



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas**

**EFEITO DA LAMININA POLIMERIZADA EM MATRIZES DE
DIFERENTES pHs NA REGENERAÇÃO DE NERVO CIÁTICO DE
CAMUNDONGO APÓS TRANSECÇÃO E TUBULIZAÇÃO COM
TUBO DE COLÁGENO.**

Renata Gorham Pitanga

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Morfológicas.

**Rio de Janeiro
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas**

**EFEITO DA LAMININA POLIMERIZADA EM MATRIZES DE
DIFERENTES pHs NA REGENERAÇÃO DE NERVO CIÁTICO DE
CAMUNDONGO APÓS TRANSECÇÃO E TUBULIZAÇÃO COM
TUBO DE COLÁGENO.**

Renata Gorham Pitanga

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, desenvolvida no Laboratório de Neurohistologia e Ultra-estrutura do Sistema Nervoso no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Orientadora: Prof^ª. Ana Maria Blanco Martinez

**Rio de Janeiro
2007**

EFEITO DA LAMININA POLIMERIZADA EM MATRIZES DE DIFERENTES pHs NA REGENERAÇÃO DE NERVO CIÁTICO DE CAMUNDONGO APÓS TRANSECÇÃO E TUBULIZAÇÃO COM TUBO DE COLÁGENO.

Renata Gorham Pitanga

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.

Aprovada em _____ de _____ de 2007 pela banca examinadora.

Prof^a Dra. Ana Maria Blanco Martinez – Orientadora

Prof^a Dra. Nádia Campos de Oliveira Miguel - Revisora e Suplente

Prof^a Christina Takyia - Examinadora

Prof^a Tatiana Coelho-Sampaio – Examinadora

Prof^a Jan Nora Hokoç - Examinadora

FICHA CATALOGRÁFICA

Gorham Pitanga, Renata

Efeito da laminina polimerizada em matrizes de diferentes pHs na regeneração de nervo ciático de camundongo após transecção e tubulização com tubo de colágeno/ Renata Gorham Pitanga, Rio de Janeiro: UFRJ/PCM, 2007.

Xvi/ 96

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas – PCM, 2007.

1. Regeneração Nervosa. 2. Nervo Ciático. 3. Ultraestrutura. 4. Tubo de colágeno. 5. Laminina. 6. Laminina ácida. 7. Laminina Neutra. 8. Recuperação motora. 9. Neurobiologia. Tese (Mestr. – UFRJ/PCM). I. Título

O encoberto

Triste de quem vive em casa,
Contente com o seu lar,
Sem que um sonho, no erguer de asa
Faça até mais rubra a brasa
Da lareira a abandonar!

Triste de quem é feliz!
Vive porque a vida dura.
Nada na alma lhe diz
Mais que a lição da raiz
Ter por vida a sepultura.

Eras sobre eras se somem
No tempo que em eras vem.
Ser descontente é ser homem.
Que as forças cegas se domem
Pela visão que a alma tem!

E assim, passados os quatro
Tempos do ser que sonhou,
A terra será teatro
Do dia claro, que no atro
Da erma noite começou.

Fernando Pessoa

Soneto de Fidelidade

De tudo, ao meu amor serei atento
Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto
Que mesmo em face do maior encanto
Dele se encante mais meu pensamento.

Quero vivê-lo em cada vão momento
E em louvor hei de espalhar meu canto
E rir meu riso e derramar meu pranto
Ao seu pesar ou seu contentamento.

E assim, quando mais tarde me procure
Quem sabe a morte, angústia de quem vive
Quem sabe a solidão, fim de quem ama

Eu possa me dizer do amor (que tive):
Que não seja imortal, posto que é chama
Mas que seja infinito enquanto dure.

Vinicius de Moraes

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste mestrado me traz muitas emoções. Primeiramente pelo sonho realizado, pela experiência engrandecedora de conviver e aprender pessoas de um meio que para mim era distante, o meio acadêmico. Além disso, as muitas dificuldades que se apresentaram ao longo da jornada tornam essa conquista ainda maior.

O aprendizado foi enorme, com relação à ciência, relações humanas, e principalmente, foi uma experiência única para o meu auto-conhecimento.

Com isso, tenho muito à agradecer, aos que me ajudaram diretamente, aos que me acolheram, aos que ao não me acolherem me ajudaram a crescer, e a todos que, mesmo que indiretamente, participaram dessa experiência, e com isso a enriqueceram de alguma forma.

À professora Dra. Ana Maria Blanco Martinez, minha orientadora, que, à sua maneira, me mostrou caminhos que eu não conhecia, me ajudando a ser hoje uma pessoa melhor.

À professora Dra. Nádia Miguel, revisora deste trabalho, obrigada pelo acolhimento, compreensão, e por ter sempre uma palavra amigável, sua ajuda foi essencial.

À Fatima Rosalina, que tem sido minha orientadora na vida. Você sempre foi, e sempre será um exemplo para mim. Esse mestrado jamais teria acontecido sem você! Obrigada por tudo! Você faz parte do que sou hoje!

À Flavia, a Flavinha, sempre prestativa e carinhosa! Obrigada pela ajuda!
Sei que nossos caminhos não se separam aqui! Boa sorte!

Ao Bruno, que à sua forma também colaborou, ajudando a tornar esse sonho possível.

À Suellen, que com sua sabedoria sempre me trouxe paz e confiança!
Obrigada pelo apoio!

À Madalena, sempre prestativa e disponível. Obrigada pela ajuda e apoio!
Você foi fundamental para esse trabalho!

À todos os colaboradores deste trabalho, que de alguma forma o tornaram possível.

À todos os amigos que encontrei nesse laboratório, afinal, nem tudo foi tão difícil! Inês, Deise, Clynton, Renata Nascimento, Michel, Abrahão (que mesmo de longe ajudou bastante), Paula, Jorge, Fernanda, entre tantas outras pessoas que me encontraram ao longo dessa jornada. Muito obrigada a todos, por tornarem esse caminho mais fácil.

Ao Rony e sua família, que na reta final foram essenciais, dando força, apoio e compreensão! Obrigada pela ajuda e pelo carinho!

À minha família, que mesmo sentindo com o afastamento, sempre me trouxe força, estímulo e amor!

À minha mãe, obrigada pelo seu amor e compreensão!

Às minhas amigas, que acompanharam minha luta!

Aos meus pacientes, que compreenderam as ausências.

E principalmente à Deus, que me deu força, saúde e vida para aprender com tudo e com todos nessa empreitada!

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA – Análise de variância paramétrica

BDNF – Fator neurotrófico derivado de cérebro

CNTF – Fator de crescimento ciliar

CA – Agente de ligação cruzada

ETS – Experimental Toe Spread (Espalhamento de pegada experimental)

EPL – Experimental Print Length (Comprimento de pegada experimental)

GAGs - Glicosaminoglicanas

GAP-43 – Proteína associada ao crescimento – 43

GMF-B – Fator *B* de maturaco glial

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia ptica

N-CAM – Molécula de adesão celular neuronal

NGF – Fator de crescimento neuronal

NF-H – Neurofilamento de cadeia pesada

NF-L – Neurofilamento de cadeia leve

NF-M – Neurofilamento de cadeia m

NPL – Normal Print Length (Comprimento de Pegada Normal)

NTS – Normal Toe Spread (Espalhamento de pegada normal)

PL – Comprimento de pegada

SFI – Sciatic Functional Index (Índice de função do ciático)

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TS – Espalhamento de pegada

TC – Tubo de colágeno

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema demonstrativo do nervo periférico.....	4
Figura 2 – Esquema representativo de fibra nervosa.....	6
Figura 3 – Esquema de regeneração de um motoneurônio após lesão axonal.....	13
Figura 4 - Esquema de matriz extracelular.....	21
Figura 5 - Esquema representativo de lâmina basal e seus principais elementos constitutivos.....	23
Figura 6 - Esquema representativo da estrutura da laminina.....	26
Figura 7 - Esquema representativo da interação entre lamininas e integrinas.....	28
Figura 8 - Esquema representativo da tubulização do nervo periférico.....	34
Figura 9 - Fotografia da visão superior do aparato utilizado das pegadas e realização do teste funcional.....	40
Figura 10 - Eletromicrografia de varredura do tubo de colágeno não implantado.....	42
Figura 11 - Eletromicrografia de varredura do tubo de colágeno não implantado.....	43
Figura 12 - Eletromicrografia de varredura do tubo de colágeno não implantado.....	44

Figura 13 – Análise qualitativa comparativa entre cortes transversais de nervo ciático de camundongo 6 semanas após cirurgia.....	47
Figura 14 – Eletromicrografia do corte transversal de nervo ciático seis semanas após cirurgia do grupo laminina ácida.....	50
Figura 15 – Eletromicrografia de corte transversal do nervo ciático seis semanas após cirurgia do grupo laminina neutra.....	51
Figura 16 – Eletromicrografia de corte transversal do nervo ciático seis semanas após cirurgia do grupo tampão ácido.....	52
Figura 17 – Eletromicrografia de corte transversal do nervo ciático seis semanas após cirurgia do grupo tubo puro.....	53
Figura 18 - Imagem das pegadas de camundongo seis semanas após cirurgia, obtidas através do teste funcional.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desenvolvimento do conceito de utilização de próteses tubulares na regeneração do nervo periférico.....	19
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise quantitativa das áreas da fibra nervosa dos quatro grupos.....56

Gráfico 2 – Análise quantitativa das áreas dos axônios dos quatro grupos.....57

Gráfico 3 – Análise quantitativa das áreas de bainha de mielina dos quatro grupos.....58

Gráfico 4 – Análise quantitativa do G Ratio de cada grupo.....59

Gráfico 5 – Histograma separando G Ratio dos diferentes grupos.....60

Gráfico 6 - Análise quantitativa do número de axônios mielínicos encontrados em cada grupo.....61

Gráfico 7 - quantitativa da diferença entre os IFC dos diferentes grupos ao longo das seis semanas de regeneração após a cirurgia.....64

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	iX
Lista de Figuras.....	Xi
Lista de Tabelas.....	Xii
Lista de gráficos.....	Xiv
Sumário.....	Xv
1 –	
Introdução.....	1
1.1 - Sistema Nervoso.....	1
1.2 – Sistema Nervoso Periférico.....	2
1.3 – Os Nervos Periféricos.....	3
1.4 – Degeneração e regeneração do sistema nervoso periférico.....	9
1.5 - Próteses tubulares.....	17
1.6 - Matriz Extracelular.....	21
1.6.1 - Laminina.....	24
2	-
Objetivos.....	30
2.1 - Objetivos Gerais.....	30
2.2 - Objetivos Específicos.....	30
3– Materiais e Métodos.....	31
3.1 - Animais.....	31

3.2 - Substância para preenchimento do intervalo do tubo de olágeno.....	31
3.3 - Tubo de olágeno.....	32
3.4 - Procedimento irúrgico.....	33
3.5 - Perfusão.....	34
3.6 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
3.7 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	36
3.8 - Morfometria.....	38
3.9 - Avaliação Funcional.....	39
4 – Resultados.....	41
4.1 - Observações Gerais.....	41
4.2 - Análise do tubo de colágeno – Microscopia Eletrônica de Varredura(MEV).....	41
4.3 - Análise qualitativa do nervo ciático 6 semanas após cirurgia - (MO) e (MET)....	45
4.3.1 - Análise histológica de nervo ciático seis semanas após cirurgia(MO).....	45
4.3.2 - Análise ultraestrutural de nervo ciático seis semanas após cirurgia (MET)..	49
4.4 - Análise quantitativa do nervo ciático 6 semanas após a cirurgia – MO.....	54
4.5 - Análise funcional.....	62
5 – Discussão.....	65
6 – Conclusões.....	71
7 – Referências Bibliográficas.....	72

1. INTRODUÇÃO:

1.1 Sistema Nervoso

O sistema nervoso atua em todo o corpo, e suas estruturas estão em íntimo contato do ponto de vista morfológico e funcional. Dessa forma, sua divisão em partes tem significado didático, podendo ser feita com base em critérios anatômicos, embriológicos e funcionais. Adotamos divisão anatômica, feita de acordo com sua divisão topográfica pelo corpo. Nessa classificação, temos o Sistema Nervoso Central (SNC), compreendido por encéfalo e medula espinhal, e o Sistema Nervoso Periférico (SNP) compreendido por nervos, gânglios periféricos e terminações nervosas que conectam os gânglios com o SNC e os receptores e efetores do corpo (Kierszenbaum, Histologia e Biologia Celular).

No SNC os neurônios formam agregados chamados núcleos. Entre os corpos celulares desses neurônios pode ser encontrada uma área chamada neuropilo, com dendritos muito próximos, ramificações axonais com abundância de sinapses e células gliais. Os grupos de neurônios dispostos em camada formam uma lâmina (córtex cerebral), os grupos dispostos longitudinalmente formam colunas. Os feixes de axônios do SNC são chamados de tractos, fascículos ou lemniscos (Kierszenbaum, Histologia e Biologia Celular).

No SNP, um grupo de neurônios forma um gânglio, que pode ser sensitivo (gânglio da raiz dorsal e gânglio do trigêmeo), ou motor (gânglio visceromotor ou autônomo). Os axônios que se originam nos gânglios se organizam em nervos, ramos ou raízes (Kierszenbaum, Histologia e Biologia Celular).

1.2 Sistema Nervoso Periférico

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) encontra-se distribuído por todo o corpo, fora do invólucro ósseo, onde se encontra o Sistema Nervoso Central – SNC. Os nervos periféricos são os nervos cranianos e espinhais.

O Sistema Nervoso Periférico possui dois tipos de células de sustentação, as células de Schwann (análogas aos oligodendrócitos no SNC) e as células satélites (que circundam os corpos celulares nos gânglios sensitivos e autônomos (Kierszenbaum, Histologia e Biologia Celular).

O SNP pode ser dividido em motor e sensorial. Neurônios sensoriais são pseudo unipolares, com um prolongamento para o SNC e outro para a periferia, direcionado ao órgão alvo. Neurônios motores são multipolares, estando seus corpos celulares localizados no corno anterior da medula espinhal e seu prolongamento estendendo-se até o órgão alvo (Junqueira & Carneiro, Histologia Básica).

1.3 Os Nervos Periféricos

Os nervos são feixes de fibras nervosas entremeadas por tecido conjuntivo propriamente dito, que ligam o SNC aos órgãos alvo, podendo ter fibras aferentes (conduzem informações da periferia para o SNC) ou eferentes (conduzem informações do SNC para a periferia). As fibras aferentes são sensoriais e as eferentes são motoras. Nervos cranianos (quando se originam no encéfalo), ou espinhais (quando se originam na medula espinhal). O sistema nervoso autônomo está associado a ambos, porém com uma organização morfofuncional distinta ((Junqueira & Carneiro, Histologia Básica).

O principal componente estrutural do nervo periférico é a fibra nervosa (um axônio com célula de Schwann). Um nervo é constituído por numerosas fibras nervosas mielinizadas e não-mielinizadas entremeadas, agrupadas em fascículos por bainhas de tecido conjuntivo propriamente dito. Os axônios são mielinizados em segmentos (internodos) separados pelos nodos de Ranvier. Uma única célula de Schwann supre a bainha de mielina de cada internodo (<http://www.sistemanervoso.com>, Liga de neurocirurgia).

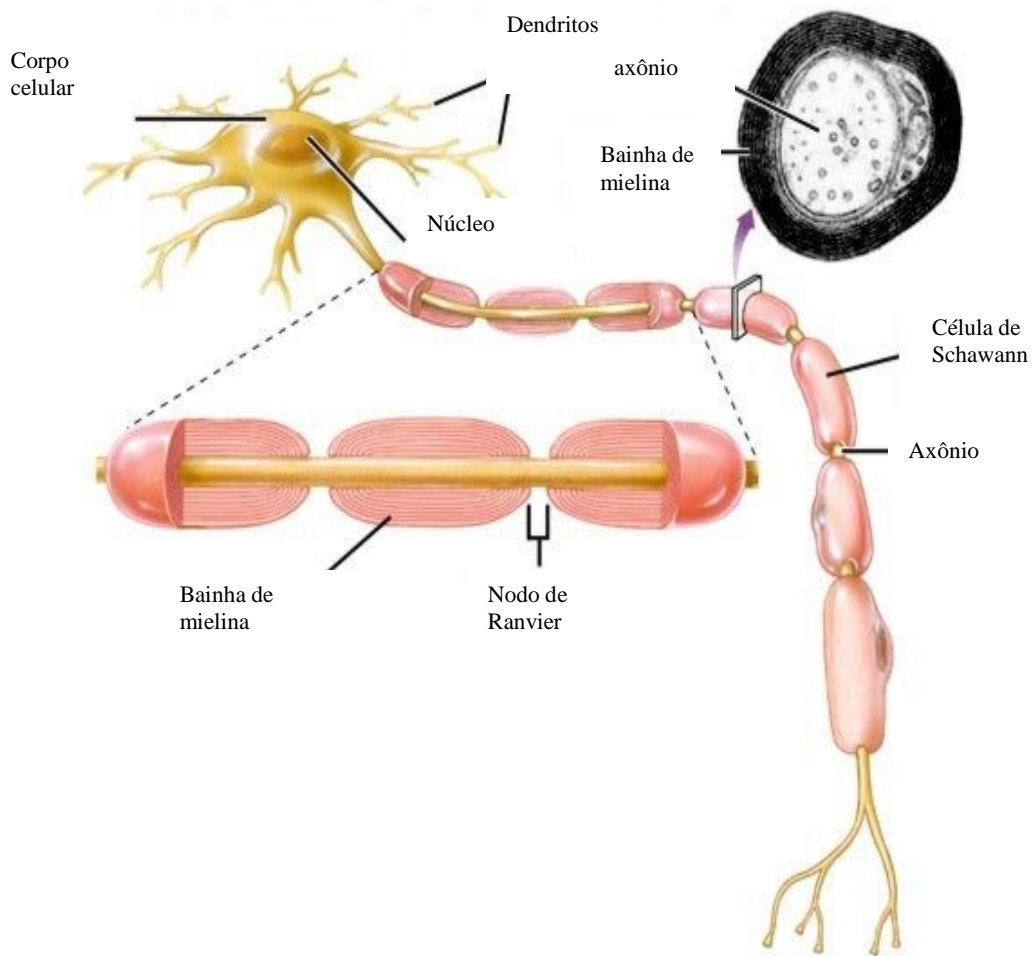


Figura 1: Esquema representativo de fibra nervosa. Reproduzido a partir de www.cmpa.tche.br/educacional/secoes_ensino/site_sec_C/nervoso.ppt

Cada nervo possui três bainhas conjuntivas, como exemplificado na figura 2. O epineuro, que é composto por fibras elásticas e de colágeno, vasos sanguíneos e fibroblastos, envolve todo o nervo e emite septos para o seu interior. O perineuro é formado por fibras colágenas dispersas entre células perineurais, envolve os feixes de fibras nervosas, é considerado o maior sítio de permeabilidade seletiva do nervo periférico, funcionando como uma barreira de difusão formada pelas junções oclusivas presentes entre as células perineurais das camadas internas do perineuro (Olsson e Reese, 1971). O endoneuro envolve cada fibra nervosa individualmente, é formado por tecido conjuntivo propriamente dito frouxo, constituído por pequenas fibrilas colágenas, onde encontramos células de sustentação como fibroblastos, adipócitos, matriz extracelular e elementos vasculares, promovendo força de tensão e proteção para o nervo.

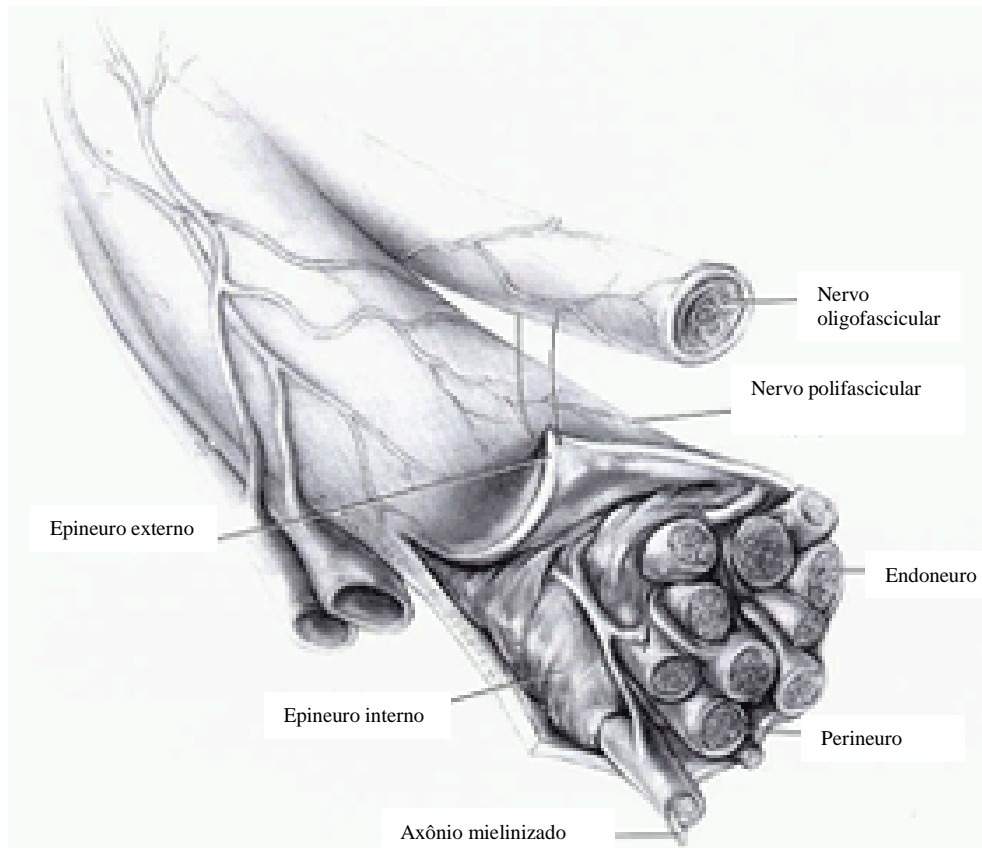


Figura 2: Esquema demonstrativo do nervo periférico com seus envólucros (epineuro, perineuro e endoneuro), seus fascículos e axônios. Reproduzida a partir de www.cndpa.com/images/nerve.gif

O axônio é constituído pelo axoplasma (citoplasma axonal) e axolema (membrana celular axonal), e possui propriedades importantes, como a transmissão de sinais elétricos e químicos, além do transporte de material citoplasmático (transporte axoplasmático).

Além de axônios e tecido conjuntivo propriamente dito, podemos encontrar também no nervo células correspondentes a glia periférica, a célula de Schwann (CS), que possui características comuns com as células satélites que circundam o corpo celular dos neurônios situados nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios autonômicos, como sua origem embrionária e suas características citológicas. Apesar disso se distinguem destas por sua relação espacial com o axônio e associação com a lâmina basal (<http://www.icb.ufmg.br/lpf/material/Como-as-celulas-se-comunicam,Katz.html>).

As células de Schwann maduras são alongadas e estendem-se longitudinalmente ao longo dos axônios, possuem núcleos ovais pálidos com uma distribuição homogênea de heterocromatina. À microscopia eletrônica, as células de Schwann, ao contrário dos fibroblastos e histiócitos endoneurais, têm uma membrana basal, e citoplasma eletrondenso. Com a diferenciação do nervo periférico, projeções da membrana das células de Schwann enrolam-se concentricamente em torno do axônio, dando origem à bainha de mielina, que é composta por lipídios e proteínas, principalmente fosfolipídios, formando assim ao redor do axônio uma capa isolante (<http://www.sistemanervoso.com>, Liga de neurocirurgia).

Ao enrolar-se em torno do axônio, cada célula de Schwann forma um segmento de bainha de mielina medindo aproximadamente 1 mm de comprimento. No intervalo entre os segmentos, o axolema fica exposto, formando uma região conhecida como nodo de Ranvier, onde estão presentes canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+), responsáveis pela despolarização da membrana e conseqüente condução do impulso nervoso. Nesse processo as células de Schwann recebem sinalização dos componentes da matriz extracelular, como

lamininas e colágenos, presentes na lamina basal que circunda os axônios mielinizados no sistema nervoso periférico, para mielinização (Martin e Peles, 2006).

Os internodos (segmentos de mielina) que atuam como isolantes elétricos e aumentam de forma significativa a resistência ao fluxo iônico através das porções recobertas da membrana. Já na região dos nodos de Ranvier, rica em canais de Na⁺, mantém as propriedades elétricas normais que permitem o fluxo iônico dependente de voltagem. Por essa razão, os potenciais de ação não correm de forma igual nos segmentos de mielina e nos nodos, conferindo uma característica de condução saltatória e em consequência, um aumento da velocidade de condução do impulso nervoso (Eftekharpour et al., 2007).

As fibras nervosas podem ser caracterizadas como mielínicas e amielínicas, e estão presentes tanto nos nervos sensoriais como nos motores. (Waxman et al., 1995). A espessura da bainha de mielina é diretamente proporcional à velocidade de condução do impulso nervoso, assim as fibras amielínicas são capazes de propagar o impulso elétrico numa velocidade de 2 a 2,5 m/s, enquanto que nas fibras mielínicas o impulso se propaga numa velocidade de 3 a 150 m/s (Watchmaker e Mackinnon, 1996).

Os nervos periféricos são frequentemente traumatizados, resultando principalmente em esmagamentos ou secções, o que leva à perda ou diminuição da sensibilidade e motricidade do local inervado pelo nervo afetado. Isso se deve principalmente pela distribuição topográfica desses nervos, tornando-os mais vulneráveis às lesões (Refaeian et al., 2001; Aktan et al., 2005).

1.4 Degeneração e Regeneração do Sistema Nervoso Periférico

Embora o Sistema Nervoso Central normalmente não se regenere, nervos periféricos se regeneram espontaneamente após lesão, devido a um microambiente permissivo e à ativação do crescimento e remielinização dos axônios em regeneração pelas células de Schwann. Múltiplos fatores participam na desdiferenciação, proliferação e remielinização das Células de Schwann, como fatores neurotróficos, proteínas da matriz extracelular e hormônios (Chen et al., 2007). Apesar da permissividade do sistema nervoso periférico à regeneração, uma completa recuperação após lesão traumática, com perda de tecido neural, levando a formação de um grande intervalo entre os cotos, ainda não foi alcançada (Lee e Wolfe, 2000; Gordon et al., 2007). Portanto, pesquisas contínuas buscam desvendar mecanismos, técnicas ou fatores que possam ajudar na completa e rápida regeneração do nervo periférico, principalmente em casos de grande perda de tecido neural com formação de grandes intervalos entre os cotos proximal e distal do nervo, levando a uma recuperação funcional efetiva e duradoura, como a utilização de fatores de crescimento e/ou substâncias capazes de facilitar e guiar o crescimento e regeneração do nervo periférico, como por exemplo a laminina (Dodla e Bellankonda., 2008).

No sistema nervoso periférico, a lesão do axônio leva à interrupção na passagem de estímulos, levando ao prejuízo das respostas sensoriais e/ou motoras. Como os neurônios possuem axônios longos, e corpos celulares relativamente pequenos, a maior parte das lesões dos sistemas nervosos central e periférico envolve danos aos axônios. Quando há perda da integridade axonal em função de uma lesão (por esmagamento, isquemia, processo inflamatório ou secção), o axônio é dividido em dois segmentos: o proximal, que

permanece em contato com o corpo celular; e o distal, que perde a ligação com o corpo celular (Fansa e Keilhoff, 2003).

Como a capacidade de síntese protéica encontra-se praticamente restrita ao corpo celular, o segmento distal do axônio tende a ser perdido. Com isso, as células de Schwann que envolvem o segmento distal também são afetadas, a bainha de mielina torna-se fragmentada, e é finalmente removida, junto com os restos axonais, por células fagocitárias. Esse conjunto de mudanças é chamado degeneração Walleriana e foi descrito por Waller em 1850.

O principal evento que envolve a degeneração do coto distal ocorre nas primeiras 24 à 48 horas, e é caracterizado pela degeneração do citoesqueleto e conseqüentemente do axoplasma, que se converte em partículas amorfas. Esta desintegração está ligada ao aumento na concentração de cálcio intracelular, que medeia a ativação de proteases cálcio-dependentes (calpaínas), intrínsecas ao axônio (George et al., 1995; Martinez e Ribeiro, 1998).

A degeneração do axônio está diretamente relacionada com a perda da capacidade de gerar e conduzir um potencial de ação. Logo nas primeiras 24 horas após a lesão é possível constatar a perda da atividade de transmissão neuromuscular (Griffin e Hoffman, 1993). Neste mesmo período, as células de Schwann presentes no segmento distal respondem prontamente sofrendo grandes modificações. Fragmentam a sua bainha de mielina e fagocitam pequenos restos desta mielina, formando gotas de lipídio. Em seguida, as células de Schwann, sem contato com o axônio, proliferam e se alinham no tubo formado pela lâmina basal, formando uma coluna de células (Bandas de Büngner). Esta coluna formada pelas células de Schwann irá posteriormente fornecer a sinalização que

guiará a regeneração da fibra nervosa a partir do coto proximal (George et al., 1995; Silva, 1995; Ramón-Cueto et al., 2000; Euler, 2002).

Durante este processo as células de Schwann diminuem a expressão de proteínas que compõem a mielina, alteram seu fenótipo, e se transformam em células não-mielinizantes com intensa atividade mitótica e produção de fatores de crescimento: fator de crescimento nervoso (NGF), fator de crescimento nervoso derivado do cérebro (BDNF), fator *B* de maturação glial (GMF-*B*) e fator de crescimento ciliar (CNTF) (Stoll e Müller, 1999).

A porção proximal do neurônio também sofre e em alguns casos os neurônios morrem por apoptose, provavelmente pelo corte no suprimento de fatores tróficos provenientes das células-alvo. Mesmo quando isso não ocorre o corpo celular passa por um processo chamado reação cromatolítica, ou cromatólise. Ocorre a fragmentação da substância de Nissl e dispersão dos ribossomas, tornando o pericário mais claro e cheio de vacúolos, o corpo celular fica entumescido, o núcleo move-se para uma posição excêntrica; o axônio se retrai e diminui seu calibre, além disso há mudanças metabólicas, como o aumento na síntese de RNA, mudanças no padrão de genes expressos pelo neurônio, aumento na expressão da proteína associada ao crescimento (GAP-43) e da periferina (filamento intermediário neuronal), que participam do alongamento axonal. Há diminuição da expressão de genes de proteínas de neurofilamento (NF-L, NF-M e NF-H) enquanto que o conteúdo de mRNAs para *B*-tubulina fica aumentado (Griffin e Hoffman 1993).

Com a subsequente recuperação do corpo celular, inicia-se então o processo regenerativo, o qual está associado ao aumento da expressão de novos genes, incluindo Pax-3, c-jun e diminuição da expressão de Krox-20 envolvidos no comportamento das células de Schwann - diferenciação e desdiferenciação - (Stoll e Muller, 1999; Soares et al.,

2001; Navarro et al., 2007), o que levará a uma reorganização de todo o segmento proximal para recompor o axônio lesado (Horner e Gage, 2000). No Sistema Nervoso Periférico (SNP), a reparação nervosa é um processo combinado de alongamento axonal e remielinização pelas células de Schwann (Akassoglou et al., 2003), como pode ser observado na Figura 3.

Na extremidade do segmento proximal forma-se uma intumescência, em função do acúmulo de organelas citoplasmáticas, denominada cone de crescimento, o qual entra pelo tubo formado pelas células de Schwann (Bandas de Büngner), estabelecendo a via que determinará a direção de crescimento do neurônio, de acordo com o microambiente e estruturas do substrato (Brecknell e Fawcett, 1996; Dezawa, 2000). Durante seu crescimento através das bandas de Büngner, o axônio em regeneração faz contato com a célula de Schwann e a lâmina basal. Ocorre também um aumento nos componentes da lâmina basal (laminina e fibronectina) e de moléculas de adesão como N-CAM (molécula de adesão da célula nervosa), L1 (molécula de adesão celular), N-caderina e E-caderina, que servirão de base para o alongamento do cone de crescimento. Esta intensa atividade das células de Schwann é essencial para o sucesso da regeneração axonal (Maggi et al., 2003).

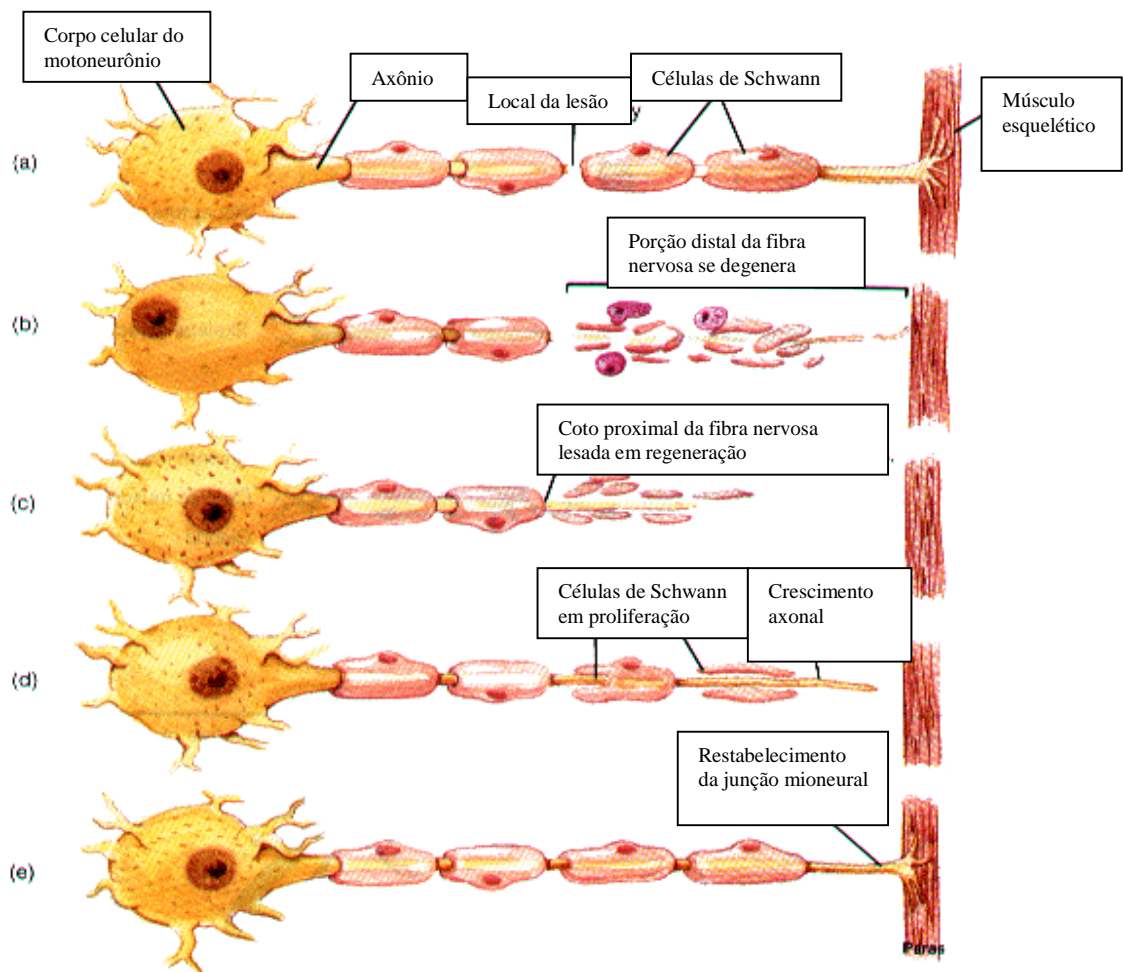


Figura 3: Esquema de regeneração de um motoneurônio após lesão axonal.

Reproduzida a partir de www.medscape.com/viewarticle/48007-4.

Para que a função normal seja restabelecida, é fundamental que os axônios em crescimento atinjam seus alvos com o máximo de especificidade possível. Para isso as sinalizações químicas e os componentes da matriz extracelular são essenciais.

Durante o início do processo de regeneração, uma célula de Schwann envolve vários axônios, posteriormente esta relação se torna de 1:1 nos axônios de maior calibre (uma célula de Schwann para cada axônio), quando se inicia então o processo de remielinização (Fawcett e Keynes, 1990). A maior facilidade de regeneração e recuperação

funcional do SNP em relação ao SNC provavelmente se deve ao microambiente onde ocorreu a lesão, principalmente ao papel desempenhado pelos fatores neurotróficos (NGF e BDNF), pelas células gliais (células de Schwann) e aos componentes da matriz extracelular (laminina e fibronectina) e intracelular (GAP-43). Todos esses fatores são essenciais para atrair e guiar o axônio em crescimento através do segmento distal.

A regeneração do SN requer um complexo encadeamento de etapas: da sobrevivência neural à reinervação do órgão alvo; da remielinização axonal à formação de sinapses funcionais. Nesse sentido várias estratégias de tratamento, atuando nas distintas fases desse processo, têm sido extensivamente pesquisadas mostrando-se promissoras em diferentes modelos experimentais animais e humanos (Horner e Gage, 2000).

Quando houver perda da solução de continuidade do nervo, há várias possibilidades de intervalos e perda tecidual entre os cotos do nervo. Se nenhuma intervenção for feita, a proliferação de colágeno na parte terminal do coto proximal estimulará o aparecimento de tecido cicatricial e neuroma, o que impedirá o crescimento do nervo em regeneração, fazendo, portanto, a fibra nervosa falhar em alcançar a posição normal, com conseqüente perda definitiva da função (Chen, 2002).

Desta maneira, no sentido de prevenir a presença excessiva de tecido conjuntivo propriamente dito, em crescimento entre os cotos do nervo, um segmento de nervo ou de outros materiais deve ser usado para servir de ponte entre os cotos (Wiberg e Terenghi, 2003).

Há dois tipos de materiais, convencionalmente usados, para servir de ponte entre os dois segmentos do nervo que perdeu sua solução de continuidade: os biológicos, e os não biológicos. Os biológicos são: nervo autógeno, com ou sem vasos; músculo esquelético e vaso sanguíneo, dentre outros. Embora estes materiais tenham boa compatibilidade com o

corpo humano, eles apresentam sérios problemas como colapso do tubo, pouca regeneração e proliferação de tecido cicatricial (Chen et al., 2002). Já os materiais não biológicos como tubos de fibras de nylon, de silicone, de poliuretano, etc., dão bom suporte tubular para a regeneração do nervo, mas não são degradáveis ou absorvidos in vivo. Por estas razões, após a regeneração do nervo eles se manterão incitando reações do organismo contra o corpo estranho (Cheng e Chen, 2002). No decorrer da década de 80, estes dois materiais foram largamente utilizados em trabalhos experimentais (Chen, 2002). No entanto, ainda não foi alcançado um resultado satisfatório em relação à efetiva regeneração do nervo periférico (Chen et al., 2006).

Com o desenvolvimento da bioengenharia, a reconstrução nervosa tornou-se novamente foco de muitas pesquisas nos últimos anos. Os resultados obtidos na reparação do nervo periférico, através do uso de tecidos biologicamente construídos, têm se mostrado promissores quanto ao problema da recuperação funcional (Chen et al., 2002).

Em virtude da regeneração do nervo periférico e sua conseqüente recuperação funcional serem como vimos um processo complexo, a utilização de métodos que apenas preencham um intervalo existente, seja ele grande, ou pequeno, e que facilitem a orientação e ligação entre os dois segmentos do nervo, está muito longe de ser satisfatória. O fato de a regeneração nervosa ocorrer de forma lenta coloca em risco todo o processo regenerativo, já que, mesmo na hipótese de uma total recuperação do nervo, a possibilidade de uma atrofia irreversível do órgão alvo (o músculo esquelético, por exemplo), torna impossível a recuperação da função, sendo este um obstáculo importante a ser ultrapassado. Quando a regeneração possibilita o retorno dos neurônios aos seus alvos a tempo de uma recuperação funcional, os axônios regenerados podem formar novas terminações nervosas funcionais.

Os axônios motores, por exemplo, podem formar novas junções neuromusculares, sendo assim a perda funcional causada pela axotomia é reversível, ainda que a regeneração não seja perfeita. Essa regeneração, como observado antes, exige um complexo encadeamento de etapas, desde a sobrevivência neural até a reinervação do órgão alvo; da remielinização do axônio à formação de sinapses funcionais. Dessa forma várias estratégias de tratamento, atuando nas distintas fases da regeneração, têm sido pesquisadas, mostrando-se promissoras em diferentes modelos experimentais animais e humanos (Horner e Gage, 2000).

Estratégias de indução através de fatores neurotróficos (Houweling et al., 1998; Stichel e Muller, 1998), enxertos artificiais (Brook et al., 1994; Weidner et al., 1999), transplante celular (Azizi et al., 1998; Gaiano e Fishell, 1998; McDonald et al., 1999; PereiraLopes et al., 2006) indução através de elementos da matriz extracelular, entre outras, têm sido utilizadas na busca da otimização da regeneração do sistema nervoso periférico, embora nenhuma tenha demonstrado ainda a possibilidade de uma recuperação funcional completa.

1.5 Próteses Tubulares

A interrupção total da continuidade do nervo é o tipo mais grave de lesão do nervo periférico, tornando necessária a intervenção cirúrgica (Lundborg, 1988), que pode ser feita através de sutura direta dos cotos do nervo.

Considerando o fato de que pode haver perda de tecido durante a lesão, muitas vezes se faz necessária a utilização de guias, que coloquem os dois cotos do nervo em contato, preenchendo o espaço deixado pela perda tecidual, e favorecendo a regeneração das fibras nervosas (Chen et al., 2006).

O SNP possui a habilidade de se regenerar, porém essa regeneração depende de muitos fatores, incluindo um substrato que forneça um microambiente favorável à regeneração, além de uma via apropriada capaz de guiar o crescimento das fibras nervosas.

Apesar disso, em algumas situações, com a perda de tecido durante a lesão, ou quando o tecido suturado encontra-se tensionado, a regeneração se torna difícil. Nesses casos se faz necessária a utilização de enxertos autólogos, como o de nervos sensoriais, que têm sido mais amplamente utilizados (Matsumoto et al., 2000; Cuevas et al., 2002; Gordon et al., 2003; Murakami et al., 2003). Porém, essa utilização possui algumas desvantagens, como por exemplo, fonte limitada de matéria prima, proliferação de tecido cicatricial com formação de neuromas, gerando alteração na condução do impulso nervoso, além de envolver mais de um processo cirúrgico, com conseqüente perda de função do nervo doador (Sinis et al., 2007).

O uso de próteses tubulares na regeneração do nervo periférico vem sendo utilizado há mais de um século. Desde então muitos materiais, além de diferentes substâncias para o preenchimento do tubo, têm sido testadas em estudos experimentais com relação a sua

eficácia na regeneração do nervo periférico (Langone et al., 1995; Anselin et al., 1997; Yoshii & Oka, 2001; Ngo et al., 2003).

Há dois tipos de próteses tubulares: as de material biológico, como vasos, segmentos de nervo, à base de colágeno, tecido acelular de vasos ou músculos (Archibald et al., 1991; Fansa et al., 2001; Frerichs et al., 2002; Fansa et al., 2003); ou não biológico como material sintético não reabsorvível, como silicone e polietileno (Madison et al., 1987; Cordeiro et al., 1989; Lundborg et al., 1991).

O uso de tubos biodegradáveis tem sido defendido como a melhor possibilidade, devido ao fato de que podem permanecer *in vivo* até sua degradação, além de favorecer e direcionar o crescimento do nervo em regeneração (Aebischer et al., 1989; Langone et al., 1995; Ceballos et al., 1999; Matsumoto et al., 2000; Wang et al., 2001).

A utilização de tubos confeccionados à base de colágeno tem se mostrado eficaz, pois além de ser um componente de fácil obtenção e manipulação, já foi amplamente utilizado com sucesso *in vivo* na regeneração do nervo periférico (Archibald et al., 1991; Pereira Lopes et al., 2006).

Os colágenos são as mais importantes glicoproteínas da matriz extracelular, sendo os maiores componentes desta, e já são muito utilizados como material biodegradável em vários tipos de próteses cirúrgicas. Além disso, o colágeno contribui para proliferação celular e facilita a regeneração tecidual, é uma substância abundante e de fácil obtenção. Muitos pesquisadores sugeriram que o colágeno tem grandes propriedades biológicas para auxiliar na regeneração do nervo periférico, quando são usados como um condutor para o nervo (Archibald, et al., 1995; Kitahara, et al., 1999). Matsumoto e colaboradores, em 2000, utilizaram tubos de PLGA associado ao colágeno para avaliação de regeneração do

nervo periférico de cães, em “gap” de 80 mm preenchido com laminina, comprovando que esse condutor é eficaz para guiar o crescimento axonal, e facilitar a recuperação funcional.

Por essa razão, em nosso estudo utilizamos tubos biodegradáveis de colágeno como guia ligando os cotos proximal e distal, após transecção de nervo ciático de camundongos.

Na tabela 1 apresentamos alguns marcos no desenvolvimento do conceito de utilização de próteses tubulares para reparo do nervo periférico, ocorridos nas duas últimas décadas.

Prótese (material)	Origem	Sistema	Referência
Polietileno	Não biológico Não degradável	rato	Madison et al., 1987
Colágeno	Biológico	Rato Rato Camundongo	Archibald et al., 1991 Stang et al., 2005 Pereira Lopes et al., 2006
Silicone	Não biológico Não degradável	rato	Lundborg et al., 1991
Poli(organo)fosfazeno (PEIP)	Não biológico Biodegradável	rato	Langone et al., 1995

Poli(DL-lactide-e— caprolactone)	Não biológico Biodegradável	rato	Meek et al., 1996
Ácido poliglicólico- colágeno (PGA)-colágeno	Não biológico Biodegradável	cachorro	Matsumoto et al., 2000
Poli(fosfoester) (PPE)	Não biológico Biodegradável	rato	Wang et al., 2001
Tecido “acelular” de músculos e vasos	Biológico	rato	Fansa et al., 2001
MEC de amnion humano (AMT)	Biológico	rato	Mligiliche et al., 2002
Poli(lactide)-co- glicólico	Não biológico Biodegradável	rato	Schlosshauer et al., 2003
Tubo de colágeno poli(l-lactide-co- glicolico)	Biológico	Coelho	Lee et al., 2006

Tabela 1: Desenvolvimento do conceito de utilização de próteses tubulares na regeneração do nervo periférico.

1.6 Matriz Extracelular

Os tecidos não são constituídos apenas por células. Uma parte substancial do seu volume é de espaço extracelular, que por sua vez, é preenchido por uma rede de macromoléculas que constituem a matriz extracelular (Figura 4).

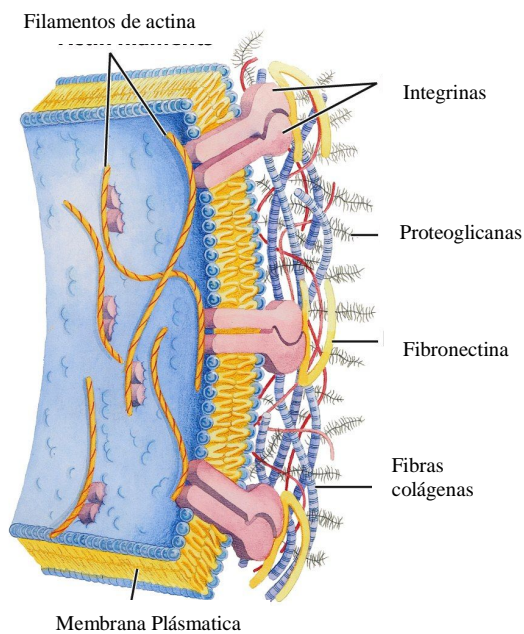


Figura 4: Esquema de matriz extracelular. Reproduzido a partir de www.steve.gb.com...connective_tissue.png.

A matriz extracelular é produzida e orientada pelas próprias células dentro dela. Na maioria dos tecidos conjuntivos propriamente ditos, a matriz extracelular é secretada por células denominadas de fibroblastos. Em certos tipos de tecidos especializados, como por exemplo, a cartilagem e tecido ósseo, as células que produzem a matriz extracelular são

denominadas, respectivamente, de condroblastos e osteoblastos, já no tecido nervoso periférico, esta matriz extracelular é produzida pelas células de Schwann e fibroblastos.

As principais classes de macromoléculas presentes na matriz extracelular são: cadeias de polissacarídeos da classe dos glicosaminoglicanos (**GAGs**), encontrados normalmente ligados a proteínas, formando proteoglicanos; glicoproteínas fibrosas de dois tipos: do sistema colágeno e elástico e glicoproteínas de adesão como fibronectina e laminina. A matriz extracelular do tecido conjuntivo propriamente dito é rica em fibras colágenas, as quais suportam a maioria do estresse mecânico sofrido pelo tecido.

A lâmina basal é uma cobertura flexível e delgada (40-120 nm) de matriz especializada, a qual ancora o epitélio ao conjuntivo propriamente dito, pode estar também envolvendo células musculares, células adiposas e células de Schwann (Figura 6). Influencia na sobrevivência e proliferação celular, determina a polaridade celular, interfere no metabolismo, organiza proteínas adjacentes à membrana plasmática, induz a diferenciação e migração celular. Seus principais constituintes são: colágeno tipo IV, laminina, heparansulfato, entactinas (nidogênio) e proteoglicanos (perlecan) (Colognato e Yurchenco, 2000) (Figura 5).

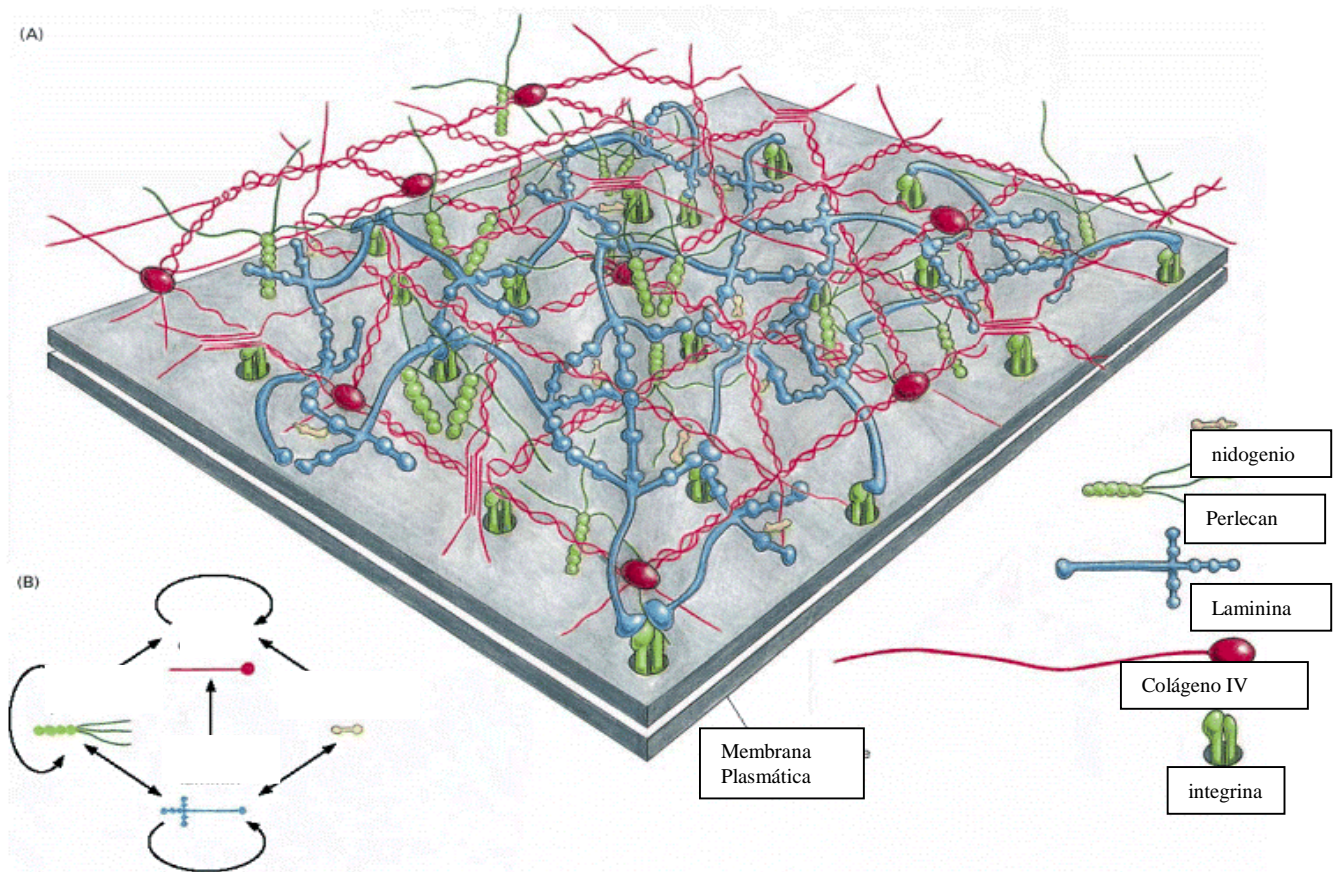


Figura 5: Esquema representativo de lâmina basal e seus principais elementos constitutivos. Reproduzido de www.upei.ca/pathclub/fig13.jpg.

Todos os componentes da lâmina basal são sintetizados pelas células que se relacionam com ela. Estes componentes podem ser encontrados associados entre si, ou com outras

macromoléculas, como fibulina-1, fibronectina e fatores de crescimento (Yurchenco, 1994; Timpl e Brown, 1996; Wu e Couchman, 1997; Groffen et al., 1998; Halfter et al., 1998).

A laminina faz a âncora através das integrinas da célula à lamina basal, onde é a glicoproteína de ligação mais abundante. Possui múltiplos sítios de ligações, o que faz dela o principal elemento de ancoragem entre a célula e a lâmina basal.

1.6.1 Laminina

A laminina é uma glicoproteína ubiquitária de alto peso molecular. Esta glicoproteína, juntamente com fibronectina, colágenos, proteoglicanos, além de outras proteínas, formam a lâmina basal, um tipo de matriz em forma de folha, que se organiza em contato íntimo com uma camada celular e que tipicamente separa um epitélio do tecido conjuntivo subjacente, sendo a laminina o principal componente desta em vertebrados e invertebrados. Dessa forma, a laminina modula várias funções celulares, como adesão celular, proliferação, e migração (Kleiman et al., 1993; Aumailley e Smith, 1998).

No período embrionário a laminina é encontrada tanto nas estruturas que darão origem às lâminas basais do adulto, como em agregados dispersos na matriz extracelular, especialmente no sistema nervoso central (Luckenbill-Edds, 1997).

A laminina tem forma de cruz, e é composta por três diferentes cadeias de polipeptídeos, as cadeias α , β e γ (Figura 7). Até o momento cinco cadeias α , três β e três γ são conhecidas para rato e humano (Miner e Yurchenco, 2004). A primeira isoforma de laminina foi descoberta 28 anos atrás (Timpl et al., 1979). Lamininas também foram caracterizadas em vermes, drosófilas e outros invertebrados, porém como essas espécies

apresentam apenas algumas isoformas de laminina, aplica-se a mesma nomenclatura já existente (Aumailley et al., 2005).

As lamininas formam um polímero em forma de rede, se ligam a outras moléculas de matriz e têm interações celulares únicas ou compartilhadas, mediadas por integrinas, distroglicanos, e outros receptores. Através dessas interações, a laminina contribui criticamente para a diferenciação, forma e movimento celular, manutenção dos fenótipos teciduais e promoção da sobrevivência tecidual (Cognato e Yurchenco, 2000), além de contribuir para a coesão da lâmina basal e a arquitetura molecular resultante desta (Yurchenco, 1994; Yurchenco e O'Rear, 1994; Timpl e Brown, 1996).

A laminina tem sítios de ligação para entactina (nidogênio), proteoglicanos (em particular o heparansulfato), distroglicano- α , e integrinas $\beta 1$ e $\beta 4$, tirosina fosfatase e outras proteínas de membrana plasmática (Cognato e Yurchenco, 2000).

A laminina é uma grande glicoproteína, que modula o comportamento celular, através da promoção adesão, espalhamento e extensão de prolongamentos celulares, em vários tipos de células (Brookey et al., 1993).

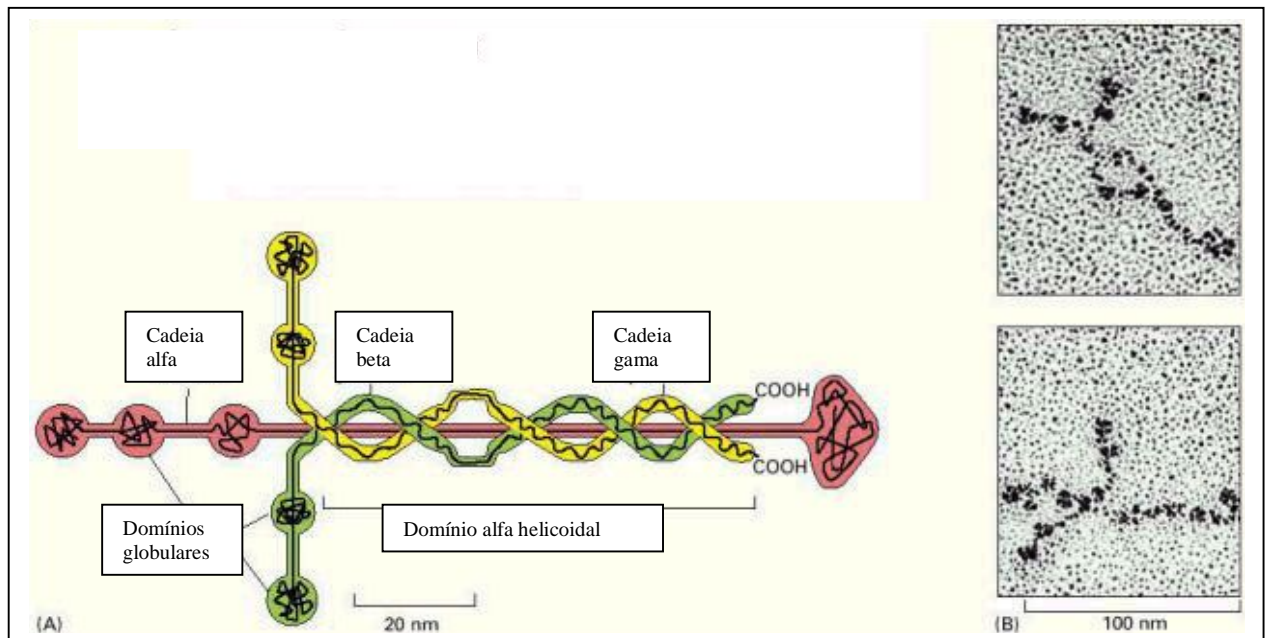


Figura 6: Esquema representativo da estrutura da laminina. Reproduzido a partir do livro *A Biologia Molecular da Célula* – (Alberts; Johnson; Lewis; Raff; Roberts; Walter) – Quarta edição.

A laminina foi encontrada na lâmina basal nas sinapses (Chiu e Sanes, 1984; Hunter et al., 1989), e na matriz extracelular do cérebro embrionário (Luckenbill e Edds, 1997).

As lamininas que contêm a cadeia $\alpha 2$ são adesivas para mioblastos (Schuler e Sorokin, 1995), e as que contêm a cadeia $\beta 2$ regulam o crescimento de axônios motores (Hunter et al., 1989; Poter et al., 1995), assim as cadeias $\alpha 2$ e $\beta 2$ estão envolvidas na miogênese e sinaptogênese respectivamente (Patton et al., 2007).

No sistema nervoso periférico a laminina é encontrada em dois tipos de lâmina basal, a lâmina basal multilamelar perineural, derivada de fibroblastos, e a lâmina basal endoneural, que envolve células de Schwann e axônios (Patton et al., 2007).

A laminina interage com a membrana plasmática através das integrinas (figura 7), as quais são heterodímeros, formados por pelo menos 16 cadeias de α e 8 de β , e são os principais receptores de sinalização das células nervosas, além do distroglican, importante proteína transmembrana receptora para a laminina que se liga também à actina do citoesqueleto. Pelo menos seis diferentes heterodímeros de integrinas se ligam as lamininas. Juntos, a multiplicidade de integrinas, o distroglican e os componentes da matriz extracelular fornecem o potencial para a considerável sutileza e especificidade nas interações dos cones de crescimento com a matriz extracelular.

A morfogênese dos sistemas, em especial do sistema nervoso é fortemente modulada pela laminina. No sistema nervoso, os axônios trafegam por caminhos específicos, por vezes relativamente longos, até encontrar seus alvos. Na extremidade do axônio há uma estrutura capaz de detectar e responder a informações extra-celulares durante o processo de alongação axonal, o cone de crescimento. A trajetória do cone de crescimento é altamente regulada, aparentemente por interações entre as células neuronais, outras células, e com a matriz extracelular (Goodman e Shatz, 1993). Sendo assim o cone de crescimento é guiado por substâncias difusíveis, moléculas de superfície de outras células e moléculas da matriz extracelular, como a laminina. De fato, vários estudos mostram efeitos de glicosaminoglicanos e de proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, tenascina e laminina, no processo de orientação axonal (Bovolenta et al., 1997; Cohen et al., 1987; Faissner-Kruse, 1990; Katoh-Semba et al., 1995; Maeda e Noda, 1996; McLoon et al., 1988; Snow et al., 1990).

O papel da laminina na morfogênese do sistema nervoso encontra suporte em diversas evidências. Assim, o tempo e a localização da laminina no cérebro em desenvolvimento indica um papel funcional na orientação axonal (Hunter et al., 1992; Letourneau et al., 1988; Liesi, 1985). A laminina exógena tem papel de guia para o re-enlongamento dos axônios lesados de nervos periféricos, contribuindo assim para o reparo do sistema nervoso periférico (Wang et al., 1992). Além disso, mutações na cadeia $\alpha 2$ da laminina levam ao aparecimento de distrofia muscular congênita e má formação dos sistemas nervosos periférico e central (Mercuri et al., 1996; Sunada et al., 1995; Van der Knaap et al., 1997).

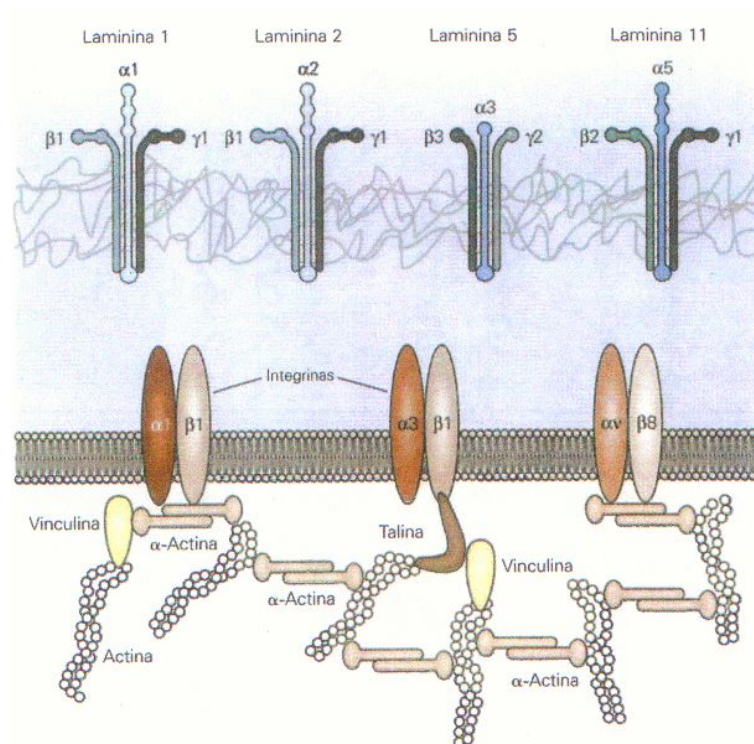


Figura 7: Esquema representativo da interação entre lamininas e integrinas. Reproduzido a partir do livro *The Molecular Biology of The Cell* – (Alberts; Johnson; Lewis; Raff; Roberts; Walter) – Quarta edição.

Tem sido mostrado que a laminina *in vitro* promove o crescimento de neuritos (Manthorpe et al., 1983; Adler et al., 1985; Edgar et al., 1988; Chamak e Prochiantz, 1988), a orientação axonal (Cohen et al., 1987; Mcloon et al., 1988; Hammarback et al., 1988; Turney e Brigman, 2005), a diferenciação (Cohen et al., 1986), a proliferação de linhagens neuronais e de precursores neurais embrionários (Drago et al., 1991, Frade et al., 1996), bem como a diferenciação, adesão e proliferação de células de Schwann, mielinização do axônio e regeneração do nervo periférico (Chen e Strickland, 2003; Vleggeert-Lankamp et al., 2004). Contudo, dentre os efeitos da laminina *in vitro*, o mais bem caracterizado é o de promover a indução do crescimento neurítico (Armstrong et al., 2007; Deister et al., 2007; Evans et al., 2007).

Como mencionamos anteriormente, a laminina tem participação evidente na regeneração do sistema nervoso periférico. Os axônios realizam seu enlogamento na interface entre as células de Schwann e sua respectiva lâmina basal (Martini, 1994). Sabe-se que a laminina tem sua síntese bastante aumentada durante a regeneração no sistema nervoso periférico (Martini, 1994), e se acumula justamente na interface entre o axônio regenerado e a lâmina basal adjacente (Kuecherer-Ehret et al., 1990).

A laminina, quando polimerizada em condições neutra ou ácida, forma matrizes estruturalmente distintas, que irão favorecer a neuritogênese ou a divisão celular através da

ativação de diferentes vias. A laminina polimerizada em pH 4,0 assume uma conformação poligonal, diferente da laminina em pH 7,0, e também é capaz de promover adesão celular, e promover maior neuritogênese no sistema nervoso central (Freire et al., 2002).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a influência da laminina polimerizada em matriz de diferentes pHs, na regeneração do nervo ciático de camundongo, após lesão por transecção e tubulização com tubo de colágeno.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar qualitativamente a regeneração axonal através de microscopia óptica e eletrônica de transmissão, comparando os diferentes tipos de laminina (ácida ou neutra), veículo (pH ácido) e tubo puro.
- Avaliar quantitativamente a regeneração de fibras nervosas comparando os diferentes tipos de laminina (ácida ou neutra), veículo (pH ácido) e tubo puro.
- Avaliar a recuperação da função motora, através de testes funcionais, analisando o índice de função do ciático.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais:

Para este estudo foram utilizados 20 camundongos Balb-C fêmeas, com peso variando de 18 a 25 g e idade de 2 meses. Esses animais foram submetidos à cirurgia para transecção e tubulização do nervo ciático. Todos os procedimentos adotados estão de acordo com as normas do comitê de ética em pesquisa com animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2 Substância para preenchimento do intervalo do tubo de colágeno:

Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com diferentes preenchimentos do tubo: Laminina em pH 4,0; laminina em pH 7,0; tampão (acetato de sódio) em pH 4,0; tubo sem preenchimento por qualquer substância.

A laminina utilizada, foi obtida pelo isolamento de laminina de tumor de “Engelbreth-Holm-Swarm” de camundongo, obtida da GIBCO BRL (Gaithersburg, MD), diluída a uma concentração final de 50ug/mL, em acetato de sódio 20mM pH 4 (para obtenção da laminina em pH 4), ou tris-HCl 20mM pH 7 (para obtenção de laminina em

pH 7), ambos contendo 1mM de CaCl₂, e então polimerizada à 37° C. O tampão utilizado para a avaliação da influência do meio ácido na regeneração foi o acetato de sódio 20mM pH 4.

3.3 Tubo de colágeno:

Os tubos de colágeno utilizados nesse estudo foram confeccionados por Dr. Silvano Lora (Universidade de Padova – Itália), seguindo o seguinte protocolo: o tubo biodegradável foi obtido a partir do peritônio de bezerras de 18 meses de idade, logo após a morte. A camada parietal do peritônio foi removida, lavada em álcool etílico, e seca em temperatura ambiente. A camada parietal foi examinada para a seleção e eliminação de regiões com características morfológicas macroscópicas irregulares. O material remanescente foi comprimido até que a espessura regular e adequada fosse atingida. Depois disso, fragmentos retangulares com uma superfície de 100 mm² foram tratados com enzimas proteolíticas, lavados em água destilada e enrolados ao redor de um bastão de aço inoxidável de 1,0 mm de diâmetro. Este preparado foi imerso em solução aquosa com reagente para ligação cruzada (crosslinking agent – CA) por duas horas. Os tubos foram secos a 37°C, retirados dos bastões de aço, lavados em água para remover totalmente os CA não reagentes, esterilizados por radiação gama e acondicionados em frascos esterilizados. Foram realizados testes de biocompatibilidade e avaliada a efetividade do tubo como guia do nervo (Langone et al., 1997; Lora et al., 1997).

3.4 Procedimento cirúrgico:

Os animais foram anestesiados, com injeção intraperitoneal de pentobarbital à 3% (45 mg/Kg). Foi realizada a tricotomia da pata traseira esquerda, e em seguida foi feita uma incisão na região posterior para expor o nervo ciático, que foi seccionado ao nível do terço superior da coxa. Após a secção do nervo há uma retração do tecido seccionado, que é reduzida a um intervalo de 3 mm, um tubo de colágeno medindo 6 mm de comprimento foi utilizado para ligar o coto proximal ao coto distal, ocorrendo assim a tubulização (Figura 8). Os cotos foram inseridos no interior do tubo, 1,5 mm de cada lado, e o epineuro foi suturado a este com monofilamento de nylon 10.0. Entre os cotos do nervo, no interior do tubo, permaneceu um espaço de 3 mm, relativo ao espaço da retração do tecido nervoso seccionado, formando o intervalo entre os cotos que será analisado posteriormente com relação à regeneração. O tubo que é suturado aos cotos permanece a noite anterior ao procedimento cirúrgico imerso na substância que será utilizada, para absorver totalmente a substância e ter seu interior totalmente preenchido por esta, assim cada tubo já vem preenchido com a substância de cada grupo, ou seja, 5 tubos com laminina ácida, cinco tubos com laminina neutra, cinco tubos com tampão ácido e cinco tubos sem preenchimento, apenas hidratados com água destilada. Foi utilizado um “n” de 5 animais para cada grupo.

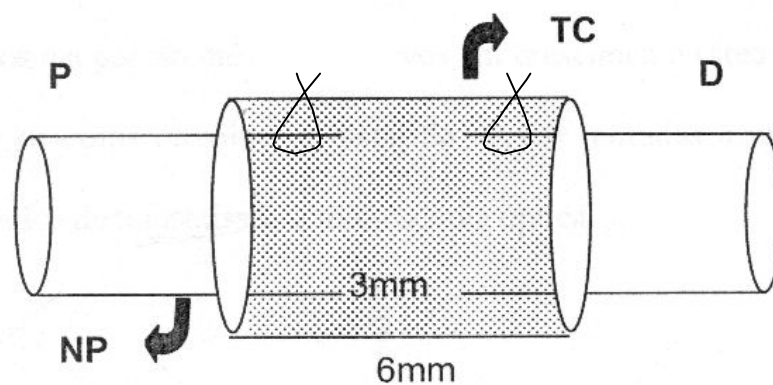


Figura 8: Esquema representativo da tubulização do nervo periférico.

Legenda: Os cotos proximal (P) e distal (D) do nervo periférico (NP), foram inseridos 1,5 mm de cada lado do tubo de colágeno (TC), com o respectivo preenchimento de cada grupo no interior do gap de 3,0 mm.

3.5 Perfusão:

Após uma sobrevivência de seis semanas, os camundongos, sob anestesia, foram operados novamente para a realização da perfusão por via intracardíaca. O procedimento consiste em abrir a caixa torácica dos animais, a partir do processo xifóide, a fim de expor o coração. Um escalpe é inserido no ventrículo esquerdo para a passagem de 50-100 mL de solução fixadora contendo aldeídos (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M- pH 7,4). Concomitante ao início do fluxo da solução fixadora, realiza-se uma pequena incisão no átrio direito para permitir o escoamento do sangue e da solução fixadora da corrente circulatória do animal. Assim ao circular por entre os tecidos imediatamente após a morte do animal, a solução fixadora promove a fixação das estruturas *in situ*. O procedimento termina quando o animal fica rígido, os órgãos pálidos e livres de sangue.

Ao final da perfusão, os animais foram dissecados, os nervos ciático esquerdos novamente expostos e a porção média dos nervos em crescimento (área correspondente ao intervalo entre os cotos proximal e distal do nervo) retirada e processada para microscopia eletrônica de transmissão.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os tubos de colágeno virgem foram fixados em glutaraldeído a 3% e paraformaldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2), pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% por duas horas, lavados e desidratados em séries de etanol. As amostras foram secas no ponto crítico (CPD 030, Balzers Instruments,

Liechtenstein) e metalizadas em ouro (FL- 9496 Balzers Union Coater). As micrografias eletrônicas de varredura foram obtidas com microscópio de varredura JEOL JSM-5310.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET):

Primeiro dia:

- Após a fixação por perfusão, os nervos foram imersos em solução fixadora contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) – 2 horas.
- Lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH7,4) – 3x5 minutos cada.
- Pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% + ferricianeto de potássio a 0,8% + cloreto de cálcio 50nM em tampão cacodilato 0,1 M – 90 min.
- Lavagem em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) – 3x5 minutos cada.
- Solução aquosa de acetato de uranila a 1% na ausência de luz, durante a noite.

Segundo dia:

- Lavagem em água destilada.
- Desidratação em concentrações crescentes de acetona a 30%, 50%, 70%, 80%, 90%- 2x7 min cada e a 100% - 2x5 min cada.

- Infiltração em mistura 1:1 de acetona 100% e resina Poly/Bed 812 (Polysciences, inc., Washington, Pa) – durante a noite no agitador.

Terceiro dia:

- Infiltração em resina pura – 8 à 12 horas.
- Colocação em moldes flexíveis para emblocar e orientar os cortes, utilizando resina pura.
- Polimerização a 60°C – 48 horas.

Ultramicrotomia e contrastação

Trimagem

Após 48 horas, os blocos foram retirados da estufa e com auxílio de uma lâmina de aço, foram aparados no próprio ultramicrótomo. A confecção do trapézio em torno do material foi realizada manualmente.

Ultramicrotomia

Após a trimagem, através de ultramicrotomia, com faca de vidro, foram obtidos cortes semifinos de 500 nm (verde e rosa), corados com azul de toluidina, para então serem observados ao microscópio óptico. Em seguida, com faca de diamante, cortes ultra-finos de 80-60 nm (dourado/prateado) foram obtidos para observação ao microscópio eletrônico. Estes cortes foram colhidos, com o auxílio de uma pinça fina, em grades de cobre 300 mesh previamente lavadas com ácido nítrico a 5%, água destilada, e secas com papel de filtro.

Contrastação

Após serem colhidos, os cortes ultra-finos foram contrastados em acetato de uranila a 5% por trinta minutos, na ausência de luz. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, e contrastados em citrato de chumbo a 1%, por dez minutos. Para evitar que o chumbo se precipite ao entrar em contato com o gás carbônico, devemos realizar este procedimento em local contendo hidróxido de sódio 1M.

Novamente as grades foram lavadas em água destilada, secas em papel de filtro, e devidamente armazenadas. Os cortes ultra-finos foram observados e fotografados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM -900) para avaliação qualitativa da regeneração das fibras nervosas.

3.8 Morfometria

A morfometria foi feita utilizando cortes semi-finos e microscopia óptica. As imagens dos cortes foram obtidas com um microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus em um aumento de 100X utilizando o software Axiovision Rel. 4.5 do mesmo fabricante. Para cada nervo foi selecionado um corte que não apresentasse falha, dentes ou partes amassadas e que estivesse corado de maneira homogênea. Foi obedecido o mesmo critério de aquisição de imagens para todos os cortes, tais como tempo de exposição e condições de brilho e contraste. Cinco campos diferentes de cada nervo foram fotografados em um aumento de 100 vezes. As fibras mielinizadas de cada imagem foram contadas e as respectivas áreas de fibra e do axônio medidas. Com esses dados calculamos a área da mielina e o g-ratio (área do axônio / área da fibra). Os resultados destas quantificações

foram estatisticamente analisados pelo programa Prism (Grapp Pad Inc.) e utilizado o pós teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$.

3.9 Avaliação funcional

Na segunda, na quarta e na sexta semanas após a cirurgia todos os animais foram submetidos a testes funcionais para a avaliação da marcha, baseado no protocolo descrito por Inerra e colaboradores (1998). Para obtenção das pegadas, os animais têm suas patas traseiras pintadas com tinta nanquim preta e deslocam-se livremente ao longo de um corredor de madeira medindo 45 x 6,5 cm, sobre papel branco (Canson 140g/m²), como mostrado na figura 9. As pegadas traseiras foram analisadas considerando-se a distância entre o terceiro dedo e a região posterior do calcanhar – comprimento de pegada (PL – print length), e a distância entre o primeiro e o quinto dedos (Toe spread - TS), para a obtenção do índice de função do ciático (IFC). As medidas foram realizadas em animais normais e nos animais operados. Para comparação das diferenças entre os grupos utilizamos a análise paramétrica (ANOVA) seguindo do pós-teste de Kruskal-Wallis para comparação intragrupo das medidas realizadas. Valores para $p = 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.



Figura 9: Fotografia da visão superior do aparato utilizado para obtenção das pegadas e realização do teste funcional. As patas traseiras do animal são pintadas e ele se desloca livremente por um corredor de madeira, sobre papel branco apropriado, deixando impressas suas pegadas. Podemos observar também na figura a impressão das pegadas da pata direita, não lesionada (seta) e da pata esquerda, lesionada (seta cheia), deixando evidente a diferença na mobilidade e distribuição de peso entre elas.

4. Resultados

4.1 Observações gerais

Dos vinte animais utilizados neste estudo nenhum apresentou qualquer tipo de complicação cirúrgica no período de sobrevivência. Todos apresentaram boa cicatrização e não foi constatado o fenômeno de autotomia. O retorno da função motora ficou caracterizado pela habilidade de suporte de peso na pata afetada durante o teste funcional de marcha.

4.2. Análise do tubo de colágeno – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise do tubo de colágeno utilizamos a microscopia eletrônica de varredura, demonstrando a partir desta a aparência geral do tubo e a disposição de suas fibras. Na figura 10 observamos a estrutura do tubo em pequeno aumento, demonstrando seu aspecto geral. Na figura 11 podemos observar em maior aumento a superfície externa do tubo, exibindo aspecto em rede (detalhe em aumento maior na 11), além da composição das paredes em camadas paralelas de fibras colágenas muito bem organizadas. Na figura 12 fica evidenciada a disposição das fibras colágenas em alinhamento longitudinal na parede interna do tubo, demonstrando assim o aspecto da parede do tubo em sua face interna.

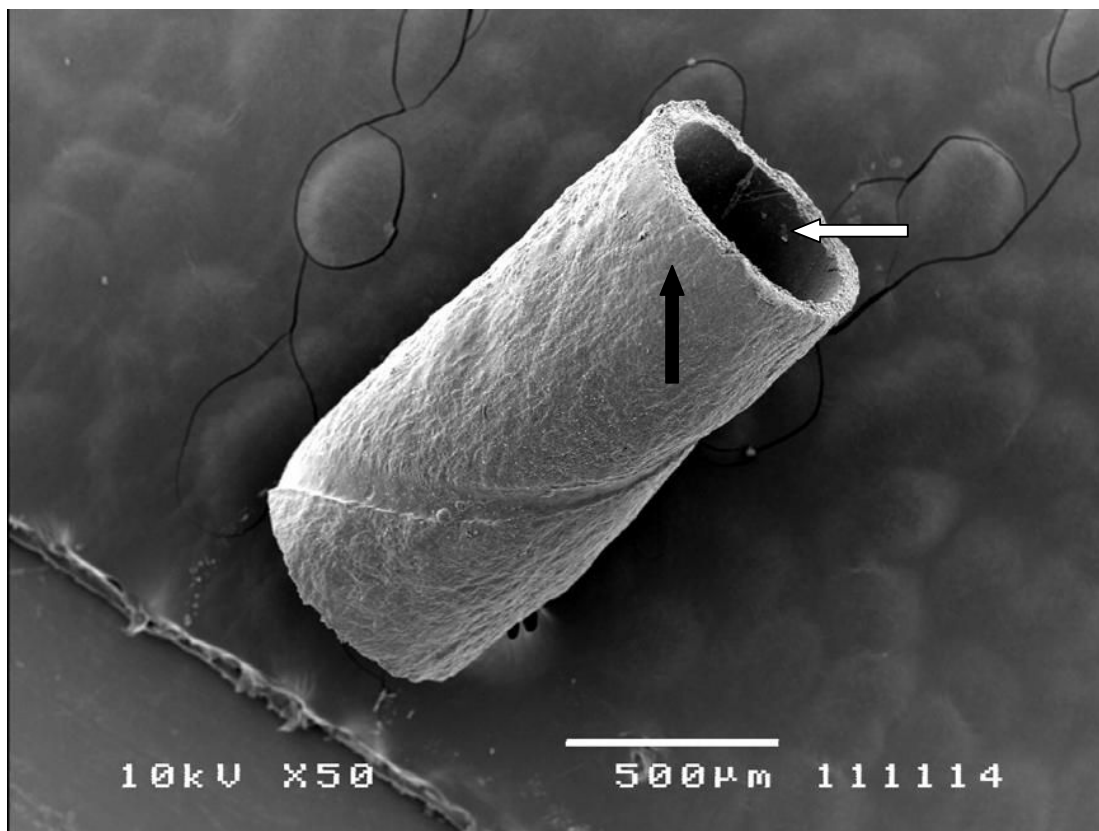


Figura 10: Eletromicrografia de varredura do tubo de colágeno não implantado. Aparência do tubo de colágeno vazio mostrando a superfície externa (seta preta) e interna (seta branca) da parede do tubo.

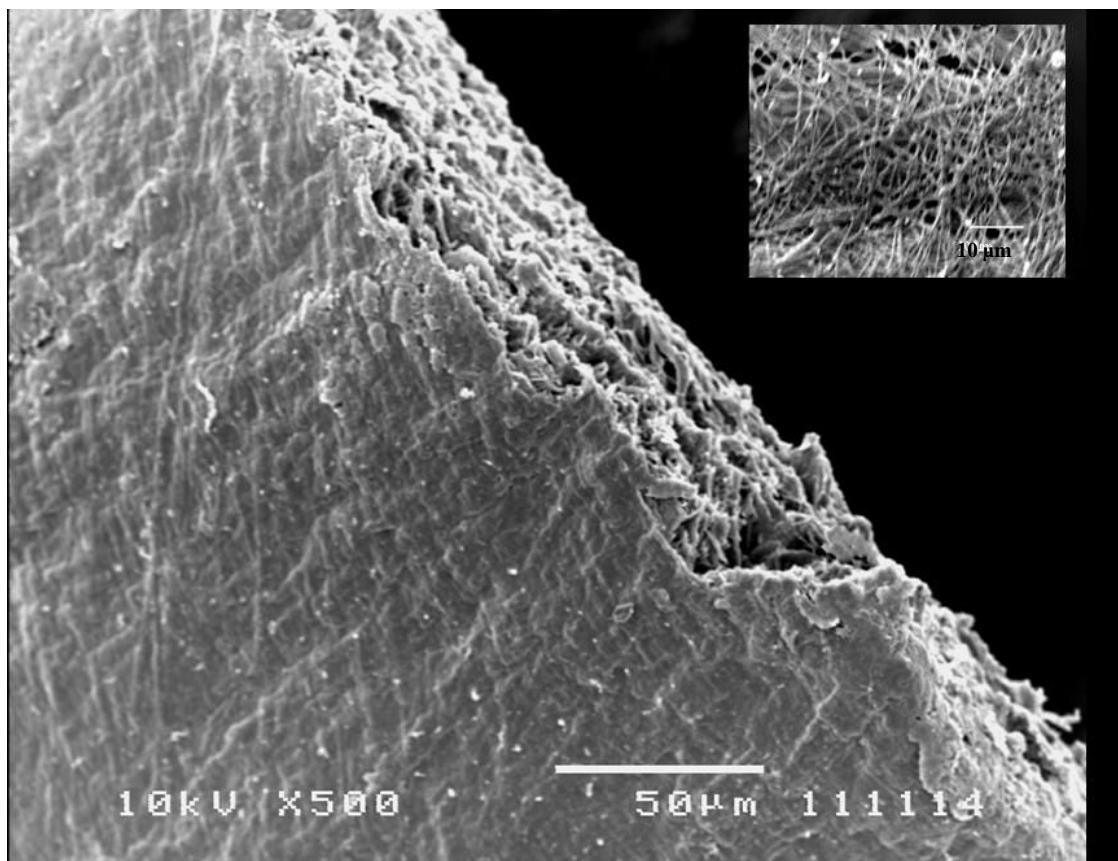


Figura 11: Eletromicrografia de varredura do tubo de colágeno não implantado. Superfície externa da parede do tubo exibindo um aspecto de rede, visualizado em maior aumento no detalhe da figura.

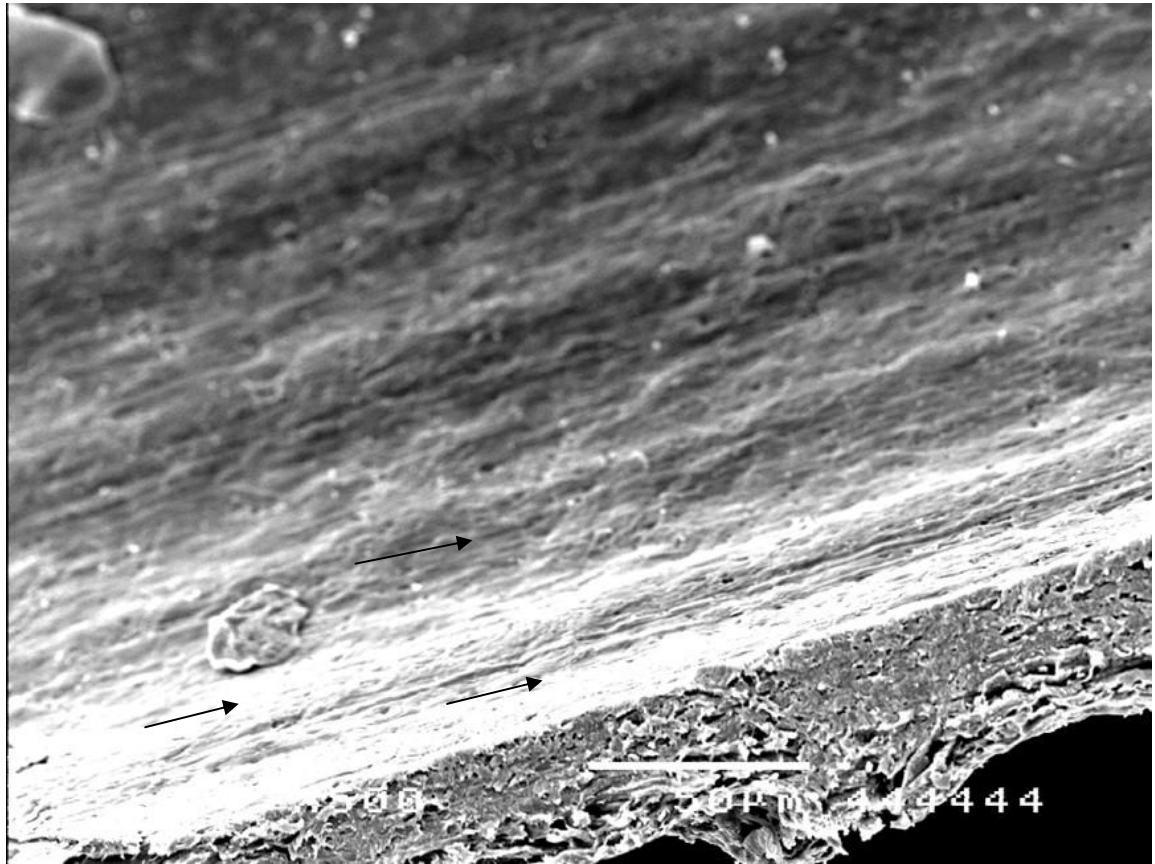


Figura 12: Eletromicrografia de varredura do tubo de colágeno não implantado. Superfície interna da parede do tubo, onde se pode observar um alinhamento longitudinal das fibras de colágeno(setas).

4.3 Análise qualitativa do nervo ciático 6 semanas após cirurgia - Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

4.3.1 Análise histológica de nervo ciático seis semanas após cirurgia – MO

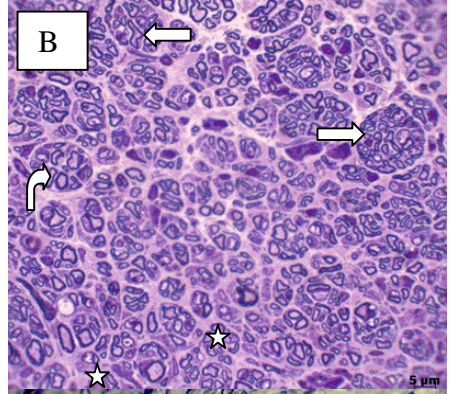
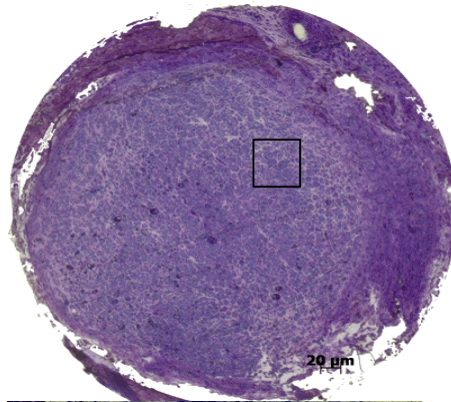
Todos os animais estudados tiveram os seus nervos ciáticos esquerdos retirados. Após a perfusão, os nervos foram dissecados para a remoção dos tecidos que os envolviam e o segmento equivalente à porção média do intervalo deixado entre os cotos proximal e distal (área correspondente aos nervos em regeneração) foram retirados para as análises morfológicas e morfométricas. Assim analisamos vinte segmentos de nervos, 5 referentes ao grupo laminina ácida, 5 relativos ao grupo laminina neutra, 5 referentes ao grupo tampão ácido e 5 referentes ao grupo tubo puro.

Através da análise dos cortes semifinos podemos observar o aspecto geral da organização tecidual em cada nervo regenerado de cada grupo. Na figura 13 observamos fotomicrografias de cortes transversais da região central do tubo, com seis semanas de regeneração do nervo. No grupo laminina ácida (A, B), os cortes revelam uma regeneração extensa e bem organizada, com inúmeras ilhotas regenerativas, boa distribuição do tecido conjuntivo, fascículos organizados e bem delimitados, melhor organização do colágeno da matriz extracelular e o nervo calibroso ocupando praticamente toda a área interna do tubo de colágeno, evidenciando um tecido morfológicamente mais organizado. No grupo de laminina neutra (C, D), podemos observar o nervo também calibroso, porém com aspecto menos organizado de fibras em regeneração e aparente maior preenchimento de tecido conjuntivo entre as ilhotas regenerativas. No grupo tampão ácido (E, F), os cortes

apresentam nervo em regeneração, porém com distribuição menos homogênea de tecido conjuntivo. No grupo tubo puro (G, H), constatamos um nervo menos calibroso dentro do tubo, com formação de tecido regenerativo consideravelmente menos organizado, com distribuição heterogênea de tecido conjuntivo e ilhotas regenerativas dispersas, evidenciando nesse grupo a pior organização tecidual dentre todos os grupos analisados.

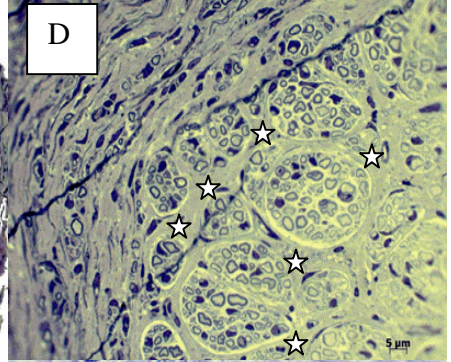
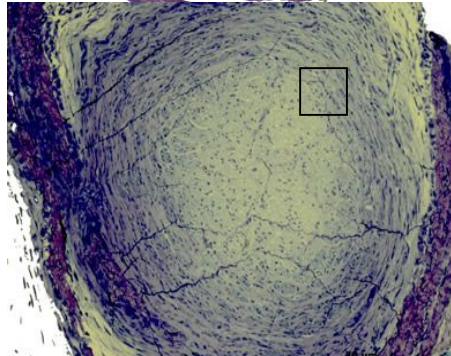
Laminina ácida

A



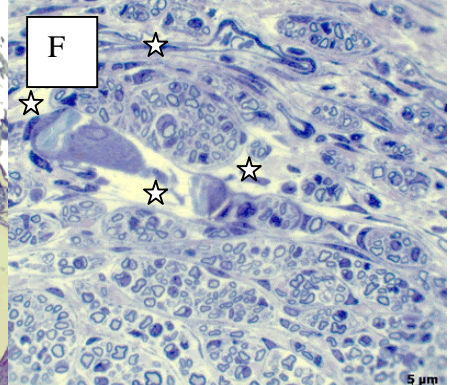
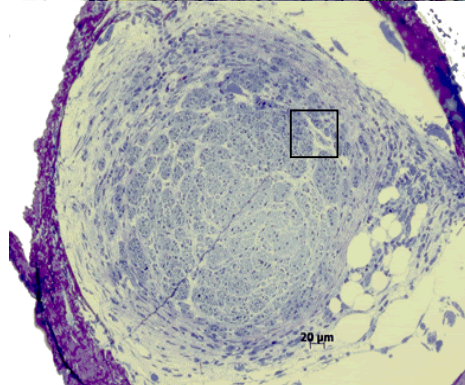
Laminina Neutra

C



Tampão ácido

E



Tubo puro

G

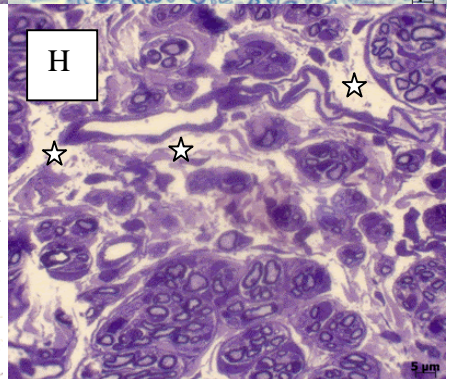
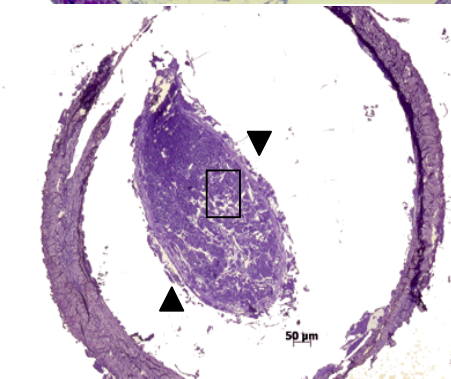


Figura 13: Análise qualitativa comparativa entre cortes transversais de nervo ciático de camundongo seis semanas após cirurgia. Em A, C, E e G aumentos de 20X e em B, D, F e H aumentos de 100X. A e B são referentes ao grupo de laminina ácida, as setas brancas indicam as ilhotas regenerativas. C e D são referentes aos grupos de laminina neutra, as estrelas indicam o tecido conjuntivo propriamente dito. E e F são referentes ao grupo de tampão ácido, as estrelas mostram o tecido conjuntivo propriamente dito e G e H são referentes ao grupo de tubo puro, as cabeças de setas indicam o nervo no interior do tubo, e as estrelas mostram o tecido conjuntivo propriamente dito.

4.3.2 Análise ultraestrutural de nervo ciático seis semanas após cirurgia –

MET

Nas figuras 14 à 17, a análise morfológica ultraestrutural de nervos ciáticos em regeneração, seis semanas após a cirurgia revelam características teciduais de cada grupo. Na figura 14 podemos observar a organização tecidual do grupo laminina ácida, com um aparente maior número de axônios mielínicos, porém não muito calibrosos, com bainha de mielina espessa e bem formada, além de numerosas fibrilas colágenas imersas na matriz extracelular, que se mostra organizada e homogênea. É notável a boa distribuição dos axônios mielínicos, amielínicos e em mielinização, que se encontram reunidos e envolvidos por células de Schwann, formando as inúmeras ilhotas regenerativas. Na figura 15 analisamos a eletromicrografia o grupo de laminina neutra, com menor número de fibras mielínicas e amielínicas em comparação à figura anterior, considerando inclusive o menor aumento, onde é possível visualizar um maior campo do nervo analisado, porém essas fibras se apresentam aparentemente mais calibrosas, com algumas ilhotas regenerativas e bainha de mielina espessa. Na figura 16 observamos eletromicrografias do grupo tampão ácido, observamos fibras mielínicas dispersas e com bainhas de mielinas finas, porém com numerosas fibras amielínicas. Na figura 17 podemos observar a organização ultraestrutural tecidual do grupo tubo puro com menor número de axônios tanto mielínicos quanto amielínicos, em relação à figura 15 (laminina neutra), que se encontra sob o mesmo aumento, porém é observado um campo da periferia do nervo, onde podemos assim observar um perineuro compacto, além da matriz extracelular desorganizada e dispersa, evidenciando a menor organização tecidual desse grupo em relação aos outros grupos analisados.

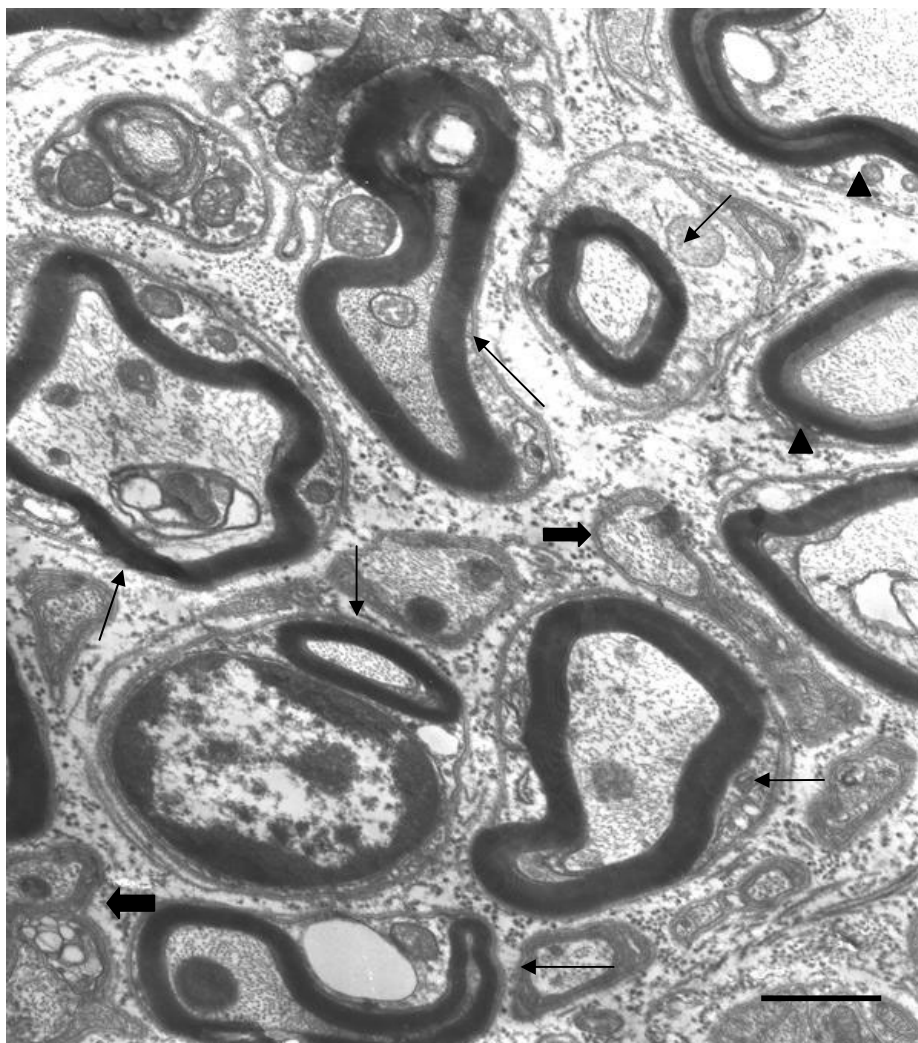


Figura 14: Eletromicrografia do corte transversal de nervo ciático do grupo laminina ácida, em processo de regeneração, seis semanas após a cirurgia. Observamos grande número de fibras mielinizadas em regeneração (setas), além de axônios amielínicos (setas largas), e fibras em processo de mielinização, como é possível observar a bainha de mielina fina em processo de espessamento (cabeças de seta). Além disso observamos a matriz extracelular do nervo homogênea e organizada. Barra = 1 μ m.

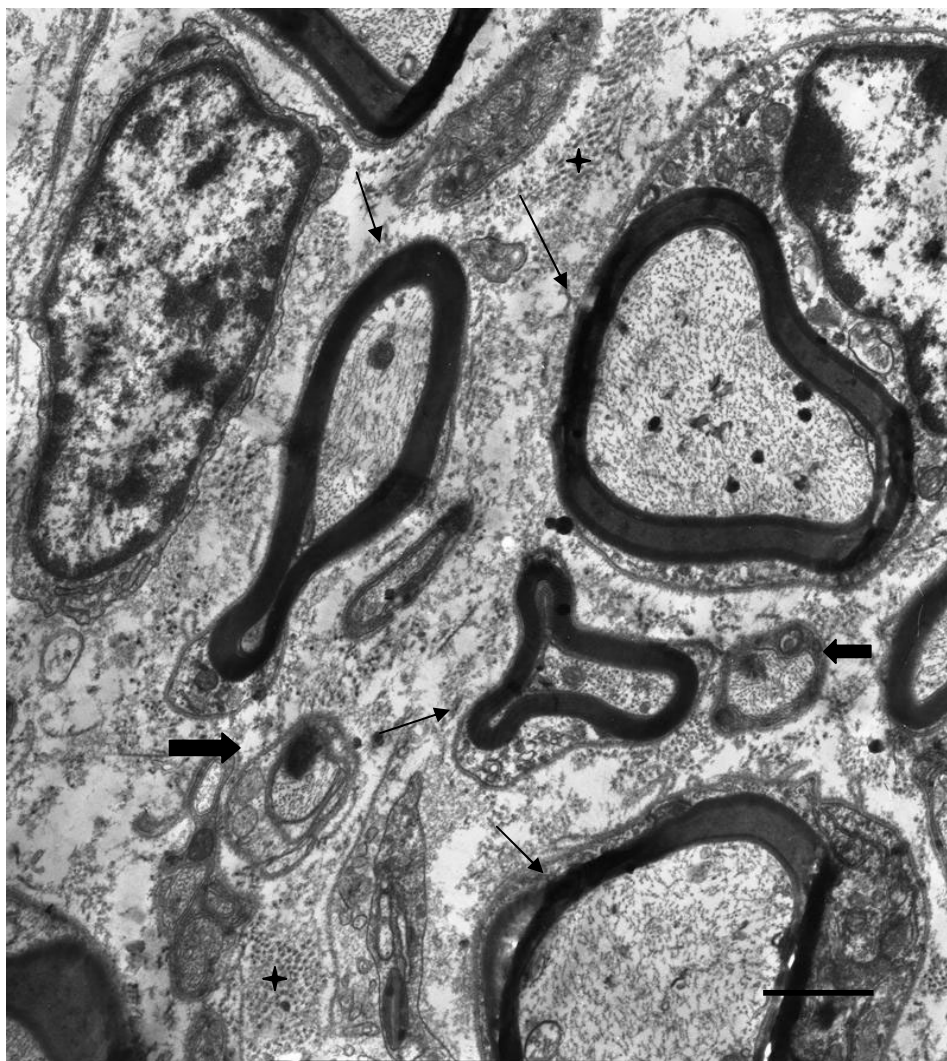


Figura 15: Eletromicrografia do corte transversal de nervo ciático do grupo laminina neutra, seis semanas após a cirurgia. Observamos pequeno número de fibras mielinizadas (setas) porém calibrosas, e algumas fibras amielínicas (setas largas) e grande quantidade de colágeno (estrela). Barra = 1 μ m.

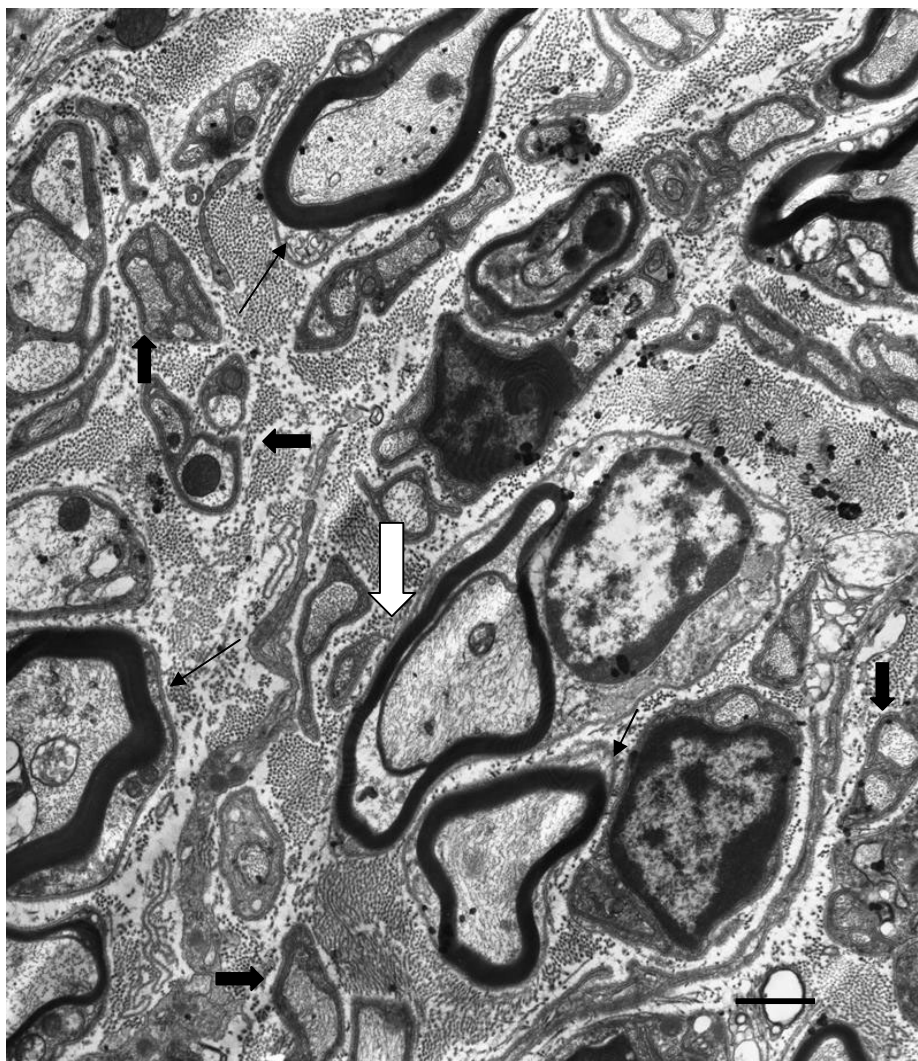


Figura 16: Eletromicrografia de corte transversal de nervo ciático do grupo tampão ácido, seis semanas após a cirurgia. Observamos fibras nervosas mielínicas mais dispersas e envolvidas por fina camada de mielina (setas), e numerosas fibras amielínicas (setas largas), além de axônios destacados da bainha de mielina indicando possível processo degenerativo (seta larga branca). Barra = 1 μ m.

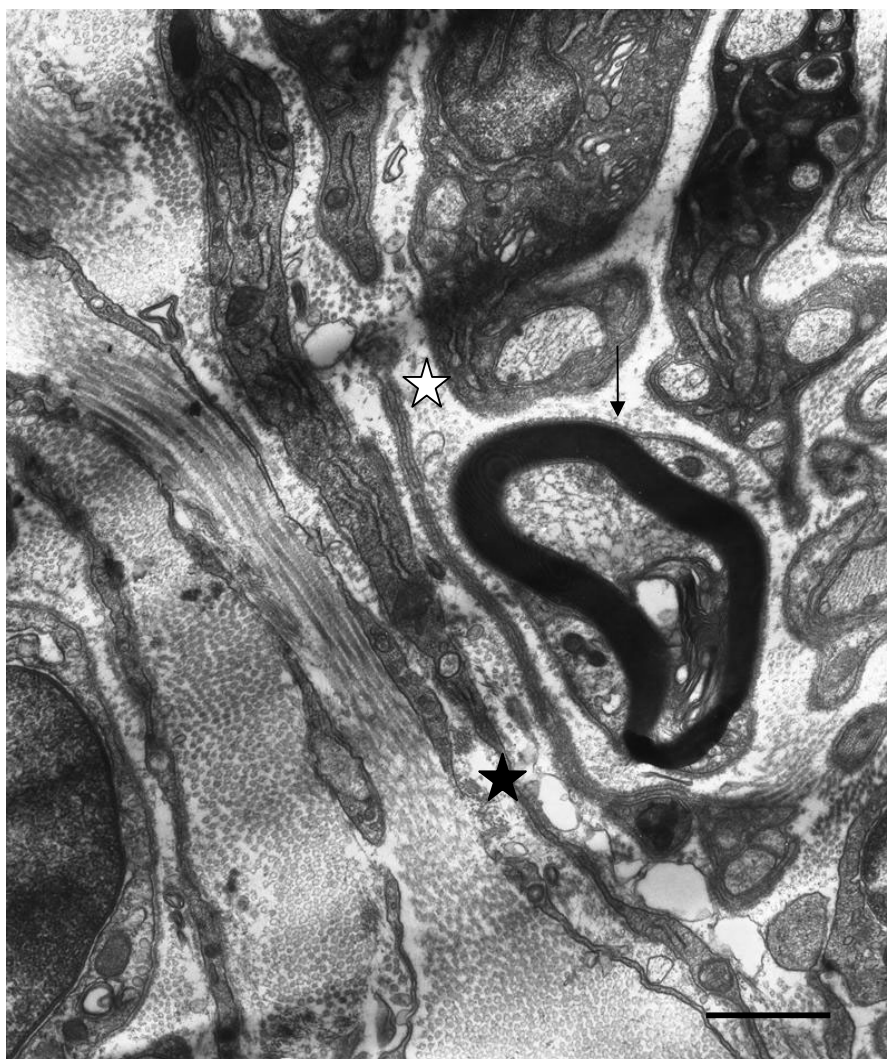


Figura 17: Eletromicrografia de corte transversal de nervo ciático do grupo tubo puro, seis semanas após a cirurgia. Podemos observar um axônio mielínico (seta), em matriz desorganizada e dispersa (estrela branca), com perineuro pouco compacto (estrela preta) com grande quantidade de colágeno. Barra = 1 μ m.

4.4 Análise quantitativa do nervo ciático 6 semanas após a cirurgia – MO

Os estudos morfométricos foram realizados a partir de cortes semifinos (MO), com base na análise da área da fibra nervosa, área do axônio, área da bainha de mielina, número de axônios mielínicos e G Ratio.

A análise das áreas das fibras (gráfico 1), mostrou que os grupos laminina ácida e laminina neutra obtiveram os maiores valores, indicando uma possível melhor regeneração para esses grupos, embora tenha sido estatisticamente significativo somente a diferença entre os grupos laminina neutra e tubo puro ($P = 0.05$).

Com relação à área do axônio (gráfico 2), mais uma vez, os grupos laminina ácida e laminina neutra obtiveram os maiores valores, sendo o maior valor obtido o da laminina neutra. Com a comparação intergrupos, foi constatada significância estatística também entre os grupos laminina neutra e tubo puro ($P = 0.05$).

Ao analisarmos a área da bainha de mielina (gráfico 3), observamos os maiores valores nos grupos laminina ácida e laminina neutra, porém sem resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos.

Com a análise do G Ratio (gráfico 4), que é a razão entre o diâmetro do axônio e da fibra nervosa, pudemos observar menores diferenças entre os resultados dos grupos, sem significância estatística. Os valores de G Ratio mais próximo de 0,5 indicam um fibra saudável, alterações nesses valores indicam alterações na constituição do axônio ou da bainha de mielina.

Quando analisamos os valores do G ratio separadamente (gráfico 5), comparando em cada valor do G ratio os resultados dos números de fibras entre os grupos, encontramos

resultado significativo entre o grupo laminina neutra e tampão ácido ($P = 0.02$), sendo o melhor resultado o do grupo tampão ácido.

Com a análise do número de axônios mielinizados (gráfico 6), observamos os maiores valores no grupo laminina ácida, apesar disso não foram encontrados resultados significativos estatisticamente para esse valores.

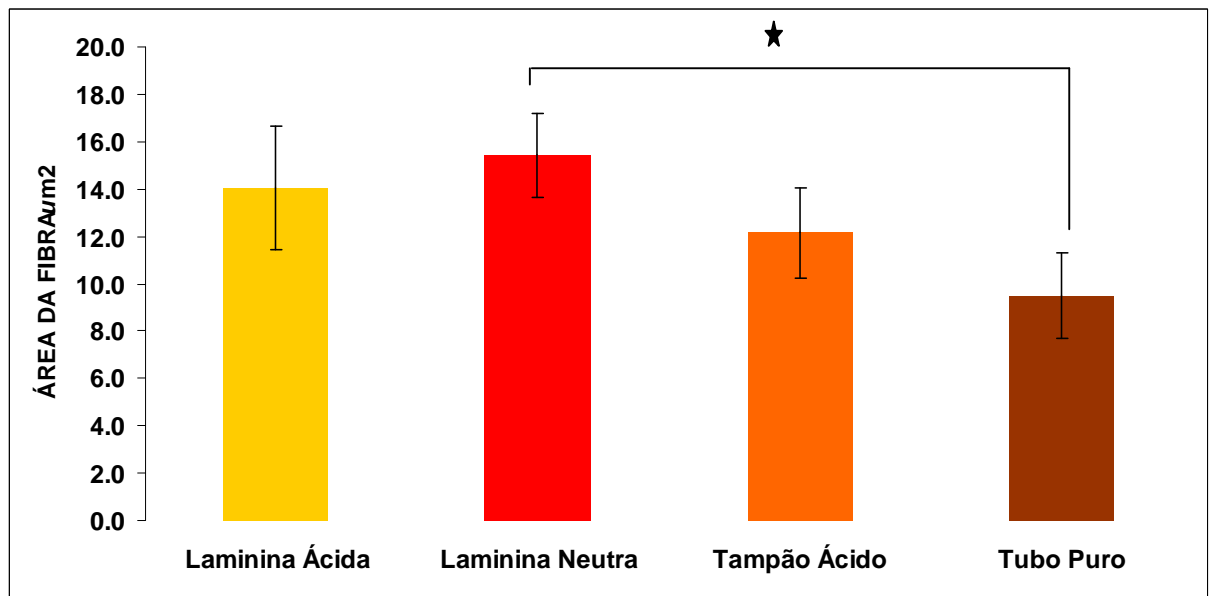


Gráfico1: Análise quantitativa das áreas da fibra nervosa dos quatro grupos (laminina ácida, laminina neutra, tampão ácido e tubo puro). Os valores representam as médias de cada grupo. ★ P = 0.05.

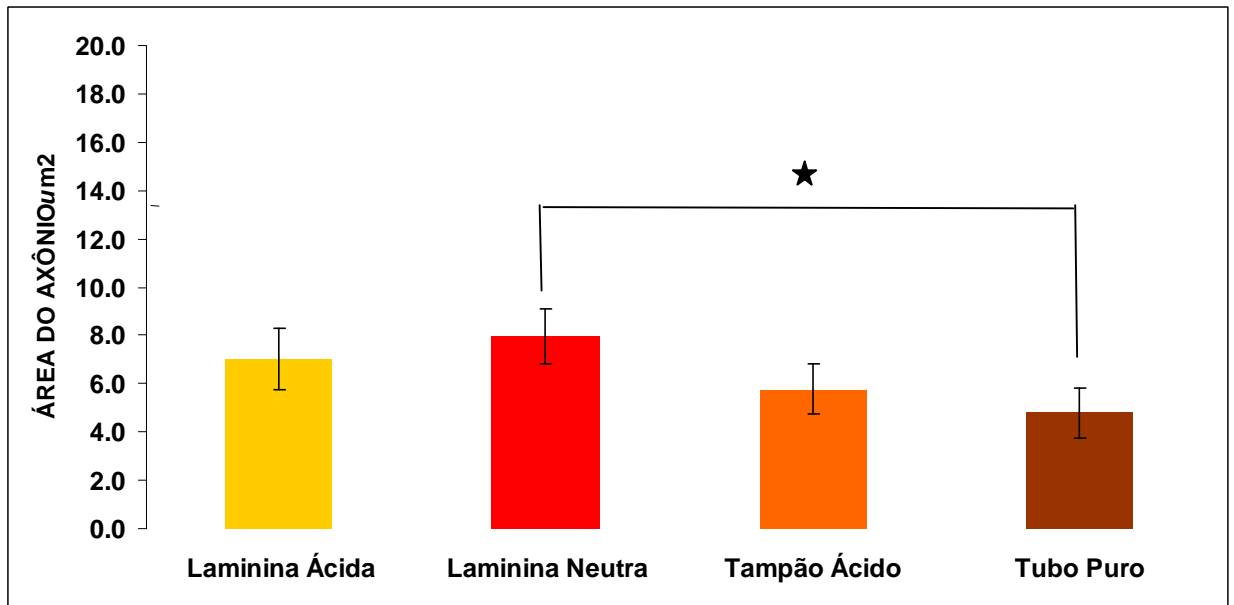


Gráfico 2: Análise quantitativa das áreas dos axônios dos quatro grupos (laminina ácida, laminina neutra, tampão ácido e tubo puro). ★ P = 0.05.

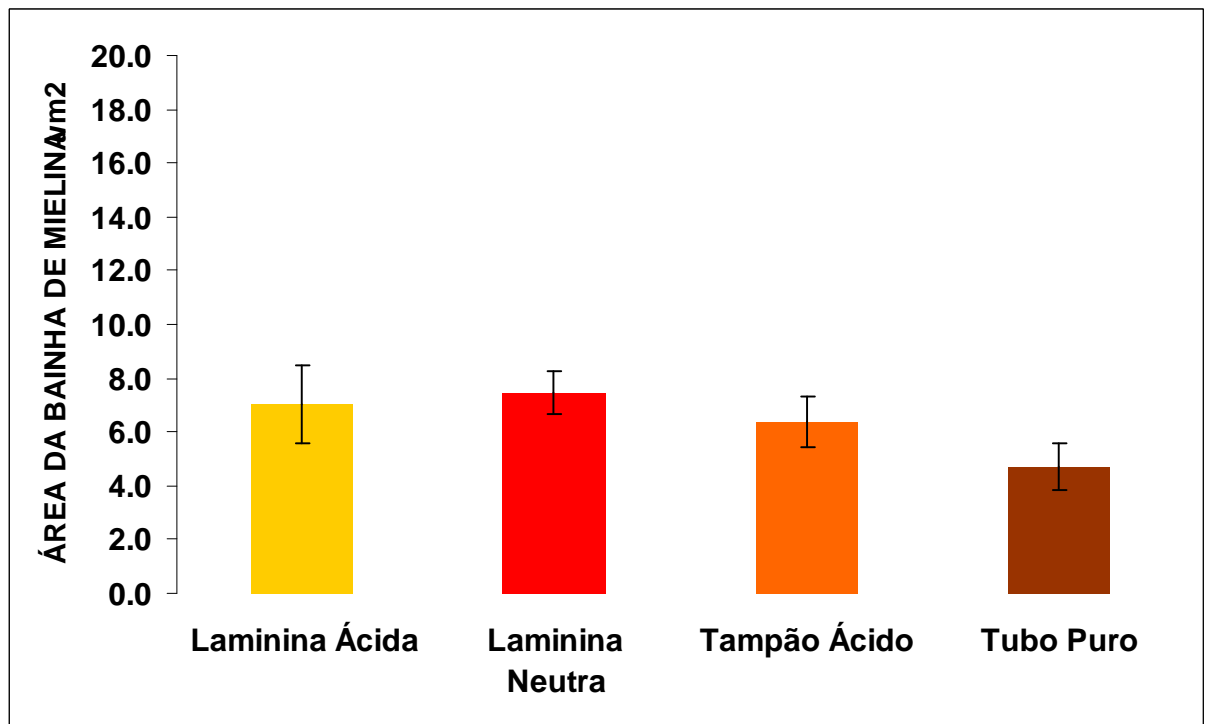


Gráfico 3: Análise quantitativa das áreas das bainhas de mielina dos quatro grupos (laminina ácida, laminina neutra, tampão ácido e tubo puro). Os valores representam as médias de cada grupo.

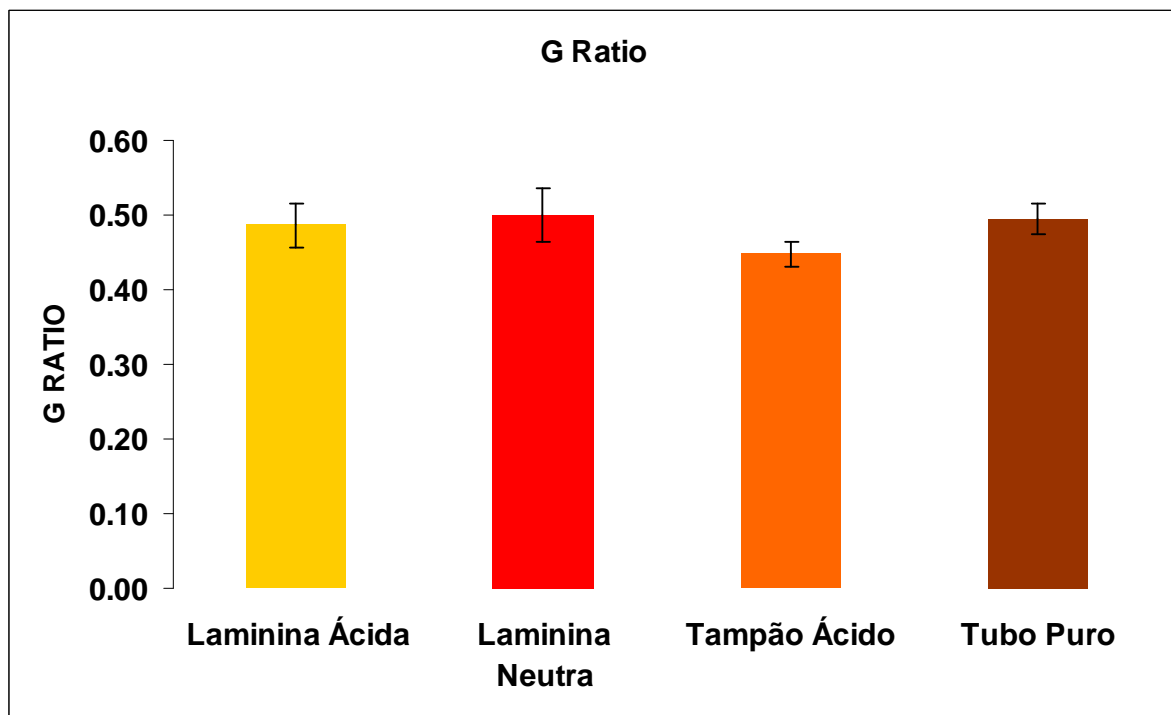


Gráfico 4: Análise quantitativa do G Ratio de cada grupo (laminina ácida, laminina neutra, tampão ácido e tubo puro).

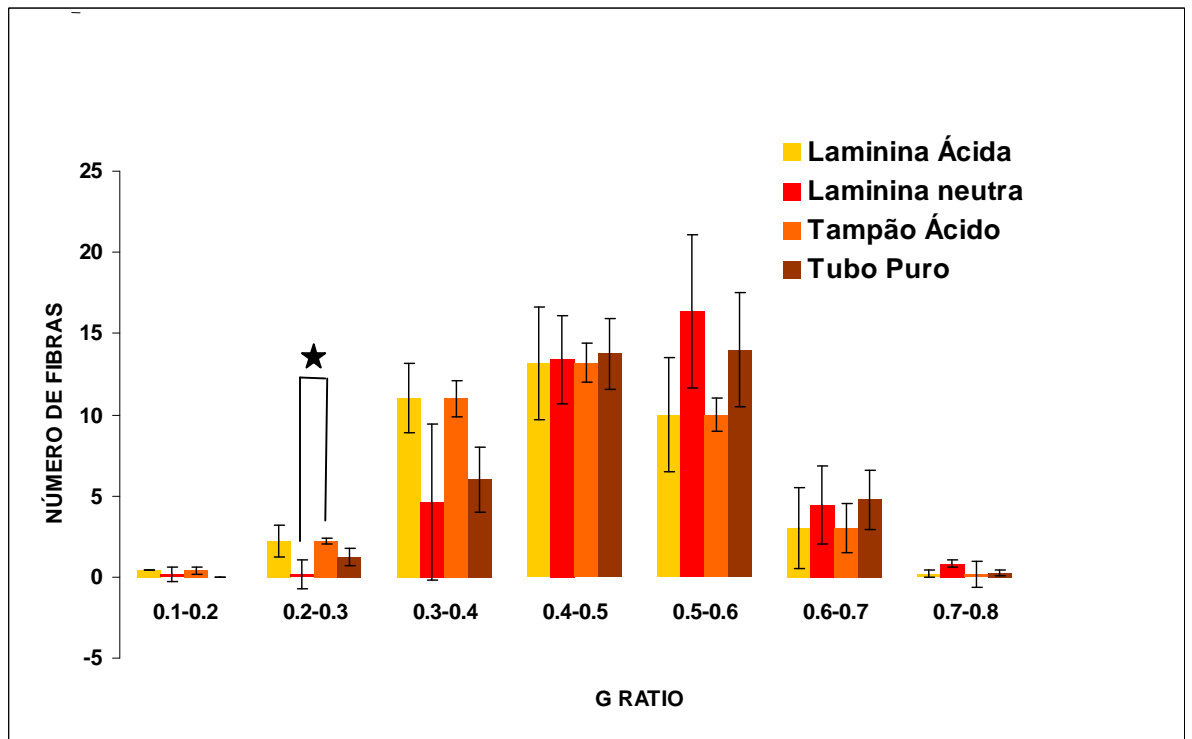


Gráfico 5: Histograma separando os valores de G Ratio dos diferentes grupos. O gráfico expressa a média dos quatro grupos (laminina ácida, laminina neutra, tampão ácido e tubo puro) com seus respectivos erros. ★ P = 0.02.

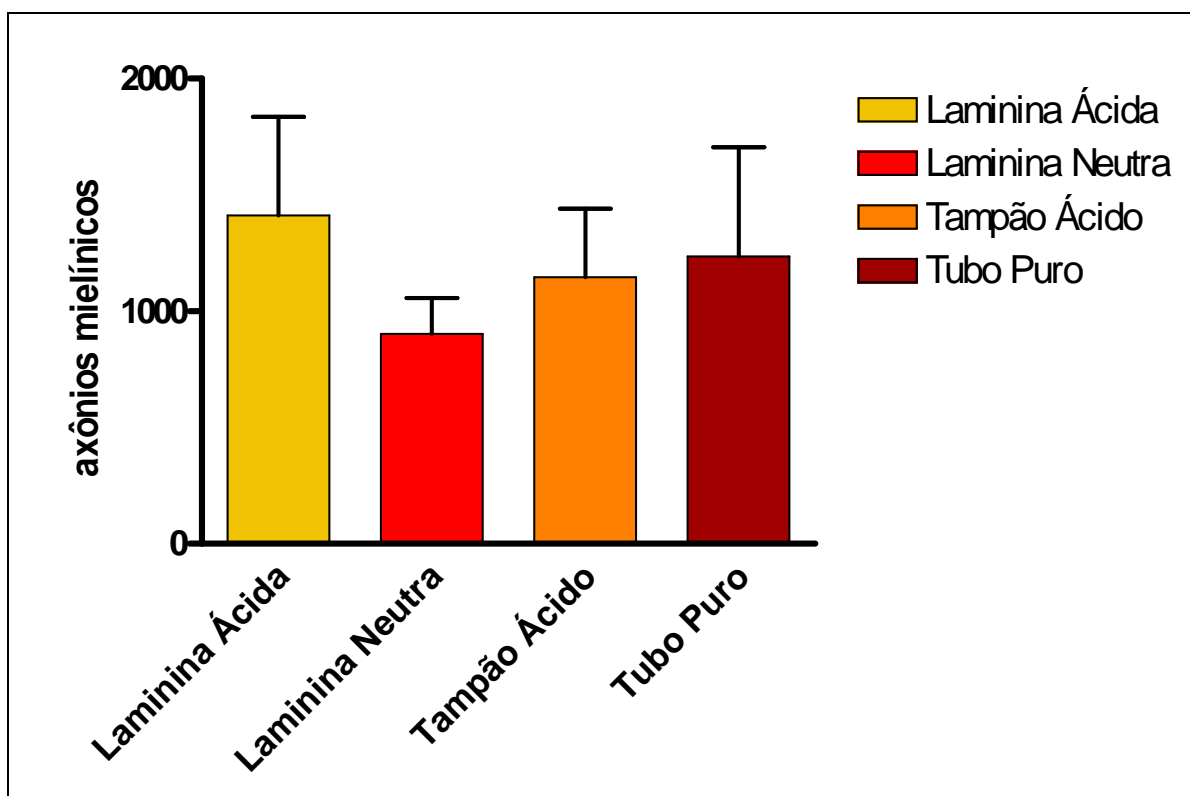


Gráfico 6: Análise quantitativa do número de axônios mielínicos encontrados em cada grupo. É possível observar a diferença entre os grupos, porém essas diferenças não foram consideradas significativas estatisticamente.

4.5 Análise Funcional

As pegadas foram obtidas, através de impressão em papel apropriado, ao final da segunda, quarta e sexta semanas após a cirurgia. De maneira geral observamos que, desde a segunda semana a locomoção ocorreu sem qualquer dificuldade. Apesar da diferença na mobilidade e distribuição de peso entre as patas lesionada e não lesionada ficar evidente na impressão das pegadas (figura 18), a dinâmica da marcha parecia normal em função das compensações e substituições de padrões de movimento, realizadas pelos animais.

Um total de 360 pegadas foram mensuradas a partir de quatro grupos (laminina ácida, laminina neutra, tampão ácido e tubo puro).

Analisando as pegadas observamos diferenças importantes tanto no comprimento de pegada (Print Length – PL) quanto no espalhamento da pegada (Toe Spread – TS), medidas que podem ser visualizadas na figura 18. Para comparação das diferenças entre os grupos utilizamos a análise de variância paramétrica (ANOVA) seguido do pós-teste de Kruskal Wallis para comparação intragrupos. A análise quantitativa destes parâmetros, como mostrado no gráfico 7, evidenciou uma recuperação melhor do grupo laminina ácida, embora esse resultado não tenha apresentado significância estatística. A partir do momento em que comparamos os grupos entre si, constatamos uma melhor recuperação funcional do grupo laminina ácida em relação à todos os grupos, havendo uma diferença significativa entre os grupos laminina ácida e tubo puro na quarta semana de recuperação.

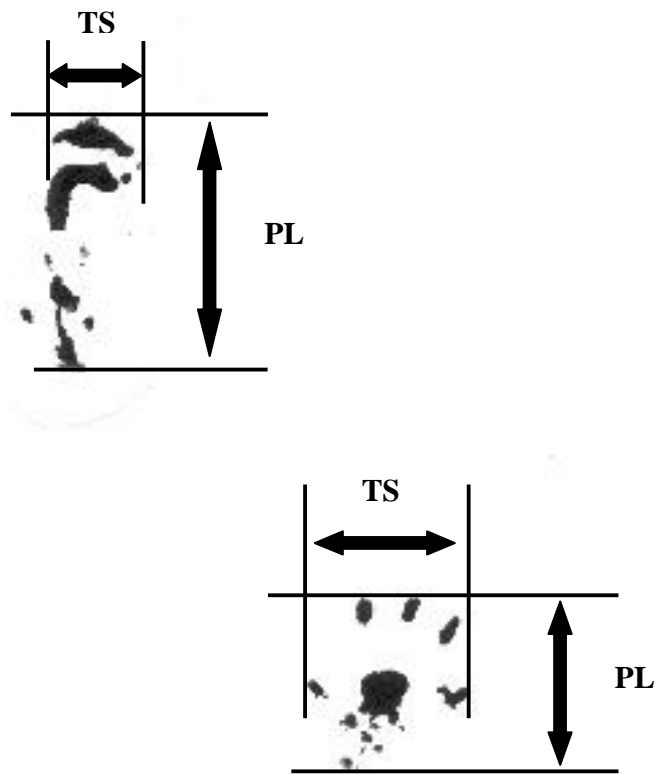


Figura 18: Imagem das pegadas de camundongo seis semanas após cirurgia, obtidas através do teste funcional. Podemos observar as medidas utilizadas para obtenção do IFC (Toe spread - TS; print length – PL). A pegada da esquerda corresponde à pata operada, e a da direita à pata normal.

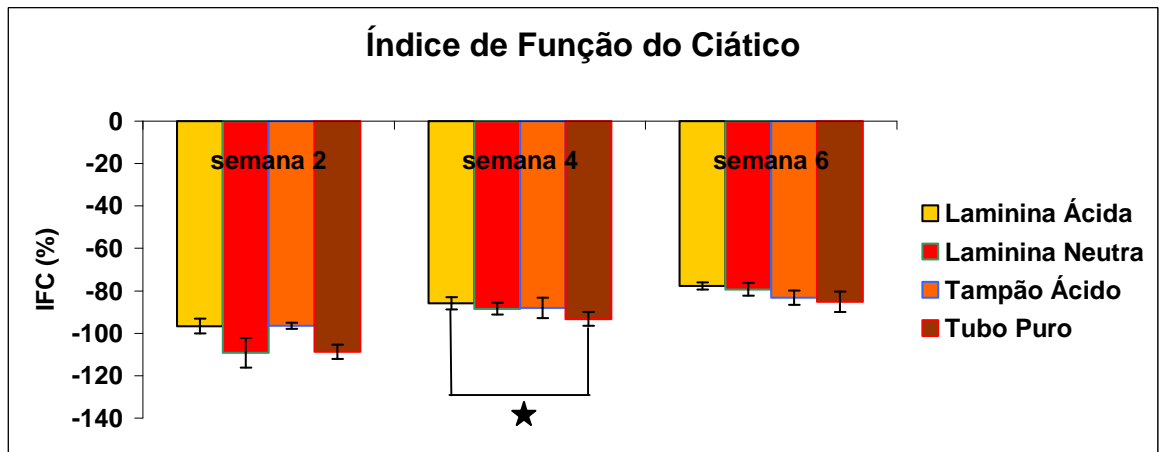


Gráfico 7: Análise quantitativa da diferença entre os IFC dos diferentes grupos ao longo das seis semanas de regeneração após a cirurgia. O grupo laminina neutra obteve melhor resultado funcional, obtendo um IFC melhor em relação aos outros grupos, embora essa diferença não tenha sido considerada significativa. Porém quando fizemos a comparação entre os grupos, observamos uma diferença significativa entre os grupos laminina ácida e tubo puro na quarta semana de regeneração, considerando ★ P = 0.02.

O IFC foi obtido através da fórmula:
$$SFI = 118.9 \frac{ETP}{NTS} - \frac{NTS}{NPL} - 51.2 \frac{EPL}{NPL} - 7.5$$

Sendo SFI (Sciatic Functional Índice), ETC (Experimental Toe Spread), NTS (Normal Toe Spread), EPL (Experimental Print Length), NPL (Normal Print Length).

5. Discussão

As lesões traumáticas no sistema nervoso são comuns, e apesar do grande potencial regenerativo do SNP, ainda não foi descrito um tratamento satisfatório com relação à total recuperação funcional após a lesão (Lee e Wolfe, 2000; Gordon et. Al, 2007). Quando há transecção do nervo, com perda de tecido neural, se faz necessária a utilização de uma ponte entre os cotos proximal e distal, sendo que quanto maior o intervalo entre os cotos, maior a dificuldade no reparo do nervo. Neste estudo, buscando aperfeiçoar a regeneração do nervo periférico e a recuperação funcional após transecção do nervo ciático, utilizamos a tubulização com tubo biodegradável de colágeno (Pereira Lopes et. al, 2006), associado a lamininas polimerizadas em diferentes pHs (Freire et. al, 2002; Freire et.al, 2004).

A combinação dessas estratégias resultou em uma melhor regeneração, com melhor organização tecidual, aumento nas áreas das fibras regeneradas e aumento nas áreas dos axônios, além de maior número de axônios mielinizados. Além disso, o teste de função motora, também foi possível constatar melhor recuperação funcional nos animais tratados com laminina.

Atualmente a principal técnica para reconstrução de defeitos em nervos periféricos é o enxerto de nervo autólogo. Porém essa técnica possui várias complicações e desvantagens, como perda de função do nervo doador, com diminuição da sensibilidade local, formação de neuroma e viabilidade limitada do material (Sinis et. al, 2006; Sinis et.al, 2007). Outras estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de sanar essas

limitações, assim, os tubos de materiais biológicos tem sido largamente utilizados. Estes são capazes de dar suporte e servir como guia durante a regeneração do nervo, sem as desvantagens dos materiais não biológicos, como tubos de nylon, silicone e poliuretano, que podem levar à compressão do nervo, resposta inflamatória além de fazer necessária uma segunda cirurgia para sua retirada, por não serem biodegradáveis (Lundberg et. al, 1997; Arai et. al, 2000). Com isso os materiais biológicos e biodegradáveis têm sido amplamente estudados, aperfeiçoados e utilizados, alcançando resultados favoráveis à regeneração do nervo periférico, não somente oferecendo sustentação, como direcionando o crescimento do nervo, prevenindo contra a formação de neuroma e crescimento de tecido cicatricial no interior do intervalo entre os cotos (Nakamura et al., 2004).

Avaliações funcionais mostraram que a regeneração de tecido nervoso após transecção com formação de intervalo entre os cotos, é superior quando utilizamos um tubo biodegradável em comparação com enxerto de nervo autólogo (Ijkema-Paassen, 2002). Estudos clínicos utilizando tubos biodegradáveis, como tubo de ácido poliglicólico, mostraram resultados favoráveis à regeneração do nervo periférico (Lee et al., 2006; Inada et al., 2004). O colágeno é um dos melhores materiais utilizados para reconstrução de intervalos entre cotos em nervos periféricos, graças à sua biocompatibilidade e adequada força de tensão (Ahmed et al., 2005), além disso suas propriedades biológicas fazem dele excelente escolha como tubo para guiar e promover o crescimento do nervo (Keilhoff et al., 2003). Em acordo com a literatura, utilizamos nesse trabalho tubos de colágeno para auxiliar o alongamento e a regeneração axonal.

Após a lesão traumática do nervo periférico, seja ela por esmagamento ou secção, inicia-se um processo de degeneração Walleriana no segmento distal do nervo comprometido. A cascata de eventos desencadeada pela lesão, na degeneração Walleriana,

leva à sinalização para as células de Schwann, que se desdiferenciam e proliferam, formando as Bandas de Büngner. O processo de regeneração se inicia com o alongamento axonal a partir do nodo de Ranvier mais próximo no segmento proximal do nervo (Stoll e Müller, 1999). Esses alongamentos axonais alcançam a Banda de Büngner e são guiados ao tecido alvo pela interação das células de Schwann com a lamina basal (Martini, 1994). As moléculas da matriz extracelular estão envolvidas diretamente nos processos de degeneração e regeneração do nervo, e a laminina é um dos principais componentes desta, estando assim presente na lâmina basal, o que indica sua importância nas interações neurônio-glia (Gantus et al., 2006). A laminina é permissiva à adesão das células de Schwann durante esses processos, e foi provado que lamininas incorporadas à membrana celular aumentam significativamente a adesão das células de Schwann e a afinidade para direcionamento da regeneração do nervo periférico (Huanq et al., 2007). Além disso, a laminina tem papel sinalizador para as células de Schwann iniciarem o processo de mielinização dos axônios, para seu crescimento longitudinal durante o desenvolvimento, e na organização dos nodos de Ranvier (Martin e Peles, 2006), promovendo também o crescimento neurítico (Armstrong et al., 2007; Deister et al., 2007; Evans et al., 2007) e orientação axonal (Turney e Brigman, 2005).

Com o objetivo de caracterizar de forma confiável a regeneração do nervo periférico, utilizamos o número de fibras mielinizadas, o diâmetro da fibra nervosa e a área da bainha de mielina como parâmetros (Savy et al., 1988). Em nosso trabalho foi possível observar uma melhor organização tecidual nos grupos que receberam laminina, além de encontrarmos no grupo laminina ácida o maior número de axônios mielinizados, e no grupo laminina neutra os melhores resultados para área da fibra nervosa, maior área do axônio e maior área da bainha de mielina. Provavelmente isso se deve à presença de

laminina. Algumas propostas podem ser levantadas para explicar o papel da laminina ácida e neutra na regeneração do nervo periférico.

Sabemos que diante da acidificação da matriz extracelular astrócitos assumem morfologia estrelada, o que seria indicativo de adesão, migração ou expansão celular (Gottfried et al., 2003). Sabemos também que a laminina, principal glicoproteína da matriz extracelular, quando em pH ácido se polimeriza, assumindo uma conformação que expõe mais sítios de ligação, o que favorece a neuritogênese (Freire e Coelho-Sampaio, 2000; Freire et al., 2002; Freire et al., 2004). Estes estudos mostram que a matriz de laminina ácida polimerizada em pH ácido facilita a neuritogênese *in vitro*, tendo sido demonstrado no sistema nervoso central. Em nossos resultados obtivemos um maior número de fibras mielinizadas e um melhor desempenho funcional no teste de função motora no grupo de laminina ácida, além de um aspecto tecidual mais organizado em relação aos outros grupos. Isso poderia ser explicado pela influência positiva da laminina ácida na regeneração neural. Apesar disso os resultados mais expressivos alcançados, com significância estatística, foram em relação à laminina neutra, com as maiores áreas de fibra nervosa, axonal e da bainha de mielina. O papel da laminina na adesão celular, proliferação, neuritogênese, mielinização e na interação entre células de Schwann e axônios são amplamente estudados tanto *in vitro* o quanto *in vivo*, e têm comprovação em vários modelos experimentais (Wallquist et al., 2005; Tucker et al., 2006; Yu et al., 2007; Deister et al., 2007; Colognato et al., 2007). Assim, como em nossos resultados observamos dados mais expressivos com relação a atuação da laminina neutra em relação à regeneração do nervo periférico, é possível que *in vivo*, devido às condições favoráveis do microambiente regenerativo, a atuação da laminina neutra tenha melhor desempenho em relação à laminina ácida.

Estudos recentes mostram que a associação de gradientes de concentração de diferentes componentes da matriz extracelular associados a hidrogel, no interior de tubos como ponte entre cotos de nervo periférico, são mais eficientes na regeneração nervosa em relação a concentrações uniformes de um único componente, como a laminina (Dodla e Bellamkonda, 2008), como também a utilização de Matrigel, gel composto pelos elementos da matriz extracelular, com a laminina como o elemento mais abundante, mostrando resultados significativos com relação a regeneração do nervo periférico (Donzelli et al., 2006). Dessa forma, pode-se concluir que talvez a laminina tenha melhor atuação *in vivo* em associação a outros componentes da matriz extracelular.

Como o G ratio é determinado pela razão entre o diâmetro do axônio e da fibra nervosa, um G ratio maior pode ser esperado em uma neuropatia desmielinizante, já que a remielinização leva a uma camada de mielina delgada, mas não altera o diâmetro do axônio (Bosboon et al., 2001). Em nosso trabalho foi possível constatar valores de G ratio próximos do normal para os grupos laminina ácida, laminina neutra e tubo puro, sendo que o grupo tubo puro teve os valores mais alterados, abaixo do normal (0,50), embora não tenha havido significância estatística.

Com isso concluímos que este resultado possa se dever ao valor da área do axônio ter sido baixo, ou a área da fibra estar aumentada. Como observamos, o grupo tampão ácido teve valores baixos para todos esses parâmetros. Com a análise morfológica constatamos o aspecto desorganizado do tecido conjuntivo propriamente dito, com a distribuição dispersa dos axônios. Com isso, podemos aventar a hipótese do valor do G ratio se dever a um possível acúmulo de GAGs, o que levaria a um aumento na área da fibra não acompanhado pelo aumento na área do axônio. Ao separarmos o G ratio por faixas relativas aos seus valores, observamos que os grupos laminina ácida e laminina

neutra apresentam maiores números de fibras para valores de G ratio próximos do normal (0,4 – 0,5 e 0,5 – 0,6), o que poderia explicar o melhor desempenho das fibras nervosas desses grupos. Dentro desses resultados obtivemos significância estatística entre os números de fibras dos grupos laminina neutra e tampão ácido, para valores de G ratio inferiores ao normal (0.2 – 0.3), o que evidencia maior número de fibras do grupo tampão ácido com sua organização tecidual comprometida.

Com a observação dos resultados funcionais da avaliação motora, obtivemos resultados estatisticamente significativos na quarta semana de regeneração entre os grupos laminina ácida e tubo puro, além disso o grupo laminina ácida mostrou uma recuperação linear e progressiva ao longo das seis semanas. Levantamos então a hipótese de que com um “n” maior, ou com maior tempo para avaliação da recuperação funcional, talvez fosse melhor para obtermos mais resultados significativos, avaliando estes a longo prazo, e verificando se a melhor organização tecidual teria maior influência na recuperação funcional do grupo laminina ácida.

Assim concluímos, que o efeito da laminina polimerizada em diferentes pHs é diverso, havendo resultados significativos tanto no grupo laminina ácida, na avaliação funcional, quanto na laminina neutra, com relação as áreas da fibra e do axônio. Assim, estes resultados indicam que o implante de tubo de colágeno preenchido com laminina neutra e ácida potencializa a regeneração do nervo ciático após lesão por transecção, com intervalo entre os cotos de 3 mm. Observamos resultados mais expressivos com relação à laminina neutra. Porém se faz necessária uma melhor investigação, com aumento do “n” e o tempo de regeneração após a cirurgia, para que possamos avaliar mais efetivamente o quanto realmente a melhor organização do nervo alcançada com a laminina ácida influenciaria na regeneração do nervo periférico e na recuperação funcional.

6. Conclusões

- O tubo de colágeno implantado serviu de guia para os axônios em regeneração, de nervo ciático seccionado, de camundongos.
- A adição de laminina ácida no interior do tubo de colágeno não conferiu resultados estatisticamente significativos, com relação à regeneração do nervo periférico, porém evidenciou uma melhor organização tecidual.
- A adição de laminina neutra no interior do tubo de colágeno resultou melhora estatisticamente significativa com relação a área da fibra regenerada e área do axônio quando comparada ao grupo tubo puro com seis semanas. Além do resultado significativo no G ratio em relação ao grupo tampão ácido na quarta semana de regeneração.
- Os dois grupos que receberam laminina demonstraram melhor organização tecidual em relação aos outros grupos.
- A análise funcional não mostrou resultados estatisticamente significativos, embora o grupo laminina ácida tenha mostrado um melhor desempenho funcional.

7. Referências Bibliográficas

ADLER, R. JERDAN, J. HEWITT, AT. Responses of culture neural retinal cells to substratum – bound laminin and other extracellular matrix molecules. *Dev. Biol.* **112**: 100 – 114, 1985.

AEBISCHER, P.; SALESIOTS, J.M.; WINN, S.R. Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates regeneration across long nerve gaps. *J. Neurosci. Res.* **23**: 282-289, 1989.

AHMED, MR. VAIRAMUTHU, S. SHAFIUZAMA, M. BASHA, BH, JAYAKUMAR, R. Microwave irradiated collagen tubes as a better matrix for peripheral nerve regeneration. *Brain Res.* **1046** (1 – 2): 55 – 67, 2005.

AKASSOGLU, K. AKPINAR, P. MURRAY, S. STRICKLAND, S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. *Neurosci. Lett* **338** (3): 185 – 188, 2003.

AKTAN IKIZ, ZA. UÇERLER, H. BILGE, O. The anatomical features of the sural nerve with na emphasis on its clinical importance. *Foot Ankle Int.* **26** (7): 560 – 567, 2005.

ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER. The molecular byology of the cell. Quarta edição.

ANSSELIN, A.D.; FINK, T.; DAVEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **23**: 387-398, 1997.

ARAI, Y. LUNDBORG, G. DAHLIN, LB. Bioartificial nerve graft for bridging extended nerve defects in rats sciatic nerve based on resorbable guiding filaments. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **34** (2): 101 – 108, 2000.

ARCHIBALD, S.J.; KRARUP, C.; SHEFNER, J.; LI, S-T; MADISON, R.D. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: na electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J. Comp. Neurol.* **306**: 685-696, 1991.

ARCHIBALD, S.J.; SHEFNER, J.; KRARUP, C.; MADISON, R.D. Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *J. Neurosci.* **15**: 4109-4123, 1995.

ARMSTRONG, SJ. WIBERG, M. TERENGUI, G. KINGHAN, PJ. ECM Molecules Mediate Both Schwann Cell Proliferation and Activation to Enhance Neurite Outgrowth. *Tissue Eng.* [Epub ahead of print], 2007.

AUMAILLEY, M. BRUCKNER – TUDERMAN, L. CARTER, WG. DEUTZMANN, R. EDGAR, D. EKBLOM, P. ENGEL, J. ENGVALL, E. HOHENESTER, E. JONES, JC. KLEIMAN, HK. MARINKOVICH, MP. MARTIN, GR. MAYER, U. MENEGUZZI, G. MINER, H. MIYAZAKI, K. PATARROYO, M. PAULSSON, M. QUARANTA, V. SANES, JR. SASAKI, T. SEKIGUCHI, K. SOROKIN, LM. TALTS, JF. TRYGGVASON, K. UITTO, J. VIRTANEN, I. VON DER MARK, K. WEWER, UM. YAMADA, Y. YURCHENCO, PD. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24** (5): 326 – 332, 2005.

AUMAILLEY, M. SMITH, N. The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.* **193** (pt 1): 1 – 21, 1998.

AZIZI, S.A.; STOKES, D.; AUGELLI, B. J.; DIGIROLAMO, C.; PROCKOP, D. J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 3908-3913, 1998.

BOSBOOM, WMJ. VAN DER BERG, LH. FRANSSEN, H. GIESBERGEN, PCLM. FLACH, HZ. VAN PUTTEN, AM. VELDMAN, H. WOKKE, JHJ. Diagnostic value of

sural nerve demyelination in chronic inflammatory demyelination polyneuropathy. *Brain* **124** (2): 2427 – 2438, 2001. :

BOVOLENTA, P. FERNAUD – ESPINOSA, I. MÉNDES – OTERO, R. NIETO – SAMPEDRO, M. Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur J Neurosci.* **9** (5): 977 – 989, 1997.

BRECKNELL, J.E.; FAWCETT, J.W. Axonal Regeneration. *Biol. Rev.* **71**: 227-255, 1996.

BRODKEY, JA. GATES, MA. LAYWELL, ED. STEINDLER, DA. The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules. *Exp. Neurol.* **123** (2): 251 – 270, 1993.

BROOK, G.A.; LAWRENCE, J.M.; SHAH, B. Extrusion transplantation of schwann cells into the adult rat thalamus induces directional host axon growth. *Exp.Neurol.* **126**: 31-43, 1994.

BURGESON, RE. CHIQUET, M. DEUTZMANN, R. EKBLUM, P. ENGEL, J. KLEIMAN, H. MARTIN, GR. MENEGUZZI, G. PAULSSON, M. SANES, J. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* **14** (3): 209 – 211, 1994.

CEBALLOS, D.; NAVARRO, X.; DUBEY, N.; WENDELSCHAFFER-CRABB, G.; KENNEDY, W.R.; TRANQUILLO, R.T. Magnetically aligned collagen gel filling a

collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* **158**: 290-300, 1999.

CHAMAK, B. PROCHIATZ, A. Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. *Development* **106**: 483 – 491, 1989.

CHEN, YS. HSIEH, CL. TSAI, CC. CHEN, TH. CHENG, WC.HU, CL. YOO, CH. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* **21** (15): 1541 – 1547, 2002.

CHEN, ZL. STRICKLAND, S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol.* **163** (4): 889 – 899, 2003.

CHEN, MB. ZHANG, F. LINEAWEAVER, WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Am. Plast. Surg.* **57** (4): 462 – 471, 2006

CHEN, ZL. YU, WM. STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**: 209 – 233, 2007.

CHENG, B. CHEN, Z. Fabricating autologous tissue to engineer artificial nerve. *Microsurg.* **22** (4): 133 – 137, 2002.

CHIU, AY. SANES, JR. Development of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of embryonic rat muscle. *Dev. Biol.* **103** (2): 456 – 467, 1984.

COHEN, J. BURNE, JF. WINTER, J. BARTLETT, P. Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation. *Nature* **322** (6078): 465 – 467, 1986.

COHEN, J. BURNE, JF. MCKINLAY, C. WINTER, J. The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. *Dev Biol.* **122** (2): 407 – 418, 1987.

COLOGNATO, H. YURCHENCO, PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* **218** (2): 213 – 234, 2000.

COLOGNATO, H. GALVIN, J. WANG, Z. RELUCIO, J. NGUYEN, T. HARRISON, D. YURCHENCO, PD. FRENCH – CONSTANT, C. Identification of dystroglycan as a second laminin receptor in oligodendrocytes, with a role in myelination. *Development* **134** (9): 1723 – 1736, 2007.

CORDEIRO, P.G.; SECKEL, B.R.; LIPTON, S.A.; D'AMORE, P.A.; WAGNER, J.; MADISON, R. Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration by target organ. *Plastic Reconstr. Surg.* **83**: 173-181, 1989.

CUEVAS, P.; CARCELLER, F.; DUJOVNY, M.; GARCIA-GÓMEZ, I.; CUEVAS, B.; GONZÁLEZ-CORROCHANO, R.; DIAZ-GONZÁLEZ, D.; REIMERS, D. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol. Res.* **24**: 634-638, 2002.

DEISTER, C. ALJABARI, S. SCHMIDT, CE. Effects of collagen 1, fibronectin, laminin and hyaluronic acid concentration in multicomponent gels on neurite extension. *J. Biomater. Sci. Polym.* **18** (8): 983 – 997, 2007.

DEZAWA, M. The interactions and adhesive mechanisms between axon and Schwann cell during central and peripheral nerve regeneration. *Kaibogaku Zasshi* **75** (3): 255 – 265, 2000.

DODLA, MC. BELLAMKONDA, RV. Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminins and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* **29** (1): 33 – 46, 2008

DONZELLI, R. MAIURI, F. PISCOPO, GA. DE NOTARIS, M. COLELLA, A. DIVITTIS, E. Role of extracellular matrix components in facial nerve regeneration: an experimental study. *Neurol. Res.* **28** (8): 794 – 801, 2006.

DRAGO, J. NURCOMBE, V. BARTLETT, PF. Laminin through its long arm E8 fragment promotes the proliferation and differentiation of murine neuroepithelial cells in vitro. *Exp Cell Res.* **192** (1): 256 – 265, 1991.

EDGAR, D. TIMPL, R. THOENEN, H. Structural requirements for the stimulation of neurite outgrowth by two variants of laminin and their inhibition by antibodies. *J Cell Biol.* **106** (4): 1299 – 1306, 1988.

EFTEKHARPOUR, E. KARIMI – ABDOLREZAEES WANG, J. EL BEHEIRY, H. MORSHEAD, C. FEHLINGS, MG. Myelination of congenitally dysmyelinated spinal cord axons by adult neural precursor cells result in formation of nodes of Ranvier and improved axonal conduction. *J. Neurosci* **28**; **27** (13): 3416 – 3428, 2007.

EULER, M.V. JANSON, A.M. LARSEN, J.O. et al. Spontaneous axonal regeneration in rodent spinal cord after ischemic injury. *J. of Neuropathol. and Exp. Neurol.* **61** (1): 64-75, 2002.

EVANS, AR. EUTENEUER, S. CHAVEZ, E. MULLEN, LM. HUI, EE. BHATIA, SN. RYAN, AF. Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *Dev Neurobiol.* **67** (13): 1721 – 1730, 2007.

FANSA, H.; KEILHOFF, G.; SCHNEIDER, W. Tissue engineering of peripheral nerves: a comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plastic Reconstr. Surg.* **1079** (2): 485-494, 2001.

FANSA, H.; DODIC, T.; WOLF, G.; SCHNEIDER, W.; KEILHOFF, G. Tissue engineering of peripheral nerves: epineurial grafts with application of cultured Schwann cells. *Microsurg.* **23**: 72-77, 2003.

FAISSNER, A. KUSE, J. J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron.* **5** (5): 627 – 637, 1990.

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. *Annu. Ver.* **13**: 43-60, 1990.

FRADE, JM. MARTÍNEZ – MORALES, JR. RODRIGUEZ – TÉBAR, A. Laminin-1 selectively stimulates neuron generation from cultured retinal neuroepithelial cells. *Exp Cell Res.* **222** (1): 140 – 149, 1996.

FREIRE, E. COELHO – SAMPAIO, T. Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *J Biol Chem.* **275** (2): 817 – 822, 2000.

FREIRE, E. GOMES, FC. LINDEN, R. NETO, VM. COELHO – SAMPAIO, T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. *J. Cell Sci.* **115** (pt 24): 4867 – 4876, 2002.

FREIRE , E. GOMES, FC. JOTHA – MATTOS, T. NETO, VM. SILVA FILHO, FC.

COELHO – SAMPAIO, T. *J. Cell Sci.* **117** (pt 18): 4067 – 4076, 2004.

FRERICHS, O.; FANSA, H.; SCHICHT, C.; WOLF, G.; SCHNEIDER, W.; KEILHOFF, G.

Reconstruction of peripheral nerves using acellular nerve grafts with implanted cultured Schwann cells. *Microsurg.* **22**: 311-315, 2002.

GAIANO, N. FISHELL, G. Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system: . *J. Neurobiol.* **36**: 152-161, 1998.

GANTUS, MAV. NASCIUTTI, LE. CRUZ, CM. PERSECHINI, PM. MARTINEZ, AMB.

Modulation of extracellular matrix components by metalloproteinases and their tissue inhibitors during degeneration and regeneration of rat sural nerve. *Brain Res.* **1122** (1): 36 – 46, 2006.

GEORGE, E.B.; GLASS, J.D.; GRIFFIN, J.W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J. Neurosci.* **15** (10): 6445-6454, 1995.

GOODMAN, CS. SHATZ, CJ. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* **72**, Suppl. 77 – 98, 1993.

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; GORDON BOYD, J. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **8**: 236 –250, 2003.

GORDON, T. BRUSHART, TM. AMIRJANI, N. CHAN, KM. The potential of electrical stimulation to promote functional recovery after peripheral nerve injury - - comparisons between rats and humans. *Acta Neurochir. Suppl.* **100**: 3 – 11, 2007.

GOTTFRIED, C. CECHIM, SR. GONZALES, MA. VACCATO, S. RODNIGHT, R. The influence of the extracellular matrix on the morphology and intracellular pH of cultured astrocytes exposed to media lacking bicarbonate. *Neuroscience* **121** (3): 553 – 562, 2003.

GRIFFIN, J.W.; HOFFMAN, P.N. Degeneration and Regeneration in the Peripheral Nervous System in Dick, P.J. Thomas, P.K. Griffin, J.W. Low, P.A. Poduslo, J.W. (Ed.) *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. **1**: 361-376, 1993.

GROFFEN, AJ. BUSKENS, CA. VAN KUPPEVELT, TH. VEERKAMP, JH. MONNENS, LA. VAN DEN HEUVEL, LP. Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *Eur. J. Biochem.* **254** (1): 123 – 128, 1998

HAFLER, DA. KENT, SC. PIETRUSEWICKZ, MJ. KHOURY, SJ. WEINER, HL. FUKAURA, H. Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF-beta 1

secreting T cells in patients with multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **835**: 120 – 131, 1998.

HAMMARBACK, JA. McCARTHY, JB. PALM, SL. FURCH, LT. LETOURNEAU, PC. Growth cone guidance by substrate-bound laminin pathways is correlated with neuron-to-pathway adhesivity. *Dev Biol.* **126** (1): 29 – 39, 1988.

HORNER, P.J.; GAGE, F.H. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature.* **407**: 963-970, 2000.

HOUWELING, D. A. LANKHORST, A. J. GISPEN, W.H. Collagen containing neurotrophin-3 (NT-3) attracts regrowing injured corticospinal axons in the adult spinal cord and promotes partial functional recovery. *Exp. Neurol.* **153**: 49-59, 1998.

HUANQ, YC. HUANQ, CC. HUANQ, YY. CHEN, KS. Surface modification and characterization of chitosan or PLGA membrane with laminin by chemical and oxygen plasma treatment for neural regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **82** (4): 842 – 851, 2007.

HUNTER, DD. PORTER, BE. BULOCK, JW. ADAMS, SP. MERLIE, JP. SANES, JR. Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell* **59** (5): 905 – 913, 1989.

HUNTER, DD. SHA, V. MERLIE, JP. SANES, JR. A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature* **338** (6212): 229 – 234, 1989.

:

HUNTER, DD. LLINAS, R. ARD, M. MERLIE, JP. SANES, JR. Expression of s-laminin and laminin in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol.* **323** (2): 238 – 251, 1992.

IJKEMA – PAASSEN, J. MEEK, MF. GRAMSBERGEN, A. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve* **25** (6): 891 – 897, 2002.

INADA, Y. MARIMOTO, S. TAKAKURA, Y. NAKAMURA, T. Regeneration of peripheral nerve gaps with a polyglycolic acid – collagen tube. *Neurosurgery* **55** (3): 640 – 646, 2004.

INSERRA M.M.; BLOCH, D.; TERRIS, D.J. Functional Índices for sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurg.* **18**: 119 – 124, 1998.

LUIZ CARLOS UCHOA JUNQUEIRA & JOSE CARNEIRO, HISTOLOGIA BÁSICA, EDIÇÃO 10, RIO DE JANEIRO, GUANABARA KOOGAN, 2004

KATOH – SEMBA, R. MATSUDA, M. KATO, K. OOHIRA, A. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur J Neurosci.* **7** (4): 613 – 621, 1995.

KEILHOFF, G. STANG, F. FANSA, H. Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* **24** (16): 2779 – 2787, 2003.

KITAHARA, A.K.; SUZUKI, Y.; QI, P.; NISHIMURA, K.; SUZUKI, T.; KIYOTANI, T.; TAKIMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y.; ENDO, K. Facial nerve repair using a collagen conduit in cats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **33**: 187-193, 1999.

KLEIMAN, R. BANKER, G. STEWARD, O. Inhibition of protein synthesis alters the subcellular distribution of mRNA in neurons but does not prevent dendritic transport of RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90** (23): 11192 – 11196, 1993.

KUECHERER – EHRET, A. GRAEBER, MB. EDGAR, D. THOENEN, H.

KREUTZBERG, GW. Immunoelectron microscopic localization of laminin in normal and regenerating mouse sciatic nerve. *J. Neurocytol.* **19** (1): 101 – 109, 1990.

LANGONE, F.; LORA, S.; VERONESE, F.M.; CALICETE, P.; PARNIGOTTO, P.P.; VALENTI, F.; PALMA, G. Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials.* **16**: 347-353, 1995.

LEE, SK. WOLFE, SW. Peripheral nerve injury and repair. *J. Am. Orthop. Surg.* **8** (4): 243 – 252, 2000.

LEE, DY. CHOI, BH. PARK, JH. ZHU, SJ. KIM, BY. HUH, JY. LEE, SH. JUNG, JH. KIM, SH. Nerve regeneration with the use of a poly (l – lactide – co – glycolic acid) – coated collagen tube filled with collagen gel. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **34** (1): 50 – 56, 2006.

LETOURNEAU, PC. MADSEN, AM. PALM, SL. FURCHT, LT. Immunoreactivity for laminin in the developing ventral longitudinal pathway of the brain. *Dev Biol.* **125** (1): 135 – 144, 1988.

LIESI, P. Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? *EMBO J.* **4**: 1163 – 1170, 1985.

LUCKENBILL – EDDS, L. Laminin and the mechanisms of neuronal outgrowth. *Brain Res. Rev.* **23**, 1 – 27, 1997.

LUNDBORG, G. Nerve injury and repair. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. Case report. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **25**: 79-82, 1991.

LUNDBORG, G. DAHLIN, L. DOHI, D. KANJE, M. TERADA, N. A new type of “bioartificial” nerve graft for bridging extended defects in nerves. *J. Hand. Surg. (Br)* **22** (3): 299 – 303, 1997.

MADISON, R.D.; DA SILVA, C.D.; 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**: 378-390, 1987.

MAEDA, N. NODA, M. 6B4 proteoglycan/ is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. *Development* **28**, 957 – 959, 1996.

MAGGI, S.P.; LOWE III, J.B.; MACKINNON, S.E. Pathophysiology of nerve injury. *Clin. Plastic. Surg.* **30**: 109-126, 2003.

MANTHORPE, M. ENGVALL, E. RUOSLAHTI, E. LONGO, EF. DAVIS, GE. VARON, S. Laminin promotes neurite regeneration from culture peripheral and central neurons. *J. Cell Biol.* **97**: 1882 – 1890, 1983.

MARTIN, K. PELES, E. Neuronal and glial cell biology. *Current Opinion in Neurobiology* **16** (5): 489 – 491, 2006

MARTINEZ, A.M.B.; RIBEIRO, L.C.V. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibres undergoing Wallerian degeneration: na oxalate-pyroantimoniate and X-ray microanalysis study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **30(3)**: 451-458, 1998.

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.

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

MCDONALD, J.W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Med.* **5**: 1410-1412, 1999.

McLOON, LK. McLOON, SC. Schwann cell-conditioned medium promotes neurite outgrowth from explants of fetal rat retina and tectum in vitro. *Brain Res.* **467** (1): 61 – 68, 1988.

MEEK, M.F.; DEN DUNNEN, W.F.; SCHAKENRAAD, J.M.; ROBINSON, P.H. Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a poly (DL-lactide- ϵ -caprolactone) nerve guide, filled with modified denatured muscle tissue. *Microsurg.* **17**: 555-561, 1996.

MERCURI, E. PENNOCK, J. GOODWIN, F. SEWRY, C. COWAN, F. DUBOWITZ, L. DUBOWITZ, V. MUNTONI, F. Sequential study of central and peripheral nervous system involvement in an infant with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* **6** (6): 425 – 429, 1996.

MINER, JH. YURCHENCO, PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**: 255 – 284, 2004.

MLIGILICHE, N.; ENDO, K.; OKAMOTO, K.; FUJIMOTO, E.; IDE, C. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* **63**: 591-600, 2002.

MURAKAMI, T.; FUJIMOTO, Y.; YASUNAGA, Y.; ISHIDA, O.; TANAKA, N.; IKUTA, Y.; OCHI, M. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res.* **974**: 17-24, 2003.

NAKAMURA, T. INADA, Y. FUKU YOUSHITANI, M. NAKADA, A. ITOI, S. KANEMARU, S. SHIMIZU, Y. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res.* **1027**(1 – 2): 18 – 29, 2004.

NAVARRO, X. VIVÓ, M. VALERO – CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral injury and regulation. *Prog. Neurobiol.* **82** (4): 163 – 201, 2007.

NGO, TT. WAGGONER, PJ. ROMERO, AA. NERLEN, KD. EBER HART, RC. SMITH, GM. Poly (L – lactide) microfilaments enhance peripheral nerve regeneration across extended nerve lesions. *J. Neurosci. Res.* **72** (5): 227 – 238, 2003.

OLSSON, Y. REESE, T.S. Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.* **30**: 105-119, 1971.

PATTON, SR. DOLAN, LM. HENRY, L. POWERS, SW. Parental fear of hypoglycemia: young children treated with continuous subcutaneous insulin infusion. *Pediatr Diabetes.* **8** (6): 362 – 368, 2007.

PEREIRA LOPES, FR. CAMARGA DE MOURA CAMPOS, L. DIAS CORREA, J Jr. BALDUÍNO, A. LORA, S. LANGONE, F. BOROJEVIC, R. BLANCO MARTINEZ, AM. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp. Neurol.* **198** (2): 457 – 468, 2006.

PORTER, BE. WEISS, J. SANES, JR. A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron.* **14** (3): 549 – 559, 1995.

RAMÓN-CUETO, A. CORDERO, M.I. SANTOS-BENITO, F.F. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia.. *Neuron.* **25**: 425-435, 2000.

REFAEIAN, M. KING, JC. DUMITRU, D. Isolated sural neuropathy presenting as lateral ankle pain. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **80** (7): 543 – 546, 2001.

SAVY, C. MARGULES, S. SOLARI, A. SAINT – JEAN, P. FARKAS – BARGETON, E. An image analysis morphometric method for the study of myelinated nerve fibers from mouse trigeminal root. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **10** (5): 307 – 316, 1988.

SCHLOSSHAUER, B.; MÜLLER, E; SCHRÖDER, B.; PLANCK, H.; MÜLLER, H-W. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res.* **963**: 321-326, 2003.

SCHULER, F. SOROKIN, LM. Expression of laminin isoforms in mouse myogenic cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* **108** (pt 12): 3795 – 3805, 1995.

SINIS, N. SCHALLER, HE. SCHULTE – EVERSUN, C. SHLOSSHAUER, B. DOSER, M. DIETZ, K. RÖSNER, H. MÜLLER, HW. HAERLE, M. tissue engineering of peripheral nerves. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* **38** (6): 378 – 389, 2006.

SINIS, N. SCHALLER, HE. SCHULTE – EVERSUN, C. LANARAS, T.

SCHLOSSHAUER, B. DOSER, M. DIETZ, K. RÖSNER, H. MÜLLER, HW. HAERLE, M. Comparative neuro tissue engineering using nerve guide implants. *Acta Neurochir. Suppl.* **100**: 61 – 64, 2007.

SILVA, CIRO DA. *Biologia Celular e Molecular da Regeneração do Sistema Nervoso Periférico. Atualização em Neurociências.* **1** (3): 1-16, 1995.

SNOW, DM. LEMNON, V. CARRINO, DA. CAPLAN, AI. SILVER, J. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* **109**: 111 – 130, 1990.

SOARES, H.D.; CHEN, S.C.; MORGAN, J.I. Differential and prolonged expression of Fos-lacZ e Jun-lacZ in neurons, glia and muscle following sciatic nerve damage. *Exp. Neurol.* **167**: 1-14, 2001.

STANG, F. FANSA, H. WOLF, G. KEILHOFF, G. Collagen nerve conduits - - assessment of biocompatibility and axonal regeneration. *Biomed Mater. Eng.* **15** (1 – 2): 3 – 12, 2005.

STICHEL, CC. MÜLLER, HW. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* **294** (1): 1 – 9, 1998.

STOLL,G.; MÜLLER, H.W. Nerve injury axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* **9**: 313-325, 1999.

SUNADA, Y. BERNIER, SM. UTANI, A. YAMADA, Y. CAMPBELL, KP. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. *Hum Mol Genet.* **4** (6): 1055 – 1061, 1995.

TIMPL, R. ROHDE, H. ROBEY, PG. RENNARD, SI. FOIDART, JM. MARTIN, GR.
Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* **254** (19): 9933 – 9937,
1979.

TIMPL, R. BROWN, JC. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* **18**
(2): 123 – 132, 1996.

TUCKER, BA. RAHIMTULA, M. MEAROW, KM. Laminin and growth factor activation
stimulates differential growth responses in subpopulations of adult DRG neurons. *Eur. J.*
Neurosci. **24** (3): 676 – 690, 2006.

TURNEY, SG. BRIGMAN, PC. Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via
growth cone myosin II activity. *Nat. Neurosci.* **8** (6): 717 – 719, 2005

VAN DER KNAAP, MS. SMIT, LM. BARTH,PG. CATSMAN – BERREVOETS, CE.
BROUWER, OF. BERGEER, JH. de COO, IF. VALK, J. Magnetic resonance imaging in
classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities. *Ann Neurol.* **42**
(1): 50 – 59, 1997.

VLEGGERT – LANKAP, CL. VAN DER BERG, RJ. FEIRABEND, HK. LAKKE, EA.
MALESSY, MJ Electrophysiology and morphometry of the Aalpha- and Abeta-fiber
populations in the normal and regenerating rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* **187** (2): 337 –
349, 2004.

WALLGUIST, W. PLANTMAN, S. THAMS, S. THYBOLL, J. KORTESMAA, J.

LÄNNERGREN, J. DOMOGATSKAYA, A. OGREN, SO. RISLING, M.

HAMMARBERG, H. TRYGGVASON, K. CULLHEIN, S. Impeded interaction between Schwann cells and axons in the absence of laminin alpha 4. *J. Neurosci.* **25** (14): 3692 – 3700, 2005.

WANG, GY. HIRAI, K. SHIMADA, H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum – treated nerve grafts. *Brain Res.* **570**: 116 – 125, 1992.

WANG, S.; WAN, A.C.A.; XU, X.; GAO, S.; MAO, H.; LEONG, K.W.; YU, H. A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester). *Biomaterials.* **22**: 1157-1169, 2001.

WATCHMAKER, G.; MACKINNON, S.E. Nerve injury and repair. In: Peimer CA, editor. *Surgery of the hand and upper extremity*. New York: McGraw-Hill. 1251-1276, 1996.

WAXMAN, S.G.; GOCSIS, J.D.; STYS, P.K. *The Axon: structure, function, and pathophysiology*. New York: Oxford University Press Inc., 1995.

WEIDNER, N. BLESCH, A. GRILL, R.J. Nerve growth factor- hypersecreting schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate

central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of LI. *J. Comp. Neurol.* **413**: 495- 506, 1999.

WIBERG, M. TERENGI, G. Will it be possible to produce peripheral nerves? *Surg. Technol. Int.* **11**: 303 – 310, 2003.

WU, RR. COUCHMAN, JR. cDNA cloning of the basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan core protein, bamacan: a five domain structure including coiled-coil motifs. *J. Cell Biol.* **136** (2): 433 – 444, 1997.

YOSHII, S.; OKA, M. Peripheral nerve regeneration along collagen filaments . *Brain Res.* **888**: 158-162, 2001.

YU, WM. YU, H. CHEN, ZL. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol. Neurobiol.* **35** (3): 288 – 297, 2007.

YURCHENCO, PD. O'REAR, JJ. Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** (5): 674 – 681, 1994.

[HTTP://WWW.ICB.UFMG.BR/LPF/MATERIAL/COMO AS CELULAS SE COMUNICAM/KATZ.HTML](http://www.icb.ufmg.br/lpf/material/como_as_celulas_se_comunicam/katz.html), ACESSADO EM NOVEMBRO DE 2007.

[HTTP://SISTEMANERVOSO.COM/LIGADENEUROCIURURGIA](http://sistemanervoso.com/ligadeneurocirurgia), ACESSADO EM NOVEMBRO DE 2007.

[WWW.UPEI.CA/PATHCLUB/FIG13.JPG](http://www.upei.ca/pathclub/fig13.jpg), ACESSADO EM MARÇO DE 2007.

[WWW.CNPDA.COMIMAGESNERVE.GIF.GIF](http://www.cnpda.com/images/nerve.gif.gif), ACESSADO EM MARÇO DE 2007.

[WWW.CMPA.TCHE.BR/EDUCACIONAL/SECOES_ENSINO/SITE_SEC_C/NERVOS O.PPT](http://www.cmpa.tc.br/educacional/secoes_ensino/site_sec_c/nervos.o.ppt), ACESSADO EM FEVEREIRO DE 2007.

[WWW.MEDSCAPE.COM/VIEWARTICLE/48007-4](http://www.medscape.com/viewarticle/48007-4), ACESSADO EM FEVEREIRO DE 2007.

[WWW.STEVE.GB.COM/CONNECTIVETISSUE.PNG.PNG](http://www.steve.gb.com/connectivetissue.png.png), ACESSADO EM MARÇO DE 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)