Madrid.**, **15**: 101-99, 1917.
- TERAVAINEN, H. Development of the myoneural junction in the rat. **Z. Zellerforsch.** **87**: 249-65, 1968.
- THOMAS, P.K. The cellular response to injury. 1. The cellular outgrowth from the distal stump of transected nerve. **J. Anat.**, **100**: 287-303, 1966.
- THOMPSON, W.J. Reinnervation of partially denervated rat soleus muscle. **Acta Physiol. Scand.**, **103**: 81-91, 1978.

- THOMPSON, W. & JANSEN, J.K.S. The extent of sprouting of remaining motor units in partly denervated immature and adult rat soleus muscles. **Neuroscience**, **2**: 523-35, 1977.
- THOMPSON, W.J.; CONDON, K.; ASTROW, S.H. The origin and selective innervation of early muscle fiber types in the rat. **J. Neurobiol.**, **21**: 212-22, 1990.
- TIMPL, R.; ENGEL, J.; MARTIN, G.R. Laminin - a multifunctional protein of basement membranes. **Trends Biochem. Sci.**, **8**: 207-9, 1983.
- TOFT, P.B. & FUGLEHOLM, K. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. **MUSCLE & NERVE**, **11**: 880-5, 1988.
- TOMAS, J.; FENOLL, R.; MAYAYO, E.; SANTAFÉ, M. Branching pattern of the motor nerve endings in a skeletal muscle of the adult rat. **J. Anat.**, **168**: 123-35, 1990.
- TORVIK, A. & SOREIDE, A.J. The perineuronal glial reaction after axotomy. **Brain Res.**, **95**: 519-29, 1976.
- TOSNEY, K.W. Proximal tissues and patterned neurite outgrowth at the lumbosacral level of the chick embryo: Partial and complete deletion of the somite. **Dev. Biol.** **127**: 266-86, 1988.
- TOSNEY, K.W.; WATANABE, M.; LANDMESSER, L.; RUTISHAUSER, U. The distribution of N-CAM in the chick hindlimb during axons outgrowth and synaptogenesis. **Dev. Biol.** **114**: 437-52, 1986.
- TOYOTA, B.; CARABONETTO, S.; DAVID, S. Involvement of laminin in nerve regeneration *in vivo*. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **14**, 498, 1988.
- TRUSSEL, L.O. & GRINNELL, A.D. The regulation of synaptic strength within motor units of the frog cutaneous pectoris muscle. **J. Neurosci.**, **5**: 243-54, 1985.
- TUFFERY, R.A. Growth and degeneration of motor end-plates in normal cat hind limb muscles. **J. Anat.**, **110**: 221-47, 1971.

UMESU, Y.; YOSHIZUKA, M.; UEDA, H.; OGATA, H.; FUJIMOTO, S.
Acetylcholinesterase activity of developing muscles in the lower limb of the rat.
Acta Anat., **138**: 332-40, 1990.

UZMAN, B.G. & VILLEGAS, G.M. Mouse sciatic nerve regeneration through semipermeable tubes: a quantitative model. **J. Neurosci. Res.**, **9**: 325-38, 1983.

VAN ESSEN, D.C. Neuromuscular synapse elimination. In: **NEURONAL development**. Ed. N.C. Spitzer. New York, Plenum Press, 1982. p. 333-76.

VAN HARREVELD, A. Reinnervation of denervated muscle fibers by adjacent functioning motor units. **Am. J. Physiol.**, **144**: 447-93, 1945.

VANLAIR, C. De la regeneration des nerfs peripheriques par le procede de la suture tubulaire. **Arch. Biol., Paris** **3**: 379-496, 1882.

VOGEL, Z.; SYTKOWSKI, A.J.; NIRENBERG, M.W. Acetylcholine receptors of muscle cells grown *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **69**: 3180-4, 1972.

VON BÜNGNER, O. Ueber die degenerations und regenerationsvorgänge an nerven nach verletzungen. **Beitr. Pathol. Anat.**, **10**: 321-93, 1891.

WALLACE, B.G. Aggregating factor from Torpedo electric organ induces patches containing acetylcholine receptors acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase on culture myotubes. **J. Cell Biol.**, **107**: 783-94, 1986.

WALLER, A.V. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. **Philos. Trans. R. Soc. London, B.**, **140**: 423-9, 1850.

WATSON, W.E. Cellular responses to axotomy and to related procedures. **Br. Med. Bull.**, **30**: 112-5, 1974.

WEAKLY, J.N. & YAO, Y.-M. Synaptic efficacy at singly- and dualli-innervated neuromuscular junctions in the frog, *Rana pipiens*. **Brain Res.**, **273**: 319-23, 1983.

- WEBSTER, H.F. Transient focal accumulation of axonal of axonal mitochondria during the early stages of Wallerian degeneration. **J. Cell Biol.**, **12**: 361-83, 1962.
- WECHSLER, W. & HAGER, H. Elektronmikroskopische befunde zur feinstruktur von axonveränderungen in regenerierenden nervenfasern des nervus ischiadicus der weissen ratte. **Acta Neuropathol.**, **1**: 489-506, 1962.
- WEHRMACHER, W.H. & HINES, H.M. The rocovery of skeletal muscle from the effects of partial denervation. **Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, **4**: 75-6, 1945.
- WEISS, P. Experiments on nerve repair. **Trans. Am. Neurol. Assoc.**, **1943**: 42-45, 1943.
- WEISS, P. The technology of nerve regeneration.: A review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. **J. Neurosurg.**, **1**: 400-50, 1944b.
- WEISS, P. & DAVIS, H. Pressure block in nerves provided with arterial sleeves. **J. Neurophysiol.**, **6**: 269-86, 1943.
- WEISS, P. & EDDS, M.V. Spontaneous recovery of muscle following partial denervation. **Am. J. Physiol.**, **145**: 587-607, 1946.
- WEISS, P. & TAYLOR, A.C. Further evidence against "neurotropism" in nerve regeneration. **J. Exp. Zool.**, **95**: 233-57, 1944.
- WEISS, P. & TAYLOR, A.C. Guides for nerve regeneration across gaps. **J. Neurosurg.**, **3**: 375-89, 1946.
- WERD, L. Ueberbrückungeines nervendefektes mittels seidennaht und lebenden venenstückes. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, **35**: 1125, 1909.
- WERLE, M.J. & HERRERA, A.A. Sprouting and remodelling at the nerve-muscle junction. **Prog. Neurobiol.**, **27**: 251-91, 1986.
- WERLE, M.J. & HERRERA, A.A. Synaptic competition and the persistence of polyneuronal innervation at frog neuromuscular junctions. **J. Neurobiol.**, **18**: 375-89, 1987.

- WERLE, M.J. & HERRERA, A.A. Synaptic competition and the elimination of polyneuronal innervation following reinnervation of adult frog sartorius muscle. **J. Neurobiol.**, **19**: 465-81, 1988.
- WERNIG, A.; PÉCOT-DECHAVASSINE, M.; STOVER, H. Sprouting and repression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare. **J. Neurocytol.**, **9**: 277-303, 1980a.
- WEYDERT, A.; BARTON, P.; HARRIS, A.J.; PINSET, C.; BUCKINGRAM, M. Developmental pattern of inhouse skeletal myosin heavy chain gene transcripts *in vivo* and *in vitro*. **Cell**, **29**: 121-9, 1987.
- WIGSTON, D.J. Remodeling of neuromuscular junctions in adult mouse soleus. **J. Neurosci.**, **9**: 639-47, 1989.
- WIGSTON, D.J. Tug-of-war at the neuromuscular junction. **Trends Neurosci.**, **13**: 310-2, 1990.
- WILLIAMS, L.R.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chambers:Parameters for a bioassay. **J. Comp. Neurol.**, **218**: 460-70, 1983.
- WILLIAMS, L.R.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Competence of nerve tissue as distal insert promoting nerve regeneration in silicone chambers. **Brain Res.**, **293**: 201-11, 1984.
- WILLIAMS, L.R.; DANIELSEN, N.; MULLER, H.; VARON, S. Exogenous matrix precursors promote functional nerve regeneration across a 15 mm gap within a silicone chamber in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **264**: 284-90, 1987.
- WILLIAMS, P.E. & GOLDSPINK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. **J. Anat.**, **116**: 45-55, 1971.
- WILLIAMS, P.L. & HALL, S.M. Chronic Wallerian degeneration - an *in vivo* and ultrastructural study. **J. Anat.**, **109**: 487-503, 1971.
- WINLOW, W. & USHERWOOD, P.N.R. Ultrastructural studies of normal and degenerating mouse neuromuscular junctions. **J. Neurocytol.**, **4**: 377-, 1975.

- XIE, Z.P. & POO, M.-M. Initial events in the formation of neuromuscular synapse: Rapid induction of acetylcholine release from embryonic neuron. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **83**: 7069-73, 1986.
- YAWO, H. & KUNO, M. How a nerve fiber repairs its cut end: Involvement of phospholipase A2. **Science**, **222**: 1351-53, 1983.
- ZACKS, S.I. The motor endplate. New York, Krieger, 1973.
- ZISKIND-CONHAIM, L.; GEFFEN, I.; HALL, Z.W. Redistribution of acetylcholine receptors on developing rat myotubes. **J. Neurosci.**, **4**: 2346-9, 1984.

ABSTRACT

The aim of the present study was to quantify the reestablishment of the neuromuscular junctions using the technique of entubulation repair as a paradigm to study peripheral nerve regeneration. Sixteen adult male C57BL/6J mice received sciatic nerve transection at mid-thigh level and both proximal and distal nerves stumps were sutured into a 6 mm long polyethylene tube, ID 0.76 mm, to bridge a final nerve gap distance of 4 mm. Following 2 to 40 weeks after surgery, animals were perfused with fixative and the EDL muscle from the operated side was removed and processed histochemically for visualization of both cholinesterase sites and nerve fibers according to the protocol of Pestronk & Drachman (Muscle & Nerve, 1:70, 1978). Sixteen additional animals suffered sciatic nerve crush and were treated in the same fashion for comparison. A total of 2800 randomly selected synaptic areas were classified according to their innervation pattern. For morphometric analysis, camera lucida drawings of impregnated terminals were made and, with the aid of a computer system, the following parameters were evaluated: number of branching points of terminal arborization, and total length of terminal arborization from the first branching point. Two weeks after nerve transection and repair, the EDL muscle was entirely denervated; axons were completely absent from the muscle and the original endplate sites could still be located by the presence of histochemical reaction product. After six weeks the muscle was reinnervated and axon sprouting among the muscle fibers led to polyinnervation of the EDL muscle. Sprout and synapse regeneration were followed by partial repression of the redundant innervation, which by 40 weeks after nerve entubulation led to monoinnervation of 80% of the muscle fibers. At this time, 80% of the endplates were monoinnervated by axons coming from the nerve trunk (a situation found in all muscle fibers of the EDL muscle from non-operated animals). Data from the morphometric analysis showed no difference in the nerve terminal branching pattern between non-operated and entubulized animals. It is noteworthy that the same ratio of mono to polyinnervated fibers (4:1) was also found in animals with the same survival time (40 weeks) in which the sciatic nerve was simply severed by crushing. These results show a similar pattern of long term muscle reinnervation after nerve transection with entubulation repair and crush lesion.