CIRO FERREIRA DA SILVA

ESTUDO EXPERIMENTAL
DA REGENERAÇÃO DE NERVOS
NO INTERIOR DE PRÓTESES TUBULARES

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universi-
dade de São Paulo para obtenção
do título de Professor Livre Do-
cente junto ao Departamento de
Anatomia.

São Paulo
1987

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Silva, Ciro Ferreira da.

Estudo experimental da regeneração de nervos no interior de próteses tubulares / Ciro Ferreira da Silva. -- São Paulo, 1987.

Tese (livre-docência)--Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Anatomia.

Unitermos: 1. Sistema nervoso periférico 2. Nervos 3. Regeneração 4. Próteses tubulares nervosas

SUMÁRIO

Resumo

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAL E MÉTODOS	7
	2.1 Objetivo específico I	7
	2.2 Objetivo específico II	12
3	RESULTADOS	15
	3.1 Objetivo específico I	15
	3.2 Objetivo específico II	26
4	DISCUSSÃO	34
	4.1 Objetivo específico I	34
	4.2 Objetivo específico II	38
5	CONCLUSÕES	43
	5.1 Objetivo específico I	43
	5.2 Objetivo específico II	44
6	ANEXO	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

Abstract

Este trabalho foi realizado
com o apoio financeiro da
FAPESP (Proc.86/2439-0) e do
CNPq (Proc. 303887/86-BF-FV e 407372-87.3)

RESUMO

O presente estudo foi realizado visando a determinação de parâmetros quantitativos durante a regeneração do nervo isquiático de roedores, no interior de próteses tubulares e sob diferentes condições experimentais. Os experimentos realizados foram organizados em torno de dois objetivos específicos. Para o objetivo específico I foram utilizados 64 camundongos da linhagem C57BL/6J. Os cotos proximais e distais dos nervos isquiáticos transeccionados foram fixados no interior de tubos de polietileno, conservando-se uma distância de 4 mm entre os mesmos. Alguns dos tubos foram preenchidos com aditivos (gel de colágeno ou de laminina) no momento da implantação. Esses animais, após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas, foram reoperados para colocação de solução de HRP em contato com os cotos distais dos nervos operados. Os animais foram sacrificados 3 dias após. A análise quantitativa dos resultados revelou um efeito estimulatório inicial do gel de laminina sobre o processo regenerativo, além de uma diminuição do número de axônios em regeneração com tempos de recuperação mais prolongados. Para o objetivo específico II foram utilizados 18 ratos Sprague Dawley. Os cotos proximais e distais dos nervos isquiáticos transeccionados foram fixados no interior de tubos de silicone, deixando-se uma distância de 20-25 mm entre os mesmos. Parte dos tubos recebeu a adição de um gel de laminina ou de colágeno no momento da implantação. A marcação neuronal retrógrada com HRP também foi realizada, após tempos de sobrevivência de 4 a 16 semanas. - Todos os animais com aditivos, e nenhum dos animais com tubos inicialmente vazios, apresentaram um fascículo em regeneração no interior dos tubos. A análise histológica revelou a presença de axônios no interior desses fascícu-

los. A marcação neuronal retrógrada mostrou que alguns desses axônios pertenciam a neurônios motores somáticos e sensitivos. Os resultados sugerem que a adição de determinadas substâncias, no interior de próteses tubulares, pode levar ao aumento da distância máxima, passível de reconexão, entre os cotos de nervos transeccionados.

INTRODUÇÃO

Em casos de lesões nervosas periféricas, as tendências atuais da prática médica favorecem, quando possível, técnicas que visam a reconstrução direta das extremidades de nervos lesados (DANIEL & TERZIS, 1977; SUNDERLAND, 1978; BRUSHART & MESULAM, 1980; ERHART, 1981). Infelizmente, há várias situações clínicas onde o realinhamento direto dos fascículos nervosos se torna impossível. Tais situações incluem extensas lacerações e casos, onde um segmento do nervo foi danificado ou removido, e os cotos proximal e distal estão separados por uma distância que deve ser reconnected.

Essa reconexão é normalmente feita através de um enxerto autólogo onde, por exemplo, uma porção do nervo sural ou intercostal, do próprio paciente, é utilizada para realinhar seu nervo mediano lesado. Infelizmente os resultados de tais enxertos nervosos não são inteiramente satisfatórios (SUNDERLAND, 1978; BRUNELLI et alii, 1985), justificando-se, assim, a necessidade de se desenvolver estratégias alternativas de reparo.

As técnicas de entubulização ("entubulation repair") visam manter as extremidades do nervo lesado em direta aposição, através de uma membrana enrolada em torno do local de descontinuidade ou pela passagem de um tubo (prótese tubular) sobre os dois cotos do nervo (ROSEN et alii, 1980). O primeiro reparo por entubulização com sucesso foi feito por VON BUNGNER em 1891, com o relato de evidências histológicas de regeneração nervosa entre os cotos lesados. Desde aquela época diferentes materiais de entubulização têm sido usados para o reparo de nervos; osso

descalcificado, artérias, veias, fascia lata, gordura, músculo, pergaminho, gelatina, borracha e vários metais foram testados antes da 2ª guerra mundial (WEISS, 1944).- Essas substâncias demonstraram uma melhora na orientação longitudinal das fibras nervosas no local de anastomose. No entanto, avaliações a longo termo dessas técnicas de entubulização falharam em demonstrar superioridade funcional em relação às técnicas convencionais de sutura, em parte como decorrência de limitações dos métodos de avaliação (ROSEN et alii, 1980).

Havia várias razões intrínsecas ao método para explicar as falhas observadas nas técnicas iniciais de entubulização (WEISS, 1944). A maioria dos materiais utilizados desencadeavam reações inflamatórias e fibróticas devido à incompatibilidade de tecidos, à liberação de substâncias irritantes ou à simples irritação mecânica. Por outro lado, em vários estudos, os tubos eram colocados sobre o local de reconstrução com prévia sutura epineural, limitando, assim, as vantagens do reparo por entubulização e, ao mesmo tempo, introduzindo as desvantagens do reparo por sutura.

De todos os materiais testados durante a 2ª guerra mundial, o tântalo (um metal flexível) foi o mais usado em reparos nervosos epineurais. A avaliação clínica de seus resultados não demonstrou qualquer superioridade estatisticamente significativa em relação aos métodos que não o utilizavam (WOODHALL & BEEBE, 1956). Foi demonstrado que o tântalo eventualmente se fragmentava, ocasionando uma reação de corpo estranho e posterior calcificação, muitas vezes requerendo uma segunda cirurgia para remover o tubo.

Após a 2ª guerra mundial (e principalmente durante os últimos anos) vários materiais, biodegradáveis ou não,

foram utilizados experimentalmente na técnica de entubulização de nervos: filtros de Millipore (NOBACK et alii, 1958), silicone (LEHMAN & HAYES, 1967; LONGO et alii, 1983a,b; LUNDBORG et alii, 1982a,b), copolímeros de polilactato/poliglicolato (REID et alii, 1978), membranas mesoteliais (LUNDBORG et alii, 1981), malhas de poliglactina (MOLANDER et alii, 1982), copolímeros acrílicos (UZMAN & VILLEGAS, 1983), colágeno (ROSEN et alii, 1983), Goretex (YOUNG et alii, 1984), copolímeros de poliéster (HENRY et alii, 1985) e colágeno/extratos de membrana basal (DA SILVA & MADISON, 1986).

Uma das finalidades do presente estudo é, então, através da utilização de tubos de polietileno, em reparos por entubulização, estabelecer parâmetros quantitativos para a avaliação da resposta regenerativa do sistema nervoso periférico, que deverão permitir a comparação de diversos materiais e diferentes técnicas de reparo de nervos.

Vários estudos recentes têm indicado a importância de vários componentes da matriz extracelular na regeneração nervosa periférica (VARON et alii, 1983; ANGLISTER & MCMAHAN, 1984; DA SILVA et alii, 1984; LONGO et alii, 1984). Destes, a fibronectina e a laminina têm recebido maior atenção. A laminina é um amplo componente de todas as membranas basais (TIMPL et alii, 1983). Tem sido mostrado, in vitro, que ela atua tanto como um substrato preferencial assim como um agente estimulatório durante o processo de extensão de axônios, no sistema nervoso periférico (SNP) e central (SNC) (MANTHORPE et alii, 1983; KLEINMAN et alii, 1984; SMALHEISER et alii, 1984; HAMMARBACK et alii, 1985). A laminina, presente nas membranas basais de células

de Schwann e de fibras musculares, tem sido implicada como um fator de direcionamento na regeneração do SNP (IDE, 1983; BIGNAMI et alii, 1984; KEYNES et alii, 1984). A membrana basal que persiste após a degeneração de fibras musculares tem a capacidade de direcionar os axônios em regeneração, para que alcancem seus locais originais de contato sináptico (SANES et alii, 1978). A membrana basal está também associada com axônios do SNP em crescimento no interior do SNC após lesões específicas (CRUTCHER & CHANDLER, 1984). Nos nervos a maior parte do material da lamina basal está associada a células de Schwann, embora pequena quantidade esteja relacionada a células endoteliais (BUNGE et alii, 1980). Devemos salientar aqui a extrema complexidade da estrutura molecular das membranas basais.- Por exemplo, porções sinápticas e extrajuncionais da membrana basal muscular contêm laminina, fibronectina e colágeno tipo IV; apenas a porção extrajuncional contém colágeno tipo V e proteínas altamente solúveis em soluções salinas (SANES & CHENEY, 1982). Outros componentes da superfície celular e produtos extracelulares são possíveis candidatos para o direcionamento axonal. COLLINS (1980) e COLLINS & GARRETT (1980) demonstraram, *in vitro*, o direcionamento axonal por intermédio de materiais secretados por células não neuronais.

Em função destes comentários surge outra finalidade que é avaliar os efeitos, a curto e longo prazo, da adição de componentes da matriz extracelular no interior de próteses tubulares, durante a regeneração do SNP.

Por outro lado, os estudos recentes sobre entubulização de nervos têm se concentrado em eventos que ocorrem no interior dos tubos (LUNDBORG et alii, 1981, 1982b; MOLANDER

et alii, 1982; KULJIS et alii, 1983; MEDINACELI & FREED, 1983; UZMAN & VILLEGAS, 1983; WILLIAMS et alii, 1983). Foram descritos: a organização dos componentes do fascículo nervoso em regeneração (KULJIS et al., 1983; UZMAN & VILLEGAS, 1983); a influência da distância entre os cotos nervosos (LUNDBORG et alii, 1982a); os efeitos do suporte mecânico durante a transecção do nervo (MEDINACELI & FREED, 1983) e o acúmulo de fatores tróficos no interior dos tubos (LUNDBORG et alii, 1982c). Vários desses estudos tentaram quantificar os componentes do fascículo nervoso em regeneração, principalmente o número de axônios mielínicos (ROSEN et alii, 1983; UZMAN & VILLEGAS, 1983; WILLIAMS et alii, 1983). Como esperado, todos eles mostraram um aumento do número de axônios mielínicos no interior dos tubos, com períodos de sobrevivência mais prolongados. No entanto, a ramificação de axônios pode ser um fator de erro em estudos, que somente levem em consideração o número de axônios, como parâmetro da regeneração nervosa (MCQUARRIE, 1981).

Assim, faremos não só a determinação do número de axônios mielínicos, mas também avaliaremos o número de corpos celulares de neurônios motores somáticos e sensitivos em regeneração, após a lesão de nervos e subsequente reparo por entubulização.

Um dos objetivos principais da técnica de reparo por entubulização seria a capacidade de reconectar cotos nervosos com distâncias variáveis de separação. A distância máxima de separação passível de reconexão, bem sucedida, depende tanto da composição do tubo utilizado como do tipo de animal de experimentação. Intervalos entre os cotos com mais de 1 cm foram transpostos com sucesso por fibras em

regeneração em gatos (NOBACK et alii, 1958), em gambás adultos (SUNDERLAND, 1953) e, recentemente, em seres humanos (RESTREPO et alii, 1985). Contrastando com essas distâncias mais longas, quatro diferentes laboratórios estabeleceram, no rato, como sendo de 1 cm a distância máxima entre os cotos nervosos, passível de reconexão com diversos materiais tubulares (DANIELSEN et alii, 1983; LUNDBORG et alii, 1982a; SECKEL et alii, 1984; HENRY et alii, 1985).

Por isso resolvemos, finalmente, testar a possibilidade de, no rato, aumentar a distância passível de reconexão para 1,5 a 2,0 cm, através do uso de aditivos no interior de próteses tubulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados estão organizados em torno de 2 objetivos específicos. Os experimentos para o **objetivo específico I** visam a quantificação da resposta regenerativa dos corpos celulares neuronais e de seus axônios, após transecção, e sob diferentes condições experimentais. Os experimentos para o **objetivo específico II** visam testar a hipótese de que é possível aumentar a distância máxima passível de correção entre os cotos proximal e distal de nervos previamente lesados, através de modificações do microambiente interno de próteses tubulares.

OBJETIVO ESPECÍFICO I (implante, em camundongos, de tubos de polietileno inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos) -

Foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com aproximadamente 8 semanas de idade, na época da cirurgia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com Avertin *.

O nervo isquiático direito desses animais foi exposto e transeccionado, com o auxílio de microscópio cirúrgico **, na região média da coxa e os segmentos proximal e distal do nervo, após retração, foram fixados com ponto único de fio de sutura 10-0 *** no interior de tubos de

*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, intra-peritoneal).

**Microscópios cirúrgicos Zeiss (mod. QPMI-6SFC) e DF-Vasconcelos (mod. MC-M9, doado pela FAPESP - PROC.-86/2439-0).

***Fio monofilamento nylon 10-0 (22µm) Ethilon.

polietileno *, deixando um espaço de 4 mm entre os cotos proximal e distal (Figura 1 A,B).

FIGURA 1 - Modelo experimental utilizado para testar a influência do gel de colágeno ou de laminina (ADITIVO) na regeneração de fibras nervosas, no interior de tubos de polietileno, em camundongos com transecção completa do nervo isquiático.

*Clay Adams, comprimento= 6 mm, diâmetro interno= 0,76 mm e diâmetro externo= 1,22 mm.

Os animais foram divididos em 3 grupos de 20 animais cada. O primeiro grupo recebeu implantes de tubos inicialmente vazios; o segundo recebeu implantes de tubos preenchidos com um gel de laminina * e o terceiro grupo recebeu implantes com tubos preenchidos com um gel de colágeno **. - Esses aditivos (à temperatura inicial de 4° C) foram colocados no interior dos tubos após a implantação dos mesmos nos animais, com o auxílio de uma micro-seringa de Hamilton (10 µl) e sob a visualização com o microscópio cirúrgico, para controlar a formação de bolhas de ar. Decorridos aproximadamente 20 minutos, os aditivos, que inicialmente eram líquidos, sofriam gelificação, num processo semelhante ao que ocorre com os mesmos quando mantidos em placas de Petri a 37° C. Em seguida, a camada muscular era suturada com fio de seda 7-0 e a pele fechada com grampos cirúrgicos (7,5 mm).

Após tempos de sobrevivência de 2, 4, 6, 12 e 40 semanas (4 animais em cada sub-grupo), o nervo isquiático operado dos mesmos animais era exposto, sob o microscópio cirúrgico, distalmente ao tubo de polietileno. O coto distal era seccionado numa distância de 3 mm do tubo, sendo sua porção proximal suturada e selada com vaselina no

*Doação dos Drs. G.R. Martin e H.K. Kleinman, do National Institutes of Health, EUA. Este gel de laminina contém 80% de laminina além de outros componentes da matriz extracelular. O gel foi extraído de tumores da linhagem celular EHS e contém laminina, colágeno tipo IV e outras glicoproteínas na proporção molar de 1:1:0,1, respectivamente (Kleinman et alii, 1982, 1986). Este gel é atualmente comercializado sob o nome de Matrigel (Collaborative Research Inc., Boston, EUA).

**Este gel (colágeno dérmico bovino) é comercializado sob o nome de Vitrogen pela firma Collagen Corp., Palo Alto, Ca, EUA. O gel é composto por colágeno dos tipos I (95-98%) e III (2-5%) dissolvidos em solução de HCl a 0,012 N. A concentração final utilizada foi de 2,4 mg/ml e pH de 7,2.

interior de um tubo de plástico preenchido com solução contendo 40% de peroxidase do rábano silvestre (HRP tipo VI, Sigma) e 10% de lisolecitina (Sigma), dissolvidos em um conjugado de aglutinina do germe do trigo/peroxidase do rábano silvestre (WGA-HRP, Vector), de acordo com o protocolo de DA SILVA et alii (1985) (Figura 1C, pag. 8). A camada muscular e pele eram fechadas como anteriormente.

Após 3 dias os animais eram perfundidos, através do ventrículo esquerdo, com 50 ml de solução de NaCl a 0,9%, seguida por 200 ml de solução fixadora contendo paraformaldeído a 1% e glutaraldeído a 2% e, finalmente, com 50 ml de solução de sacarose a 10% (todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH de 7,3).

Os tubos de polietileno com os cotos e fascículos nervosos eram dissecados, removidos e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH de 7,3 (2 horas a 4°C); eram em seguida desidratados em série crescente de álcool etílico, clareados em óxido de propileno e incluídos em resina (Epon 812, Polyscience). Cortes transversais de 1 µm de espessura foram obtidos a partir da porção média dos fascículos nervosos e corados com solução alcalina de azul de toluidina. Em seguida, esses cortes eram fotografados no fotomicroscópio Zeiss (com objetiva de imersão de 60x) e, após a impressão dos negativos, eram feitas montagens dos diversos campos isoladamente fotografados, de tal forma a abranger a transecção do fascículo em regeneração. Nessas montagens foi determinado, através de contagens manuais, o número total de axônios mielínicos presentes em cada um dos fascículos em regeneração, encontrados no interior dos tubos.

Simultaneamente, os correspondentes gânglios espinais L3, L4 e L5 do nervo operado, e a intumescência lombar da medula espinal, eram removidos e mantidos por 12 horas a 4° C em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH de 7,3. Em seguida, com o auxílio de fios de sutura e agulhas hipodérmicas, os gânglios e medula espinal eram cuidadosamente posicionados em moldes de plástico (Figura 1D, pag. 8) e incluídos em solução de albumina-gelatina. Cortes seriados e longitudinais de congelação com 40 µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um criostato (Reichert, mod. 975C) e coletados em solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,3). Para a demonstração histoquímica do HRP foi utilizada a tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) como substrato, de acordo com o protocolo de MESULAN (1978). Após a reação os cortes eram montados em lâminas histológicas usuais recobertas com gelatina, secos à temperatura ambiente por 24 horas, estabilizados com salicilato de metila (ADAMS, 1980) e corados com solução de Giemsa (DA SILVA et alii, 1985) *.- As transecções de corpos celulares marcados com HRP eram identificadas e contadas ao microscópio óptico com aumento final de 400x. Todas as transecções das células marcadas foram contadas; os números obtidos foram corrigidos com fatores derivados da fórmula de ABERCROMBIE (1946) **.

*2 ml de solução estoque de Giemsa (Harleco) diluídos em 50 ml de solução aquosa de fosfato de sódio monobásico a 0,05 M e pH de 4,3.

**Equação de correção: $N = n \cdot T/T+d$ onde N= número de células após correção; n= número total de células contadas; T= espessura do corte; d= diâmetro celular (obtido através da fórmula $d = a+b/2$, onde a e b representam os diâmetros mínimo e máximo dos corpos celulares).
Para a medula espinal (200 células medidas), d= 27,2 µm.
Para os gânglios espinais (200 células medidas), d= 25,6 µm.

Para a estimativa do número de células nervosas motoras e sensitivas e respectivos axônios mielínicos componentes do nervo isquiático de camundongos normais, 4 animais controles, não operados (todos machos e com 8 semanas de vida), tiveram seus nervos isquiáticos direitos expostos e transeccionados. Os cotos proximais foram suturados e selados no interior de tubos preenchidos com solução de HRP/lisolecitina/HRP-WGA. Após 3 dias esses animais foram processados para a histoquímica do HRP, da mesma maneira que os animais experimentais. Simultaneamente, os nervos isquiáticos do lado esquerdo foram processados para inclusão em resina para posterior contagem do número de fibras mielínicas.

OBJETIVO ESPECÍFICO II (implante, em ratos, de tubos de silicone, inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos, com 20-25 mm de comprimento) -

Dezoito ratos Sprague Dawley (machos e pesando aproximadamente 400 g) foram utilizados. Sob anestesia profunda com nembutal * esses animais tiveram seus nervos isquiáticos transeccionados, como descrito anteriormente.- Os cotos proximal e distal foram fixados com ponto único de fio de sutura 10-0 no interior de tubos de silicone **, deixando uma distância de 15 a 20 mm entre os mesmos (Figura 2A, pag. 13).

*35 mg/kg de peso corporal, intra-peritoneal.

**Cole Parmer, comprimento= 20-25 mm; diâmetro interno= 1,6 mm; diâmetro externo= 3,2 mm.

FIGURA 2 - Modelo experimental utilizado para testar a influência do gel de laminina ou de colágeno (aditivos), na regeneração de fibras nervosas sobre longas distâncias, em ratos com transecção total do nervo isquiático. AD = aditivos; CD = coto distal; CP = coto proximal; Fasc. = fascículo em regeneração; GE = gânglios espinais L3, L4, L5; HRP = solução de HRP/lisolecitina/WGA-HRP; MEL = medula espinal lombar; NI = nervo isquiático; TPI = tubo de plástico; TS = tubo de silicone.

Os animais foram divididos em 3 grupos: o primeiro (5 animais) recebeu implantes de tubos inicialmente vazios; os outros dois grupos (6 animais cada) tiveram os tubos preenchidos, no momento do implante, com um gel de laminina ou um gel de colágeno (conforme descrito no objetivo específico I, pag. 9).

Após um período de sobrevivência de 4 a 16 semanas, o coto distal desses animais foi seccionado 5 mm distalmente aos tubos de silicone, sendo sua porção proximal selada no interior de tubos de plástico preenchidos com uma solução de HRP/lisolecitina/WGA-HRP (Figura 2B, pag. 13). Os animais foram perfundidos após 3 dias (vide objetivo específico I, pag. 10).

Após a perfusão os cotos proximais e distais dos nervos e respectivos fascículos em regeneração foram dissecados e processados para inclusão em resina (vide objetivo específico I, pag. 10). Cortes transversais de 1 μ m de espessura foram feitos a intervalos de 2 mm nos fascículos em regeneração, isto é, 2, 4, 6 ... 18 e 20 mm no interior do tubo. Esses cortes foram corados com solução alcalina de azul de toluidina e examinados ao microscópio óptico para a identificação de fibras mielínicas. Algumas áreas mais distais dos fascículos nervosos foram seccionadas e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, mod. 100B).

Simultaneamente, os gânglios espinais L3, L4 e L5 e a intumescência lombar da medula espinal desses animais foram dissecados e processados para a histoquímica do HRP (vide objetivo específico I, pag. 11). Células contendo HRP foram identificadas e contadas com aumento final de 400x. Todas as células marcadas foram contadas. Devido ao número de células ser relativamente pequeno, a possibilidade de dupla contagem das mesmas não foi levada em consideração, tendo sido dispensado o uso de fórmulas de correção.

RESULTADOS

A apresentação dos resultados obedecerá à divisão de experimentos realizados neste trabalho, segundo os objetivos específicos propostos em **material e métodos** (pag. 7).

OBJETIVO ESPECÍFICO I (implante, em camundongos, de tubos de polietileno inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos) -

DADOS QUALITATIVOS -

Em todos os grupos e tempos de sobrevivência estudados houve a formação de fascículos em regeneração interligando os cotos proximal e distal dos nervos seccionados.

A **Figura 3** (pag. 16) mostra cortes transversais com 1 μ m de espessura através do ponto médio dos fascículos em regeneração, nas três condições experimentais analisadas.- Todos os cortes apresentam aspecto geral similar, sendo constituídos por numerosos fascículos nervosos, cada um deles com seu próprio perineuro e mantidos em união por um espesso epineuro. Os fascículos em regeneração de todas as idades apresentaram, quando comparados com nervos isquiáticos de animais controles, como era de se esperar, em face da literatura, fibras mielínicas menores e menos densamente agrupadas e maior quantidade de colágeno endoneural e células de Schwann (**Figura 4**, pag. 17).

FIGURA 3 - Cortes transversais com 1 μ m de espessura passando pelo ponto médio dos cabos de regeneração, em camundongos com implantes de tubos de polietileno inicialmente vazios ou preenchidos com um gel de colágeno ou de laminina, e com tempos de sobrevivência de 2, 4, 6, 12 e 40 semanas.

FIGURA 4 - Detalhe de fascículos em regeneração mostrados na Figura 3, presentes em camundongos com implantes de tubos de polietileno vazios (A) ou preenchidos com um gel de colágeno (B) ou de laminina (C), após um período de sobrevivência de 12 semanas. Em (D) é apresentado, para comparação, detalhe de um dos fascículos do nervo isquiático de um animal controle, não operado.

DADOS QUANTITATIVOS -

A Figura 5 mostra alguns neurônios marcados com HRP, presentes na medula espinal e gânglio sensitivo L4 de um animal processado 4 semanas após a implantação de um tubo de polietileno vazio. A sensibilidade da técnica pode ser avaliada pela Figura 5 B,D que mostra corpos celulares de neurônios motores somáticos e sensitivos vistos com maior aumento. A intensidade da reação tornou a etapa de contagem das células relativamente simples e altamente reproduzível (embora extremamente laboriosa). Em todos os períodos e grupos estudados os neurônios marcados puderam ser facilmente identificados e contados.

FIGURA 5 - Cortes longitudinais de congelação, com 40 μ m de espessura, mostrando neurônios marcados retrogradamente com HRP, após 4 semanas do implante de um tubo de polietileno inicialmente vazio. A,B = coluna ventral da medula espinal; C,D = neurônios sensitivos do gânglio espinal L4. Barras em A&C = 200 μ m; em B&D = 50 μ m.

O número de neurônios motores somáticos marcados, presentes na medula espinal de cada um dos animais estudados, é mostrado na Tabela 1; no gráfico da Figura 6* (pag. 20) estão representadas as médias e respectivos erros padrões para cada um dos grupos estudados.

TABELA 1 - Número de motoneurônios marcados com HRP na medula espinal de camundongos com implantes de tubos de polietileno inicialmente vazios ou com aditivos de gel de laminina ou de colágeno, após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas. Os totais representam a média dos valores $\pm$ erro padrão da média. Os animais controles são camundongos não operados.

TIPO DE IMPLANTE	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (SEMANAS)				
	2	4	6	12	40
TUBOS VAZIOS	632	666	526	690	731
	373	452	757	609	795
	607	777	748	582	700
	363	758	621	878	856
	494 $\pm$ 73	663 $\pm$ 74	663 $\pm$ 55	689 $\pm$ 67	770 $\pm$ 35
TUBOS C/GEL DE LAMININA	685	706	759	868	750
	782	758	651	823	836
	662	732	808	865	877
	502	778	803	875	864
	658 $\pm$ 58	743 $\pm$ 16	755 $\pm$ 36	857 $\pm$ 12	831 $\pm$ 29
TUBOS C/GEL DE COLÁGENO	499	808	571	780	869
	218	442	532	384	726
	227	473	853	768	710
	366	569	642	870	743
	327 $\pm$ 66	573 $\pm$ 83	649 $\pm$ 71	700 $\pm$ 108	762 $\pm$ 36
ANIMAIS CONTROLES	879				
	852				
	829				
	818				
	844 $\pm$ 13				

*Os gráficos das Figuras 6, 7 e 8 foram plotados através do programa de computação Sigma-Plot (Jandel Scientific, Ca, EUA), a partir dos dados da Tabelas 1, 2 e 3.

FIGURA 6 - Gráfico mostrando o número (média e erro padrão da média) de **neurônios motores somáticos** marcados com HRP na medula espinal de animais com implantes de tubos de polietileno, inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos (gel de laminina ou de colágeno), após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas. (*) indica (neste e nos demais gráficos), em cada um dos tempos considerados, os casos onde houve diferença estatisticamente significativa entre a média dos valores, de acordo com o teste t de Student ($p < 0,05$). Os valores representados pela barra vazia na extremidade direita deste e dos demais gráficos correspondem aos números obtidos em animais controles, não operados.

Nos três grupos estudados foi observado um aumento do número de motoneurônios marcados com tempos de sobrevivência progressivamente mais longos. Além disso, o grupo com implantes de tubos com gel de laminina apresentou, em cada um dos cinco períodos analisados, um número maior de neurônios marcados em relação ao grupo com implantes de tubos inicialmente vazios; este último grupo, por sua vez, apresentou um número maior de neurônios marcados em relação ao grupo com implantes de tubos com gel de colágeno. A análise estatística*, no entanto, apenas revelou diferença ($p < 0,05$) estatisticamente significativa (ES) na 2ª semana pós-operatória e somente entre o grupo de animais com gel de laminina (658 ± 58) e o grupo de animais com gel de colágeno (327 ± 66).

Os grupos experimentais, após 40 semanas de sobrevivência, apresentaram um número de neurônios marcados que variou de 86% (gel de colágeno) a 98% (gel de laminina) do número de neurônios presentes no grupo de animais controles, não operados, não havendo diferença ES entre esses dois grandes grupos.

O número de neurônios sensitivos marcados encontrados nos gânglios espinais L3, L4 e L5 de cada um dos camundongos estudados é mostrado na Tabela 2 (pag. 22); suas médias e respectivos erros padrões estão representados no gráfico da Figura 7 (pag. 23).

*Para a análise estatística dos números obtidos nos diferentes grupos e em cada um dos tempos de sobrevivência estudados, foi utilizado o **test t de Student**. Para isto, os dados, apresentados nas Tabelas 1, 2, e 3 foram analisados através do programa de computação Sigma-Scan (Jandel Scientific, Ca, EUA).

TABELA 2 - Número de neurônios sensitivos marcados com HRP nos gânglios espinais L3, L4 e L5 de camundongos com implantes de tubos de polietileno inicialmente vazios ou com aditivos de gel de laminina ou de colágeno, após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas.

TIPO DE IMPLANTE	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (SEMANAS)				
	2	4	6	12	40
TUBOS VAZIOS	1269 279 1121 546 <u>804±234</u>	1516 768 1017 1350 <u>1163±167</u>	742 1772 1060 908 <u>1120±227</u>	1475 1788 1499 2067 <u>1707±139</u>	2330 2796 2483 2689 <u>2574±104</u>
TUBOS C/GEL DE LAMININA	2332 2088 1348 990 <u>1687±311</u>	1403 1609 1033 1476 <u>1380±123</u>	1373 1331 1789 2043 <u>1634±171</u>	1508 1778 2225 1522 <u>1758±167</u>	2739 2487 2364 2508 <u>2524±78</u>
TUBOS C/GEL DE COLÁGENO	623 67 149 449 <u>322±66</u>	1522 896 1203 1152 <u>1193±128</u>	1498 952 1545 1852 <u>1463±188</u>	1924 810 1541 1873 <u>1592±213</u>	2637 2455 2272 2389 <u>2438±76</u>
ANIMAIS CONTROLES	4212 4476 4031 4126 <u>4211±96</u>

FIGURA 8 - Gráfico mostrando o número (média e erro padrão da média) de **axônios mielínicos** presentes na porção média dos fascículos em regeneração, em animais com implantes de tubos de polietileno, inicialmente vazios ou preenchidos com um gel de laminina ou de colágeno, após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas.

Foi observado, com tempos de sobrevivência de 2 a 12 semanas, um aumento progressivo do número de axônios mielínicos presentes nos fascículos em regeneração dos três grupos experimentais estudados; no período entre a 12ª e a 40ª semana pós-operatória, no entanto, foi observada uma diminuição ES ($p < 0,05$) do número de fibras mielínicas.

O grupo com implantes de tubos com gel de laminina apresentou, em cada um dos cinco períodos analisados, um

de colágeno (322 ± 66). Após 40 semanas de sobrevivência, todos os grupos apresentaram aproximadamente 60% do número de neurônios sensitivos marcados presentes em animais controles, não operados.

O número de fibras nervosas mielínicas presentes na porção média dos fascículos em regeneração é mostrado na Tabela 3; no gráfico da Figura B (pag. 25) estão representadas as médias e respectivos erros padrões para cada um dos grupos estudados.

TABELA 3 - Número de axônios mielínicos presentes na porção média dos fascículos em regeneração de camundongos com implantes de tubos de polietileno vazios ou preenchidos com um gel de laminina ou de colágeno, após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas. Os valores controles representam o número de fibras mielínicas presentes no nervo isquiático de animais não operados.

TIPO DE IMPLANTE	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (SEMANAS)				
	2	4	6	12	40
TUBOS VAZIOS	581 67 209 69 <u>231$\pm$121</u>	1532 206 1498 1538 <u>1193$\pm$329</u>	781 1729 1371 922 <u>1200$\pm$216</u>	2180 1825 1852 2067 <u>1981$\pm$86</u>	1539 1454 1697 1236 <u>1481$\pm$96</u>
TUBOS C/GEL DE LAMININA	2122 1724 1322 957 <u>1531$\pm$252</u>	1752 1592 1248 1970 <u>1640$\pm$152</u>	1979 1313 2066 2769 <u>2032$\pm$298</u>	2526 2207 2447 2149 <u>2332$\pm$91</u>	2237 1505 1802 1764 <u>1827$\pm$152</u>
TUBOS C/GEL DE COLÁGENO	143 12 8 9 <u>43$\pm$33</u>	1643 1044 1172 881 <u>1185$\pm$164</u>	1541 1709 2179 1825 <u>1813$\pm$135</u>	2111 1536 2360 2700 <u>2177$\pm$245</u>	1143 1269 1671 1715 <u>1550$\pm$143</u>
ANIMAIS CONTROLES	3375 3363 3359 3149 <u>3311$\pm$54</u>

FIGURA 8 - Gráfico mostrando o número (média e erro padrão da média) de axônios mielínicos presentes na porção média dos fascículos em regeneração, em animais com implantes de tubos de polietileno, inicialmente vazios ou preenchidos com um gel de laminina ou de colágeno, após tempos de sobrevivência de 2 a 40 semanas.

Foi observado, com tempos de sobrevivência de 2 a 12 semanas, um aumento progressivo do número de axônios mielínicos presentes nos fascículos em regeneração dos três grupos experimentais estudados; no período entre a 12ª e a 40ª semana pós-operatória, no entanto, foi observada uma diminuição ES ($p < 0,05$) do número de fibras mielínicas.

O grupo com implantes de tubos com gel de laminina apresentou, em cada um dos cinco períodos analisados, um

número maior de axônios mielínicos em relação aos outros dois grupos; no entanto, essa diferença somente foi ES ($p < 0,05$) na 2ª semana pós-operatória, desaparecendo a partir da 4ª semana. Os grupos experimentais, após 40 semanas de sobrevivência, apresentaram um número de axônios mielínicos que variou de 45% (tubos vazios ou com gel de colágeno) a 55% (tubos com gel de laminina) do número de axônios mielínicos presentes no nervo isquiático de animais controles, não operados.

OBJETIVO ESPECÍFICO II (implante, em ratos, de tubos de silicone inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos e com 20-25 mm de comprimento) -

No momento da colocação da solução de HRP em contato com a porção proximal do coto distal seccionado dos animais operados, foi tomado cuidado especial para identificar se os cotos proximal e distal dos nervos seccionados ainda se encontravam unidos aos tubos de silicone. Constatou-se, nessa ocasião, que somente parte dos animais apresentaram cirurgia bem sucedida. Tanto o coto distal como o proximal haviam desconectado dos tubos em 3 dos 6 animais com implantes de gel de laminina, em 2 dos 6 animais com tubos preenchidos com gel de colágeno e em 1 dos 6 animais com tubos inicialmente vazios. Os insucessos foram provavelmente devidos ao excessivo comprimento (20-25 mm) dos tubos utilizados que, por ocuparem grande parte da extensão da coxa dos animais, sujeitavam os cotos nervosos a forças de tração resultantes da movimentação das articulações próximas.

Portanto, dos 18 animais originais deste estudo, 6 não foram considerados pelo fato de pelo menos um dos cotos

nervosos haver se separado dos tubos de silicone. Deste modo, foram analisados 7 animais com aditivos e 5 animais com implantes de tubos inicialmente vazios.

Em todos os animais com aditivos foram encontrados fascículos em regeneração conectando os cotos nervosos proximais e distais. A Figura 9 mostra o aspecto macroscópico de um desses fascículos, presente em um animal com implante de um tubo preenchido com gel de laminina e sacrificado 5 semanas após a cirurgia inicial.

FIGURA 9 - Aspecto macroscópico de um fascículo em regeneração presente em um rato com implante de um tubo de silicone preenchido com gel de laminina, após 5 semanas da cirurgia inicial. Parte do tubo foi removida para evidenciar o fascículo no seu interior. As setas A, B, C e D indicam os níveis onde foram retirados os cortes mostrados na Figura 10. As divisões da escala menor da foto representam 1 mm.

Contrastando com esses resultados, nenhum dos animais com implantes de tubos inicialmente vazios apresentou qualquer estrutura interligando os cotos nervosos proximais e distais. A ausência de fascículos em regeneração nesses animais está de acordo com os dados da literatura apresentados na introdução deste trabalho.

A análise microscópica dos fascículos em regeneração evidenciou, na periferia de todos os cortes examinados, um material com organização nitidamente circunferencial (Figura 10); somente nessa região mais periférica foram encontradas fibras nervosas mielínicas em regeneração (Figura 10A).

FIGURA 10 - Cortes transversais com 1 μ m de espessura obtidos dos níveis indicados pelas setas na Figura 9 (pag.27). Os asteriscos indicam as regiões mostradas em maior aumento na Figura 11 (pag. 29). Barra = 200 μ m.

A porção central dos fascículos em regeneração estava ocupada por um material acelular, que tendia a aumentar de volume à medida que nos afastávamos do coto proximal (Figura 10B-D, pag.28). A Figura 11 mostra, em maior aumento, a zona de transição entre a porção celular periférica e a zona acelular central do fascículo em regeneração ilustrado na Figura 9 (pag.27). Quando presentes, os axônios mielínicos eram sempre encontrados nessa zona de transição (Figura 11 A,B); na ausência dos mesmos, a porção periférica dos fascículos era ocupada por uma estrutura semelhante ao epitélio perineural de nervos normais (Figura 11 C,D).

FIGURA 11 - Detalhe das áreas indicadas por asteriscos na Figura 10 (pag.28); as mesmas letras correspondem aos mesmos cortes em ambas as figuras. Barra = 20 μ m.

Apesar de vários axônios mielínicos terem sido identificados, à microscopia óptica, nos níveis mais proximais dos fascículos em regeneração, em nenhum caso eles foram encontrados a uma distância superior a 6 mm no interior dos tubos (Tabela 4).

TABELA 4 - Distância máxima (a contar a partir do coto proximal) onde axônios mielínicos foram observados, à microscopia óptica, no interior dos fascículos em regeneração, em ratos com implantes de tubos de silicone inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos.

TIPO DE IM-PLANTE	CÓDIGO DO ANIMAL	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (Semanas)	DISTÂNCIA MÁXIMA (mm)
Silicone + Gel de Laminina	SGL-1	4	4
	SGL-2	5	6
	SGL-3	16	4
Silicone + Gel de Colágeno	SGC-1	6	4
	SGC-2	8	6
	SGC-3	8	4
	SGC-4	12	4
Silicone Inicialmente Vazio	SVz-1	4	Não foram observados fascículos em regeneração.
	SVz-2	8	
	SVz-3	12	
	SVz-4	12	
	SVz-5	16	

O microscópio eletrônico de transmissão foi então utilizado para investigar a presença de fibras nervosas amielínicas nas porções mais distais dos fascículos em regeneração. Como ilustrado na Figura 12, vários axônios amielínicos foram identificados na zona mais periférica desses níveis distais. A maioria desses axônios estava claramente associada à células de Schwann. Além disso, foram observados numerosos fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e grande quantidade de fibras colágenas (não ilustrados).

FIGURA 12 - Micrografia eletrônica mostrando a região periférica, correspondente ao corte ilustrado na Figura 11D (pag.29). É evidente a presença de vários axônios amielínicos (A), envoltos por prolongamentos de células de Schwann (S). Barra = 1 µm.

Para descartar a possibilidade de que os axônios encontrados no interior dos fascículos em regeneração representassem apenas fibras simpáticas em regeneração, a marcação neuronal retrógrada com HRP foi incluída nos experimentos. Todos os animais com implantes bem sucedidos de tubos com aditivos, e nenhum dos animais com tubos inicialmente vazios, apresentaram neurônios marcados na medula espinal e em gânglios sensitivos (Tabela 5 e Figura 13, pag. 33). A ausência de neurônios marcados nos animais com implantes de tubos inicialmente vazios representa evidência importante para descartar a marcação não específica de células por uma possível difusão da solução de HRP.

TABELA 5 - Número absoluto de neurônios marcados na medula espinal e gânglios espinais L3,L4,L5 de ratos com implantes de tubos de silicone inicialmente vazios ou com a adição de um gel de laminina ou de colágeno, após tempos de sobrevivência de 4 a 16 semanas.

TIPO DE IM-PLANTE	CÓDIGO DO ANIMAL	TEMPO SOBREV. (Semanas)	MEDULA ESPINAL	GÂNGLIOS ESPINAIS
Silicone + Gel de Laminina	SGL-1	4	176	57
	SGL-2	5	664	205
	SGL-3	16	221	5
Silicone + Gel de Colágeno	SGC-1	6	2	35
	SGC-2	8	244	116
	SGC-3	8	294	10
	SGC-4	12	242	46
Silicone Inicialmente Vazio	SVz-1	4	0	0
	SVz-2	8	0	0
	SVz-3	12	0	0
	SVz-4	12	0	0
	SVz-5	16	0	0

FIGURA 13 - Cortes longitudinais de congelação, com 40 μ m de espessura, mostrando neurônios marcados com HRP, na medula espinal (A) e no gânglio espinal L4 (B), de um animal sacrificado 5 semanas após o recebimento do implante de um tubo de silicone (25 mm) com gel de laminina (mesmo caso representado na Figura 9, pag. 27). Barra = 100 μ m.

DISCUSSÃO

A discussão dos resultados também obedecerá à divisão de experimentos proposta em **material e métodos**.

OBJETIVO ESPECIFICO I (implante, em camundongos, de tubos de polietileno inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos) -

Este trabalho apresenta os resultados obtidos na análise da resposta neuronal ao emprêgo de próteses tubulares de polietileno (com ou sem aditivos) a fim de facilitar a regeneração do nervo isquiático em camundongos adultos.

Nossos dados qualitativos são consistentes com aqueles obtidos pelo uso de diversos materiais tubulares, incluindo copolímeros de polilactato/poliglicolato (REID et alii, 1978; ROSEN et alii, 1983), copolímeros de acrílico (UZMAN & VILLEGAS, 1983), malhas de poliglactina (MOLANDER et alii, 1982), filtros de Millipore (NOBACK et alii, 1958; BASSETT et alii, 1959; CAMPBELL et alii, 1961; SJOSTRAND et alii, 1969), silicone (LEHMAN & HAYES, 1976; LUNDBORG et alii, 1982a,b,c; LONGO et alii, 1983a,b; WILLIAMS et alii, 1983), Goretex (YOUNG et alii, 1984), segmentos arteriais (WEISS & TAYLOR, 1943), poliéster biodegradáveis (NYILAS et alii, 1983; SECKEL et alii, 1984; DA SILVA et alii, 1985; HENRY et alii, 1985; MADISON et alii, 1987), câmaras mesoteliais pré-formadas (LUNDBORG & HANSSON, 1979; LUNDBORG et alii, 1981) e extratos de colágeno (GIBBY et alii, 1983; DA SILVA & MADISON, 1986). Em todos esses estudos foi observado que os axônios em regeneração tendiam

a formar, no interior dos tubos, uma estrutura central, altamente vascularizada e envolta por uma camada de tecido conjuntivo. Esse mesmo aspecto foi observado nos fascículos em regeneração de todos os animais utilizados no presente estudo.

Por outro lado, nossos dados quantitativos apresentam parâmetros que serão úteis na avaliação de diversos materiais atualmente em desenvolvimento, para possível uso em próteses tubulares nervosas (DA SILVA et alii, 1985; DA SILVA & MADISON, 1986; MADISON et alii, 1987).

A análise dos dados obtidos com o emprego de aditivos mostrou que a adição de um gel de laminina, no interior de tubos de polietileno, leva a um efeito estimulatório inicial sobre a taxa de regeneração nervosa, comprovando os resultados descritos por DA SILVA et alii (1984) e MADISON et alii (1985) com o emprêgo de tubos de poliéster. Deste modo, a análise estatística dos nossos resultados revelou, na 2ª semana pós-operatória, um número maior de axônios mielínicos no interior dos tubos de polietileno preenchidos com o gel de laminina, quando comparados com os tubos de polietileno inicialmente vazios. No entanto, não foi observada uma diferença correspondente (e ES) no número de corpos celulares de neurônios motores e sensitivos marcados nesses mesmos animais. Uma explicação para este fenômeno seria um possível efeito estimulatório exercido pelo gel de laminina sobre o grau de ramificação e crescimento das fibras nervosas em regeneração do coto nervoso proximal, fazendo com que um número inicialmente maior de axônios (correspondentes, no entanto, a um número idêntico de corpos celulares em ambas situações experimentais) cruzassem a luz dos tubos e invadissem o coto distal. Uma outra alternativa, seria um possível efeito estimulatório

exercido pelo gel de laminina sobre o processo de migração das células de Schwann para o interior dos tubos, a partir de ambos os cotos nervosos, fazendo com que o processo de mielinização dos axônios em regeneração se iniciasse precocemente nos tubos preenchidos com esse gel. Ambas as hipóteses são válidas, pois estão de acordo com observações de vários autores que descreveram um efeito estimulatório, in vitro, do gel de laminina sobre o crescimento e direcionamento de fibras nervosas do SNP e SNC (MANTHORPE et alii, 1983; KLEINMAN et alii, 1984; SMALHEISER et alii, 1984; HAMMARBACK et alii, 1985).

Por outro lado, foi observado um efeito inibitório inicial do gel de colágeno sobre a taxa de regeneração de neurônios motores somáticos e sensitivos, quando comparado com o gel de laminina. Estudos recentes sobre a regeneração nervosa periférica no interior de próteses tubulares (vazias no momento da implantação) descreveram a formação inicial de uma matriz de fibrina na luz dos tubos (UZMAN & VILLEGAS, 1983; WILLIAMS et alii, 1983), logo invadida por fibroblastos, células endoteliais e células de Schwann, que passaram a modificar essa mesma matriz. A maior densidade do gel de colágeno utilizado neste estudo (KNAPP et alii, 1977; KLJAVIN et alii, 1985) em relação a matriz de fibrina e ao gel de laminina constituiu, provavelmente, um fator importante no retardo da migração de células e fibras nervosas para o interior dos tubos preenchidos com o gel de colágeno.

Um dos aspectos mais importantes deste trabalho foi a constatação de que, após 40 semanas do implante inicial, apenas 50% do número de axônios mielínicos, presentes no nervo isquiático de animais não operados, foram encontrados no interior das próteses tubulares. Do mesmo modo, a marca-

ção neuronal retrógrada com HRP demonstrou, nesses mesmos animais, uma diminuição acentuada do número de corpos celulares de neurônios sensitivos (60% do número obtido no grupo controle) em regeneração. No entanto, não foi observada uma diminuição correspondente do número de neurônios motores somáticos marcados (86-98% dos números obtidos em animais não operados) nesse mesmo período. Vários estudos recentes descreveram a ocorrência de degeneração de neurônios de gânglios sensitivos após transecção de seus axônios no interior de nervos (ALDSKOGIUS & ARVIDSSON, 1978; HOFFER et alii, 1980; RISLING et alii, 1983; YGGE & ALDSKOGIUS, 1984; TESSLER, 1985). ARVIDSSON et alii (1986) relataram o desaparecimento de 15 a 30% dos corpos celulares de neurônios sensitivos presentes em gânglios espinais lombares, após a transecção do nervo isquiático de ratos. Essas observações estão de acordo com os dados obtidos neste estudo, onde aproximadamente 60% dos neurônios sensitivos originais, após 40 semanas de sobrevivência, apresentavam axônios no coto distal dos nervos seccionados. Deste modo, a presença de um reduzido número de axônios mielínicos no interior dos fascículos em regeneração estaria relacionada, pelo menos em parte, à diminuição da população neuronal sensitiva após a lesão nervosa periférica.

Um outro aspecto importante deste trabalho foi a constatação de que, entre a 12ª e a 40ª semana pós-operatória, houve uma diminuição significativa do número de fibras nervosas mielínicas no interior dos fascículos em regeneração, sem que houvesse uma diminuição correspondente do número de corpos celulares de neurônios marcados na medula espinal ou nos gânglios sensitivos. A explicação mais viável para essa observação seria uma possível degeneração das colaterais axônicas em regeneração incapazes de

restabelecer contatos com seus órgãos terminais (fibras musculares ou receptores), seguindo um padrão semelhante ao descrito durante o desenvolvimento embrionário da inervação muscular (PURVES & LICHTMAN, 1985).

Finalmente, os dados quantitativos, obtidos com a adição do gel de colágeno ou de laminina no interior dos tubos de polietileno, representam importantes parâmetros para futuras avaliações, in vivo, das ações de várias substâncias descritas como tendo um efeito estimulatório, in vitro, sobre o processo de regeneração de axônios do SNP (NGF (LEVI-MONTALCINI et alii, 1978) e gangliosídeos (ROISEN et alii, 1981), por exemplo).

OBJETIVO ESPECÍFICO II (implante, em ratos, de tubos de silicone inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos e com 20-25 mm de comprimento) -

Os dados apresentados revelam aspectos importantes em relação ao uso de próteses tubulares no auxílio da regeneração nervosa periférica. O mais importante, sem dúvida, é a demonstração de que é possível aumentar, pelo menos por um fator de dois, a distância máxima através da qual axônios do SNP se estenderão no interior de uma prótese tubular, pela adição de um gel de laminina ou de colágeno à luz dos tubos.

Os resultados obtidos sugerem que: 1) axônios estavam presentes em toda a extensão dos fascículos em regeneração nos animais que receberam a adição de um gel de laminina ou de colágeno no interior dos tubos e 2) pelo menos alguns desses axônios pertenciam a neurônios motores somáticos e sensitivos. Essas duas observações dão forte apoio à

hipótese de que determinadas substâncias, adicionadas ao interior de próteses tubulares, permitem que axônios do SNP cruzem distâncias longas entre os cotos de nervos lesados.

Além disso, observações à microscopia óptica e eletrônica revelaram a existência de gradientes próximo-distal e periférico-central no desenvolvimento dos fascículos em regeneração. A porção periférica dos fascículos em regeneração era ocupada, em grande parte, por um tecido semelhante ao perineuro de nervos normais e por fibras nervosas mielínicas e amielínicas. Acreditamos que o material acelular encontrado na região central dos fascículos represente parte dos aditivos colocados inicialmente no interior dos tubos, o que estaria de acordo com as observações de KLJAVIN et alii (1985) ao microscópio eletrônico de varredura.

Nossa hipótese, com base nessas observações, é de que células e axônios em regeneração invadiriam a prótese tubular a partir, principalmente, do coto proximal e que a primeira onda de células (e talvez axônios) migraria, inicialmente, ao longo da superfície dos aditivos. Foi demonstrado por KLJAVIN et alii (1985) que durante a fase de gelificação, esses aditivos se retraem, criando um espaço entre os mesmos e a parede interna dos tubos. Essas células pioneiras passariam então a modificar o microambiente inicial do interior dos tubos, através da degradação e/ou rearranjo dos aditivos, dando origem a um novo microambiente. Este processo teria início na superfície do aditivo para, em seguida, se estender progressivamente em direção central. Essa sequência de eventos explicaria os gradientes de maturação observados nos fascículos em regeneração.

Vários tipos celulares têm sido demonstrados com capacidade de degradação do colágeno tipo I. Fibroblastos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares possuem colagenases necessárias para a quebra do colágeno tipo I (HORWITZ et alii, 1977). Além disso, foi demonstrado que substratos de colágeno estimulam o crescimento e diferenciação de vários tipos de células in vitro (GEY et alii, 1974; MEIER & HAY, 1974; GOSPODAROWICZ et alii, 1978; KLEINMAN et alii, 1981). Foi demonstrado, também, que o gel de laminina, in vitro, influencia a morfologia e migração de células de Schwann (KLEINMAN et alii, 1984), assim como o crescimento e diferenciação de vários outros tipos celulares (KLEINMAN et alii, 1986). É altamente provável que o gel de laminina e de colágeno atuem como substrato preferencial para a migração inicial de células no interior dos tubos e que as mesmas, logo em seguida, passem a degradar e/ou rearranjar esses aditivos. Essas células seriam capazes, também, de produzir seus próprios substratos característicos e atuar na composição da matriz extracelular (CARBONETTO, 1984).

Há considerável evidência de que o coto distal de nervos seccionados libere substâncias capazes de exercer influências tróficas e troficas sobre as fibras nervosas em regeneração, no coto proximal (WEISS & TAYLOR, 1946; CAJAL, 1959; POLITIS et alii, 1982; LUNDBORG et alii, 1982a; OCHI, 1983; VARON & LUNDBORG, 1983; SECKEL et alii, 1984; WILLIAMS et alii, 1984; SHINE et alii, 1985; MULLER et alii, 1987). Do mesmo modo, vários estudos têm demonstrado um efeito neurotrófico exercido por músculos esqueléticos sobre neurônios motores somáticos (HAMBURGER, 1939; HOLLYDAY & HAMBURGER, 1976; PITTMAN & OPPENHEIM, 1978).

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que tanto o gel de laminina como o gel de colágeno são capazes de

manter o crescimento axonal sobre longas distâncias, no interior de próteses tubulares. Uma possível explicação para esse efeito seria a liberação, pelo coto distal, de substâncias tróficas no interior dos tubos; estas se ligariam ao gel de laminina ou de colágeno para exercer suas ações específicas. Na ausência dos aditivos esses fatores não se fixariam e deixariam de exercer seus efeitos sobre as fibras nervosas em regeneração. Uma explicação alternativa, mas ainda relacionada, seria a de que apenas quantidades mínimas de substâncias neurotróficas sejam liberadas pelo coto distal; na ausência dos aditivos elas sofreriam uma diluição ainda maior no espaço relativamente amplo dos tubos, perdendo suas atividades estimulatórias. O gel de laminina (ou de colágeno) teria a função de ocupar a maior parte da luz dos tubos, permitindo uma maior concentração desses fatores neurotróficos. Uma terceira possibilidade, e a que nos parece mais viável, é a de que os aditivos aumentariam a migração de células não neuronais para o interior dos tubos, onde elas passariam a degradar o aditivo inicial e, ao mesmo tempo, secretariam proteínas e fatores que atrairiam e direcionariam os axônios em regeneração. Dados a favor dessa hipótese são fornecidos pelo trabalho de LONGO et alii (1984). Esses autores, usando um modelo similar ao nosso, demonstraram que uma matriz de fibrina é formada no interior dos tubos logo após a implantação, antes do início de qualquer migração celular. Após 7 dias, essa matriz apresentou reação imunohistoquímica intensamente positiva com anticorpos anti-fibronectina e negativa com anticorpos anti-laminina. Decorridos 14 dias do implante inicial, quando a matriz de fibrina havia sido totalmente invadida por diversos tipos celulares, as reações anti-laminina e anti-fibronectina eram intensamente

positivas. Ao mesmo tempo, foi evidenciada uma alta atividade neurotrófica no interior das próteses tubulares. LONGO et alii (1984) sugeriram a hipótese de que as células em migração, para o interior dos tubos, seriam a fonte dos fatores neurotróficos. Nos experimentos aqui descritos, a presença do gel de colágeno, ou de laminina, se mostrou necessária para que células invadissem o interior dos tubos. Assumindo que essas células representem a fonte dos fatores tróficos necessários para o crescimento das fibras em regeneração, torna-se necessário prover um substrato adequado para que as mesmas migrem para o interior dos tubos.

Qualquer que seja o mecanismo exato, fica evidente que a adição de aditivos específicos, no interior de próteses tubulares, pode aumentar consideravelmente a distância, entre os cotos de nervos lesados, a ser transposta pelos axônios em regeneração.

CONCLUSÕES

O presente estudo foi realizado visando a determinação de parâmetros quantitativos durante a regeneração de nervos no interior de próteses tubulares, sob diferentes condições experimentais.

As conclusões alcançadas serão apresentadas em duas partes, segundo a divisão de objetivos proposta em **material e métodos**.

OBJETIVO ESPECÍFICO I - A análise dos resultados obtidos com a implantação, em camundongos, de próteses tubulares de polietileno, inicialmente vazias ou preenchidas com um gel de laminina ou de colágeno e mantendo uma distância de 4 mm entre os cotos nervosos, permitiu concluir que:

1) A presença de um gel de laminina no interior dos tubos de polietileno resultou em aumento inicial significativo, evidente na 2ª semana pós-operatória, do número de axônios mielínicos presentes no interior dos fascículos em regeneração.

2) A presença de um gel de colágeno, no interior das próteses tubulares, quando comparada com um gel de laminina, resultou na diminuição inicial (2 semanas de sobrevivência) do número de neurônios motores e sensitivos marcados e correspondentes axônios mielínicos em regeneração.

3) A presença dos aditivos no interior dos tubos de polietileno não alterou, a partir da 4ª semana pós-operatória, a resposta neuronal regenerativa observada com o implante de tubos inicialmente vazios.

4) Entre a 12ª e a 40ª semana pós-operatória houve, nos três grupos experimentais, uma diminuição significativa do número de fibras mielínicas presentes no interior dos fascículos em regeneração, **não acompanhada** por uma diminuição correspondente do número de neurônios marcados.

5) Em relação aos animais controles, não operados, apenas 60% dos neurônios sensitivos e mais de 90% dos neurônios motores somáticos foram capazes de regenerar axônios através das próteses tubulares; o componente sensitivo seria, assim, responsável em grande parte pelo reduzido número de axônios mielínicos presentes no interior dos fascículos em regeneração (50% do número de fibras mielínicas existentes no nervo isquiático de animais não operados).

OBJETIVO ESPECÍFICO II - A análise dos resultados obtidos com o implante, em ratos, de tubos de silicone, inicialmente vazios ou preenchidos com aditivos e com 20-25 mm de comprimento, permite concluir que:

1) A presença do gel de colágeno ou de laminina no interior das próteses tubulares levou, ao contrário dos tubos inicialmente vazios, à formação de fascículos em regeneração conectando os cotos nervosos proximais e distais dos nervos transeccionados.

2) Axônios mielínicos e amielínicos estavam presentes no interior dos fascículos em regeneração; a marcação neuronal retrógrada com HRP demonstrou que, pelo menos alguns desses axônios pertenciam a neurônios motores somáticos e sensitivos.

3) A adição de determinadas substâncias no interior de próteses tubulares pode levar ao aumento da distância máxima passível de reconexão entre os cotos de nervos transeccionados.

ANEXO - QUADRO GERAL DO NÚMERO DE CÉLULAS MARCADAS COM HRP E AXÔNIOS MIELÍNICOS EM CAMUNDONGOS COM IMPLANTES DE TUBOS DE POLIETILENO INICIALMENTE VAZIOS OU COM ADITIVOS DE GEL DE LAMININA OU DE COLÁGENO, APÓS TEMPOS DE SOBREVIVÊNCIA DE 2, 4, 6, 12 E 40 SEMANAS. OS TOTAIS REPRESENTAM A MÉDIA DOS VALORES $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA. OS ANIMAIS CONTROLES SÃO CAMUNDONGOS NÃO OPERADOS.

TEMPO SOBRE VIVÊN- CIA	TUBOS INICIALMENTE VAZIOS				TUBOS COM GEL DE LAMININA				TUBOS COM GEL DE COLÁGENO			
	COD. ANIM.	MED. ESP.	GANGL. ESP.	AXON. MIEL.	COD. ANIM.	MED. ESP.	GANGL. ESP.	AXON. MIEL.	COD. ANIM.	MED. ESP.	GANGL. ESP.	AXON. MIEL.
2 SEM.	PE02-1	632	1269	581	GL02-1	685	2322	2122	GC02-1	499	623	143
	PE02-2	373	279	67	GL02-2	782	2088	1724	GC02-2	218	67	12
	PE02-3	607	1121	209	GL02-3	662	1348	1322	GC02-3	227	149	8
	PE02-4	<u>363</u>	<u>546</u>	<u>69</u>	GL02-4	<u>502</u>	<u>990</u>	<u>957</u>	GC02-4	<u>366</u>	<u>449</u>	<u>9</u>
		494 $\pm$ 73	804 $\pm$ 234	231 $\pm$ 121		658 $\pm$ 58	1687 $\pm$ 311	1531 $\pm$ 252		327 $\pm$ 66	322 $\pm$ 66	43 $\pm$ 33
4 SEM.	PE04-1	666	1516	1532	GL04-1	706	1403	1752	GC04-1	808	1522	1643
	PE04-2	452	768	206	GL04-2	758	1609	1592	GC04-2	442	896	1044
	PE04-3	777	1017	1498	GL04-3	732	1033	1248	GC04-3	473	1203	1172
	PE04-4	<u>758</u>	<u>1350</u>	<u>1538</u>	GL04-4	<u>778</u>	<u>1476</u>	<u>1970</u>	GC04-4	<u>569</u>	<u>1152</u>	<u>881</u>
		663 $\pm$ 74	1163 $\pm$ 167	1193 $\pm$ 329		743 $\pm$ 16	1380 $\pm$ 123	1640 $\pm$ 152		573 $\pm$ 83	1193 $\pm$ 128	1185 $\pm$ 164
6 SEM.	PE06-1	526	742	781	GL06-1	759	1373	1979	GC06-1	571	1498	1541
	PE06-2	757	1772	1729	GL06-2	651	1331	1313	GC06-2	532	952	1709
	PE06-3	748	1060	1371	GL06-3	808	1789	2066	GC06-3	853	1545	2179
	PE06-4	<u>621</u>	<u>908</u>	<u>922</u>	GL06-4	<u>803</u>	<u>2043</u>	<u>2769</u>	GC06-4	<u>642</u>	<u>1852</u>	<u>1825</u>
		663 $\pm$ 55	1120 $\pm$ 227	1200 $\pm$ 216		755 $\pm$ 36	1634 $\pm$ 171	2032 $\pm$ 298		649 $\pm$ 71	1463 $\pm$ 188	1813 $\pm$ 135
12 SEM.	PE12-1	690	1475	2180	GL12-1	868	1508	2526	GC12-1	780	1924	2111
	PE12-2	609	1788	1825	GL12-2	823	1778	2207	GC12-2	384	810	1536
	PE12-3	582	1499	1852	GL12-3	865	2225	2447	GC12-3	768	1541	2360
	PE12-4	<u>878</u>	<u>2067</u>	<u>2067</u>	GL12-4	<u>875</u>	<u>1522</u>	<u>2149</u>	GC12-4	<u>870</u>	<u>1893</u>	<u>2700</u>
		689 $\pm$ 67	1707 $\pm$ 139	1981 $\pm$ 86		857 $\pm$ 12	1758 $\pm$ 167	2332 $\pm$ 91		700 $\pm$ 108	1592 $\pm$ 213	2177 $\pm$ 245
40 SEM.	PE40-1	731	2330	1539	GL40-1	750	2739	2237	GC40-1	869	2637	1143
	PE40-2	795	2796	1454	GL40-2	836	2487	1505	GC40-2	726	2455	1269
	PE40-3	700	2483	1697	GL40-3	877	2364	1802	GC40-3	710	2272	1671
	PE40-4	<u>856</u>	<u>2689</u>	<u>1236</u>	GL40-4	<u>864</u>	<u>2508</u>	<u>1764</u>	GC40-4	<u>743</u>	<u>2389</u>	<u>1715</u>
		770 $\pm$ 35	2574 $\pm$ 104	1481 $\pm$ 96		831 $\pm$ 29	2524 $\pm$ 78	1827 $\pm$ 152		762 $\pm$ 36	2438 $\pm$ 76	1450 $\pm$ 143
CON- TRO- LE	NORM-1	879	4212	3375								
	NORM-2	852	4476	3363								
	NORM-3	829	4031	3359								
	NORM-4	<u>818</u>	<u>4126</u>	<u>3149</u>								
		844 $\pm$ 13	4211 $\pm$ 96	3311 $\pm$ 54								

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, **94**: 239-46, 1946.
2. ADAMS, J.C. Stabilizing and rapid thionin staining of TMB-based HRP reaction product. *Neurosci. Lett.*, **17**: 7-9, 1980.
3. ALDSKOGLIUS, H. & ARVIDSSON, J. Nerve cell degeneration and death in the trigeminal ganglion of the adult rat following peripheral nerve transection. *J. Neurocytol.*, **7**: 229-50, 1978.
4. ANGLISTER, L. & MCMAHAN, U.J. Basal lamina directs the accumulation of acetylcholinesterase at synaptic sites on regenerating muscles. *Soc. Neurosci. Absts.*, **10**: 85.6, 1984.
5. ARVIDSSON, J.; YGGE, J.; GRANT, G. Cell loss in the lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res.*, **373**: 15-21, 1986.
6. BASSETT, C.A.L.; CAMPBELL, J.B.; HUSBY, J. Peripheral nerve and spinal cord regeneration: factors leading to success of a tubulation technique employing millipore. *Exp. Neurol.*, **1**: 386-406, 1959.
7. BIGNAMI, A.; CHI, N.M.; DAHL, D. Laminin in rat sciatic nerve undergoing Wallerian degeneration. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, **43**: 94-103, 1984.
8. BRUNELLI, G.; MONINI, L.; BRUNELLI, F. Problems in nerve lesions surgery. *Microsurg.*, **6**: 187-98, 1985.
9. BRUSHART, T.M. & MESULAM, M.M. Alteration in connections between muscle and anterior horn motoneurons after peripheral nerve repair. *Science*, **208**: 603-5, 1980.

10. BUNGE, M.B.; WILLIAMS, A.K.; WOOD, P.M.; VITTO, J.; JEFFREY, J.J. Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures, with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J. Cell Biol.*, **84**: 184-202, 1980.
11. BUNGNER, V.O. Ueber die degenerations- and regenerations- vorange am nerven nach cerletzungen. *Beitr. Pathol.*, **10**: 321-31, 1891.
12. CAJAL, S.R. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. New York, Hafner Publ., 1959. p.223--64.
13. CAMPBELL, J.B.; BASSETT, C.A.L.; HUSBY, J.; THULIN, C.; FERINGA, E.R. Microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J. Trauma*, **1**: 139-57, 1961.
14. CARBONETTO, S. The extracellular matrix of the nervous system. *Trends in Neurosci.*, **7**: 382-7, 1984.
15. COLLINS, F. Neurite outgrowth induced by the substrate associated material from nonneuronal cells. *Dev. Biol.*, **79**: 247-52, 1980.
16. COLLINS, F. & GARRETT, J.E. Elongating nerve fibers are guided by a pathway of material released from embryonic nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 6226-8, 1980.
17. CRUTCHER, K.A. & CHANDLER, J.P. Association of basal lamina with peripheral axons elongating within the rat central nervous system. *Brain Res.*, **308**: 177-81, 1984.
18. DA SILVA, C.F.; DIKKES, P.; MADISON, R.; GREATOREX, D.; SIDMAN, R.L. Laminin gel stimulates axonal regeneration in vivo. *Soc. Neurosci. Absts.*, **10**: 85.-11, 1984.

19. DA SILVA, C.F. & MADISON, R. Nerve regeneration through collagen/laminin gel tubes: a quantitative HRP study. *Soc. Neurosci. Absts.*, 12: 190.11, 1986.
20. 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.
21. DANIEL, R.K. & TERZIS, J.T. *Reconstructive microsurgery*. Boston, Little, Brown & Co., 1977.
22. DANIELSEN, N.; DAHLIN, L.B.; LEE, Y.F.; LUNDBORG, G. Axonal growth in mesothelial chambers: the role of the distal nerve segment. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 17: 119-25, 1983.
23. ERHART, E.A. Experimental data and practical results which modify concepts of peripheral nerve fibres regeneration. In: Gorio A. e col., ed. *Posttraumatic nerve regeneration*. New York, Raven Press, 1981. p.-433-40.
24. GEY, G.O.; SVOTELIS, M.; FOARD, M.; BANG, F.B. Long-term growth of chicken fibroblasts on a collagen substrate. *Exp. Cell Res.*, 84: 63-71, 1974.
25. GIBBY, W.A.; KOERBER, R.; HORCH, K.W. A quantitative evaluation of suture and tubulization nerve repair techniques. *J. Neurosurg.*, 58: 574-9, 1983.
26. GOSPODAROWICZ, D.; GREENBURG, G.; BIRDWELL, C.R. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.*, 38: 4155-71, 1978.
27. 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, 1939.

28. HENRY, E.W.; CHIU, T.-H.; NYILAS, E.; BRUSHART, T.M.; DIKKES, P.; SIDMAN, R.L. Nerve regeneration through biodegradable polyester tubes. *Exp. Neurol.*, 90: 652--6, 1985.
29. HOFFER, J.A.; GORDON, T.; STEIN, R.B. Differential atrophy of sensory and motor fiber following ligation or resuture of cat hindlimb. In: Jewett, D.L. & McCarroll Jr., H.R., ed. *Nerve regeneration and repair*. St. Louis, Mosby, 1980. p. 163-5.
30. HOLLYDAY, M. & HAMBURGER, V. Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.*, 170: 311-20, 1976.
31. HORWITZ, A.L.; HANCE, A.J.; CRYSTAL, R.G. Granulocyte collagenase: Selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 897-901, 1977.
32. IDE, C. Nerve regeneration and Schwann cell basal lamina: observations of the long term regeneration. *Arch. Histol. Jap.*, 46: 243-57, 1983.
33. KEYNES, R.J.; HOPKINS, W.G.; HUANG, C.L.-H. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane. *Brain Res.*, 295: 275-81, 1984.
34. KLEINMAN, H.K.; KLEBE, R.J.; MARTIN, G.R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, 88: 473-85, 1981.
35. KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; LIOTTA, L.; ROBEY, P.G.; TRYGGVASON, K.; MARTIN, G.R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from EHS sarcoma. *Biochem.*, 21: 6188-93, 1982.

36. KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSELL, J.R.; MARTIN, G.R.; BARON-VAN EVERCOOREN, A.; DUBOIS-DALCOQ, M. The role of laminin in basement membranes and in the growth, adhesion, and differentiation of cells. In: **The role of the extracellular matrix in development.** New York, Alan R. Liss, 1984. p. 123-43.
37. KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSEL, J.R.; STAR, V.L.; CANNON, F.B.; LAURIE, G.W.; MARTIN, G.R. Basement membrane complex with biological activity. **Biochem.**, 25: 312-8, 1986.
38. KLJAVIN, I.; MADISON, R.; DA SILVA, C.F.; SIDMAN, R.L. SEM visualization of early events in PNS regeneration within a tubular prosthesis: effects of different protein additives. **Soc. Neurosci. Absts.**, 11: 367.5, 1985.
39. KNAPP, T.R., LUCK, E.; DANIELS, J.R. Behavior of solubilized collagen as a bioimplant. **J. Surg. Res.**, 23: 96-105, 1977.
40. KULJIS, R.O.; DECAROLIS, V.; FERNANDEZ, V.; VINCENT, O. Observations on the early mechanisms of severed nerve regeneration after compressive tubulation repair. **Exp. Neurol.**, 80: 708-25, 1983.
41. LEHMAN, R.A.W. & HAYES, G.J. Degeneration and regeneration in peripheral nerve. **Brain**, 90: 285-96, 1967.
42. LEVI-MONTALCINI, R.; ALDE, L.; CHEN, M.G.M.; CHEN, J.S. New features of the nerve growth factor-target cells interaction. In: Levi-Montalcini, R., ed. **Cellules Nerveuses, Transmetteurs et Comportement.** Vaticano, Pont. Acad. Scient., 1980. p.11-39.

43. LONGO, F.M.; MANTHORPE, M.; SKAPER, S.D.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Neurotrophic activities accumulate in vivo within silicone nerve regeneration chambers.- **Brain Res.**, 261: 109-17, 1983a.
44. LONGO, F.M.; SKAPER, S.D.; MANTHORPE, M.; WILLIAMS, L.R.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Temporal changes of neurotrophic activities accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Exp. Neurol.**, 81: 756--69, 1983b.
45. 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.
46. LUNDBORG, G. & HANSSON, H.-A. Regeneration of peripheral nerve through a preformed tissue space. Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibres and perineurium. **Brain Res.**, 178: 573-6, 1979.
47. 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.
48. 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, 1982a.

49. 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 six-millimeter gap. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 41: 412-22, 1982b.
50. LUNDBORG, G.; LONGO, F.M.; VARON, S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. *Brain Res.*, 232: 157-61, 1982c.
51. MADISON, R.; DA SILVA, C.F.; DIKKES, P.; SIDMAN, R.L.; CHIU, T.-H. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp. Neurol.*, 88: 767-72, 1985.
52. MADISON, R.; DA SILVA, C.F.; DIKKES, P.; SIDMAN, R.L.; CHIU, T.-H. Peripheral nerve regeneration with entubulation repair: comparison of biodegradable nerve guides versus polyethylene tubes and the effects of a laminin-containing gel. *Exp. Neurol.*, 95: 387-90, 1987.
53. 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: 882-90, 1983.
54. MCQUARRIE, I.G. Acceleration of axonal regeneration in rat somatic motoneurons by using a conditioning lesion. In: Gorio et al., ed. *Posttraumatic peripheral nerve regeneration*. New York, Raven Press, 1981.- p.49-58.
55. MEDINACELI, L. & FREED, W.J. Peripheral nerve reconnection: immediate histologic consequences of distributed mechanical support. *Exp. Neurol.*, 81: 459-68, 1983.

56. MEIER, S. & HAY, E.D. Control of corneal differentiation by extracellular materials. Collagen as a promoter and stabilizer of epithelial stroma production. *Dev. Biol.*, 38: 249-70, 1974.
57. MESULAM, M.M. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 106-17, 1978.
58. MOLANDER, H.; OLSSON, Y.; ENGKVIST, O.; BOWALD, S.; ERIKSSON, I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle & Nerve*, 5: 54-7, 1982.
59. MULLER, H.; WILLIAMS, L.R.; VARON, S. Nerve regeneration chamber evaluation of exogenous agents applied by multiple injections. *Brain Res.*, 413: 320-6, 1987.
60. NOBACK, C.R.; HUSBY, J.; GIORADO, J.M.; BASSETT, C.A.L.; CAMPBELL, J.B. Neural regeneration across long gaps in mammalian peripheral nerves: early morphological findings. *Anat. Rec.*, 131: 633-47, 1958.
61. NYILAS, E.; CHIU, T.-H.; SIDMAN, R.L.; HENRY, E.W.; BRUSHART, T.M.; DIKKES, P.; MADISON, R. Peripheral nerve repair with bioresorbable prosthesis. *Trans. Amer. Soc. Artif. intern. Organs*, 29: 307-13, 1983.
62. OCHI, M. Experimental study on orientation of regenerating fibers in the severed peripheral nerve. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 32: 389-94, 1983.
63. PITTMAN, R. & OPPENHEIM, R. Neuromuscular blockage increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature*, 271: 364-6, 1978.

64. POLITIS, M.J.; EDERLE, K.; SPENCER, P.S. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves.- **Brain Res.**, 253: 1-12, 1982.
65. PURVES, D. & LICHTMAN, J.W. **Principles of neural development**. Sunderland, Sinauer Publ., 1985. p.131-53.
66. REID, R.L.; CUTRIGHT, D.E.; GARRISON, J.S. Biodegradable cuff as an adjunct to peripheral nerve repair: a study in dogs. **Hand**, 10: 259-66, 1978.
67. RESTREPO, Y.; MERLE, M.; PETRY, D.; MICHON, J. Empty perineurial tube graft used to repair a digital nerve: A first case report. **Microsurg.**, 6: 73-7, 1985.
68. RISLING, M.; ALDSKOGIUS, H.; HILDEBRAND, C.; REMAHL, S. Effects of sciatic nerve resection on L7 spinal root and dorsal root ganglia in adult cats. **Exp. Neurol.**, 82: 568-80, 1983.
69. ROISE, F.J.; BARTFIELD, H.; NAGELE, R.; YORKE, G. Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. **Science**, 214: 577-8, 1981.
70. ROSEN, J.M.; HENTZ, V.R.; KAPLAN, E.N. Fascicular tubulization: a cellular approach to peripheral nerve repair. **Ann. Plast. Surg.**, 11: 397-411, 1983.
71. ROSEN, J.M.; KAPLAN, E.N.; JEWETT, D.L. Suture and sutureless methods of repairing experimental nerve injuries. In: Jewett, D.L. & McCarrol Jr., H.R., ed. **Nerve regeneration and repair**. St. Louis, Mosby, 1980. p.235-42.
72. SANES, J.R. & CHENEY, J.M. Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. **J. Cell Biol.**, 93: 442-51, 1982.

73. SANES, J.R.; MARSHALL, L.M.; MCMAHAN, U.J. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J. Cell Biol.*, 78: 176-98, 1978.
74. SECKEL, B.; CHIU, T.-H.; NYILAS, E.; SIDMAN, R.L.- Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides- role of the target organ. *J. Plast. Recon. Surg.*, 74: 173-81, 1984.
75. SHINE, H.D.; HARCOURT, P.G.; SIDMAN, R.L. Cultured peripheral nervous system cells support peripheral nerve regeneration through tubes in the absence of distal nerve stump. *J. Neurosci. Res.*, 14: 393-401, 1985.
76. SMALHEISER, N.R.; CRAIN, S.M.; REID, L.M. Laminin as a substrate for retinal axons in vitro. *Dev. Brain Res.*, 12: 136-40, 1984.
77. SUNDERLAND, S. The capacity of regenerating axons to bridge long gaps in nerves. *J. Comp. Neurol.*, 99: 481-93, 1953.
78. SUNDERLAND, S. *Nerve and nerve injuries*. Edinburg, Churchill-Livingstone, 1978. p.483-650.
79. TESSLER, A.; HIMES, B.T.; KRIEGER, N.R.; MURRAY, M.; GOLDBERGER, M. Sciatic nerve transection produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of substance P in spinal cord. *Brain Res.*, 332: 209-18, 1985.
80. TIMPL, R.; ENGEL, J.; MARTIN, G.R. Laminin - a multifunctional protein of basement membranes. *Trends Biochem. Sci.*, 8: 207-9, 1983.

81. UZMAN, B.G. & VILLEGAS, G.M. Mouse sciatic nerve regeneration through semipermeable tubes: a quantitative model. *J. Neurosci. Res.*, **9**: 325-38, 1983.
82. VARON, S. & LUNDBORG, G. In vivo models for peripheral nerve regeneration and the presence of neurotrophic factor. In; Haber, B. et al., ed. *Nervous system regeneration*. New York, Alan R. Liss, 1983. p.221-40.
83. VARON, S.; MANTHORPE, M.; LONGO, F.M.; WILLIAMS, L.R. Growth factors in regeneration of neural tissues- In: *Nerve, organ and tissue regeneration research perspectives*. New York, Academic Press, 1983. p.127-55.
84. WEISS, P. The technology of nerve regeneration: a review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *J. Neurosurg.*, **1**: 400-50, 1944.
85. WEISS, P. & TAYLOR, A.C. Histomechanical analysis of nerve reunion in the rat after tubular splicing. *Arch. Surg. Chicago*, **47**: 419-47, 1943.
86. WEISS, P.A. & TAYLOR, A.C. Guides for nerve regeneration across gaps. *J. Neurosurg.*, **3**: 400-20, 1946.
87. 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.
88. WILLIAMS, L.R.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Competence of nerve tissue as a distal insert promoting regeneration in a silicone chamber. *Brain Res.*, **293**: 201-11, 1984.
89. WOODHALL, B. & BEEBE, G. *Peripheral nerve regeneration - a follow-up study of 3,656 World War II injuries*. VA Medical Monograph, 1956.

90. YGGE, J. & ALDSKOGIUS, H. Intercostal nerve transection and its effect on the dorsal root ganglion. A quantitative study on ganglion cell number and sizes. *Exp. Brain Res.*, 55: 402-8, 1984.
91. YOUNG, B.L.; BEGOVAC, P.; STUART, D.G.; GOSLOW JR., G.E. An effective sleeving technique in nerve repair.- *J. Neurosci. Meth.*, 120: 51-8, 1984.

ABSTRACT

The experiments reported here present quantitative data concerning peripheral nerve regeneration in vivo. The material in this thesis was organized around two specific aims. Experiments for **Specific Aim I** established the time course (from 2 to 40 weeks) of regeneration for both motor and sensory neurons which send an axon through a polyethylene tube bridging a 4 mm gap in the transected mouse sciatic nerve. The microenvironment of the regenerating axons within the tubular prostheses was modified by adding either collagen or a laminin-enriched gel to the interior of the tubes at the time of the initial implantation. The data presented demonstrate that specific manipulations to the microenvironment of regenerating peripheral axons may have quantitative effects on the rate and extent of nerve regeneration. Experiments for **Specific Aim II** tested the hypothesis that the maximum nerve gap distance that peripheral nervous system axons would grow through a tubular prostheses could be increased by specific modifications to the internal environment of the tube. The sciatic nerve of adult rats was transected and proximal and distal nerve stumps were sutured into a silicone tube 20-25 mm in length. The silicone tubes were implanted empty or the lumen was first filled with collagen or a laminin-enriched gel. The animals were sacrificed following 4 to 16 weeks survival time. All of the tubes with additives, but none of the initially empty tubes, displayed a regenerated cable within the tube. Retrograde labeling studies showed that some of the axons present in the regenerated cables arose from primary motor and sensory neurons.