Discussão

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**AÇÕES DAS NEUROCINAS CNTF E IL-6 EXÓGENAS NA
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA**

Candidato: Francisco Carlos Pereira
Orientador: Prof. Dr. Ciro Ferreira Da-Silva

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Psicologia.
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

SÃO PAULO
1998

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, F.C.

Ações das neuroquinas CNTF e IL-6 exógenas na regeneração nervosa periférica. / Francisco Carlos Pereira.- São Paulo : s.n., 1998. 79p.

Tese (doutorado) - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. Núcleo de Pesquisa em Neurociências e Comportamento.

Orientador: Ciro Ferreira Da-Silva

1. Sistema nervoso periférico 2. Regeneração nervosa 3. Fator neurotrófico ciliar 4. Interleucinas 5. Citocinas I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

AÇÕES DAS NEUROCINAS CNTF E IL-6 EXÓGENAS NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA

Candidato: Francisco Carlos Pereira
Orientador: Prof. Dr. Ciro Ferreira Da-Silva

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Psicologia.
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado
em sessão publica realizada em / /19 , considerou o(a) candidato(a)
aprovado(a).

1º) Examinador: _____

2º) Examinador: _____

3º) Examinador: _____

4º) Examinador: _____

5º) Examinador: _____

A
JULIA e MIRIAM,
com muito carinho.

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.

A todos amigos e amigas da pós-graduação em especial RAQUEL DIAS LAINETTI e RAQUEL SIMONE PIRES pelo apoio e incentivo durante estes anos.

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

À Sra. ROSANA DUARTE PRISCO do Serviço de Informática e Análise de Dados do ICB da USP, pela orientação recebida na elaboração da análise estatística empregada neste trabalho.

Aos funcionários e estagiários do Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica (SBiB) ICB da USP, pelo apoio e dedicação sempre prestados no auxílio em busca das referências bibliográficas para a elaboração deste trabalho.

A todos os funcionários e amigos do Departamento Histologia e Embriologia do ICB da USP.

A todos os funcionários, amigos e colegas do Departamento de Anatomia do ICB da USP.

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)**

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	01
REVISÃO DA LITERATURA.....	04
1. Formação e Estrutura do Nervo Espinhal.....	05
2. Lesão Nervosa Periférica	06
2.1. Alterações na Porção Distal à Lesão	06
2.2. Alterações na Porção Proximal à Lesão	07
2.3. Eventos da Regeneração Nervosa Periférica	08
3. Microambiente da Regeneração Nervosa Periférica.....	08
4. Moléculas de Adesão	09
4.1. Adesão entre Células de Schwann e Axônios	09
4.1.1. Família das Imunoglobulinas	09
4.1.2. Família das Caderinas.....	10
4.2. Adesão entre Lâmina Basal e Axônios	11
5. Citocinas	12
5.1. Neurotrofinas.....	13
5.2. Neuropoetinas ou Neuroquinas	14
5.2.1. Fator Inibitório de Leucemia (LIF)	14
5.2.2. Cardiotrofina 1 (CT-1)	15
5.2.3. Oncostatina M (OsM)	15
5.2.4. Atividade Promotora de Crescimento (GPA)	16
5.2.5. Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF)	16
5.2.5.1. Ações do CNTF	17
5.2.5.1.1. Na Sobrevivência de Neurônios Embrionários	
<i>In Vitro</i>	17
5.2.5.1.2. Na Diferenciação de Neurônios <i>In Vitro</i>	18
5.2.5.1.3. Na Diferenciação de Neurônios <i>In Vivo</i>	18
5.2.5.1.4. Possíveis Funções do CNTF no Sistema	
Nervoso Normal	19
5.2.6. Interleucina 6 (IL-6).....	19
5.3. Receptores das Neuroquinas CNTF e IL-6	20
6. Técnica de Tubulização.....	22
6.1. Vantagens no Uso da Técnica de Tubulização.....	23
6.2. Eventos Observados com o Uso da Técnica de Tubulização	24

MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com Solução de CNTF	28
2. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com Solução de IL-6.....	28
3. Procedimentos Cirúrgicos	28
4. Processamento para Microscopia de Luz.....	30
4.1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com CNTF	30
4.1.1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com CNTF e Avaliados com o Traçador HRP	31
4.2. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com Solução de IL-6.....	32
5. Análise Quantitativa dos Nervos Regenerados	33
6. Análise Quantitativa dos Neurônios Sensitivos e Motores Marcados com HRP	34
7. Análise Quantitativa dos Neurônios Sensitivos Presentes em Cortes de Historesina.....	34
8. Tratamento Estatístico.....	35
RESULTADOS	36
1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com CNTF	37
1.1. Dados Qualitativos	37
1.2. Dados Quantitativos	38
1.2.1. Número de Axônios Mielínicos.....	38
1.2.2. Número de Neurônios Motores.....	39
1.2.3. Número de Neurônios Sensitivos dos Gânglios das Raízes Dorsais.....	40
2. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com IL-6	40
2.1. Dados Qualitativos	40
2.2. Dados Quantitativos	41
2.2.1. Número de Axônios Mielínicos.....	41
2.2.2. Número de Neurônios Sensitivos do Gânglio da Raiz Dorsal L5.....	41
DISCUSSÃO	42
Efeito das Neuroquinas CNTF e IL-6 sobre a Regeneração de Neurônios Sensitivos....	45
Efeito do CNTF sobre a Regeneração de Neurônios Motores.....	46
Efeito do CNTF e da IL-6 sobre o Número de Axônios Mielínicos Regenerados	53
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Abstract

Francisco Carlos Pereira. Effects of Exogenous Ciliary Neurotrophic Factor and Interleukin-6 in Peripheral Nerve Regeneration, São Paulo, 1998, Thesis (Doctorate). Institute of Psychology, University of Sao Paulo.

We studied the actions of exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) and interleukin-6 (IL-6) on peripheral nerve regeneration. The sciatic nerve of 12 adult C57BL/6J mice (3 groups; $n=4$) was transected and both proximal and distal nerve stumps were secured by a single 10-0 suture into a 6-mm of a polyethylene tube (PT) (0,76 mm ID) to give a final gap length of 4mm. The PT were implanted empty or filled with one of the following solutions: (1) a purified preparation of collagen (Vitrogen, 2,4 mg/ml) plus phosphate buffer solution (0,2M), in 1:1 ratio; (2) Vitrogen + human recombinant CNTF (1:1, with 100 $\mu\text{g/ml}$ of CNTF/tube). After 6 weeks the tubes containing the regenerated nerve cables (**NC**) were processed for Epon embedding. Myelinated nerve fibers were counted from the mid-portion of the cables with a computer-controlled system (Biographics). CNTF injected mice regenerated significantly more myelinated axons (3027 ± 62 , mean $\pm$ SEM) compared to the animals implanted with tubes left empty (1384 ± 128) or filled with collagen alone (1639 ± 104). Next, 12 additional animals had the sciatic nerve transected and repaired as above. After 6 weeks, HRP was applied to the distal stump of the regenerated nerves and labeled neurons were counted in the spinal cord and $L_{4,5,6}$ dorsal root ganglia (**DRG**). No significant difference in the number of motoneurons was detected between the experimental (empty= 740 ± 21 ; collagen= 749 ± 44 ; CNTF= 790 ± 14) and non-operated (794 ± 30) animals. No difference was also found in the number of labeled DRG neurons among the experimental groups (empty= 1920 ± 59 ; collagen= 2262 ± 152 ; CNTF= 2124 ± 96) and all had fewer labeled sensory neurons compared to the non-operated group (4211 ± 96). For the IL-6 experiments, 12 C57BL/6J mice were divided into 2 groups ($n=6$) and implanted with PT filled with one of the following solutions: (1) Vitrogen (2,4 mg/ml) plus phosphate buffer solution (0,2 M), in 1:1 ratio; (2) Vitrogen + murine recombinant IL-6 (1:1, with 100 $\mu\text{g/ml}$ of IL-6/tube). Following a survival time of 6 weeks, the tubes with the regenerating nerve cables were processed for Epon embedding and myelinated nerve fiber counting. The results showed a significant difference in the number of myelinated axons between the collagen+IL-6 group (2025 ± 143) and the collagen alone group (1542 ± 122). The L_5 DRG was also removed from the same mice, and serially sectioned (5 μm) for sensory neuron counts. No significant difference was found in the number of DRG neurons between the experimental groups (collagen= 528 ± 42 ; collagen+IL-6= 554 ± 37). However, all had significantly fewer sensory neurons compared to the non-operated group (1112 ± 63). These results indicate that locally applied CNTF and IL-6 stimulate peripheral nerve regeneration in adult animals, and that the effects are due to a neurite-promoting activity on axotomized neurons.

RESUMO

Francisco Carlos Pereira. Ação das Neuroquinas CNTF e IL-6 exógenas na Regeneração Nervosa Periférica. São Paulo, 1998, Tese (Doutorado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

Foi estudada a ação do fator neurotrófico ciliar (CNTF) e da interleucina 6 (IL-6) exógenos na regeneração nervosa periférica. Aplicação de CNTF recombinante humano: o nervo ciático de 12 camundongos adultos C57BL/6J (3 grupos, n=4) foi seccionado e os cotos proximal e distal ancorados com ponto único de sutura no interior de tubo de polietileno (TP) com 6 mm de comprimento e 0,76 mm de diâmetro interno, com intervalo de 4 mm entre os cotos. Os TP foram implantados vazios ou preenchidos com uma das seguintes soluções: (1) colágeno (col.) purificado (Vitrogen, 2,4 mg/ml) em tampão fosfato (0,2M), na proporção de 1:1; (2) col.+CNTF (1:1, com 100 µg/ml de CNTF/tubo). Após 6 semanas os tubos contendo os cabos nervosos regenerados (CR) foram processados e incluídos em Epon. Fibras nervosas mielínicas foram contadas na porção média dos CR com um sistema controlado por computador (Biographics). Camundongos que receberam CNTF apresentaram número significativamente maior de axônios regenerados (3027 ± 62 , média $\pm$ erro padrão) em relação aos animais implantados com tubos vazios (1384 ± 128) ou preenchidos apenas com colágeno (1639 ± 104). Outros 12 animais adicionais tiveram o nervo ciático seccionado e reparado da mesma maneira. Após 6 semanas, um tubo contendo solução do traçador neuronal HRP foi implantado no coto distal do nervo. Decorrido um período suplementar de 3 dias, neurônios marcados foram contados na medula espinhal e nos gânglios das raízes dorsais L_{4,5,6}. Não houve diferença significativa no número de motoneurônios entre os diferentes grupos experimentais (vazio= 740 ± 21 ; col.= 749 ± 44 ; CNTF= 790 ± 14) e os animais não-operados (794 ± 30). Não houve também diferença significativa no número de neurônios sensitivos entre os diferentes grupos experimentais (vazio= 1920 ± 59 ; col.= 2262 ± 152 ; CNTF= 2124 ± 96) e todos apresentaram número menor de neurônios sensitivos quando comparados com os animais não operados (4211 ± 96). Aplicação de IL-6 recombinante murina: 12 camundongos C57BL/6J adultos foram divididos em dois grupos (n=6) e implantados com TP preenchidos com: (1) Vitrogen (2,4 mg/ml) e tampão fosfato (0,2 M), na proporção de 1:1; (2) Vitrogen + IL-6 (1:1, com 100 µg/ml de IL-6/tubo). Após tempo de sobrevivência de 6 semanas, os tubos com os CR foram processados da mesma forma que no experimento anterior. Fibras nervosas mielínicas foram contadas na porção média dos CR. Os resultados mostraram que os animais implantados com col.+IL-6 tinham número significativamente maior de axônios mielínicos (2025 ± 143) que os animais injetados apenas com col. (1542 ± 122). O gânglio L₅ foi também removido dos mesmos animais e cortado seriadamente (5µm), para posterior contagem do número de neurônios sensitivos. Não houve diferença significativa no número de neurônios sensitivos entre os grupos experimentais (col.= 528 ± 42 ; col.+IL-6= 554 ± 37); todos, no entanto, apresentaram número significativamente menor de neurônios sensitivos quando comparados com os animais não operados (1112 ± 63). Esses resultados indicam que a aplicação local de CNTF ou IL-6 estimula a regeneração de nervos seccionados e que este efeito é devido, provavelmente, a um aumento da taxa de brotamento dos axônios em regeneração.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A capacidade de regeneração do sistema nervoso tem sido estudada através de diferentes modelos experimentais. Condições favoráveis para a expressão do potencial de regeneração de neurônios são encontradas no sistema nervoso periférico, e seus fenômenos são conhecidos há décadas, tendo sido sistematizados por Santiago Ramon y Cajal nos anos vinte (Ramon Y Cajal, 1928). No entanto, aspectos celulares e moleculares da regeneração começaram a ser desvendados somente nos últimos anos.

O sistema nervoso periférico (**SNP**), ao contrário do sistema nervoso central (**SNC**), apresenta condições intrínsecas favoráveis à regeneração após a lesão em que ocorra perda considerável de substância. Acredita-se que essa diferença na capacidade regenerativa esteja na composição do microambiente dos nervos, onde a natureza da matriz extracelular e a ação das citocinas são fundamentais para o sucesso do processo de regeneração.

A capacidade de regeneração de nervos traumatizados é reconhecida de longa data. Avanços instrumentais e técnicos ocorridos nas últimas décadas têm contribuído consideravelmente para a melhora dos resultados da microcirurgia de nervos. No entanto, a recuperação funcional obtida é ainda incompleta. Na verdade, a abordagem cirúrgica do problema representa apenas o passo inicial de uma seqüência extremamente complexa de eventos celulares e moleculares, que visam a regeneração dos axônios atingidos pela lesão.

Nervos, ao contrário do sistema nervoso central, possuem as células de Schwann, um tipo especial de glia. Estas células apresentam, além da função de isolamento dos axônios, a capacidade de produzir uma membrana basal rica em substâncias direcionadoras do crescimento axonal, além de diversos fatores neurotróficos essenciais à manutenção da saúde neuronal. Deste modo, o conhecimento detalhado do microambiente de regeneração, seguido de sua manipulação farmacológica, constitui um caminho para os futuros progressos na regeneração funcional do SNP.

A técnica de tubulização (que consiste em fixar em aposição dentro de um tubo os cotos de nervos seccionado) é um dos modelos experimentais utilizados para o estudo de regeneração de nervos. Nosso laboratório, em particular, tem utilizado o implante de tubos sintéticos para o estudo da ação de substâncias exógenas na regeneração de nervos periféricos em roedores.

Nesse trabalho pretendemos avaliar as ações das neuroquinas CNTF e IL-6 exógenas na regeneração nervosa periférica de camundongos C57BL/6J, após a secção do nervo ciático e reparo imediato através da técnica de tubulização.

Revisão da Literatura

1. Formação e Estrutura do Nervo Espinhal

Neurônios motores formam uma coluna morfológicamente homogênea que, após cessarem o processo de divisão celular, emitem axônios para a metade anterior dos somitos. Do mesmo modo, as células da crista neural também migram para mesma região de cada somito, após emergirem do tubo neural, onde vão dar origem aos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (Ramon y Cajal, 1929; Romanes, 1951; Hollyday & Hamburger, 1977; Heaton et alii., 1978; Morris, 1978; Keynes et alii., 1996). Os prolongamentos periféricos dos neurônios sensitivos projetam-se desses gânglios e crescem ao longo das fibras motoras formando, com essas, os nervos espinhais. Uma das hipóteses para o comportamento migratório das fibras motoras e das células da crista neural, é que ambas seriam atraídas por algum tipo de sinal originado na metade anterior dos somitos, ou repelidas da sua metade posterior por moléculas presentes nessas regiões (Keynes et alii., 1996).

Diferentes tecidos entram na formação dos nervos espinhais e cabe a eles a manutenção da integridade dos elementos funcionais dos mesmos, as fibras nervosas ou axônios. Dentre eles há o tecido conjuntivo; o **endoneuro** envolve a fibra nervosa individualmente, sendo formado por fibras colágenas; o **perineuro** envolve grupos de fibras nervosas formando fascículos; o **epineuro** envolve os diversos fascículos. O perineuro e o epineuro funcionam como barreiras protetoras contra o trauma; o segundo apresenta-se mais espesso quanto mais próximo das articulações e mais superficial esteja o nervo. Nervos apresentam diferentes tipos celulares, tais como fibroblastos e macrófagos, sendo também ricamente vascularizados (Low, 1976; Key & Retzius 1876, Olsson & Kristensson 1971, 1973).

As fibras nervosas que entram na formação dos nervos são classificadas em amielínicas e mielínicas, de acordo com a relação com as células de Schwann que as envolvem. Conjuntos de fibras amielínicas são envolvidos por células de Schwann que não produzem bainha de mielina. Já nas fibras mielínicas, estas células formam, com suas membranas celulares a bainha de mielina. As extremidades de cada bainha de mielina são denominadas de mielina internodal, que é separada da adjacente pelo nodo de Ranvier. As células de Schwann são envolvidas externamente por lâmina basal, continua em toda a

extensão da fibra nervosa (Geren 1954; Ide, 1996).

2. Lesão Nervosa Periférica

Após trauma sofrido pelo nervo periférico, uma série de alterações proximais e distais ao local do ferimento podem levar tanto à regeneração como à degeneração total da fibra nervosa e de seu corpo celular (Fiori et alii., 1988).

As alterações observadas nas fibras nervosas distalmente ao local do ferimento são coletivamente denominadas de "degeneração Walleriana". Ao mesmo tempo, na porção proximal destas fibras lesadas e em seus respectivos corpos celulares ocorre um processo conhecido como "reação axonal" ou "efeito retrógrado" (Gragg, 1970; Lieberman, 1971; Fiori et alii., 1988; Kreutzberg, 1995).

2.1. 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 nodo de Ranvier mais próximo à lesão nos axônios do coto proximal (Waller, 1850).

A degeneração dos axônios parece estar relacionada ao esgotamento de materiais necessários para a manutenção dos axônios e à ausência de reposição dos mesmos pelo corpo neuronal (Webster, 1962)

Inicialmente há um acúmulo de organelas no axoplasma paranodal, com perda dos microtúbulos e neurofilamentos axoplasmáticos provocada pela ação de proteases (Donat & Wisniewski, 1973; Schlaepfer & Micko, 1978; Tapia et alii., 1995).

Há hipertrofia das células de Schwann com alterações em seu citoplasma e membrana plasmática (Abrahams et alii. 1980; Lubinska, 1982). Ao mesmo tempo, ocorre fragmentação da bainha de mielina e início de sua fagocitose por macrófagos residentes e por aqueles que invadem o coto distal durante o processo de degeneração nervosa (Beuche & Friede, 1984; Scheidt & Friede, 1987). Uma pequena parte da mielina é também fagocitada pelas próprias células de Schwann, como demonstrado *in vivo* (Allt, 1976) e *in vitro* (Bigbee et alii., 1987; Crang & Blakemore, 1987).

Os macrófagos, além de fagocitarem a maior parte da mielina, parecem ser responsáveis pela proliferação das células de Schwann. Macrófagos secretam

também várias citocinas, incluindo interleucina 1 e interleucina 6, promotoras da regeneração nervosa (Guénard et alii., 1991; Reichert et alii., 1996). São ainda responsáveis pela produção da apolipoproteína E, uma proteína com peso molecular de 37kDa e que parece estar relacionada com a mobilização de lípidos produzidos pela degeneração axonal (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).

Com 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.

2.2. Alterações na Porção Proximal à Lesão

A degeneração Walleriana no coto proximal está limitada à área adjacente a 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; Kreutzberg, 1995).

Dentre as reações axonais com alterações de caráter morfológico está a cromatólise, caracterizada pela dissociação da substância de Nissl, aumento de volume do corpo celular e deslocamento do núcleo para periferia. Já nas alterações relacionadas ao metabolismo celular predomina uma progressiva diminuição na síntese de proteínas relacionadas à transmissão sináptica e aumento daquelas relacionadas à reestruturação celular.

Muitas das alterações estruturais e morfológicas que ocorrem no corpo do neurônio parecem estar intimamente relacionadas a eventos celulares ligados à síntese protéica e transporte axonal, podendo conduzir tanto à regeneração como à morte neuronal (Hydén, 1960; Lieberman, 1971, 1974; Torvik & Soreide

1976; Fawcett & Keynes, 1990; Kreutzberg, 1995).

Alguns estudos demonstraram que a síntese de proteínas associadas ao crescimento (GAP), tubulina e actina em neurônios axotomizados está aumentada pela indução de genes para tubulina (α 1T e β classe II) durante a regeneração nervosa periférica (Miller et alii., 1989), sendo este um fenômeno característico também dos axônios em fase de desenvolvimento.

2.3. Eventos da Regeneração Nervosa Periférica

Após o trauma, os neurônios que sobreviveram à lesão começam a reorganizar suas membranas plasmáticas e, decorridas algumas horas, cada um dos axônios mielínicos e amielínicos pode gerar dezenas de brotos axonais, ou neuritos de regeneração (Cajal, 1928; Lubinska, 1952; Yawo & Kuno, 1983). Nos axônios mielínicos, os brotamentos têm origem junto ao nodo de Ranvier mais próximo a 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 suas relações morfofuncionais primitivas (Langone, 1991).

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

3. Microambiente da Regeneração Nervosa Periférica

O microambiente da 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 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 confirmadas por estudos posteriores com microscopia eletrônica (Wechsler & Hager, 1962; Barton, 1962; Ide, 1983, 1996).

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 de desenvolvimento do sistema nervoso (Sanes, 1989; Fawcett & Keynes, 1990).

4. Moléculas de Adesão

Durante o crescimento axonal, os cones de crescimento dos axônios em regeneração podem contactar as células de Schwann e sua lâmina basal. Estes cones de crescimento exibem seletividade a diferentes famílias de moléculas de adesão (Bunge, 1973).

4.1. Adesão entre Células de Schwann e Axônios

4.1.1. Família das Imunoglobulinas

Várias moléculas têm como função manter a adesão entre axônios e células de Schwann; entre elas destacam-se **N-CAM**, **L1** e **proteína zero (Po)**. Durante o desenvolvimento, **N-CAM** e **L1** são expressas na membrana plasmática dos axônios e células de Schwann nos locais em que essas membranas fazem contato (Martini & Schachner, 1986; Rathjen, 1988). Foi mostrado que a **L1** promove o crescimento de neuritos em cultura (Bixby et alii., 1988, Seilheimer & Schachner, 1988) Essas moléculas apresentam expressão diminuída em fibras mielínicas intactas (Martini, 1994).

Tanto a **L1** como a **N-CAM** apresentam concentrações aumentadas nos axônios e células de Schwann após lesão nervosa e seus modos de

associação são homofílicos, podendo-se ligar ainda a outros receptores (Daniloff et alii., 1988; Grumet & Edelman, 1988; Martini & Schachner, 1988). Há uma diminuição na concentração dessas moléculas após as células de Schwann começarem a formar as lamelas de mielina sobre os axônios em regeneração.

A molécula **Po**, envolvida principalmente na compactação da mielina, promove também a regeneração axonal em cultura (Schneides-Schaulies et alii., 1990; Yazaki et alii., 1994). Outra molécula dessa superfamília, a **glicoproteína associada à mielina (MAG)**, é expressa em níveis baixos nos pontos de contato entre axônios e células de Schwann, e está aumentada apenas no início do processo de mielinização, quando a célula de Schwann começa a envolver o axônio com seus processos citoplasmáticos (Martini, 1994).

Além dessas moléculas da superfamília das imunoglobulinas, há outras provavelmente envolvidas na adesão célula de Schwann-axônio: **P30**, molécula expressa nas células de Schwann de ratos adultos após lesão nervosa e com ação na regeneração nervosa periférica (Daston & Ratner, 1991); **TAG-1/F3** (Felsenfeld et alii., 1994) e **Big-I** (Yoshihara, et alii., 1994). A **L2/HNK-1** é um epitopo carbohidrato expresso por células de Schwann que já se associavam a axônios motores em nervos periféricos reinervados (Martini et. alii., 1992).

4.1.2. Família das Caderinas

A caderina é uma molécula de adesão dependente de Ca^{++} , com importante papel na neurogênese. Existem diferentes subclasses de caderinas que apresentam adesão homofílica (Takeichi, 1990), destacando-se a E-, B-, P-, R-, N-caderina e a protocaderina (Sano et alii. 1993). Algumas delas apresentam uma grande homologia como a N-, B- R-caderina e foram demonstradas em tecido neural (Hatta et alii., 1987, 1988).

A N-caderina é uma molécula que promove o crescimento de neuritos em cultura sobre astrócitos e, *in vivo*, sobre células de Schwann (Bixby & Zhang, 1990; Neugebauer et alii., 1988; Tomaselli et alii., 1988 Letourneau et alii., 1990; Shibuya et alii., 1995). Em axônios em regeneração, a imunorreatividade dessa molécula está localizada em pontos de contato entre axônio-axônio e/ou axônio-célula de Schwann, sugerindo que a N-caderina estaria envolvida no crescimento axonal, mediando a adesão entre axônios e células de Schwann (Shibuya et alii.,

1995). Locais em que foi observada a imunoreatividade da N-caderina foram coincidentes com aqueles de R-caderina (Ide, 1996).

A E-caderina é encontrada em áreas limitadas do sistema nervoso periférico. A imunoreatividade a essa molécula é expressa em subconjuntos de axônios de pequeno calibre da raiz dorsal e em subconjuntos de neurônios sensitivos (Uchiyama et alii., 1994; Shimamura et alii., 1992).

4.2. Adesão entre Lâmina Basal e Axônios

A lâmina basal contém várias moléculas fisiologicamente ativas, tais como laminina, nidogen/entactina, colágeno tipo IV e proteoglicana heparam sulfato (**HSPG**). Entre essas, a laminina é considerada como um dos principais fatores promotores de crescimento de neuritos. Substratos cobertos com laminina purificada mostraram-se mais eficazes na promoção do crescimento 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).

A laminina é uma glicoproteína com três subunidades conhecidas como cadeias α (com 400 kDa de peso molecular), β (com 210 kDa) e γ (com 200 kDa), sendo sempre expressa na lâmina basal de nervos periféricos (Timpl & Brown, 1994 e Luckenbill-Edds, 1997). Quando essas cadeias estão dispostas sobre a forma de cruz, seus braços menores são formados pelas cadeias β e γ , enquanto o braço maior é formado pela cadeia α e partes das cadeias β e γ .

Tomando como base a laminina presente na membrana basal do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (**EHS**), existem lamininas com diferentes composições nas cadeias de polipeptídeos denominadas de $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$; $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\gamma 1$, $\gamma 2$ (Timpl & Brown, 1994). A **laminina-1**, formada pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$, é derivada do tumor **EHS** e está presente em vários tecidos; a **laminina 2** ou **merosina** ($\alpha 2$, $\beta 1$ e $\gamma 1$), está presente em músculos cardíaco e esquelético e em nervos; a **laminina 3** ou **laminina-s** ($\alpha 1$, $\beta 2$ e $\gamma 1$) está limitada à lâmina basal das junções neuromusculares (Hunter et alii., 1989); a **laminina 4** ou **merosina-s** foi descrita na membrana basal das células de Schwann e em músculos esqueléticos

(Leivo & Engvall 1988 e Luckenbill-Edds, 1997).

Os contatos entre o cone de crescimento dos axônios e a lâmina basal são principalmente mediados pela ligação entre laminina e integrinas (Reichardt & Tomaselli, 1991; Hynes, 1992; Hynes & Lander, 1992; Haas & Plow, 1994; Letourneau et alii., 1994).

Os diferentes tipos de integrinas são definidos como receptores celulares para vários componentes da matriz extracelular (Tomazelli et alii., 1988; Hynes, 1992). As integrinas são heterodímeros compostos de cadeias α e β , e considerados como os principais receptores para a laminina. Até o momento foram caracterizados, em vertebrados, quinze diferentes subunidades α e oito subunidades β , que formam uma família de pelo menos 20 diferentes heterodímeros (Venstrom & Reichardt, 1995). A maioria das subunidades α se associa a apenas uma subunidade β , mas podem ser encontrados heterodímeros com mais de uma subunidade β (Ulrich et al., 1995).

Entre as integrinas que mediam a associação de neurônios e células neuronais à laminina estão os heterodímeros $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ que se associam ao braço longo da laminina na cadeia $\alpha 1$ no fragmento E8, enquanto o heterodímero $\alpha 1\beta 1$ se associa ao braço curto da laminina também na cadeia $\alpha 1$ mas no fragmento E1 nos sítios de ligação VI-IVb (Colognato-Pyke et al., 1995).

A associação laminina-integrina pode ajudar na adesão e motilidade do cone de crescimento através de sinais de transdução mediados em parte pela proteína cinase C (Bixby & Jhabvala, 1990). A integrina que se associa à laminina pode interagir com componentes do citoesqueleto intracelular e induzir o rearranjo destes, levando a uma estimulação do crescimento dos axônios em regeneração (Otey et alii., 1990).

5. Citocinas

O termo **citocina** originalmente referia-se a movimento celular; na década de setenta foi adotado por Cohen et alii. (1974) para se referir a proteínas.

Atualmente o termo é definido como um grupo heterogêneo de mediadores polipeptídicos que estão associados com a ativação de numerosas funções, incluindo as respostas do sistema imunológico e inflamatórias (Hopkins

& Rothwell, 1995).

Na família das citocinas incluem-se as **interleucinas, quimiocinas, fatores de necrose tumoral, interferons, fatores estimulantes de colônia, fatores de crescimento, neurotrofinas** e as **neuropoetinas** (Hopkins & Rothwell, 1995).

As ações clássicas das citocinas no sistema nervoso ocorrem através de sinais derivados do alvo ou retrógrados; assim, alvos neuronais como os músculos usam essas proteínas (ou fatores) para manter as atividades dos neurônios que os inervam (Patterson & Nawa, 1992).

A descoberta destes fatores foi baseada em seu envolvimento na morte neuronal natural. Em diferentes partes do sistema nervoso quase 50% dos neurônios produzidos na embriogênese morrem durante o desenvolvimento subsequente, e o tecido alvo que o neurônio inerva tem um papel no controle de quantos neurônios sobreviverão (Hamburger, 1934; Hamburger & Levi-Montalcini, 1949, Levi-Montalcini, 1987).

Alguns desses fatores são necessários para impedir a morte dos neurônios durante o desenvolvimento ou após lesão (Da-Silva, 1995; Thoenen, 1995). Esses fatores podem também afetar o estado funcional dos neurônios, modulando os níveis, ou até mesmo o tipo de neurotransmissores por eles sintetizados (Landis, 1994).

5.1. Neurotrofinas

O primeiro fator trófico a ser isolado foi fator de crescimento de nervos (**NGF**) (Cohen et alii., 1954), e seu gene foi clonado somente no início dos anos 80 (Scott et alii., 1983). Nessa época foram caracterizadas outras moléculas com ações sobre neurônios comparáveis às ações do NGF (Hefti et alii., 1993).

Fatores neurotróficos podem ser conceituados como proteínas solúveis que regulam a sobrevivência, crescimento, plasticidade e a síntese de proteínas utilizadas para funções específicas dos neurônios (Hefti et alii., 1993).

Até o momento, os fatores neurotróficos melhor caracterizados compreendem uma família de proteínas homodímeras denominadas de neurotrofinas, com 7 membros identificados: NGF, BDNF ("brain-derived neurotrophic factor") (Barde et alii., 1982), NT-3 (neurotrofina 3) (Ernfors et alii.,

1990), NT-4 (neurotrofina 4) de *Xenopus* (Hallbook et alii., 1991), NT-5 (neurotrofina 5) de mamífero (Berkemeier et alii., 1991) (denominadas de NT-4/5 por, possivelmente, representarem a mesma proteína), NT-6 (neurotrofina 6) do peixe teleósteo *Xiphophorus* (Gotz, et alii., 1994) e NT-7 (neurotrofina 7) do peixe zebra *Brachydanio rerio* (Nilsson et alii., 1997).

Os receptores das neurotrofinas pertencem a família **trk** ("tropomiosyn-receptor-kinase") e são diferenciados em **trkA**, **trkB** e **trkC**. Estão localizados na membrana celular e apresentam estrutura molecular tripla composta por: 1) domínio extracelular para o reconhecimento do fator, 2) domínio transmembranoso simples e 3) uma porção citoplasmática (que contém os resíduos tirosina cinase) que iniciam as reações em cascata de sinalização. Os receptores **trk** são conhecidos como receptores de alta afinidade (Barbacid, 1994) para as neurotrofinas. Outra proteína de estrutura tripla que se associa a todas as neurotrofinas é a proteína **p75** que, assim como os receptores **trk**, é também um receptor de tirosina, porém com baixa afinidade às neurotrofinas e com função ainda não definida (McDonald & Chao, 1995).

5.2. Neuropoetinas ou Neurocininas

São citocinas com ações sobre o sistema nervoso e que atuam via um complexo receptor. Fazem parte dessa família o fator inibitório de leucemia (**LIF**), cardiotrofina-1 (**CT-1**), oncostatina M (**OsM**), atividade promotora de crescimento (**GPA**), as interleucinas **IL-6** e **IL-11** e o fator neurotrófico ciliar (**CNTF**) (Hopkins & Rothwell, 1995; Kishimoto et alii., 1995). É característica dessa família de citocinas o peso molecular entre 20-24 kDa na forma não glicosilada, e a baixa homologia entre as cadeias de aminoácidos (**aa**) que não excede a 30% (Gadient & Otten, 1997).

O agrupamento dessas moléculas numa mesma família foi baseado na estrutura terciária das moléculas, que consiste de 4- α hélices com disposição antiparalela, dando origem a uma forma tridimensional semelhante para toda a família (Gadient & Otten, 1997).

5.2.1. Fator Inibitório de Leucemia (LIF)

Foi purificado e clonado em 1987 por Metcalf e colaboradores (Gearing

et alii., 1987). LIF foi identificado por sua capacidade de diferenciar as linhagens de células leucêmicas murina M1 em monócitos, inibindo sua proliferação. Foi estabelecido também que ele age sobre diferentes tipos de células nos estágios iniciais do desenvolvimento.

LIF foi relacionado com o sistema nervoso por sua equivalência ao fator de diferenciação colinérgico, que apresentava atividade indutora da produção de acetilcolina em neurônios simpáticos (Yamamori et alii., 1989). Thompson et alii. (1997) demonstraram que LIF era transportado retrogradamente por grupamentos de neurônios sensitivos de ratos adultos. Posteriormente foi demonstrado que a aplicação exógena do LIF associado a lesão nervosa periférica induzia o brotamento de neurônios simpáticos pós-ganglionares (Thompson & Majithia, 1998). Foram também mostradas ações em músculos,, provavelmente atuando como fator de trauma no músculo lesado (Austin & Burgen, 1991; Kurek et alii., 1996)

5.2.2. Cardiotrofina 1 (CT-1)

CT-1 foi identificada por induzir hipertrofia em miocitos cardíacos *in vitro*, durante pesquisas sobre os fatores que mediam as fases de hipertrofia cardíaca (Pennica et alii., 1995a).

CT-1 inibe o crescimento de células da linhagem leucêmica mielóide (M1), promove a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos do SNC e de neurônios do SNP como os neurônios ciliares de galinha e motoneurônios espinhais de ratos. Modula também o fenótipo de neurônios simpáticos de ratos em cultura, inibindo a ação da atividade da tirosina hidroxilase e estimulando a atividade da colina acetiltransferase (Pennica et alii., 1995b, 1996).

5.2.3. Oncostatina M (OsM)

Foi caracterizada por inibir a divisão de células do melanoma A375 e de outras células tumorais humanas. Foi isolada do sobrenadante de culturas de células de linfoma histocístico U-937. A proteína purificada tem peso molecular aparente de 28 kDa, determinado por eletroforese com gel de acrilamida (Zarling et alii., 1986). A clonagem do gene para OsM humana demonstrou que ele é sintetizada como uma cadeia de polipeptídeo com 252 aa e com sinal peptídico

de 25 aa no terminal amina (Malik et alii., 1989).

5.2.4. Atividade Promotora de Crescimento (GPA)

Outro fator neurotrófico ciliar foi caracterizado em aves e recebeu a denominação de **GPA** (Eckenstein et alii., 1990). Esse fator tem peso molecular estimado em 21 kDa e sua molécula clonada mostrou uma homologia de 50% com a molécula de CNTF de mamíferos (Leung et alii., 1992).

5.2.5. Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF)

CNTF foi identificado e parcialmente purificado em tecido ocular de embrião de galinha por Adler e colaboradores (Adler et alii., 1979), que mostraram que os tecidos oculares (íris, corpo ciliar e camada coróide) eram uma fonte rica de um fator que promovia a sobrevivência de neurônios ciliares. Esses estudos foram feitos com neurônios do gânglio ciliar por se tratar de uma população relativamente pequena, onde quase 50% dos neurônios formados morrem durante a segunda semana de desenvolvimento embrionário (Landmesser et alii., 1974).

Na década de 80 foi descrito que nervos periféricos representavam uma fonte maior desse fator. Essa nova fonte permitiu a purificação parcial da molécula de CNTF, mostrando ser uma proteína com 20kDa de peso molecular (Williams et alii., 1984).

Somente no final da década de 80 seu gene foi clonado e expresso em bactérias, levando à síntese do fator em quantidades suficientes para estudos biológicos, geração de anticorpos e preparo de sondas de RNA e DNA (Richardson, 1994).

O gene do CNTF foi clonado em rato, coelho e no homem, mostrando uma grande conservação de sua estrutura nessas três espécies (Masaikowski et alii., 1991; Negro et alii., 1991).

CNTF apresenta uma cadeia de 200 aa; a análise dessa sequência mostrou a existência de uma grande homologia entre CNTF e as proteínas fator de inibição de leucemia (**LIF**), oncostatina M (**OSM**), interleucina 6 (**IL-6**) e fator estimulante de colônia de granulócitos (**G-CSF**).

Em nervos periféricos, a síntese de CNTF é regulada por sinais

originados dos axônios. Durante o desenvolvimento, tanto o CNTF como seu RNAm são detectados em nervos durante a primeira semana pós-natal (Stockli et alii., 1989; Dobrea et alii., 1992). Em nervos de animais adultos a proteína CNTF é sintetizada por células de Schwann mielinizantes (Dobrea et alii., 1992; Friedman et alii., 1992; Rende et alii., 1992; Sendtner et alii., 1992b), sendo também produzida por células de Schwann associadas a fibras amielínicas, embora em menor quantidade (Dobrea et alii., 1992; Friedman et alii., 1992). Após a lesão nervosa periférica, há uma redução substancial do RNAm para CNTF no coto distal do nervo (Friedman et alii., 1992; Rao et alii., 1992b; Sendtner et alii., 1992b; Seniuk et alii., 1992). Com o processo de regeneração e conseqüente início da remielinização, as concentrações do RNAm para CNTF voltam aos níveis normais (Sendtner et alii., 1992b).

CNTF também é detectado no sistema nervoso central (**SNC**), embora em níveis menores que no sistema nervoso periférico (**SNP**). As maiores concentrações de seu RNAm no SNC são encontradas no nervo óptico e bulbo olfatório (Stockly et alii., 1991). Sua síntese aumenta após trauma cerebral (Ip et alii., 1992b).

5.2.5.1. Ações do CNTF

5.2.5.1.1. Na Sobrevivência de Neurônios Embrionários *In Vitro*

Em neurônios periféricos, essas ações são dependentes da idade e da espécie do animal doador. Por exemplo, neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos em E10 têm sobrevivência aumentada na presença de CNTF, o que não ocorre com essa mesma classe de neurônios em embriões de galinhas em E8 (Barbin et alii., 1984; Manthorphe et alii., 1986). Motoneurônios espinhais de embriões de galinha em E10 apresentam sobrevida aumentada na presença de CNTF e FGF.

Várias populações de neurônios centrais também respondem ao CNTF, que age favoravelmente na sobrevivência de neurônios cerebelares, corticais, pontinos e espinhais (Larkfors et alii., 1991; Magal et alii., 1991a,b). CNTF atua diretamente também sobre neurônios parassimpáticos ciliares, aumentando a sobrevida de 1 para 15 dias em 76% dos neurônios cultivados (Unsicker et alii.,

1987).

5.2.5.1.2. Na Diferenciação de Neurônios *In Vitro*

CNTF induz o fenótipo colinérgico em neurônios simpáticos de ratos neonatais. Em meio condicionado na presença de NGF para manter neurônios simpáticos vivos, o CNTF aumenta a atividade da enzima colina acetil-transferase (**ChAT**) em até 100 vezes, diminuindo simultaneamente a atividade da enzima tirosina hidroxilase (Saadat et alii., 1989). Nessas mesmas populações neuronais o CNTF aumenta a produção do RNAm do peptídeo vasointestinal (VIP), substância P e somatostatina, além de diminuir a produção do RNAm do neuropeptídeo Y e de receptores muscarínicos (Rao et alii., 1992b; Ludlan & Kessler, 1993). Em neurônios sensitivos de ratos neonatos, o CNTF não altera expressão de ChAT, somatostatina, substância P e VIP.

CNTF inibe também a proliferação de células precursoras neuronais em gânglios simpáticos nos estágios iniciais do desenvolvimento de embriões de galinha (Ernsberger et alii., 1989).

Neurônios embrionários de mamíferos e aves cultivados na presença de CNTF apresentam prolongamentos contendo neurofilamentos. A capacidade de estimular o crescimento de prolongamentos foi demonstrada pela ação do CNTF em culturas de neurônios de moluscos, que adquirem prolongamentos após a adição do CNTF ao meio de cultura (Bullock et alii., 1992).

5.2.5.1.3. Na Diferenciação de Neurônios *In Vivo*

Aplicações diárias de 2 a 20 µg de CNTF na membrana corioalantóide de embrião de galinha de E6 a E10 previnem a morte celular natural em 50% de seus motoneurônios espinhais (Oppenheim et alii., 1991).

CNTF impede a morte de 50% dos neurônios do núcleo facial após axotomia em ratos neonatos, quando aplicado na dose de 5 µg no coto proximal do nervo seccionado (Sendtner et alii., 1990). Quando injetado na câmara posterior ocular, CNTF prolonga a sobrevivência de células ganglionares da retina previamente axotomizados (Mey & Thanos, 1993). Reduz também a morte de neurônios do tálamo após lesão cortical (Clatterbuck et alii., 1993) e da substância negra após lesão da via nigrostriatal (Hagg and Varon, 1992).

5.2.5.1.4. Possíveis Funções do CNTF no Sistema Nervoso Normal

A distribuição celular do RNAm do CNTF nas células da glia tanto do SNC como do SNP, combinada às respostas *in vitro* de neurônios ao CNTF, sugere que o CNTF é um fator neurotrófico que media os efeitos tróficos das células gliais sobre os neurônios. Três sugestões foram feitas sobre a função do CNTF no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso:

Primeiro, as evidências de que a administração de CNTF exógeno durante o desenvolvimento pode aumentar o número de neurônios sobreviventes ao processo de morte celular natural (Oppenheim et alii., 1991) são consistentes com a hipótese de que o CNTF participe na regulação da morte neuronal durante o desenvolvimento. Por outro lado, foi descrita a incapacidade de detectar RNAm do CNTF em animais pré-natais (Stockli et alii., 1991).

Segundo, o fenótipo colinérgico estimulado pelo CNTF em neurônios simpáticos *in vitro* (Nawa & Patterson, 1990), sugere que essa neurocina possa estar implicada na diferenciação colinérgica que ocorre *in vivo*, embora os detalhes dessa ação ainda não estejam definidos (Richardson, 1994).

Terceiro, a liberação de CNTF por células da glia após lesão cerebral, com a manutenção da sobrevivência de grupos de neurônios e aumento de sua síntese por astrócitos, é compatível com a hipótese de que o CNTF seria um fator de lesão. Do mesmo modo, em camundongos pmn (neuropatia motora periférica) e em camundongos com desativação ("knockout") do gene para CNTF, o número de neurônios degenerados após a lesão nervosa periférica é maior nos animais com desativação do gene para CNTF, o que demonstra uma dependência para a sobrevivência dos motoneurônios aos níveis de CNTF endógeno (Sendtner et alii., 1997). Essa hipótese não foi confirmada no SNP devido a baixa produção da proteína pelas células de Schwann durante a degeneração Walleriana (Sendtner et alii., 1992a).

5.2.6. Interleucina 6 (IL-6)

IL-6 é uma citocina multifuncional produzida por células T, células B, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, micróglia e astrócitos (Hirano, 1991).

Além de suas funções nas respostas inflamatórias e imune, através da produção de anticorpos por células B (Hirano et alii., 1985, 1986), tem sido

sugerido que ela tomaria parte nos eventos fisiológicos e patológicos que ocorrem no SNC e SNP durante o desenvolvimento e na fase adulta. Estruturalmente a IL-6 é um homólogo do CNTF e do LIF (Bazan, 1991).

IL-6 afeta diretamente o crescimento, sobrevivência e diferenciação de neurônios centrais e periféricos. Atua como um fator de sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos do mesencéfalo nas fases pré- e pós-natais (Kushima et alii., 1992), de neurônios colinérgicos da medula espinhal embrionária e prosencéfalo basal (Kushima & Hatanaka, 1992; Hama et alii., 1989). Promove a diferenciação de células de neuroblastoma (Munoz Fernandez et alii., 1994) e células PC12 (Sato et alii., 1988; Nakafuku et alii., 1992), além de induzir a síntese da enzima ChAT e a expressão de substância P em neurônios simpáticos (Fann & Patterson, 1994; Oh & O'Malley, 1994).

IL-6 protege neurônios estriatais colinérgicos dos efeitos neurotóxicos do NMDA (Toulmond et alii., 1992), assim como neurônios hipocámpais da morte induzida por glutamato (Yamada & Hatanaka, 1994).

Em preparações *in vitro* com fragmentos de nervo ciático, o RNAm para IL-6 foi detectável somente 16 horas após incubação. Em preparações *in vivo* durante o processo de degeneração Walleriana do nervo ciático os níveis do RNAm para IL-6 apresentaram dois picos: o primeiro 4 horas após a lesão, persistindo até o terceiro dia; o segundo iniciando-se no quarto dia (Reichert et alii., 1996).

Entre as células que produzem IL-6 estão os fibroblastos e macrófagos residentes no nervo. Os macrófagos recrutados após a lesão, que invadem o coto distal durante o processo da degeneração Waleriana, parecem ser os responsáveis pelo segundo pico de produção do RNAm para IL-6 (Reichert et alii., 1996).

5.3. Receptores das Neurocinas CNTF e IL-6

O receptor da neurocina CNTF é formado por um complexo de três proteínas que foram identificadas em estudos com CNTF marcado com iodo 125 (**CNTF-I¹²⁵**) (Davis et alii., 1991).

Dos três componentes do complexo receptor, um deles liga-se apenas

ao CNTF e foi denominado de receptor α do CNTF (**R α CNTF**) (Davis et alii., 1991). R α CNTF apresenta uma cadeia de 372 aa e não possui a proteína transmembranosa característica dos receptores utilizados pela família das neurotrofinas, sendo ancorado à superfície celular pelo glicosil fosfatodilinositol (GPI) (Davis et alii., 1991). Por faltar o domínio citoplásmico ao R α CNTF, ele deve combinar com outras moléculas da membrana celular para poder transduzir a ação do CNTF (Richardson, 1994).

Os outros dois componentes do complexo receptor foram identificados através de estudos de fosforilação de tirosina em células MAH estimulada pelo CNTF (Ip et al. 1992a).

O segundo componente, uma proteína associada à membrana que fosforila resíduos de tirosina é semelhante ou idêntico à glicoproteína 130 (**gp130**), e foi descoberto por suas funções na transdução de sinal da IL-6 (Taga et al. 1989; Hibi et al., 1990). Posteriormente verificou-se que se associava também em ligação de alta afinidade com o LIF e à OsM (Gearing et al., 1992a,b).

A terceira subunidade do complexo é similar, ou idêntica, ao receptor β LIF (**R β LIF**) cujo gene foi clonado e sequenciado por Gearing et alii. em 1991. Três são as evidências que o relacionam ao R β LIF: (1) uma proteína de alto peso molecular nas células do sarcoma de Ewing, que é fosforilada sobre resíduos de tirosina seguido à administração do LIF ou CNTF e que pode ser imunoprecipitada por anticorpo para R β LIF (Stahl et al., 1993); (2) competição do LIF e CNTF- I^{125} para ligação com proteínas de associação de alta afinidade em células P19 (Gupta et al., 1993); (3) em células COS transfectadas com genes para R α CNTF, gp130 e R β LIF, a estimulação com CNTF dispara a associação da gp130 e R β LIF (Davies et alii., 1993b).

Foi sugerido que a sinalização do CNTF é mediada pela heterodimerização de R β LIF e gp130 (componentes " β "), que é iniciada pela associação do CNTF ao R α CNTF (Davies et al., 1993b).

O início da sinalização do CNTF é decorrente da ativação de membros da família das tirosinas cinases conhecidas como Jak/Tyk ("Janus Kinase"), que estão associadas a gp130 e ao R β LIF, e tornam-se ativadas somente quando esses receptores sofrem homo- ou heterodimerização (Stahl et alii., 1994).

A pré-associação da Jak/Tyk com a gp130 e R β LIF envolve uma região próxima à membrana que contém uma sequência conservada nos diferentes receptores de citocina, a qual demonstrou-se necessária para a função da gp130 em particular (Stahl et alii., 1994; Murakami et alii., 1991).

A sequência da formação do complexo receptor para as citocinas requer como primeira etapa a ligação do fator com o componente α do receptor. Em seguida ocorre a ligação com um dos componentes β do receptor (gp130 ou R β LIF) que está associado a um membro da família das Jak/Tyk; esse complexo intermediário formado não é ativado para a transdução de sinal. Finalmente, o recrutamento do outro componente β completa a dimerização do receptor, resultando na ativação das cinases Jak/Tyk e na fosforilação dos resíduos de tirosina. O complexo fosforilado se liga a várias moléculas transdutoras de sinais que são responsáveis pelo início da cascata de reações intracelulares (Stahl & Yancopoulos 1994).

O R α CNTF é expresso no sistema nervoso em alvos que sofrem a ação do CNTF como: neurônios simpáticos em desenvolvimento e adultos; neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal; neurônios parasimpáticos do gânglio ciliar; nos núcleos motores do nervo facial e do nervo trigêmio; e em neurônios medulares (Davis et alii., 1991; Ip et alii., 1993). Foram também observados altos níveis da expressão dos receptores em músculos esqueléticos, o que poderia indicar uma ação miotrófica direta do CNTF (Davis et alii., 1991, 1993a; Helgren et alii., 1994).

6. Técnica de Tubulização.

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 20 anos (Lundborg, 1987).

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. Com base nestes estudos, vários experimentos foram executados por Vanlair (1882), que utilizou os mesmos tipos de próteses para unir os cotos nervosos do nervo ciático de cães (mantendo uma distância de 3 cm entre os cotos). 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 materiais biológicos destacam-se **artérias** (von Büngner, 1891; Weiss, 1944b; Weiss & Davis, 1943; Weiss & Taylor, 1944), **veias** (von Büngner, 1891; Werd, 1909; Weiss, 1943; Chiu et alii., 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; Pereira, 1993) 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).

6.1. Vantagens no Uso da 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 uma vez completada 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).

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., 1988).

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 neovascularização 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, Pires, 1994; Lainetti, 1995). 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).

6.2. Eventos Observados com o Uso da Técnica de Tubulização

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 sangüíneo 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, 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 (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 a 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, 1984a,b; 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 mielina 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

Os camundongos utilizados nesse trabalho pertenciam à linhagem C57BL/6J, todos machos com aproximadamente 12 semanas de idade na época da cirurgia. Foi utilizado um total de 36 animais, divididos em diferentes grupos experimentais com $n = 6$ ou $n = 4$, de acordo com a substância administrada no interior da prótese tubular.

CNTF recombinante humano (**CNTF**) foi produzido e purificado de *E. coli* e gentilmente cedido pelo Prof. Alessandro Negro (Departamento de Bioquímica, Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Pádova, Itália; Negro et alii, 1991). IL-6 recombinante murina (**IL-6**) foi adquirida da empresa PeproTech Inc. (Rock Hill, NJ, USA). Ambos os fatores foram administrados em associação com uma solução de colágeno (Vitrogen, Collagen Corporation, Palo Alto, CA, USA) que, à temperatura corpórea, torna-se um gel e impede o escoamento dos fatores do interior das próteses tubulares.

1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com Solução de CNTF

Foram utilizados 24 animais divididos em 6 grupos. O primeiro e segundo grupos receberam implantes de próteses inicialmente vazias; o terceiro e quarto grupos receberam implantes de próteses preenchidas com solução de colágeno (**Col.**) (2.4 mg/ml); o quinto e sexto grupos receberam implantes de próteses preenchidas com a solução de CNTF, na proporção volumétrica de 1:1, e concentração final de CNTF dentro das próteses de 100 µg/ml.

2. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com Solução de IL-6

Nesse grupo foram utilizados 12 animais divididos em 2 grupos com 6 animais. O primeiro grupo recebeu implantes de próteses preenchidas com Col. (2.4 mg/ml); o segundo grupo recebeu implantes de próteses preenchidas com a solução de IL-6, na proporção de 1:1 com concentração final de IL-6 dentro dos tubos de 100 µg/ml.

3. Procedimentos Cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com

Avertin¹. Após a anestesia, os animais foram tricotomizados na região da coxa esquerda e posicionados para que o nervo ciático fosse exposto. Com o auxílio de microscópio cirúrgico² e tendo o osso fêmur como referência, a pele da região da coxa foi aberta para exposição da musculatura póstero-lateral; esta foi dissecada e o nervo exposto. Feita a secção do nervo na região média da coxa, os seus segmentos proximal e distal (**SP** e **SD**) e , após retração, foram fixados com ponto único sutura³ no interior de tubo de polietileno (**TP**) (6 mm de comprimento, 0,76 mm de diâmetro interno e 1,22 mm de diâmetro externo), deixando-se um espaço de 4 mm entre os cotos (**Fig. 1**).

FIGURA 1 - Modelo experimental utilizado para o estudo de fibras nervosas periféricas, no interior de tubos de polietileno, em camundongos com transecção do nervo ciático.

Nos grupos experimentais cujas próteses foram preenchidas com aditivos, esse preenchimento foi executado com auxílio de uma microseringa de Hamilton (10µl) e sob visualização com o microscópio para evitar a formação de

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 Zeiss OPM 240 F.

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

bolhas de ar no interior das mesmas. Os aditivos foram adicionados à temperatura de aproximadamente 4°C, encontrando-se na forma líquida. Decorridos aproximadamente 20 minutos do implante, as soluções sofriam um processo de gelificação, semelhante ao que ocorre quando essas soluções são mantidas em placa de Petri a 37°C. Após o término dos procedimentos cirúrgicos, a camada muscular foi suturada com fio de seda 7-0 e a pele fechada com grampos cirúrgicos (7,5 mm). A seguir, os animais foram colocados em gaiolas individuais e mantidos durante todo o período pós-operatório em ciclo de 12 horas de claro-escuro, recebendo ração e água à vontade.

4. Processamento para Microscopia de Luz

4.1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com CNTF

Após tempos de sobrevida pós-cirúrgicos de 6 semanas, os animais dos grupos 1, 3 e 5 foram re-anestesiados e perfundidos através do ventrículo esquerdo com 10 ml de solução salina a 0,9% e heparinizada, seguida por 150 ml de solução fixadora contendo paraformaldeído a 1% e glutaraldeído a 2%, em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,3.

Os tubos de polietileno contendo os segmentos nervosos regenerados (**cabos de regeneração – CR**) foram dissecados, removidos e mantidos na mesma solução fixadora a 4°C até o dia seguinte. Após este período, o material regenerado foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (2% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,3) por 2 horas a 4°C e, em seguida, desidratado em série crescente de álcool etílico, clareado em óxido de propileno e incluído em resina⁴. Cortes semifinos transversais, com 1 µm de espessura, foram feitos na porção média dos CR, sendo corados com solução de parafenilenodiamina (PPD) (Estable-Puig et alii, 1965).

Os animais do grupo controle, não operados, foram anestesiados e perfundidos da mesma forma que os dos grupos experimentais. O nervo ciático esquerdo desses animais foi exposto na altura média da coxa para que um segmento de 0,5 cm de comprimento fosse removido de sua região média.

4) Epon 812, Polyscience.

Seguiu-se, então, o processamento histológico do material de forma idêntica ao realizado com os CR dos animais tubulizados.

4.1.1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com CNTF e Avaliados com o Traçador HRP

Os animais dos grupos 2, 4 e 6 que também tiveram implantes de tubos preenchidos com CNTF, após tempo de sobrevivência de 6 semanas, foram submetidos a uma nova cirurgia e tiveram o nervo ciático novamente exposto na região distal à prótese tubular. Os nervos foram seccionados 3 mm distalmente aos tubos e fixados com ponto de sutura dentro de um tubo de polietileno preenchido com uma solução do traçador neuronal HRP contendo 40% de HRP tipo VI (Sigma) e 10% de lisolectina (Sigma) dissolvidos em solução de conjugado WGA-HRP (Sigma) (Da-Silva et alii, 1985); esses tubos foram imediatamente fechados com vaselina (Fig. 2). Outros 4 animais, que não tiveram

FIGURA 2 - Representação esquemática do cabo de regeneração formado no interior de tubos de polietileno, após 6 semanas do implante, e colocação de tubo de polietileno preenchido com o traçador neuronal (HRP). Gânglios espinhais formadores do nervo ciático estão indicados na porção superior da figura.

secção do nervo e implantes tubulares, foram operados para colocação de tubo de polietileno preenchido com a solução de HRP ao redor do coto proximal, servindo posteriormente para a determinação do número de neurônios motores e

sensitivos presentes em animais controles não tubulizados.

Decorrido um período adicional de 3 dias, esses animais foram re-anestesiados e perfundidos da mesma maneira que os animais dos grupos 1, 3 e 5, acrescido somente com perfusão final de 50 ml de solução de sacarose a 10%. Cada uma das soluções foi preparada com o mesmo tampão fosfato. Após a perfusão, os animais foram dissecados e a coluna vertebral aberta para exposição da medula espinhal e dos gânglios espinhais. Os gânglios das raízes dorsais L4, L5, L6 e a medula espinhal lombar foram removidos e incluídos em albumina gelatina. Cortes seriados e longitudinais de congelação com 40 μm de espessura foram reagidos com solução de tetrametilbenzidina (Sigma) (Fig. 3A e B) (Mesulam, 1978) para demonstração dos neurônios marcados com HRP.

FIGURA 3 – A) Corte longitudinal da medula espinhal lombar de animal tratado com CNTF, mostrando motoneurônios marcados retrogradamente com HRP. B) Corte longitudinal do gânglio da raiz dorsal L5 de animal injetado com CNTF, mostrando neurônios sensitivos marcados retrogradamente com HRP. Barra de escala de A e B=300 μm .

4.2. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com Solução de IL-6

Após tempos de sobrevivência pós-cirúrgicos de 6 semanas, os animais dos grupos 1, 2 foram re-anestesiados e perfundidos da mesma forma que os animais implantados com tubos preenchidos com CNTF.

Os tubos de polietileno contendo os CR foram dissecados, removidos e mantidos na mesma solução fixadora a 4°C até o dia seguinte. O material regenerado foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio por 2 horas a 4°C, desidratado em série crescente de álcool etílico à temperatura ambiente, clareado em óxido de propileno e incluído em resina. Cortes transversais, com 1 µm de espessura, foram feitos da porção média dos CR, sendo corados com solução de parafenilenodiamina (PPD).

Outros 4 animais utilizados como grupo controle não operado, foram anestesiados e perfundidos da mesma forma que os dos grupos experimentais. O nervo ciático esquerdo desses animais foi exposto na altura média da coxa e, após dissecado, um segmento foi removido desta região, sendo processado de forma similar aos segmentos regenerados dos animais tubulizados para inclusão final em resina Epon.

Todos os animais desse grupo tiveram o gânglio espinhal L5 removido e incluído em historesina (Leica). Cortes longitudinais e seriados com 5 µm de espessura foram corados com solução de azul de toluidina e utilizados para análise quantitativa dos corpos dos neurônios sensitivos. Este procedimento mostrou-se menos laborioso que a técnica de marcação com HRP para a determinação do número de neurônios sensitivos regenerados.

5. Análise Quantitativa dos Nervos Regenerados

A análise quantitativa das fibras mielínicas presentes nos CR nos animais operados e nos nervos ciáticos dos animais do grupo controle foi feita em cortes semifinos (1 µm). Foi utilizado um sistema de análise de imagens computadorizado⁵, que permite a interação com o operador. O sistema consiste de microscópio de luz (Zeiss Axioskop) equipado com câmara clara (Zeiss) e estágio motorizado interligado a um microcomputador PC através de um controlador de estágio. Uma mesa digitalizadora (Summagraphics) ligada ao microcomputador integra a imagem observada pelo operador ao computador. O programa utilizado foi o CARP (Biographics Inc., Winston-Salem, NC) baseado

5) Biographics, Wiston Salen, NC, EUA

no sistema operacional UNIX.

As etapas para análise quantitativa foram as seguintes: a) era feita a calibragem do sistema de análise de imagem com os diferentes aumentos das objetivas do microscópio; b) os contornos dos cortes a serem analisados eram traçados com objetiva de baixo aumento; c) o sistema automaticamente dividia os contornos em campos que eram armazenados na memória do computador; d) o observador realizava a marcação das fibras mielínicas com cursor da mesa digitalizadora através de imagem da câmara clara e objetiva de 100X; e) era sinalizado o término na marcação de todas as fibras de um determinado campo pelo operador; f) ao completar o último campo, o computador fornecia imediatamente a somatória das fibras marcadas, seguida da plotagem das mesmas na tela do monitor.

Esse sistema impedia a contagem dupla de fibras presente no campo observado, eliminando, assim, este importante fator de erro.

6. Análise Quantitativa dos Neurônios Sensitivos e Motores Marcados com HRP

Para a análise quantitativa dos neurônios sensitivos e motores evidenciados com o marcador retrógrado HRP, foi utilizado microscópio Zeiss acoplado a câmara clara e sob objetiva de 40X. Os neurônios marcados eram facilmente evidenciados pelo precipitado granular escuro que preenchia seu citoplasma. Foram contados todos os neurônios marcados em todos os cortes dos gânglios sensitivos L4,5,6 e na coluna anterior da medula espinhal. Os números obtidos foram corrigidos com fator derivado da fórmula de Abercrombie (Abercrombie, 1946).

7. Análise Quantitativa dos Neurônios Sensitivos Presentes em Cortes de Historesina.

Para análise quantitativa dos neurônios sensitivos presentes no gânglio espinhal L5 incluído em historesina, e cujos cortes foram corados com azul de toluidina/fucsina, foi utilizado microscópio de luz Zeiss acoplado à câmara clara. Utilizando-se 1 em cada 10 cortes da seriação e, sob aumento de objetiva

RESULTADOS

Desde o início do século que o microambiente de regeneração, ou seja, o espaço formado após a lesão nervosa periférica que é preenchido por várias substâncias e o coto distal de nervos lesados e seus constituintes, tem sido considerado como importante fator que pode influenciar a regeneração nervosa periférica (Ramon Y Cajal, 1928). Foi através do uso da técnica de tubulização de nervos que o microambiente de regeneração pôde ser manipulado e os eventos que ocorrem nesse processo serem analisados de forma sistemática (Lundborg, 1987 e Fields et alii., 1989, Williams et alii., 1983).

A técnica de tubulização permitiu dividir os processos envolvidos durante a regeneração nervosa periférica em cinco grandes fases: 1) respostas pós-traumáticas, 2) fase de migração celular e de crescimento de processos para dentro da prótese tubular; 3) diferenciação dos elementos neuronais, gliais e vasculares; 4) crescimento axonal e 5) processo de mielinização das fibras nervosas. Cada uma dessas fases é interdependente, sobrepondo-se umas às outras (Lundborg et alii., 1982a,b,c; Longo et alii., 1983b; Fields e Ellisman, 1986b; Le Beau et alii., 1988a; Williams et alii., 1983).

Williams et alii (1983) analisaram a evolução espaço-temporal da regeneração nervosa periférica em ratos implantados com tubos de silicone vazios. Após a secção do nervo, o espaço deixado entre os cotos nervosos é preenchido por plasma sanguíneo e outros fluídos intra e extracelulares nas primeiras 24 horas (Longo et alii, 1983b; Williams et alii, 1983). Tem início com isso a formação de uma ponte de fibrina contendo fibroblastos, fibronectina, macrófagos, leucócitos e eritrócitos que conecta o coto proximal ao distal, e que parece servir de ponte para a migração e orientação de células de Schwann, fibroblastos e processos axonais que começam a cruzar o local da lesão (Weiss, 1944b; Longo et alii, 1984, Le Beau et alii, 1988b).

As características morfofuncionais de nervos regenerados no interior de tubos vazios foram analisadas por diferentes autores que constataram uma maior atividade regenerativa quando os cotos nervosos não estavam separados por distância superior a 10 mm (Lundborg et alii, 1982b; Henry et alii., 1985; Williams & Varon, 1985; Da-Silva, 1987; Madison et alii., 1987). Com a adição de aditivos protéicos ao interior das próteses, foi demonstrado um efeito regenerativo em cotos nervosos separados por distância de até 18 mm (Da-Silva, 1987; Williams et

alii., 1987; Madison, et alii., 1987). Esses experimentos demonstram que a modificação do microambiente de regeneração pode melhorar a resposta regenerativa.

Neste trabalho, usando a técnica de tubulização de nervos, estudamos as ações das neurocinas exógenas CNTF e IL-6 sobre a regeneração nervosa periférica em camundongos da linhagem C57BL/6J. Essas substâncias foram colocadas dentro das próteses tubulares no momento do implante nos animais, e sempre acompanhadas de um veículo (gel de colágeno), que impedia o escoamento das mesmas pelas extremidades dos tubos. Comparamos os efeitos regenerativos dessas substâncias em animais implantados com próteses tubulares vazias ou preenchidas apenas com o gel de colágeno e nos animais usados como controle, não operados.

Os dados qualitativos da regeneração nervosa periférica dos animais implantados com tubos de polietileno, nos diferentes grupos experimentais, são consistentes com os descritos na literatura para tubos confeccionados com materiais biológicos, como **artérias** (Weiss, 1944b; Weiss & Davis, 1943; Weiss & Taylor, 1944), **veias** (Weiss, 1943; Chiu et alii, 1982; Rice & Berstein, 1984b), **fáscia muscular** (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 de colágeno/extrato de membrana basal** (Da-Silva & Madison 1986; Pereira & Da-Silva, 1992); ou com materiais sintéticos, como **polietileno** (Garrity, 1955; Chi & Dahl, 1983; Da-Silva & Langone, 1989; Langone, 1991; Marques, 1992; Pereira, 1993; Pires, 1994; Lainetti, 1995) 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). Assim como relatado na literatura, observamos em todos os grupos experimentais, após 6 semanas da cirurgia, a presença de uma estrutura cilíndrica com aspecto macroscópico a qual chamamos de cabo de regeneração (CR), unindo o coto proximal ao distal e que era ricamente vascularizada. Foi também observado, em nosso material, um espaço entre a parede interna da prótese tubular e a superfície externa do CR, espaço esse preenchido por líquido semelhante ao plasma sagüíneo como

descrito anteriormente por diversos autores (Lundborg et alii, 1982a,b,c; Williams et alii., 1983; Da-Silva, 1987; Langone, 1991).

Ramon y Cajal (1928) sugeriu em seus escritos que o coto distal de nervos seccionados secretariam substâncias difusíveis na fase regenerativa, e que os axônios lesados no coto proximal seriam atraídos para o coto distal. Vários estudos posteriores mostraram que o material acumulado no interior de próteses tubulares, quando utilizados em cultura de neurônios, exercem ações tróficas, isto é, promovem tanto o crescimento como a sobrevivência desses neurônios (Lundborg et alii., 1982a,b,c; Longo et alii., 1983a,b; Longo et alii., 1984).

Efeito das Neuroquinas CNTF e IL-6 sobre a Regeneração de Neurônios Sensitivos

Os animais do grupo controle (não op.) apresentaram número de neurônios sensitivos significativamente maior que os animais dos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais dos grupos experimentais. Esses resultados estão de acordo com a literatura pertinente e confirmam o trabalho de vários autores.

Richardson e colaboradores descreveram uma redução na regeneração axonal em camundongos da linhagem C57BL/6J (Xin et alii., 1990; Lu et alii., 1994); nessa mesma linhagem de camundongos Lainetti e colaboradores em 1995 descreveram uma redução na resposta regenerativa de neurônios do gânglio da raiz dorsal após a transecção do nervo e reparo por tubulização; essa perda de neurônios do gânglio sensitivo estaria relacionada à lesão periférica de seus axônios (Aldskogius et alii., 1992).

Macrófagos acumulam nos gânglios da raiz dorsal de nervos lesados, exercendo ação benéfica na regeneração dos axônios dos neurônios sensitivos (Lu & Richardson, 1991, 1993). A expressão do RNAm das interleucinas IL-6 e IL-1 β e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é sempre antecipada pela presença dos macrófagos nos gânglios da raiz dorsal de nervos normais e seccionados (Johnston, 1988; Northemann et alii., 1989). Alguns autores consideram a IL-6 como um fator de proteção contra lesão; Murphy et alii. (1995) detectaram a presença de IL-6 em subpopulações de neurônios sensitivos de médio e grande tamanho após lesão do nervo ciático de ratos. Em nosso trabalho não foi

observado qualquer efeito da IL-6 sobre a sobrevivência de neurônios sensitivos axotomizados, quando administrada dentro das próteses tubulares em doses farmacológicas. Do mesmo modo, no grupo de animais que receberam tubos preenchidos com CNTF, não foi observado aumento do número de neurônios sobreviventes nos gânglios da raiz dorsal, após secção e reparo de seus nervos correspondentes.

Efeito do CNTF sobre a Regeneração de Neurônios Motores

Quando analisamos o número de motoneurônios que sobreviveram à lesão de seus axônios na porção média da coxa, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (CNTF, colágeno e vazio) e entre esses e os animais do grupo não operado.

Essa diferença na taxa de sobrevivência dos motoneurônios em relação aos neurônios sensitivos poderia ser explicada pela maior dependência dos neurônios sensitivos aos fatores neurotróficos para sobreviverem após lesão de seus axônios em animais adultos. A axotomia poderia levar à morte neuronal por falta de suporte neurotrófico derivado do alvo. Diferentes classes de neurônios sensitivos respondem diferentemente aos membros das famílias de neurotrofinas e também expressam diferentes tipos de receptores trk de alta afinidade para esses fatores neurotróficos (McMahon et al., 1994). Após lesão de nervos periféricos, há um aumento na síntese de NGF e do BDNF pelas células de Schwann, consequência da perda do contacto axonal (Heumann et al., 1987; Meyer, et al., 1992). No entanto, há um intervalo de dias entre a lesão axonal e o pico máximo de síntese desses fatores, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a perda neuronal observada. Vários trabalhos demonstraram que a administração de NGF exógeno pode impedir parcialmente a perda de neurônios sensitivos induzida por lesão axonal: Da-Silva & Langone (1989) relataram que a adição de NGF exógeno no interior de próteses tubulares, utilizadas para o reparo do nervo ciático transecionado de camundongo, resultou em aumento de 50% do número de neurônios sensitivos dos gânglios da raiz dorsal que sobreviviam à lesão, quando comparados com animais com implantes de próteses tubulares vazias; Otto et alii. (1987) descreveram uma perda neuronal de 35% dos neurônios sensitivos dos gânglios da raiz dorsal de ratos adultos após a lesão por

secção do nervo ciático, e relataram que a aplicação de NGF ao redor dos cotos proximais contidos no interior de tubos de silicone preveniu completamente a degeneração desses neurônios.

A maior taxa de sobrevivência dos motoneurônios que sofreram lesão axonal poderia ser explicada pela produção ou liberação de fatores tróficos pelos cotos dos nervos seccionados. Esses fatores chegariam ao corpo do neurônios através do sistema axonal de transporte retrógrado.

Um dos fatores com estas características é o CNTF, identificado e parcialmente purificado em tecido ocular de embrião de galinha por suas ações nos neurônios pós-ganglionares parassimpático do gânglio ciliar (Adler et alii., 1979). Investigações posteriores demonstraram também uma ação *in vitro* desse fator sobre neurônios simpáticos e sensitivos periféricos e sobre neurônios centrais do hipocampo, locus ceruleus e dopaminérgicos mesencéfalicos (Ip et alii., 1991; Sendtner et alii., 1991; Hagg et alii., 1992; Louis et alii., 1993; Magal et alii., 1993).

A clonagem do gene para o CNTF no final da década de 80 e sua expressão em bactérias (Lin et alii., 1989; Stöckli et alii., 1989; Masaiakowski et alii., 1991; Negro et alii., 1991) levou à síntese do mesmo em quantidades suficientes para estudos biológicos, geração de anticorpos e preparo de sondas de RNA e DNA (Richardson, 1994), o que permitiu a determinação de sua expressão em vários tecidos e o estudo de suas ações *in vitro* e *in vivo*.

In vitro, foi demonstrado que o CNTF induz o fenótipo colinérgico em neurônios simpáticos de ratos neonatais, aumentando a atividade da enzima ChAT em até 100 vezes (Saadat et alii., 1989); aumenta a produção do RNAm do peptídeo vasointestinal (VIP), substância P e somatostatina e diminui a produção do RNAm do neuropeptídeo Y e de receptores muscarínicos (Rao et alii., 1992b; Ludlan & Kessler, 1993); inibe a proliferação de células precursoras neuronais em gânglios simpáticos nos estágios iniciais do desenvolvimento de embriões de galinha (Ernsberger et alii., 1989).

In vivo, CNTF impede a morte de 50% dos neurônios do núcleo facial após axotomia em ratos neonatos, quando aplicado na dose de 5 µg no coto proximal do nervo seccionado (Sendtner et alii., 1990). Quando injetado na câmara ocular posterior, CNTF prolonga a sobrevivência de células ganglionares da retina

axotomizadas (Mey & Thanos, 1993). Diminui também a morte de neurônios do tálamo após lesão cortical (Clatterbuck et alii., 1993) e da substância negra após lesão da via nigrostriatal (Hagg and Varon, 1992). Quando aplicado na membrana cório-alantóide de embrião de galinha (2 a 20 μ g diariamente), CNTF impede a morte celular de 50% dos motoneurônios medulares (Oppenheim et alii, 1991).

Foi também demonstrado que CNTF é expresso no período pós-natal, principalmente em células de Schwann mielinizantes no SNP (Stöckli et alii., 1989, 1991; Friedman et alii., 1992; Rende et alii., 1992; Sendtner et alii., 1992), e em subpopulações de astrócitos tipo 1 no SNC (Dobre et alii., 1992; Stöckli et alii., 1991). Em nervos periféricos, a concentração de CNTF é estimada em cerca de 5 nmol/kg, isto é, 100 vezes maior que a concentração de NGF ou qualquer outra neurotrofina no tecido nervoso. A concentração de CNTF, encontrada no citoplasma das células de Schwann é 10.000 vezes maior que o volume de NGF transportado retrógradamente em nervo ciático de ratos (Heumann et alii., 1987; Gupta et alii., 1992; Richardson, 1994).

O período de morte neuronal natural que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso é seguido por um período de aumento da sensibilidade à lesão axonal em roedores recém nascidos. Schmalbruch (1984) mostrou que a lesão do nervo ciático de ratos logo após o nascimento, leva à morte da quase totalidade dos neurônios que entram na sua formação. Em ratos, esse período de vulnerabilidade dos motoneurônios coincide com os baixos níveis de CNTF no nervo (Stöckli et alii., 1989). Essa vulnerabilidade diminui com o aumento da idade dos animais, sendo coincidente com níveis maiores de CNTF produzidos pelas células de Schwann mielinizantes a partir do final da primeira semana de vida (Sendtner et alii., 1992). Estas observações levaram a noção de que o CNTF encontrado em grande quantidade no citoplasma das células de Schwann mielinizantes poderia atuar como um fator de proteção contra lesão do nervo (Sendtner, et alii, 1992c, 1994). Estudos posteriores com animais mutantes trouxeram mais evidências para uma possível função de "proteção contra lesões" do CNTF. Camundongos *pmn* ("progressive motor neuropathy"), utilizados como modelo experimental para doenças do neurônio motor inferior no homem, apresentam degeneração progressiva dos motoneurônios que se inicia nos segmentos lombossacrais da medula espinhal, progride para segmentos cervicais

para, finalmente, atingir os núcleos motores dos nervos cranianos, incluindo o núcleo motor do VII (Schmalbruch et alii., 1991). Para analisar a função do CNTF como um fator de lesão, Sendtner e colaboradores (1992b, 1997) seccionaram o nervo facial de camundongos *pmn* com 4 semanas de idade e observaram uma diminuição na morte dos motoneurônios desse núcleo. Esse efeito de proteção era dramaticamente reduzido em camundongos *pmn* com desativação ("knock-out") do gene para CNTF, indicando que o CNTF endógeno evitaria a morte de motoneurônios. Sendtner e colaboradores (1997), com o objetivo de estudar se os animais *pmn* apresentavam níveis menores de CNTF, dosaram os níveis da proteína no nervo ciático de camundongos normais com 4 semanas de idade, e compararam com os níveis encontrados em camundongos *pmn* sem alteração do gene para CNTF, não constatando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados. Resultados semelhantes foram obtidos da análise da bioatividade do CNTF extraído de nervos e testado sobre neurônios embrionário de galinha (Sendtner et alii., 1997).

Do exposto, pode-se supor que a liberação do CNTF pelas células de Schwann logo após a lesão do nervo garantiria a sobrevivência dos motoneurônios axotomizados (Sendtner et alii., 1990). A transecção nervosa privaria tanto neurônios motores como sensitivos dos fatores tróficos derivados de seus alvos; os neurônios motores teriam uma fonte imediata de um fator promotor de sobrevivência (CNTF) liberado pelas células de Schwann lesadas, sobrevivendo, assim, à axotomia; os neurônios sensitivos, por outro lado, estariam mais susceptíveis à degeneração após axotomia, pois seriam dependentes de fatores neurotróficos produzidos com um certo retardo temporal pelas células de Schwann após a lesão nervosa. O fato dessa morte neuronal sensitiva ser parcial e não total, seria explicada pelo fato de alguns desses neurônios apresentarem um estoque próprio (autócrino) de fatores neurotróficos (BDNF por exemplo), não dependendo, portanto, do suprimento periférico de fatores neurotróficos para sua sobrevivência (Acheson et alii., 1995).

Outra molécula que poderia participar na sobrevivência dos motoneurônios seria a IL-6, pois foi demonstrado que essa neurocina participa em

eventos fisiológicos e patológicos que ocorrem no SNC e SNP durante o desenvolvimento e na fase adulta.

A IL-6 é uma neurocina produzida por células T, células B, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, micróglia, astrócitos e clones de células de Schwann imortalizadas (Hirano, 1991; Kiefer et alii., 1993; Bolin et alii., 1995). Estruturalmente a IL-6 é um homólogo do CNTF e do LIF (Bazan, 1991), agindo sobre complexos receptores semelhantes (Murakami et alii., 1993).

Reichert e colaboradores (1996) estudaram a expressão e produção da IL-6 em nervos periféricos lesados, utilizando linhagens de camundongos que apresentavam diferenças na velocidade da degeneração Walleriana, demonstrando que essa neurocina era produzida principalmente por macrófagos e fibroblastos residentes do nervo, e que começava a ser detectada na segunda hora após a axotomia. Demonstraram também que nem o RNAm, nem a proteína IL-6 eram expressos por células não neuronais residentes em nervos intactos.

A produção de IL-6 em camundongos com degeneração Walleriana rápida ocorre em duas fases: a primeira tem início logo após a lesão e apresenta pico de produção no segundo dia; a segunda inicia-se no quarto dia após a lesão. Em camundongos com degeneração Walleriana de progressão lenta foram constatados níveis de produção de IL-6 significativamente menores e com apenas uma fase de produção (Reichert et alii., 1996).

O estudo da produção de IL-6 por Reichert et alii (1996) não se limitou apenas aos segmentos em degeneração Walleriana, incluindo também os segmentos proximais, ou seja, segmentos dos neuromas situados a 3 mm do local da lesão. Nestes neuromas, os níveis de produção foram também maiores em camundongos com degeneração Walleriana rápida. A diferença na quantidade de IL-6 produzida nesses camundongos com degeneração Walleriana rápida e lenta, sugere que a maior produção da molécula é um evento relacionado diretamente à própria degeneração Walleriana (Reichert et alii., 1996).

Macrófagos e fibroblastos derivados de nervos lesados produzem grande quantidade de IL-6 em cultura. Este achado está em concordância com estudos que mostraram que a produção da proteína em outros tecidos é feita principalmente por macrófagos e fibroblastos (Hirano, 1991).

A produção de IL-6 por macrófagos e fibroblastos pode ser aumentada *in vitro* com a adição de lipopolissacarídeo (LPS) ao meio de cultura, sugerindo que o estímulo apropriado, quando presente *in vivo*, pode aumentar a produção de IL-6 (Rechert et alii., 1996). Por outro lado, foi observado que células de Schwann em cultura produzem pouca IL-6, mesmo na presença de LPS (Reichert et alii., 1996). É improvável, portanto, que as células de Schwann contribuam de maneira significativa para a produção de IL-6 em nervos lesados.

Fibroblastos residentes em nervos lesados parecem ser os maiores produtores de IL-6, pois altos níveis dessa neurocina são produzidos em nervos lesados *in vitro* e durante os dois primeiros dias da degeneração *in vivo*, antes do recrutamento dos macrófagos da circulação para o nervo lesado. Por outro lado macrófagos produzem também IL-6, pois o segundo pico de aumento da produção dessa linfocina inicia-se no quarto dia de degeneração *in vivo*, momento em que ocorre aumento na população de macrófagos no interior do nervo (Beuche & Friede, 1984; Scheidt & Friede, 1987).

IL-1 e o TNF- α são indutores da expressão de IL-6 (Aloisi et alii., 1992; Planck et alii., 1992; Cadman et alii., 1994). Rotshenker e colaboradores (1992) documentaram produção ativa de IL-1 em nervos lesados, *in vitro* e *in vivo*, de camundongos com degeneração Walleriana rápida. A atividade da IL-1 foi detectada nas primeiras 5 horas de incubação em meio condicionado de nervo ciático extraído de camundongos. É provável, portanto, que nervos lesados comecem a produzir a IL-1 que, por sua vez, induziria a produção de IL-6 (Reichert et alii., 1996).

A expressão de TNF- α foi estudada em nervos periféricos de ratos pela imunocitoquímica (Stoll et alii., 1993). Reichert e colaboradores (1996) detectaram produção de TNF- α em meio condicionado de nervos lesados somente 14 dias após lesão, sugerindo, portanto, o não envolvimento do TNF- α no aumento da produção de IL-6 durante os primeiros dias de degeneração Walleriana. Além disso, a IL-6 poderia suprimir a produção de TNF- α (Aderka et alii., 1989).

IL-6 presente em neuromas e nervos em degeneração Walleriana pode desempenhar pelo menos três funções na fisiopatologia das lesões de nervos periféricos. **Primeiro**, a demonstração que a IL-6 é produzida em neuromas e em segmentos nervosos em degeneração sugere que a mesma estaria disponível

continuamente aos neurônios simpáticos, sensitivos e motores axotomizados. IL-6 promove o crescimento, sobrevivência e/ou diferenciação de células nervosas (Sato et alii., 1988; Kushima & Hatanaka, 1992; Nakafuku et alii., 1992; Fann & Patterson, 1994; Munhoz Fernandez, 1994 et alii., 1994; Oh & O'Malley, 1994), podendo ter influência semelhante em neurônios axotomizados. **Segundo**, IL-6 poderia modular a produção de outras citocinas e fatores de crescimento após lesão do nervo, pois há um aumento da atividade da IL-1 nos neuromas e nos segmentos em degeneração Walleriana (Rotsenker et alii., 1992). IL-1, por sua vez, também induz síntese de NGF (Lindholm et alii., 1987; Brown et alii., 1991). IL-6 induz a produção de IL-1, tendo um papel importante na modulação da síntese de IL-1 e NGF (Schindler et alii., 1989). **Terceiro**, foi demonstrado que a IL-6 estimula, de maneira autocrina, a proliferação de fibroblastos pulmonares (Fries et alii., 1994), sugerindo que a IL-6 poderia contribuir para a proliferação dos fibroblastos em nervos periféricos lesados.

Os resultados de Reichert e colaboradores (1996) sobre a produção de IL-6 diferem em dois aspectos das descrições feitas por Bolin et alii. (1995) em ratos. **Primeiro**, clones de células de Schwann imortalizadas produziram IL-6 após serem combinadas com LPS, IL-1 ou TNF- α . Reichert e colaboradores (1996) não detectaram níveis significantes de IL-6 em cultura de células de Schwann derivadas de nervos com ou sem adição de LPS ao meio de cultura. **Segundo**, em ratos o RNAm da IL-6 foi detectado nas primeiras 12 horas após o esmagamento do nervo e em nenhum outro tempo, sugerindo uma produção transitória de IL-6 nesses animais. Reichert e colaboradores (1996) documentaram produção de IL-6 por tempo prolongado nas duas linhagens de camundongos.

Efeito do CNTF e da IL-6 sobre o Número de Axônios Mielínicos Regenerados

Os dois grupos de animais experimentais (próteses tubulares preenchidas com CNTF ou IL-6) apresentaram número significativamente maior de axônios mielínicos quando comparados aos animais implantados com próteses vazias ou preenchidas apenas com o veículo (colágeno). Não houve diferença

significativa entre os animais normais e aqueles implantados com próteses tubulares preenchidas com CNTF.

Imunorreatividade aos receptores α para CNTF (CNTFR α) tem sido demonstrada no pericário e axônios de praticamente todos os subtipos de neurônios do gânglio da raiz dorsal (MacLennan, 1996), sendo consistente com o transporte retrogrado de CNTF por neurônios sensitivos adultos (Curtis et alii., 1993). Se a administração de CNTF não promove a sobrevivência de neurônios axotomizados do gânglio da raiz dorsal, qual seria sua função durante a regeneração nervosa periférica? CNTF exógeno possivelmente induz a modificação da bioquímica neuronal, pois foi demonstrado aumento dos níveis de substância P (SP) e do gene do peptídeo relacionado à calcitonina (CGRP) em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos após injeção sistêmica de CNTF (Apfel et alii., 1993). CNTF teria também um efeito promotor do crescimento de neuritos em axônios lesados, como demonstrado em neurônios do gânglio ciliar (Unsicker & Wiegandt, 1988; Varon et alii., 1979), neurônios da medula espinhal de embrião de galinha em cultura (Oyesiku & Wigston, 1996), em terminais de axônios motores de músculos adulto intactos (Gurney et alii., 1992), e em nervo ciático transeccionado de ratos adulto (Sahenk et alii., 1994).

A produção de IL-6 é rapidamente elevada no SNC após lesão cerebral (Kiefer et alii., 1993; Kossmann et alii., 1996; Woodroffe et alii., 1991) e no SNP após axotomia (Bolin et alii., 1995; Bourde et alii., 1996; Hirota et alii., 1996; Murphy et alii., 1995; Reichert et alii., 1996). Neurônios axotomizados, células gliais, fibroblastos e macrófagos foram identificados como fontes produtoras de IL-6 (Bolin et alii., 1995; Murphy et alii., 1995; Reichert et alii., 1996). O acúmulo local de IL-6 após lesão nervosa acelera a regeneração nervosa periférica em camundongos transgênicos que expressam receptores para IL-6 (Hirota et alii., 1996). IL-6 provavelmente teria funções similares durante o desenvolvimento do sistema nervoso ou após lesões axonais, sugerindo sua participação no crescimento de axônios (Murphy et alii., 1995; Hirota et alii., 1996).

Os resultados de nosso trabalho demonstram que a administração local de CNTF e IL-6 promove a regeneração de axônios periféricos lesados, embora sem efeito sobre a sobrevivência dos neurônios atingidos pelo trauma. Nossos resultados sugerem também um possível potencial terapêutico para o uso das

neuroquinas CNTF e IL-6 no auxílio do tratamento de lesões nervosas periféricas, pois a estimulação do brotamento axonal poderia ser decisiva para o sucesso funcional da regeneração nervosa periférica (Brushart, 1993).

CONCLUSÕES

O uso combinado das neuroquinas fator neurotrófico ciliar (CNTF) e interleucina 6 (IL-6) e da técnica de tubulização para o reparo de nervos periféricos em camundongos permitiu concluir que:

1. A administração das neuroquinas CNTF e IL-6 no interior de próteses tubulares estimula a regeneração nervosa periférica.
2. A injeção local das neuroquinas CNTF e IL-6 estimula o brotamento de axônios em regeneração.
3. As neuroquinas CNTF e IL-6 exógenas não aumentam a taxa de sobrevivência de neurônios sensitivos primários axotomizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

*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, BIOSIS, 1989

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anat. Rec.**, **94**: 239-46, 1946.
- ABRAHAMS, 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.
- ACHESON, A.; CONOVER, J.C.; FANDL, J.P.; DECHIARA, T.M.; RUSSELL, M.; THADANI, A.; AQUINTO, S.P.; YANCOPOULOS, G.D.; LINDSAY, R.M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature** **374**: 450-3, 1995.
- ADERKA, D.; LE, J.M.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumors necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. **J. Immunol.**, **143**: 3517-23, 1989.
- 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.
- ADLER, R.; LANDA, K.B.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of atrophic activity for ciliary neurons. **Science** **204**: 1434-6, 1979.
- ALDSKOGIUS, H.; ARVIDSSON, J.; GRANT, G. Axotomy-induced changes in primary sensory neurons. Pages 363-383 in S.S.Scott, Ed., *Sensory Neurons*. Oxford University Press, New York, 1992.
- ALLT, G. Pathology of the peripheral nerve. In: *THE PERIPHERAL nerve*. Ed. D.N. Landon. London, Chapman & Hall, 1976. p. 666-739.
- ALOISI, F.; CARE, A.; BORSELLINO, G.; GALLO, P.; ROSA, S.; BASSANI, A.; CABIBBO, A.; TESTA, U.; LEVI, G.; PESCHLE, C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in responses to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, **149**: 2358-66, 1992.
- APFEL, S.C.; AREZZO, J.C.; MORAN, M.; KESSLER, J.A. Effects of administration of ciliary neurotrophic factor on normal motor and sensory peripheral nerves in vivo. **Brain Res.** **604**: 1-6, 1993.
- ARAKAWA, Y.; SENDTNER, M.; THOENEN, H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: Comparison with other neurotrophic factors and cytokines. **J. Neurosci.** **10**: 3507-15, 1990.
- AUSTIN, L. & BURGESS, A.W. Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukemia inhibitory factor and other cytokines. **J. Neurol. Sci.**, **103**: 193-7, 1991.
- BARBACID, M. The trk family of neurotrophin receptors. **J. Neurobiol.** **25**: 1386-403, 1994.
- BARBIN, G.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. **J. Neurochem.** **43**: 1468-78, 1984.
- BARDE, Y.A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain, **Embo. J.** **1**: 549-53, 1982.
- BARTON, A.A. An electron microscopic study of degeneration and regeneration of nerve. **Brain**, **85**: 799-808, 1962.

- BAZAN, J.F. Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. **Neuron** **7**: 197-208, 1991.
- BERKEMEIER, L.R.; WINSLOW, J.W.; KAPLAN, D.R.; NIKOLICS, K.; GOEDDEL, D.V.; ROSENTHAL, A. Neutrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. **Neuron** **7**: 857-66, 1991.
- BEUCHE, W. & FRIEDE, R.L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. **J. Neurocytol.**, **13**: 767-96, 1984.
- 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.
- BIXBY, J.L. & JHABVALA, P. Extracellular matrix molecules and cell adhesion molecules induce neurites through different mechanisms. **J. Cell. Biol.** **111**: 2725-32, 1990.
- BIXBY, J.L. & ZHANG, R. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. **J. Cell. Biol.** **110**: 1253-60, 1990.
- 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.
- BOLIN, L.M.; VERITY, A.N.; SILVER, J.E.; SHOOTER, E.M.; ABRAMS, J.S. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. **J. Neurochem.**, **64**: 850-8, 1995.
- BOURDE, O.; KIEFER, R.; TOYAKA, K.V.; HARTUNG, H.P. Quantification of interleukin-6 messenger RNA in Wallerian degeneration by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Neuroimmunol.**, **69**: 135-40, 1996.
- 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.
- BROWN, M.C.; PERRY, V.H.; LUNN, E.R.; GORDON, S.; HEUMANN, R. Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve factor. **Neuron**, **6**: 359-70, 1991.
- BRUSHART, T.M.E. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. **J. Neurosci.** **13**: 2730-8, 1993.
- BULLOCH, A.G.M.; SYED, N.I.; RICHARDSON, P.M. Ciliary neurotrophic factor induces sprouting by adult lymnaea neurons in vitro. In: 22nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Anaheim, CA., October 25-30, 1992, Abstract 1095p.
- BUNGE, M.B. Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. **J. Cell Biol.**, **56**: 713-35, 1973.
- CADMAN, E.D.; WITTE, D.G.; LEE, C.M. Regulation of the release of interleukin-6 from human astrocytoma cells. **J. Neurochem.**, **63**: 980-7, 1994.
- 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].

- 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.
- CLATTERBUCK, R.E.; PRICE, D.L.; KOLIATSOS, V.E. Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **90**: 2222-6, 1993.
- COHEN, S.; BIGAZZI, P.E.; YOSHIDA, T. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. **Cell Immunol.**, **12**: 150-9, 1974.
- COHEN, S.; LEVI-MANTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, **40**: 1014-8, 1954.
- COLOGNATO-PYKE, H.; O'REAR, J.J.; YAMADA, Y.; CARBONETTO, S.; CHENG, Y.-S.; YURCHENCO, P.D. Mapping of network-forming, heparin-binding, and $\alpha 1\beta 1$ integrin-recognition sites within the α -chain short arm of laminin-1. **J. Biol. Chem.**, **270**: 9398-406, 1995.
- CONLEY, J.J. Facial nerve grafting in treatment of parotid gland tumors. **Arch. Surg.**, **70**: 359-66, 1955.
- 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.
- CURTIS, R.; ADRYAN, K.M.; ZHU, Y.; HARKNESS, P.J.; LINDSAY, R.M.; DISTEFANO, P.S. Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. **Nature** **365**: 253-5, 1993.
- 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.
- 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. Fatores neurotróficos: estrutura, funções e aplicações clínicas. In: *Atualização em Neurociências 1*: 1995, 20p.
- 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. In: 16th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, D.C., November 9-14, 1986, Abstract 190.11, 1986.
- DA-SILVA, C.F.; MADISON, R.; DIKES, P.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L. An in vivo model to quantify motor and sensory peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guide tubes. *Brain Res.*, 342: 307-15, 1985.
- DASTON, M.M. & RATNER, N. Expression of P30, a protein with adhesive properties, in Schwann cells and neurons of the developing and regenerating peripheral nerve. *J. Cell Biol.*, 96: 1337-54, 1991.
- DAVIES, S.; ALDRICH, T.H.; IP, N.Y.; STAHL, N.; SCHERER, S.; FARRUGGELLA, T.; DISTEFANO, P.S.; CURTIS, R.; PANAYOTATOS, N.; GASCAN, H.; CHEVALIER, S.; YANCOPOULOS, G.D. Released form of CNTF receptor α component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259: 1736-9, 1993a.
- DAVIES, S.; ALDRICH, T.H.; STAHL, N.; PAN, L.; TAGA, T. KISHIMOTO, T.; IP, N.Y.; YANCOPOULOS, G.D. LIFR β and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260: 1805-8, 1993b.
- DAVIES, S.; ALDRICH, T.H.; VALENZUELA, D.M. WONG, V.; FURTH, M.; SQUINTO, S.P.; YANCOPOULOS, G.D. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253: 59-63, 1991.
- DENK, W. Ueber schussverletzungen der nerven. *Beitr. Klin. Chir.*, 91: 217-21, 1914.
- DOBREA, G.M.; UNNERSTALL, J.R.; RAO, M.S. The expression of CNTF message and immunore-activity in the central and peripheral nervous system of the rat. *Devl. Brain Res.* 66: 209-19, 1992.
- DONAT, J.R. & WISNIEWSKI, H.M. The spatio-temporal pattern of Wallerian degeneration in mammalian peripheral nerves. *Brain Res.*, 53: 41-53, 1973.
- ECKENSTEIN, F.P.; ESCH, F.; HOLBERT, T.; BLACHER, R.W.; NICHI, R. Purification and characterization of a trophic factor for embryonic peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors. *Neuron*, 4: 623-31, 1990.
- 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.
- ERNFORS, P.; WETMORE, C.; OLSON, L.; PERSSON, H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5: 511-26, 1990.
- ERNSBERGER, U.; SENDTNER, M.; ROHRER, H. Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor. *Neuron* 2: 1275-84, 1989.
- FANN, M. -J. & PATTERSON, P.H. Neuropoietic cytokines and activin. A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 43-7, 1994.

- FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**, **13**: 43-60, 1990.
- FELSENFELD, D.P.; HYNES, A.; SKOLER, K.M.; FURLEY, A.J.; JESSELL, T.M. TAG-I can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-I requires an L1-like molecule and $\beta 1$ integrins. **Neuron**, **12**: 675-90, 1994.
- 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. **Prog. 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. Inst. Super. Sanita**, **24**: 143-58, 1988.
- FREEMAN, B.S. Adhesive neural anastomosis. **Plast. Reconstr. Surg.**, **1**: 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.
- FRIEDMAN, B.; SCHERER, S.S.; RUDGE, J.S.; HELGREN, M.; MORRISEY, D.; MCCLAIN, J.; WANG, D.Y.; WIEGAND, S.J.; FURTH, M.E.; LINDSAY, R.M.; IP, N.Y. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. **Neuron** **9**: 295-305, 1992.
- FRIES, K.M.; FELCH, M.E.; PHIPPS, R.P. Interleukin-6 is an autocrine growth factor for murine lung fibroblast subset. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, **11**: 552-60, 1994.
- GADIENT, R.A & OTTEN, U.H. Interleukin-6 (IL-6) – A molecule with both beneficial and destructive potentials. **Prog. Neurobiol.**, **52**: 379-90, 1997.
- GARRITY, R.W. The use of plastic and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. **Surg. Forum**, **6**: 517-20, 1955.
- GEARING, D.P.; COMEAU, M.R.; FRIEND, D.J.; GIMPEL, S.D.; THUT, C.J.; MCGOURTY, J.; BRASHER, K.K.; KING, J.; GILLIS, S.; MOSLEY, B.; ZIEGLER, S.F.; COSMAN, D. The IL-6 signal transducer, gp130: na oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. **Science**, **255**: 1434-7, 1992a.
- GEARING, D.P.; GOUGH, N.M.; KING, J.A.; HILTON, D.J.; NICOLA, N.A.; SIMPSON, R.J.; NICE, E.C.; KELSO, A.; METCALF, D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). **EMBO J.**, **6**: 3995-4002, 1987.
- GEARING, D.P.; THUT, C.J.; VANDENBOS, T.; GIMPEL, S.D.; DELANEY, P.B. KING, J.; PRICE, V.; COSMAN, D.; BECKMANN, M.P. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. **EMBO, J.** **10**: 2839-48, 1992b.

- GEREN, B.B. The formation from Schwann cell surface of myelin. **Exp. Cell Res.**, **7**: 558-62, 1954.
- GLÜCK, T. Ueber neroplastick auf dem Wege der transplantation. **Archs Klin. Chir.**, **25**: 606-16, 1880.
- 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.
- GOTZ, R.; KOSTER, R.; WINKLER, C.; FRIEDICH, R.; LOTTSPEICH, F.; SCHARTI, M.; THOENEN, H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. **Nature** **372**: 266-9, 1994.
- 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.
- GUÉNARD, V.; DINARELLO, C.A.; WESTON, P.J.; AEBISHER, P. Peripheral nerve regeneration in impeded by interleukin-1 receptor antagonist released from polymeric guidance channel. **J. Neurosci. Res.**, **29**: 396-400, 1991.
- GUPTA, S.K.; ALTARES, M.; BENOIT, R.; RIOPELLE, R.J.; DUNN, R.J.; RICHARDSON, P.M. Preparation and biological properties of native and recombinant ciliary neurotrophic factor. **J. Neurobiol.** **23**: 481-90, 1992.
- GUPTA, S.K.; HAGGARTY, A.J.; CARBONETTO, S.; RIOPELLE, R.J.; RICHARDSON, P.M.; DUNN, R.J. Trophic actions of ciliary neurotrophic factor on murine embryonal carcinoma cells. **Eur. J. Neurosci.** **5**: 977-85, 1993.
- GURNEY, M.E.; YAMAMOTO, H.; KWON, Y. Induction of motor neuron sprouting in vivo by ciliary neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor. **J. Neurosci.** **12**: 3241-7, 1992.
- HAAS, T.A. & PLOW, E.F. Integrin-ligand interactions: a year in review. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **6**: 656-62, 1994.
- HAGG, T. & VARON, S. Ciliary neurotrophic factor prevents axotomy-induced degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons. In: 22nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Anaheim, CA., October 25-30, 1992, Abstract 390.
- HAGG, T.; QUON, D.; HIGAKI, J.; VARON, S. Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. **Neuron**, **8**: 145-58, 1992.
- HAKES, S. & WANG, J.L. Extracellular matrix. New York, Academic Press, 1982.
- HALLBOOK, F.; IBANEZ, C.F.; PERSSON, H. Evolutionary studies of nerve growth factors family reveal a new member abundantly expressed in xenopus ovary. **Neuron** **6**: 845-58, 1991.
- HAMA, T.; MIYAMOTO, M.; TSUKUI, H.; NISHIO, C.; HATANAKA, H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. **Neurosci. Lett.** **104**: 340-4, 1989.
- HAMBURGER, V. The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. **J. Exp. Zool.** **68**: 449-94, 1934.

- HAMBURGER, V. & LEVI-MONTALCINI, R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. **J. Exp. Zool.** **111**: 457-501, 1949.
- 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. **Devl. 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.
- HEFTI, F.; Denton, T.L.; Knusel, B. and Lapchak, P.A. Neurotrophic factors: what are they and what are they doing? In: Neurotrophics Factors. Eds. S.E. Loughlin, J.S. Fallon. San Diego, Academic Press, 1993.
- HELGREN, M.E.; SQUINTO, S.P. DAVIS, H.L.; PARRY, D.J., BOULTON, T.G. HECK, C.S.; ZHU, Y.; YANCOPOULOS, G.D.; LINDSAY, R.M.; DISTEFANO, P.S. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. **Cell**, **76**: 493-504, 1994.
- HENRY, E.W.; CHIU, T.; NYLAS, E.; BRUSHART, T.M.; DIKKES, P.;SIDMAN, R.L. Nerve regeneration through biodegradable polyester tubes. **Exp. Neurol.**, **90**: 652-9, 1985.
- HEUMANN, R.; KORSHING, S.; BANDTLOW, C. and THOENEN, H. Changes of nerve growth factor synthesis in neuronal cells in response to sciatic nerve transection. **J. Cell Biol.** **104**: 1623-31, 1987.
- HIBI, M.; MURAKAMI, M.; SAITO, M.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Molecular cloning and expression of na IL-6 signal transducer, gp130. **Cell**, **63**: 1149-57, 1990.
- HIRANO, T. Interleukin-6. In: The cytokine handbook. Thomson, A. (ed), Academic Press, London, pp. 169-90, 1991.
- HIRANO, T.; TAGA, T.; NAKANO, N.; YASUKAWA, K.; KASHIWAMURA, S.; SHIMIZU, K.; NAKAJIMA, K.; PYUN, K.H.; KISHIMOTO, T. Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 5490-4, 1985.
- HIRANO, T.; YASUKAWA, K.; HARADA, H.; TAGA, T.; WATANABE, Y.; MATSUDA, T.; KASHIWAMURA, S.; NAKAJIMA, K.; KOYAMA, K.; IWAMATSU, A.; TSNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; MATSUI, H.; TAKAHARA, Y.; TANIGUCHI, T.; KISHIMOTO, T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature** **324**: 73-6, 1986.
- HIROTA, H.; KIYAMA, H.; KISHIMOTO, T.; TAGA, T. Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. **J. Expl. Med.**, **183**: 2627-34, 1996.
- 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.
- HOPKINS, S.J. & ROTHWELL, N.J. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. **TINS**, **18**: 83-8, 1995.
- 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 nerves anastomosed with silastic cuffs. **Curr. Top. Surg. Res.**, 187-90, 1971.
- 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, 1989.
- HYDÉN, H. Cell Eds J. Brachet, A.E. Mirsky. New York, Academic Press, 1960. p. 215-323.
- HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, **69**: 11-25, 1992.
- HYNES, R.O. & LANDER, A.D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. **Cell**, **68**: 303-22, 1992.
- IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci. Res.** **25**: 101-21, 1996.
- 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.
- IKEDA, K.; KINOSHITA, M.; TAGAYA, N.; SHIOJIMA, T.; TAGA, T.; YASUKAWA, K.; SUZUKI, H.; OKANO, A. Coadministration of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor delays progression of wobbler mouse motor neuron disease. **Brain Res.**, **726**: 91-7, 1996b.
- IP, N.Y.; LI, Y.; VAN DE STADT, I.; PANAYOTATOS, N.; ALDERSON, R.F.; LINDSAY, R.M. Ciliary neurotrophic factor enhances neuronal survival in embryonic rat hippocampal cultures. **J. Neurosci.**, **11**: 3124-34, 1991.
- IP, N.Y.; MCCLAIN, J.; BARREZUETA, N.X.; ALDRICH, T.H.; PAN, L.; LI, Y.; WIEGAND, S.J.; FRIEDMAN, B.; DAVIS, S.; YANCOPOULOS, G.D. The alpha component of the CNTF receptor is required for signalling and defines potential CNTF targets in the adult and during development **Neuron**, **10**: 89-102, 1993.

- IP, N.Y.; NYE, S.H.; BOULTON, T.G.; DAVIS, S.; TAGA, T.; LI, Y.; BIRREN, S.J.; YASUKAWA, K.; KISHIMOTO, T.; ANDERSON, D.J.; STAHL, N.; YANCOPOULOS, G.D. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. **Cell**, **69**: 1121-32, 1992a.
- IP, N.Y.; WIEGAND, S.J.; MORSE, J.; RUDGE, J.S. Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. **Eur. J. Neurosci.**, **5**: 25-33, 1992b.
- JOHNSTON, R.B.JR. Monocytes and macrophages. **N. Engl. J. Med.**, **318**: 747-52, 1988.
- KEY, A. & RETZIUS, G. Studien in der Anatomie des Nervensystems. **Arch. Microsk. Anat.**, **9**: 308-86, 1897.
- KEYNES, R.J.; JOHNSON, A.R.; PINI, A.; TANNAHILL, D.; COOK, G.M.W. Spinal nerve segmentation in higher vertebrates: axon guidance by repulsion and attraction. **Seminars in: The Neuroscience**, **8**: 339-45, 1996.
- KIEFER, R.; LINDHOLM, D.; KREUTZBERG, G.W. Interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneurons axotomy. **Eur. J. Neurosci.** **5**: 775-81, 1993.
- KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NARAZAKI, M.; TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, **86**: 1243-54, 1995.
- KOSSMANN, T.; HANS, V.; IMHOF, H.G.; TRENTZ, O.; MORGANTI-KOSSMANN, M.C. Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production by astrocytes. **Brain Res.**, **713**: 143-52, 1996.
- 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.
- KREUTZBERG, G.W. Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In: *The Axon: Structure, function and pathophysiology*. Waxman S.G., Kocsis, J.D. and Stys, P.K. ed. New York, Oxford University Press, 1995, p 355-74.
- KUREK, J.B.; AUSTIN, L.; CHEENA, S.S.; BARTLETT, P.F.; MURPHY, M. Up-regulation of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. **Neuromusc. Disord.** **6**: 105-14, 1996.
- KUSHIMA, Y. & HATANAKA, H. Interleukin-6 and leukemia inhibitory factor promote the survival of acetylcholinesterase-positive neurons in culture from embryonic rat spinal cord. **Neurosci. Lett.**, **143**: 110-4, 1992.
- KUSHIMA, Y.; HAMA, T.; HATANAKA, H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured catecholaminergic neurons in a chemically defined medium. **Neurosci. Res.**, **13**: 267-80, 1992.
- LAINETTI, R.D. **Ação estimulatória dos fatores de crescimento de fibroblastos ácido e básico (aFGF e bFGF) exógenos na regeneração nervosa periférica: Interação com as glicosaminoglicanas heparan-sulfato e heparina.** São Paulo, 1995. 133p. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. São Paulo].

- LAINETTI, R.D. & DA-SILVA, C.F. Local addition of monosialoganglioside GM1 stimulates peripheral axon regeneration *in vivo*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **26**: 841-5, 1993.
- LAINETTI, R.D.; PEREIRA, F.C.; DA-SILVA, C.F. Reduced sensory neuron regeneration by C57BL/6J mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **28**: 781-5, 1995.
- LANDIS, S.C. Development of sympathetic neurons: neurotransmitter plasticity and differentiation factors. **Prog. Brain Res.**, **100**: 19-23, 1994.
- LANDMESSER, L. & PILAR, G. Synaptic transmission and cell death during normal ganglionic development. **J. Physiol.** **241**: 737-49, 1974.
- 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].
- LÄRKFORSS, L.; ALDERSON, R.F.; PANAYOTATOS, N.; RADZIEJEWSKI, C.; LINDSAY, R.M. Effects of neurotrophins and CNTF on cerebellar purkinje cell development in vitro. In: IBRO Abs 3: 46, 1991.
- 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.
- LEBLANC, G & LANDIS, S. Development of choline acetyltransferase (CAT) in sympathetic innervation of rat sweat glands. **J. Neurosci.**, **6**: 260-5, 1986.
- LEIVO, I. & ENGVALL, E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 1544-8, 1988.
- LETOURNEAU, P.C.; CONDIC, M.L.; SNOW, D.M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. **J. Neurosci.**, **14**: 915-28, 1990.
- LETOURNEAU, P.C.; SHATTUCK, T.A.; ROCHE, F.K.; TAKEICHI, M.; LEMMON, V. Nerve growth cone migration onto Schwann cells involves the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. **Dev. Biol.**, **138**: 430-42, 1994.
- LEUNG, D.W.; PARENT, A.S.; CACHIANES, G.; ESCH, F.; COULOMBE, J.N.; NIKOLICS, K.; ECKENSTEIN, F.P.; NISHI, R. Cloning, expression during development, and evidence for release of a trophic factor for ciliary ganglion neurons. **Neuron**, **8**: 1045-53, 1992.
- LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**, **237**: 1154-62, 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.
- LIN, L.-F.; DRZISLAV, M.; LILE, J.D.; ARMES, L.G. BUTLER, E.T.; VANICE, J.L.; COLLINS, F. Purification cloning and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). **Science**, **246**: 1023-5, 1989.
- 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.
- 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.
- LOUIS, J.C.; MAGAL, E.; BURNHAM, P.; VARON, S. Cooperative effects of ciliary neurotrophic factor and norepinephrine on tyrosine hydroxylase expression in cultured rat locus coeruleus neurons. **Devl. Biol.**, **155**: 1-13, 1993.
- LU, X. & RICHARDSON, P.M. Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. **J. Neurosci.** **11**: 972-8, 1991.
- LU, X. & RICHARDSON, P.M. Responses of macrophages in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. **J. Neurocytol.**, **22**: 334-41, 1993.
- LU, X.; SKAMENE, E.; RICHARDSON, P.M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice, **Brain Res.** **652**: 174-2, 1994.
- LUBINSKA, L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow 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.
- LUCKENBILL-EDDS, L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. **Brain Res. Rev.**, **23**: 1-27, 1997.
- LUDLAM, W. H. & KESSLER, J. A. Leukemia inhibitory factor in ciliary neurotrophic factor regulate expression of muscarinic receptors in cultured sympathetic neurons. **Devl. Biol.** **155**: 497-506, 1993.
- 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.
- MACLENNAN, A.J.; VINSON, E.N.; MARKS, L.; MCLAURIN, D.L.; PFEIFER, M.; LEE, N. Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alfa expression in the rat nervous system. **J. Neurosci.**, **16**: 621-30, 1996.
- MADISON, R.; DA-SILVA, C.F.; DIKES, 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.
- MAGAL, E.; BURNHAM, P.; VARON, S. Effect of ciliary neurotrophic factor on rat spinal cord neurons *in vitro*: survival and expression of choline acetyltransferase and low-affinity nerve growth factor receptors. **Dev. Brain Res.**, **63**: 141-50, 1991b.
- MAGAL, E.; BURNHAM, P.; VARON, S. Effect of CNTF on low-affinity NGF receptor expression by cultured neurons from different rat brain regions. **J. Neurosci. Res.**, **30**: 560-6, 1991a.
- MAGAL, E.; LOUIS, J.C.; OUDEGA, M.; VARON, S. CNTF promotes the survival of neonatal rat corticospinal neurons *in vitro*. **NeuroReport**, **4**: 779-82, 1993.
- MALIK, N.; KALLESTAD, J.C.; GUNDERSON, N.L.; AUSTIN, S.D.; NEUBAUER, M.G.; OCHS, V.; MARQUARDT, H.; ZARLING, J.M.; SHOYAB, M.; WEI, C.M. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. **Mol. Cell Biol.**, **9**: 2847-53, 1989.
- 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.
- MANTHORPE, M.; SKAPER, S.D.; WILLIAMS, L.R.; VARON, S. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor. **Brain Res.**, **367**: 282-6, 1986.
- 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].

- MARTINI, R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. **J. Neurocytol.**, **23**: 1-28, 1994.
- 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, 1989.
- MARTINI, R.; XIN, Y.; SCHMITZ, B.; SCHACHNER, M. The L2/HNK-1 carbohydrate epitope is involved in the preferential outgrowth of motor neurons in ventral roots and motor nerves. **Eur. J. Neurosci.**, **4**: 628-39, 1992.
- MASIAKOWSKI, P.; LIU, H.; RADZIEJEWSKI, C.; LOTTSPEICH, F.; OBERTHUER, W.; WONG, V.; LINDSAY, R.M.; FURTH, M.E. AND PANAYOTATOS, N. Recombinant human and rat ciliary neurotrophic factors. **J. Neurochem.**, **57**: 1003-12, 1991.
- MCDONALD, N.Q. & CHAO, M.V. Structural determinants of neurotrophin action. **J. Biol. Chem.**, **270**: 19669-72, 1995.
- MCMAHON, S.B.; ARMANINI, M.P.; LING, L.H. and PHILLIPS, H.S. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. **Neuron**, **12**: 1161-71, 1994.
- 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.
- MESULAM, M.M. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase immunohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. **J. Histochem. Cytochem.**, **26**: 106-17, 1978.
- MEY, J. & TANOS, S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats *in vivo*. **Brain Res.** **602**: 304-17, 1993.
- MEYER, M.; MATSUOKA, C.; WETMORE, C.; OLSON, L.; and THOENEN, H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: Different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. **J. Cell Biol.** **119**: 45-54, 1992.
- MILLER, F.D.; TETZLAFF, W.; BISBY, M.A.; FAWCETT, J.W.; MILNER, R.J. Rapid induction of the major embryonic α -tubulin mRNA, T α 1, during nerve regeneration in adult rats. **J. Neurosci.**, **9**: 1452-63, 1989.
- 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.; WENDELL, 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.

- MUNOZ FERNANDEZ, M.A.; CANO, E.; O'DONNELL, C.A.; DOYLE, J.; LIEW, F.Y.; FRESNO, M. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ , and interleukin-6 but not TNF- β induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide. **J. Neurochem.**, **62**: 1330-6, 1994.
- MURAKAMI, M.; MASAHICO, H.; NAKAGAWA, N.; NAKAGAWA, T.; YASUKAWA, K.; YAMANISHI, K.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. **Science**, **260**: 1808-10, 1993.
- MURAKAMI, M.; NARAZAKI, M.; HIBI, M.; YAWATA, H.; YASUKAWA, K.; HAMAGUCHI, M.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Critical cytoplasmic region of the interleukin-6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 11349-53, 1991.
- MURPHY, P.G.; GRONDIN, J.; ALTARES, M.; RICHARDSON, P.M. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. **J. Neurosci.**, **15**: 5130-8, 1995.
- NAKAFUKU, M.; SATOH, T.; KAZIRO, Y. Differentiation factors, including nerve growth factor, fibroblast growth factor, and interleukin-6, induce an accumulation of an active ras-GTP complex in rat pheochromocytoma PC12 cells. **J. Biol. Chem.**, **267**: 19448-54, 1992.
- NAWA, H. & PATTERSON, P.H. Separation and partial characterization of neuropeptide-inducing factors in heart cell conditioned medium. **Neuron**, **4**: 269-77, 1990.
- NEGRO, A.; CORONO, G.; BIGON, E.; MARTINI, I.; GRANDI, C.; SKAPER, S.D.; CALLEGARO, L. Synthesis, purification, and characterization of human ciliary neuronotrophic factors from *E. coli*. **J. Neurosci. Res.**, **29**: 251-60, 1991.
- NEUGEBAUER, K.M.; TOMASELLI, K.J.; LILIEN, J.; REICHARDT, L.F. N-cadherin, N-CAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes *in vitro*. **J. Cell Biol.**, **107**: 1177-87, 1988.
- NILSSON, A-S; FALCK, P.; FAINZILBER, M.; PERSSON, H. AND IBÁÑEZ C.F. Neurotrophin-7: A novel member of the neurotrophin family from the zebra fish. In: 27th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA., October 25-30, 1997 Abstract 566.13. p. 1425.
- NORTHEMANN, W.; BRACIAK, T.A.; HATTORI, M.; LEE, F.; FEY, G.H. Structure of rat interleukin-6 gene and its expression in macrophage-derived cells. **J. Biol. Chem.** **264**: 16072-82, 1989.
- OH, Y.J. & O'MALLEY, K.L. IL-6 increases choline acetyltransferase but not neuropeptide transcripts in sympathetic neurons. **NeuroReport**, **5**: 937-40, 1994.
- OLSSON, Y. & KRISTENSSON, K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. **Acta Neuropathol.**, **23**: 105-11, 1973.
- OPPENHEIM, R.W.; PREVETTE, D.; YIN, Q.W.; COLLINSAND, F.; MACDONALD, J. Control of embryonic motoneuron survival *in vivo* by ciliary neurotrophic factor. **Science**, **251**: 1616-8, 1991.
- OTEY, C.A.; PAVALKO, F.M.; BURRIDGE, K. An interaction between α -actinin and β 1-integrin subunit *in vitro*. **J. Cell Biol.**, **111**: 721-9, 1990.

- OTTO, D.; UNSICKER, K.; CROTHER, C. Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on death in adult rat dorsal root ganglia. **Neurosci. Lett.**, **83**: 156-60, 1987.
- OYESIKU, N.M. & WIGSTON, D.J. Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons. **J. Comp. Neurol.**, **364**: 68-77, 1996.
- PATTERSON, P.H. & NAWA, H. Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. **Cell**, **72 (Suppl.)**: 123-37, 1993.
- PENNICA, D.; ARCE, V.; SWANSON, T.A.; VEJSADA, R.; POLLOCK, R.A.; ARMANINI, M.; DUDLEY, K.; PHILLIPS, H.S.; ROSENTHAL, A.; KATO, A.C.; HENDERSON, C.E. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. **Neurons**, **17**: 63-74, 1996.
- PENNICA, D.; KING, K.L.; SHAW, K.J.; LUIS, E.; RULLAMAS, J.; LUOH, S.M.; DARBONNE, W.C.; KNUTZON, D.S.; YEN, R.; CHIEN, K.R. Expression cloning of cardiotrophin-1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **92**: 1142-6, 1995a.
- PENNICA, D.; SHAW, K.J.; SWANSON, T.A.; MOORE, M.W.; SHELTON, D.L.; ZIONCHECK, K.A.; ROSENTHAL, A.; TAGA, T.; PAONI, N.F.; WOOD, W. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor gp130 signaling complex. **J. Biol. Neurochem.**, **270**: 10915-22, 1995b.
- PEREIRA, F.C. **Estudo experimental e quantitativo da reinervação muscular após regeneração de nervos no interior de próteses tubulares.** São Paulo, 1993. 135p. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. São Paulo].
- 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.
- PIRES, R.S. **Padrão morfométrico de nervos regenerados no interior de próteses tubulares e influência do fator de crescimento nervoso (NGF) exógeno.** São Paulo, 1994. 171p. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Psicologia da Univ. São Paulo].
- PLANCK, S.R.; DANG, T.T.; GRAVES, D.; TARA, D.; ANSEL, J.C.; ROSENBAUM, J.T. Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **33**: 78-82, 1992.
- RAMON Y CAJAL, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London. Oxford. University Press. 1928. p. 459.
- RAMON Y CAJAL, S. Studies on vertebrate neurogenesis. Springfield, Charles Thomas, 1929.
- RAO, M.S.; TYRRELL, S.; LANDIS, S.C.; PATTERSON, P.H. Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons. **Dev. Biol.**, **150**: 281-93, 1992b.

- RATHJEN, F.C. A neurite outgrowth-promoting molecule in developing fiber tracts. **TINS**, **11**: 183-4, 1988.
- REICHARDT, L.F. & TOMASELLI, K. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. **Ann. Rev. Neurosci.**, **14**: 531-70, 1991.
- REICHERT, F.; LEVITZKY, R.; ROTSHENKER, S. Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. **Eur. J. Neurosci.**, **8**: 530-5, 1996.
- RENDE, M.; MUIR, E.; RUOSLAHTI, T.; HAGG, S.; VARON, S.; MANTHORPE, M. Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor in adult rat sciatic nerve. **Glia**, **5**: 25-32, 1992.
- RICE, D.H. & BERSTEIN, F.D. The use of autogenous vein for nerve grafting. **Otol. Head Neck Surg.**, **92**: 410-2, 1984b.
- RICH, K.M.; LUCZCZYNSKI, J.R.; OSBORNE, P.A. and JOHNSON, E.M.JR. Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. **J. Neurocytol.**, **16**: 261-8, 1987.
- RICHARDSON, P.M. Ciliary neurotrophic factor: a review. **Pharmac. Ther.**, **63**: 187-98, 1994.
- 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 lumbosacral 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. Jewett, H.R. McCarroll. St Louis, Mosby, 1980. p. 235-42.
- ROTSHENKER, S.; AAMAR, S.; BARAK, V. Interleukin-1 activity in lesioned peripheral nerve. **J. Neuroimmunol.**, **39**: 75-80, 1992.
- SAADAT, S.; SENDTNER, M.; ROHRER, H. Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. **J. Cell Biol.**, **108**: 1807-16, 1989.
- SAHENK, Z.; SEHAARASEYON, J.; MENDEL, J.R. CNTF potentiates peripheral nerve regeneration. **Brain Res.**, **655**: 246-50, 1994.
- 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. Extracellular matrix molecules that influence neural development. **Ann. Rev. Neurosci.**, **12**: 491-516, 1989.
- SANES, J. R. Roles of extracellular matrix in neural development. **Ann. Rev. Physiol.**, **45**: 581-600, 1983.
- SANO, K.; TANIHARA, H.; HAIMARK, R.L.; OBATA, S.; DAVIDSON, M.; ST JOHN, T.; TAKETANI, S.; SUZUKI, S. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in the central nervous system. **EMBO J.**, **12**: 2249-56, 1993.
- SATOH, T.; NAKAMURA, S.; TAGA, T.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; KAZIRO, Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B cell stimulatory factor 2/interleukin-6. **Mol. Cell Biol.**, **8**: 3546-9, 1988.
- 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.
- SCHINDLER, R.; GHEZZI, P.; DINARELLO, C.A. Interferons as inhibitors of interleukin 1 induced interleukin 1 synthesis. **Lymphokine Res.**, **8**: 275-80, 1989.
- SCHLAEPFER, W.W. & MICKO, S. Chemical and structural changes of neurofilaments in transected rat sciatic nerve. **J. Cell Biol.**, **78**: 369-78, 1978.
- SCHMALBRUCH, H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. **J. Comp Neurol.**, **224**: 252-8, 1984.
- SCHMALBRUCH, H.; JENSEN, H.J.S.; BJAERG, M.; KAMIENIECKA, Z. KURLAND, L. A new mouse mutant with progressive motor neuropathy. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **50**: 192-204, 1991.
- SCHNEIDES-SCHAULIES, J.; VON BRUNN, A.; SCHACHNER, M. Recombinant peripheral myelin protein Po confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties. **J. Neurosci. Res.**, **27**: 286-97, 1990.
- SCOTT, J.; SELBY, M.; URDEA, M.; QUIROGA, M.; BELL, G.I.; RUTTER, W.J. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. **Nature**, **302**: 538-40, 1983.
- 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.
- SENDTNER, M.; ARAKAWA, Y.; STOCKLI, K.A.; KREUTZBERG, G.W.; THOENEN, H. Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. **J. Cell Sci. (Suppl.)**, **15**: 103-9, 1991.
- SENDTNER, M.; CARROLL, P.; HOLTMANN, B.; HUGHES, R.A.; THOENEN, H. Ciliary Neurotrophic factor. **J. Neurobiol.**, **25**: 1436-53, 1994.

- SENDTNER, M.; GÖTZ, R.; HOLTMANN, B.; THOENEN, H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. **J. Neurosci.**, **17**: 6999-7006, 1997.
- SENDTNER, M.; KREUTZBERG, G.W.; THOENEN, H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature**, **345**: 440-1, 1990.
- SENDTNER, M.; SCHMALBRUCH, H.; STÖCKLI, K.A.; CARROL, P.; KREUTZBERG, G.W.; THOENEN, H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. **Nature**, **358**: 502-4, 1992b.
- SENDTNER, M.; STÖCKLI, K.A.; CARROL, P.; KREUTZBERG, G.W.; THOENEN, H.; SCHMALBRUCH, H. More on motor neuron. **Nature**, **360**: 541-42, 1992c.
- SENDTNER, M.; STOCKLI, K.A.; THOENEN, H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **J. Cell Biol.**, **118**: 139-48, 1992a.
- SENIUK, N.; ALTARES, M.; DUNN, R.; RICHARDSON, P.M. Decreased synthesis of ciliary neurotrophic factor in degenerating peripheral nerves. **Brain Res.**, **572**: 300-2, 1992.
- SHIBUYA, Y.; MIZOGUCHI, A.; TAKEICH, M.; SHIMADA, K.; IDE, C. Localization of N-cadherin in the normal and regenerating nerve fibers of the chicken peripheral nervous system. **Neurosci.**, **67**: 253-61, 1995.
- SHIMAMURA, K.; TAKAHASHI, T.; TAKEICH, M. E-cadherin expression in a particular subset of sensory neurons. **Devl. Biol.**, **152**: 242-54, 1992.
- SHIMIZU, H.; MITOMO, K.; WATANABE, T.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, K. Involvement of a NF-kappa b-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. **Mol. Cell Biol.**, **10**: 561-8, 1990.
- 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.
- STAHL, N. & YANCOPOULOS, G.D. The tripartite CNTF receptor complex: Activation and signaling involves components shared with other cytokines. **J. Neurobiol.**, **25**: 1454-66, 1994.
- STAHL, N.; BOULTON, T.G.; FARRUGGELLA, T.; IP, N.Y.; DAVIS, S.; WITTHUHN, B.; QUELLE, F.W.; SILVENNOINEN, O.; BARBIERI, G.; PELLEGRINI, S.; IHLE, J.N.; YANCOPOULOS, G.D. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL6 β receptor components. **Sciences**, **263**: 92-5, 1994.
- STAHL, N.; DAVIS, S.V.W.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; IP, N.Y.; YANCOPOULOS, G.D. Cross-linking of CNTF and LIF to endogenous and reconstructed receptor complexes identifies LIF binding protein as a CNTF receptor component. **J. Biol. Chem.**, **268**: 7628-31, 1993.
- STÖCKLI, K.A.; LILLIEN, L.E.; NAHER-NOÉ, M.; BREITFELD, G.; HUGHES, R.A.; RAFF, M.C.; THOENEN, H.; SENDTNER, M. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. **J. Cell Biol.**, **155**: 447-59, 1991.

- STÖCKLI, K.A.; LOTTSPREICH, F.; SENDTNER, M.; MASIAKOWSKI, P. CARROLL, P.; GOTZ, R.; LINDHOLM, D.; THOENEN, H. Molecular cloning expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor . **Nature**, **342**: 920-3, 1989.
- STOLL, G.; JUNG, S.; JANDER, S.; VAN DER MEIDE, P.; HARTUNG, H.P. Tumor necrosis factor- α in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. **J. Neuroimmunol.**, **45**: 175-82, 1993
- SUNDERLAND, S. Degeneration of the axon and associated changes. In: NERVES and nerve injuries. 2 ed. Ed. S. Sunderland. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1978. p. 82-107.
- TAGA, T.; HIBI, M.; HIRATA, Y.; YAMASAKI, K.; YASUKAWA, K.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. **Cell**, **58**: 573-81, 1989.
- TAKEICHI, M. Cadherin: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Ann. Rev. Biochem.**, **59**: 237-52, 1990.
- TAPIA, M.; INESTROSA, N.C.; ALVAREZ, J. Early axonal regeneration: by repression by Schwann cell and a protease? **Exp. Neurol.**, **131**: 124-32, 1995.
- THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, **270**: 593-8, 1995.
- THOMPSON, S.W.N. & MAJITHIA, A.A. Leukemia inhibitory factor induces sympathetic sprouting in intact dorsal root ganglia in the adult rat *in vivo*. **J. Physiol.**, **506.3**: 809-16, 1998.
- THOMPSON, S.W.N.; VERNALLIS, A.B.; HEATH, J.K.; PRIESTLEY, J.V. Leukaemia inhibitory factor is retrogradely transported by a distinct population of adult rat sensory neurons: co-localization with trkA and other neurochemical markers. **Eur. J. Neurosci.**, **9**: 1244-51, 1997.
- TIMPL, R. & BROWN, J.C. The laminins. **Matrix Biol.**, **14**: 275-81, 1994.
- TOMASELLI, K.J.; NEUGEBAUER, K.M.; BIXBY, J.L.; LILIEN, J.; REICHARDT, L.F. N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. **Neuron**, **1**: 33-4, 1988.
- TORVIK, A. & SOREIDE, A.J. The perineuronal glial reaction after axotomy. **Brain Res.**, **95**: 519-29, 1976.
- TOSATO, G. & JONES, K.D. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. **Blood**, **75**: 1305-10, 1990.
- TOULMOND, S.; VIGE, X.; FAGE, D.; BENVIDES, J. Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. **Neurosci. Lett.**, **144**: 49-52, 1992.
- TOYOTA, B.; CARBONETTO, S.; DAVID, S. Involvement of laminin in nerve regeneration *in vivo*. In: 18th. Annual Meeting of Society for Neuroscience, Toronto, Ontario, Canada, November 13-18, 1988 Abstract 203.14. p. 498.

- UCHIYAMA, N.; HASEGAWA, M.; YAMASHITA, T.; YAMASHITA, J.; SHIMAMURA, K.; TAKEICHI, M. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in dorsal root ganglion, dorsal root and dorsal horn of postnatal mice. **J. Neurocytol.**, **23**: 460-8, 1994.
- ULRICH, M.; BOSSY, B.; VENSTROM, K.; REICHARDT, L.F. Integrin $\alpha 8 \beta 1$ promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. **Mol. Biol. Cell**, **6**: 433-48, 1995.
- UNSICKER, K. & WIEGANDT, H. Promotion of survival and neurite outgrowth of cultured peripheral neurons by exogenous lipids and detergents. **Exp. Cell Res.**, **178**: 377-89, 1988.
- UNSICKER, K.; REICHERT-PREIBSCH, H.; SCHMIDT, R.; PETTMANN, B.; LABOURDETTE, G.; SENSENBRENNER, M. Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **85**: 5459-63, 1987.
- VANLAIR, C. De la regeneration des nerfs peripheriques par le procede de la suture tubulaire. **Arch. Biol., Paris**, **3**: 379-496, 1882.
- VARON, S.; MANTHORPE, M.; ADLER, R. Cholinergic neurotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. **Brain Res.**, **173**: 29-45, 1979.
- VENSTROM, K. & REICHARDT, L. Beta8 integrins mediate interactions of chick sensory neurons with laminin-1, collagen IV, and fibronectin. **Mol. Biol. Cell.**, **6**: 419-31, 1995.
- VON BÜNGNER, O. Ueber die degenerations und regenerationsvorgänge an nerven nach verletzungen. **Beitr. Pathol. Anat.**, **10**: 321-93, 1891.
- 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.
- WEBSTER, H.F. Transient focal accumulation of axonal and axonal mitochondria during the early stages of Wallerian degeneration. **J. Cell Biol.**, **12**: 361-83, 1962.
- WECHSLER, W. & HAGER, H. Elektronenmikroskopische befunde zur feinstruktur von axonveränderungen in regenerierenden nervenfaseren des nervus ischiadicus der weissen ratte. **Acta Neuropathol.**, **1**: 489-506, 1962.
- 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. & 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. Ueberbrückung eines nervendefektes mittels seidennaht und lebenden venenstückes. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, **35**: 1125, 1909.
- WILLIAMS, L.R. & VARON, S. Modification of fibrin matrix formations in situ enhances nerve regeneration in silicone chambers. **J. Comp. Neurol.**, **231**: 209-20, 1985.
- 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, L.R.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: Parameters for a bioassay. **J. Comp. Neurol.**, **218**: 460-70, 1983.
- WILLIAMS, L.R.; MANTHORPE, M.; BARBIN, G.; NIETO-SAMPEDRO, M. COTMAN, C.W.; VARON, S. High ciliary neurotrophic specific activity in rat peripheral nerve. **Int. J. Devl. Neurosci.**, **2**: 177-80, 1984.
- 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.
- WOODROOFE, M.N.; SARNA, G.S.; WADHA, M.; HAYES, G.M.; LOUGHLIN, A.J.; TINKER, A.; CUZNER, M.L. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by *in vivo* microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. **J. Neuroimmunol.**, **33**: 227-36, 1991.
- XIN, L.; RICHARDSON, P.M.; GERVAIS and SKAMENE, E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. **Brain Res.**, **510**: 144-6, 1990.
- YAMADA, M. & HATANAKA, H. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. **Brain Res.**, **643**: 173-80, 1994.
- YAMAMORI, T.; FUKADA, K.; AEBERSOLD, R.; KORSCHING, S.; FANN, M.J.; PATTERSON, P.H. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. **Science**, **246**: 1412-6, 1989.
- YAWO, H. & KUNO, M. How a nerve fiber repairs its cut end: Involvement of phospholipase A2. **Science**, **222**: 1351-53, 1983.
- YAZAKI, T.; MIURA, M. ASOU, H.; TOYA, S.; UYEMURA, K. Peripheral myelin Po protein mediates neurite outgrowth of cortical neurons *in vitro* and axonal regeneration *in vivo*. **Neurosci. Lett.**, **176**: 13-6, 1994.
- YOSHIHARA, Y.; KAWASAKI, M.; TANI, A.; TAMADA, A.; NAGATA, S.; KAGAMIYAMA, H.; MORI, K. Big-I: A new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity. **Neuron**, **13**: 414-26, 1994.
- ZARLING, J.M.; SHOYAB, M.; MARQUARDT, H.; HANSON, M.B.; LIOUBIN, M.N.; TODARO, G.J. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histocytic lymphoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **83**: 9379-43, 1986.

ZHANG, Y.H.; LIN, J.X.; VILCEK, J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblast involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. **Mol. Cell Biol.**, **10**: 3818-23, 1990.

de 25X, foram contados todos os corpos neuronais que apresentassem nucléolo evidente (**Fig. 4A e B**). Neste caso não foi utilizado qualquer fator para a correção dos números finais.

FIGURA 4: **A)** Corte longitudinal do gânglio espinal L5, com 5 μm de espessura, corado com azul de toluidina/fucsina e utilizado para contagem dos corpos celulares de neurônios sensitivos. **B)** Corpos celulares de neurônios sensitivos e com nucléolos bem evidentes foram contados em um em cada dez cortes da seriação.

8. Tratamento Estatístico.

Para avaliação estatística dos números obtidos em cada uma das situações experimentais foi realizada análise de variância seguida de comparações múltiplas pelo método de Student-Newman-Keuls.

O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

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

Os resultados serão apresentados seguindo-se a divisão dos grupos experimentais feita em “material e métodos”.

1. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com CNTF

1.1. Dados Qualitativos

Decorridas 6 semanas do implante das próteses tubulares, em todos os animais dos grupos 1, 3 e 5 foi possível evidenciar uma estrutura com aspecto macroscópico semelhante e denominada de cabo de regeneração (**CR**). Esses **CR** uniam o coto proximal ao distal, apresentando um diâmetro decrescente da extremidade proximal para a distal e coloração leitosa (**Fig. 5**).

FIGURA 5 – Nervo regenerado (seta) no interior de tubo vazio implantado 6 semanas previamente. Caracteristicamente, este cabo de regeneração ocupa posição central dentro da prótese tubular.

Foi possível evidenciar uma rede de vasos sanguíneos em toda a extensão dos **CR**. O espaço entre a parede interna da prótese tubular e a superfície externa do **CR** era preenchido por um líquido amarelado, semelhante em coloração ao plasma sanguíneo.

Cortes transversais da porção média dos **CR**, observados sob microscopia de luz e como ilustrado na **figura 6A - D**, mostraram que, nos animais implantados com próteses preenchidas com **Col.+CNTF** os diâmetros dos **CR** eram nitidamente maiores que aqueles presentes nos animais implantados com próteses **vazias** ou apenas preenchidas com solução de **colágeno**.

A análise qualitativa dos cortes transversais dos **CR** mostrou conjuntos de axônios organizados em minifascículos, evidenciando processo de compartimentalização, típico da regeneração nervosa periférica. Cada minifascículo era envolvido e delimitado por seu perineuro próprio, e conjuntos deles eram mantidos unidos por um epineuro evidente; foram observados vasos sanguíneos entre os minifascículos.

FIGURA 6 – Fotomicrografias de cortes semi-finos representativos de cabos de regeneração, 6 semanas após o implante de: tubo vazio (A), tubo preenchido com colágeno (B) e tubo preenchido com Col.+CNTF (C). Observam-se vasos cortados transversalmente, assim como minifascículos com perineuro próprio. Em (D), detalhe de C, para melhor evidência dos minifascículos e fibras nervosas mielinizadas. Barra de escala em A, B e C = 100 μ m; D = 20 μ m.

Nos cortes transversais dos nervo ciáticos dos animais não operados foi possível distinguir seus quatro fascículos que, distalmente, formavam os nervos tibial, fibular, sural e ramo cutâneo.

1.2. Dados Quantitativos

1.2.1. Número de Axônios Mielínicos (Figura 7)

Seis semanas após a tubulização foi observada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) no número de axônios mielinizados (3027 ± 62 , média $\pm$ erro padrão) presentes nos cabos de regeneração dos

animais implantados com **Col.+CNTF**, quando comparados com os animais implantados com tubos preenchidos apenas com **Col.** (1639 ± 104) ou implantados com **tubo vazio** (1384 ± 128). Animais do **grupo controle** não operado apresentaram número significativamente maior ($P < 0,05$) de axônios mielínicos (3311 ± 54) em relação aos animais dos grupos experimentais.

FIGURA 7 - Número de axônios mielínicos presentes nos cabos de regeneração dos animais dos diferentes grupos experimentais e controle. Os animais implantados com tubos preenchidos com CNTF tinham número significativamente maior de axônios em relação aos outros grupos experimentais (*), porém menor em relação ao grupo não operado (**).

1.2.2. Número de Neurônios Motores (Figura 8)

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) no número de motoneurônios marcados com HRP entre os três grupos experimentais e o grupo

FIGURA 8 - Número de motoneurônios presentes na medula espinhal dos animais dos diferentes grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os 3 grupos experimentais e o grupo controle (não operado).

controle (Col+CNTF = 790 ± 14 ; Col. = 749 ± 44 ; Vazio = 740 ± 30 ; Controle = 794 ± 30).

1.2.3. Número de Neurônios Sensitivos dos Gânglios das Raízes Dorsais (Figura 9)

Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) no número de neurônios marcados com HRP nos gânglios espinhais L4, L5 e L6 dos animais dos diferentes grupos experimentais; no entanto, todos apresentaram número significativamente menor ($P<0,05$) de neurônios marcados quando comparados com os animais do grupo controle ($\text{Col}+\text{CNTF} = 2124\pm89$; $\text{Col.} = 2262\pm152$; $\text{Vazio} = 1920\pm59$; $\text{Controle} = 4211\pm96$).

FIGURA 9 - Número de neurônios sensitivos marcados com HRP nos gânglios das raízes dorsais L4,5,6. Embora não houvesse diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais, todos apresentaram um número significativamente menor de neurônios marcados em relação ao grupo controle (*).

2. Animais Implantados com Tubos Preenchidos com IL-6

2.1. Dados Qualitativos

Decorridas 4 semanas do implante das próteses tubulares, em todos os animais do grupo 1, 2 e 3 foi possível evidenciar uma estrutura semelhante à observada nos animais dos grupos experimentais implantados com tubos preenchidos com CNTF. Todos os animais desse grupo experimental apresentaram CR com a mesma coloração leitosa e diâmetro decrescente no sentido próximo-distal.

Foi possível evidenciar rede de vasos sanguíneos em toda a extensão dos CR, com os espaços entre a parede interna da prótese tubular e a superfície externa do CR preenchida por líquido amarelado, semelhante em coloração ao plasma sanguíneo.

2.2. Dados Quantitativos

2.2.1. Número de Axônios Mielínicos (Figura 10)

Seis semanas após a tubulização verificou-se diferença estatisticamente significante ($P < 0,001$) no número de axônios mielínicos nos animais implantados com IL-6 (2025 ± 143), quando comparados com os animais implantados com tubos preenchidos apenas com colágeno (1524 ± 122). Os dois grupos experimentais apresentaram número significativamente menor ($P < 0,05$) de axônios mielínicos em relação aos animais não operados (3311 ± 54).

FIGURA 10 - Número de axônios mielínicos presentes nos CR dos diferentes grupos estudados. Os animais implantados com tubos preenchidos com IL-6 apresentaram número significativamente maior de axônios em relação aos implantados com colágeno apenas (*). No entanto, os dois grupos experimentais tiveram número significativamente menor de axônios em relação ao grupo não operado (**).

2.2.2. Número de Neurônios Sensitivos no Gânglio L5 da Raiz Dorsal (Figura 11)

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o número de neurônios sensitivos presentes no gânglio L5 dos animais implantados com tubos preenchidos com Col. (528 ± 42) e IL-6 (554 ± 37). Esses dois grupos, no entanto, apresentaram número de neurônios significativamente menor ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (1112 ± 63).

FIGURA 11 - Número de neurônios sensitivos nos diferentes grupos estudados. Os animais implantados com tubos preenchidos com Col. ou IL-6 não apresentam diferença significante no número de neurônios sensitivos. Tiveram, no entanto, número significativamente menor de neurônios sensitivos em relação ao grupo não operado (*).