

# ESTUDO SÔBRE O COMPORTAMENTO DA MIELINANA REGENERAÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS, ATRAVÉS DE ENXERTO NA MEDULA ESPINHAL DORSO-LOMBAR (no cão)\*

PAOLO CONTU

HUGO CAÑETE

A regeneração é, sem dúvida, um tema apaixonante que sempre atraiu a atenção dos pesquisadores, acumulando-se assim, ao longo dos últimos séculos, as informações que permitiram mais recentemente, a abordagem do complexo problema da regeneração do Sistema Nervoso Central.

As investigações neste sentido sofreram um grande incremento, a partir da Segunda Guerra Mundial, em virtude do aumento de indivíduos incapacitados por traumatismos raqui-medulares.

Os trabalhos de Windle e colaboradores comprovaram definitivamente que as fibras do Sistema Nervoso Central têm potencialidade regenerativa persistindo, entretanto, dúvidas quanto à capacidade destas fibras de se reorganizarem estruturalmente, permitindo a recuperação funcional do órgão.

Dentre os vários aspectos a serem considerados, em relação ao tema, resolvemos abordar o comportamento da mielina no Sistema Nervoso Central, sabendo-se que, a adequada mielinização é indispensável à recuperação funcional do nervo. Os estudos sôbre a mielinização do Sistema Nervoso Central são ainda bastante reduzidos e êste foi um dos motivos que nos levou a empreender a presente pesquisa.

Complementamos as observações realizadas por Contu, Krimberg e Saadi (1 e 2) sôbre parte do material por nós utilizado, permitindo uma correlação entre os achados por eles relatados sôbre o comportamento das fibras e os resultados por nós apresentados sôbre a mielinização.

## ANÁLISE DA LITERATURA

Após os trabalhos de Haighton (3) que pela primeira vez consegue obter regeneração nervosa e de Waller (4) que dá a primeira descrição detalhada sôbre o mecanismo da degeneração da fibra nervosa, Jastrowitz (5) observa a presença de gotículas lipídicas nas células gliais concluindo que a neuroglia toma parte no processo de mielinização da fi-

bra nervosa e Boll (6), o primeiro a preocupar-se com a mielogênese, creditou a origem da mielina aos grânulos lipídicos que encontrou na substância branca no período embrionário.

Mayer (7), Kühne (8), Wlassak (9), Nageotte (10), Renyi (11), Sokolanski (12), Bruno (13), Spiegel (14), Speidel (15, 16 e 17), Young (18), Bodian (19), Schwärzacher (20), Folch et coll. (21), Koenig (22), D'Iorio (23), Webster (24), Tomasch (25), Wolman (26), Adams et coll. (27) se ocupam de estudos de morfologia e biologia geral da mielina.

Vários pesquisadores se dedicaram a estudos da mielina na regeneração do sistema nervoso central e periférico.

Harrison (28) estudando a regeneração dos nervos da cauda do cão, observa que a formação da bainha da mielina requer algum tempo para se evidenciar.

Kirk e Lewis (29) no nervo ciático de cães verificaram o aparecimento de mielina em fibras neoformadas, seis semanas após a secção total do nervo, com mielinização progredindo em sentido próximo-distal.

Baldi (30) descrevendo as modificações da mielina no decurso da regeneração walleriana caracterizou o que chamava de «estudo pulverento anisotrópico» que sucede a fase de aparecimento dos cristais líquidos esferoidais com cruz de polarização.

Eveleth e Biester (31) estudando em porcos a relação entre a degeneração da bainha mielínica e a incoordenação muscular, observaram que alguns animais recuperando-se da incoordenação, ainda mostram degeneração da bainha mielínica, ao passo que a degeneração da mielina foi encontrada, sem incoordenação, em cães alimentados com vitaminas A, B, D e E.

Draganesco e Casangiu (32) estudando com a luz polarizada a desintegração e regeneração da bainha da mielina em nervos periféricos, observaram que o processo decorre segundo vários estágios, que podem ser acompanhados pelas modificações da birrefringência, com diminuição inicial por embebição, de á-

\* Trabalho realizado no Departamento de Neuro-Anatomia do Inst. Anat. F.M.P.A. com auxílio da Fundação Rockefeller e do Conselho Nacional de Pesquisas.

gua; já nas primeiras 24 horas após a secção do nervo à bainha no côto distal fragmenta-se em gotas e 20 dias após aparece o contorno birrefringente de algumas fibras em regeneração, bem evidente nos 65 dias, embora com diâmetro 10 a 15 vezes menor do que o das fibras normais.

Radhkrishna Rao (33) estudou em nervos ciáticos de cão a degeneração walleriana com o método da luz polarizada de Suttum e coll., observando as modificações sofridas pela mielina.

Rosebluet e Dempsey (34) estudando os nervos peroneiro e popliteo de gatos, quatro dias, após a secção do nervo ciático, observaram que a degeneração era mais marcada num dado tempo no côto central do que no periférico.

Weis (35) observou o restabelecimento funcional e histológico em nervos de gatos e macacos, com recuperação perfeita da bainha de mielina dentro do período de 3 a 6 meses: o mesmo autor (36) realizando estudos «in vitro» sobre a recuperação de nervos constatou que as células nutrem-se por difusão e migram segundo os princípios «of contact guidance».

Bensley (37) em nervos seccionados de rãs e ratos constatou que o primeiro fenômeno que ocorre é a embebição da mielina por fluídos com conseqüente estreitamento do axônio conseguindo reduzir a desintegração da mielina e do axônio colocando no local traumatizado uma substância higroscópica, a gelatina seca.

Weis e Taylor (38) constataram que as fibras nervosas em regeneração, quando submetidas à constrição localizada, ficam finas e fracamente mielinizadas em todos os níveis distais à constrição, atribuindo este efeito à supressão de uma contribuição do corpo celular essencial para o crescimento continuado do axônio.

Woolsey e outros (39) submeteram a um homoenxerto de medula, 47 dias após secção por ferimento com arma de fogo na região dorsal, um rapaz de 16 anos, que faleceu 4 meses após a cirurgia: o exame macroscópico revelou continuidade anatômica do segmento distal com o enxerto, comprovada também microscopicamente pela presença de um certo número de fibras novas não mielinizadas, invadindo o enxerto.

Guardiola (40) após seccionar a medula de patos submeteu o nervo peroneiro a axonotúesis realizando estudos histológicos dos nervos seccionados aos 45, 65, 100 e 180 dias, concluindo que a denervação central dos neurônios não exercia influência marcante sobre o grau de mielinização da fibra regenerada, quando comparada a um grupo de controle.

Lewis (41), tentando a explicação do fenômeno da regeneração do axônio, afirma a existência de uma camada superficial gelificada no axônio que seria menos resistente no côto em crescimento provocando uma expansão como um pseudopode amebóide.

Denny Brown (42) dá mais importância aos fibroblastos do perineuro e do epineuro na regeneração do nervo periférico, relegando a plano secundário os outros fatores.

Sanders e Whitteridge (43) esmagando o nervo peroneiro de coelhos observaram a velocidade de condução do nervo até 16 meses após a lesão inicial, concluindo que a velocidade de condução do estímulo nervoso guarda relação com a espessura da bainha mielinica, que nas fibras regeneradas no côto proximal é mais espessa do que as fibras normais, quando examinadas entre 2 e 5 meses após a lesão.

Clark e Clark (44) constataram a degeneração da mielina e o brotamento de novos axônios em nervos de mamíferos, após secção dentro de um período mínimo de 22 dias.

Löfstrom e Olivecrona (45) estudaram a formação da mielina em ratos observando que nos nervos frênicos em regeneração, após esmagamento ou secção, os primeiros lipídios apareciam orientados em forma de uma bainha lisa e contínua, localizada em torno do axônio e aparentemente induzida por ele.

Van Harreverd (46) demonstrou ser a bainha de mielina uma barreira à difusão do potássio.

Guardiola (47) estudando o nervo peroneiro de gato, após esmagamento, constatou que 100 dias depois do traumatismo a mielinização ainda não se havia refeito completamente.

Young (48) observou que a mielina e o axoplasma são deslocados ao longo do nervo e liquefazem-se quando um nervo é esmagado pelo forceps, retornando ao local primitivo uma vez desfeita a

pressão e retomando aspecto aparentemente normal pouco depois, aparecendo dentro de 24 a 48 horas modificações da mielina junto aos nódulos de Ranvier, iniciando-se a seguir a degeneração walleriana.

Mc Coll e Weston (49) estudaram, em gatos, a influência do acetato de cortisona na degeneração do nervo ciático submetido à secção constatando que este não altera o grau de decréscimo do edema nem a velocidade e a extensão da diminuição da concentração da mielina, ao passo que parece inibir a proliferação das células comumente vistas na degeneração. Além disso uma diminuição significativa da resistência à tensão dos nervos submetidos à secção como a capacidade da cortisona de inibir em doses de 7,5 mg dias a deposição do colágeno durante o processo degenerativo, enquanto Adams e coll. (50) administrando altas doses de pyromen a embriões de ratos e animais recém-nascidos, constataram não haver modificações na gliogênese normal.

Wolman (51) através de observações histológicas e histoquímicas, em ratos jovens, concluiu que, no estágio inicial de desmielinização, antes do aparecimento da coloração de Marchi, liberta-se do complexo mielínico um carboidrato, possivelmente ácido.

Wolman (52) estudando o processo de mielinização em ratos de 1 a 62 dias de vida, estabelece diferenciação nítida entre o processo de mielinização e desmielinização que ocorre na degeneração walleriana ao determinar a ausência do aparecimento dos compostos de Marchi, no processo normal de mielinização.

Gamble (53) mostra, através de suas verificações, que a temperatura de 35° a 37° C, no ponto onde se processa a regeneração, acelera a maturação das fibras neoformadas; isto foi constatado pela rapidez com que as fibras adquiriram sua bainha de mielina. Conclui aceitando ser razoável admitir que o nervo humano lesado responda ao calor, com uma aceleração de crescimento e de maturação das fibras regeneradas.

Noback, Thulin e Basset (54) relataram observações sobre a participação das células mesenquimais na regeneração das fibras nervosas após a retirada de um segmento de medula, e reunião entre os dois pontos, com uma membrana de Millipore. As primeiras células a

migrar para dentro da bainha de plástico são células mesenquimais da leptomeninge, nas 2 primeiras semanas. Durante as duas semanas seguintes, o coágulo formado é invadido por células hiperplásticas do endotélio e da adventícia dos vasos intramedulares. Estas células tomam a disposição da rede de fibrina e organizam o coágulo, formando vias pelas quais os axônios em regeneração penetram restabelecendo a continuidade com o côto oposto em 30 dias. Os fagócitos mononucleares que aparecem são de origem histiocitária e microglial. Os processos que ocorrem nos nervos periféricos, sob as mesmas condições, são muito semelhantes.

Robert (55) aponta como tipo padrão de desmielinização, a que ocorre na degeneração walleriana, ao abordar o problema das doenças desmielinizantes. Considera a possibilidade de produção experimental de moléstias desmielinizantes como o maior passo dado nos últimos 30 anos, permitindo o estudo e observação acurados do comportamento da mielina e suas relações com os histiócitos, macrofagos gordurosos e outros elementos celulares.

Shambaugh e Faith (56) determinaram em seus estudos sobre nervos periféricos que o processo de mielinização só é iniciado quando o axônio atinge determinada espessura; os fatos observados são sugestivos de que a espessura do axônio seria um fator básico a influenciar a mielinização.

Wolman e Wiener (57) verificaram em suas experiências sobre nervos transversalmente cortados, o efeito estabilizante dos cation sobre os elementos da bainha de mielina, tentando uma explicação baseada nos princípios de equilíbrio osmótico. Interessantes também os estudos sobre a regeneração na medula espinhal.

Migliavacca (58) concluiu que a regeneração funcional da medula espinhal é possível em mamíferos. Seus estudos foram efetuados sobre 24 fetos de camundongos e 38 animais recém-nascidos, comprovando em 2 deles regeneração anatômica e funcional, 15-20 dias após a secção completa da medula na região lombar.

Cramer e Alpers (59) estudando as fibras da medula espinhal submetida à hemissecção, constataram que as célu-

las gliais tanto meso como ectodermas foram agentes ativos no processo de fagocitose dos restos degenerativos da medula espinhal. A microglia e a oligodendroglia continuaram sua atividade até toda a mielina estar transformada em gordura.

Sugar e Gerard (60) comprovaram a recuperação anatômica e funcional da medula espinhal de ratos com 3 a 5 semanas.

Brown e Mc Couch (61) concluem que a regeneração não ocorre na medula espinhal, em virtude do bloqueio pelo tecido colágeno, que impede o crescimento e passagem do axônio.

Davidoff e Ransohoff (62) trabalhando com gatos tentaram sem resultado obter regeneração de medula espinhal.

Barnard e Carpenter (63) não conseguiram demonstrar capacidade regenerativa do S.N.C., em rato.

Windle e Chambers (64) obtiveram uma sensível redução da escara do tecido fibro-glial que forma-se entre as extremidades seccionadas da medula pela administração de pirogênio (polissacarídeo bacteriano). A redução da cicatriz acompanhou-se de regeneração das fibras nervosas, que alcançaram a extremidade oposta da medula em grande quantidade restabelecendo assim a unidade anatômica da medula. Não foi observada recuperação funcional até 59 dias após a lesão.

Freeman (65) seccionou a medula de 1750 ratos adultos dos quais 41 (3,5%) apresentaram recuperação funcional completa e cujas medulas microscopicamente revelaram continuidade dos axônios na área seccionada.

Windle, Clemente e outros (66) após extensivas experimentações sobre a regeneração da medula em animais, concluem que dois fatores são fundamentais para alcançar uma regeneração significativa das fibras medulares: proporcionar adequado contacto entre os dois côtos da medula, aproximando-os bem, para evitar a formação de cicatriz fibro-glial e combater o desenvolvimento desta cicatriz por meio da administração de PYROMEN (pirogênio).

Freeman e colaboradores (67) efetuaram a hemissecção da medula, em 79 cães adultos, tratando-os com tripsina, a fim de observar a recuperação anatômi-

ca e funcional dos animais. Após tratamento intensivo de 30 dias com a droga, sacrificou os animais entre 60 e 90 dias, notando que alguns mostraram já movimentos voluntários. Ao exame histológico observou-se a presença de feixes de fibras neoformadas, restabelecendo a continuidade anatômica da medula espinhal.

Noback, Basset e Campbell (68) observaram a presença de numerosos axônios regenerados unindo os dois extremos da medula espinhal, seccionada e enxertada com Millipore; 1 a 3 meses depois da secção apareceram numerosos os axônios linearmente arranjados. A pia-mater não invadiu o espaço entre os côtos, para firmar cicatriz, mas envolveu o tubo de Millipore.

Basset, Campbell e Hisby (69) empregando tubos de plástico Millipore, para formar uma ponte de união entre os dois extremos de nervos ou da medula, seccionados e submetidos à excisão de um pequeno segmento, obtiveram evidências de que tubos de plástico servem como suporte para a migração das células de origem leptomeníngea, que por sua vez orientam os axônios em crescimento, no sentido de encontrar a extremidade do segmento oposto.

Noback e outros (70) com o emprego de material plástico sintético poroso (MILLIPORE) como bainha ou luva na reconstrução de estruturas nervosas, observaram que o processo de regeneração é muito semelhante na medula e no nervo periférico.

Vários autores orientaram os seus estudos na análise do papel sustentado no processo de mielinização pela glia.

Hortega (71) relacionou a oligodendroglia com a mielinogênese apontando a proximidade dos oligodendrócitos da bainha de mielina, a maior concentração nas zonas de mielinização em decurso, com característico acúmulo de grânulos lipídicos, e a semelhança de posição e gênese destes com as células de Schwann como fatos que são sugestivos da participação da oligodendroglia na mielinização.

Alpers e Haymakers (72) em observações detalhadas de cérebros humanos prematuros, não só comprovaram a participação dos oligodendrócitos na mielinização, como levantaram a hipótese de

que também os astrócitos desempenham sua função neste processo.

Roback e Scherer (73) denominaram de «gliose» o aumento do número de células gliais que acompanha a mielinização, por eles observado e descrito.

Gutner (74) constatou a existência de um paralelismo entre o grau de mielinização e a função da fibra nervosa, em embriões humanos recém-nascidos e em animais de laboratório de várias idades.

Loretto (75) conclui haver uma analogia entre a célula de Schwann e as células oligodendróglia, pelas respectivas posições e relações com as fibras nervosas. Quanto à função mielogênica, insiste na presença de tipos schwanoídes na oligodendróglia, sobretudo no feto e no recém-nascido, que seriam elementos ativos no processo de mielinização.

Bairati (76) ao analisar as funções da neuroglia, cita entre outras a função mielogênica, baseando sua afirmativa em trabalhos de del Rio Hortega.

Bairati (77) apresenta seus trabalhos sobre as estruturas gliais do tecido nervoso e sua significação funcional; chama a atenção para o fato de que as fibras em mielinização são abraçadas por processos gliais;

Contu (78) nos seus estudos sobre a neuroglia dos mamíferos, parece aceitar a hipótese da função mielogênica, sustentada por del Rio Hortega e por Bairati.

Dekaban (79) apresenta suas observações sobre o processo de mielinização em coelhos, e possíveis relações com a oligodendróglia, que levaram-no à conclusão de que, não se pode estabelecer relação entre a quantidade de oligodendroglia e o processo normal de mielinização, ao passo que parece haver certa interdependência metabólica entre o axônio e a bainha de mielina.

Luse (80) estudou cortes de cérebro de ratos recém-nascidos, ao microscópio eletrônico, constatando que nos primeiros estágios de mielinização formam-se 2 a 4 lamelas de mielina que envolvem o axônio. Estas lâminas, segundo o autor, são formadas pelos processos gliais, em particular os da oligodendroglia.

Bunge e Bunge (81) em suas observações sobre a mielinização da medula espinhal, após secção completa, constatou relação dos oligodendrócitos com a mielogênese; os primeiros sinais de mieli-

zação surgiram aos 19 dias do post-operatório.

Hyden (82) apresenta seus estudos sobre as relações da glia com a célula nervosa, e baseado nos fatos, observados por ele, formula a hipótese de que a oligodendróglia funcionaria como um doador de energia para o neurônio, metabolizando substâncias até os últimos estágios, entregando-os ao neurônio que a degradaria até o final, fase em que ocorre a maior liberação de energia; não comenta detalhes acerca da mielinização.

Peters (83) relata suas observações sobre a gênese da mielina, mostrando, pela microscopia eletrônica, que no primeiro estágio a fibra nervosa é envolvida por um prolongamento glial, que forma um mesaxônio alongado em espiral que desaparece após a deposição da mielina. O autor sugere que os oligodendrócitos são células formadoras da mielina.

Benetato e outros (84) estudaram as relações entre a neuroglia e a desmielinização alérgica experimental em ratos.

Chevreau e Marty (85) acompanharam as modificações de densidade da neuróglia durante o processo de mielinização. Agruparam as variações em 3 estágios; no inicial há um grande aumento de células da neuróglia, ao qual sucede uma organização de células gliais acompanhada de deposição da mielina em torno do axônio. A última etapa é caracterizada por uma regressão do número de células gliais.

Lubinska (86) após produzir esmagamento em nervos periféricos, observa as modificações sofridas pelos envoltórios dos nervos, e sugere a existência de relações entre as células de Schwann e a mielinização;

Olhweiler (87) em estudos sobre a regeneração do nervo hipoglosso no cão, não nega o valor das células de Schwann na reconstituição da bainha da mielina.

Bunge, Bunge e Pappas (88) demonstraram pela primeira vez ao microscópio eletrônico, a existência de conexões entre as bainhas de mielina e as células gliais, no tecido nervoso central em desenvolvimento.

Queremos terminar esta revisão bibliográfica com Windle e outros (89) que reunidos em Bethesda, em 1954, discutiram exaustivamente o problema da regeneração no sistema nervoso central.

O processo de mielinização das fibras regeneradas não foi discutido em detalhes, mas Duncan salienta o fato de que as fibras neoformadas, apresentam uma bainha de mielina mais espessa do que as fibras normais. O mesmo autor chama ainda a atenção sobre as relações topográficas entre as células gliais e os acúmulos de mielina.

## II — MATERIAL E MÉTODOS

O material básico usado em nosso trabalho, constou de cortes histológicos da medula dorso-lombar de seis cães de idade adulta, cujos sexos são fornecidos na Tabela I. Consta, também, na Tabela I a indicação do número de dias decorridos entre a operação e o sacrifício dos cães.

| Cão nº | Sexo  | Pêso | Intervalo<br>operação/<br>sacrifício | Observações |
|--------|-------|------|--------------------------------------|-------------|
| 1      | fêmea | 12.0 | —                                    | —           |
| 2      | fêmea | 11.5 | 11 dias                              | —           |
| 3      | macho | 11.0 | —                                    | faleceu     |
| 4      | fêmea | 9.0  | 31 dias                              | —           |
| 5      | fêmea | 8.5  | —                                    | faleceu     |
| 6      | macho | 12.0 | 32 dias                              | —           |
| 7      | fêmea | 12.0 | —                                    | faleceu     |
| 8      | fêmea | 11.5 | 32 dias                              | —           |
| 9      | fêmea | 13.0 | —                                    | faleceu     |
| 10     | fêmea | 13.0 | 44 dias                              | —           |
| 11     | macho | 13.0 | —                                    | faleceu     |

Os cães de nº 4 a 11 foram operados pelo Dr. Manoel Krimberg e constituem o material analisado por Contu, Krimberg e Saadi (1 e 2).

O cão nº 1 foi sacrificado sem prévia intervenção, com a finalidade de utilizar sua medula dorso-lombar indene como controle.

Os cães nºs. 3, 5, 7 e 11 moreram algumas horas ou dias após a cirurgia, e

o nº 9 durante o ato operatório; sobre eles não foram realizadas observações.

Na medula dorso-lombar dos cães nºs. 2, 4, 6, 8 e 10, praticou-se secção completa com excisão de um segmento e colocação de enxerto cruzado, proveniente dos animais operados no mesmo dia.

A colocação de enxerto cruzado foi feita segundo o método abaixo descrito sumariamente:

1) Laminectomia em dois cães, anestesiados com 30 mg de tiobarbiturato, na região dorso-lombar e interessando duas ou três vértebras;

2) Secção de um segmento medular de 10 a 12 mm e sua substituição pelo segmento retirado do outro cão, respeitando a orientação anatômica, sem efetuar sutura da dura-mater, nem tampouco entre extremos do enxerto e os cotos medulares;

3) Fechamento dos planos musculares e sutura da pele com pontos contínuos.

No pós-operatório, os cães apresentaram paralisia flácida dos membros posteriores e incontinência esfinteriana. Durante as primeiras 72 horas, receberam tratamento de antibióticos (Tetraciclina IM-15mg/dia).

Os cães foram conservados no biotério da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre, sendo sacrificados nas datas acusadas na Tabela I, pelo método de fixação «in vivo».

A seguir, foi retirado o sistema nervoso central e colocado em formalina neutra a 10%, pelo período de 24 horas, sendo então destacado um segmento de medula, compreendendo os cotos proximal e distal e também o enxerto, por uma extensão de 20 mm.

Nos cães nºs. 1, 2, 4 e 6, a medula dorso-lombar foi seccionada longitudinal, praticando-se cortes longitudinais e transversais ao micrótomo de congelação, respectivamente em cada hemimedula e refixada em formol 10%.

As peças dos cães nºs. 8 e 10 foram incluídas em celoidina, segundo a técnica abaixo:

- 1 — Lavagem em água corrente por 24 horas;
- 2 — Lavagem rápida em água destilada e passagem em álcool;
- 3 — Passagem em álcool a 95° por 14 horas;
- 4 — Passagem em partes iguais de

- álcool absoluto e éter para análise, durante 2 a 3 horas;
- 5 — Passagem em celoidina a 2% durante 15 dias;
  - 6 — Passagem em celoidina a 4% durante 15 dias;
  - 7 — Passagem em celoidina a 8% durante 8 dias;
  - 8 — Inclusão em celoidina e cortes em congelação, refixados em formol a 10%.

Como método histológico foi usado o método de Lison-Dagnelie

- 1 — Fixação em formol neutro a 10%;
- 2 — Lavagem em água destilada;
- 3 — Cortes ao micrótomo de congelação;
- 4 — Colocação dos cortes em solução saturada de Sudan III, por 12 e 15 horas;
- 5 — Lavagem em água destilada e montagem em glicerina.

A especificidade dêste método para evidenciar a mielina, sua técnica de fácil execução e os bons resultados, tornam imprescindível o seu emprêgo no estudo da mielina, na regeneração no sistema nervoso central e periférico (Ohlweiler e Contu (90)). Foram utilizados também outros métodos, como complementares para as finalidades do nosso trabalho: o método de Del Rio-Hortega foi por nós empregado para observar as relações intercorrentes entre as células gliais e a mielina; o método de Cayal-De Castro, específico para as fibras nervosas e que oferece também a vantagem da seriação, foi usado com a finalidade de seguir tôda uma área medular enxertada no caso n° 4; o método de Bodian por sua propriedade de diferenciar as fibras nervosas da mielina foi utilizado segundo a técnica descrita por Contu e coll. (91); o método de hematxilina fêrrica, para observar a posição e distribuição das células gliais; o método de Bielschowsky para evidenciar fibras mielínicas e enfim o método de Mallory para identificar o tecido conjuntivo nas áreas de regeneração.

#### IV — OBSERVAÇÕES PESSOAIS

As descrições de nossas observações, obedecem a ordem de numeração dos

cães, fornecida na Tabela I, que é coincidente com a do número de dias de pós-operatório.

Adotamos, como referência principal de nossas descrições, os cordões anterior e posterior dos segmentos medulares em estudo, como demonstra a documentação fotográfica.

##### *Cão N° 1*

Os feixes de fibras são compactos, dispostas linearmente as fibras são distinguidas com clareza, tanto no corte longitudinal como transversal. Com o método de Lison-Dagnelie, destacam-se as bainhas de mielina, coradas em escuro, cujo contorno é regular, delimitando no seu interior linhas claras que correspondem ao axônio (fig. 1). Em algumas bainhas são visíveis as incisuras de Schmidt-Lantermann e os estrangulamentos de Ranvier. A mielina está distribuída somente nas bainhas, organizadas em placas imbricadas entre si.

Ao corte transversal, vemos anéis de mielina de diâmetro variável, delimitando os axônios (fig. 1 A e B).

As células gliais estão dispostas em posição perimielínica, ao longo das fibras e nos septos medulares.

##### *Cão N° 2*

Observamos com pequeno aumento, que a área do enxerto aparece estreitada e afunilada, sendo grande a quantidade de tecido conjuntivo e células gliais nêste local (fig. 2 A e D). Na porção anterior da medula vemos um feixe de fibras que transpõe, sem dificuldade, o tecido conjuntivo-glial e estabelece conexão entre os dois cotos medulares, passando por baixo do enxerto, que sofreu um deslocamento no sentido ântero-posterior.

Em tôda a região próxima ao enxerto, na periferia dos côtos medulares há intensa proliferação de células gliais. Observando as extremidades medulares, notamos a presença de bolas e fusos de mielina, de grande diâmetro e de pequenas granulações da mesma substância espalhadas difusamente entre as fibras e células (fig. 2 B e C). Em algumas áreas, temos a impressão de que estas formações de mielina obedecem a orientação das fibras, dispondo-se ao longo de

seu trajeto. As células gliais e alguns macrófagos, agrupam-se em torno destas formações fagocitando a mielina (fig. 2 C). É bastante nítida a redução de tamanho das células.

Tanto no coto proximal como no distal, as fibras estão intumescidas, com o contorno irregular, e de suas superfícies desprendem-se placas de mielina.

#### *Cão Nº 4*

Alguns feixes de fibras regeneradas, sem bainha mielínica, atingem o enxerto e penetram no seu interior seguindo um trajeto tortuoso. Estas fibras cruzam a faixa de tecido conjuntivo, verificando-se que, a partir deste ponto, não há sinais de mielinização das fibras.

Os segmentos das fibras regeneradas, situados nos cotos proximal e distal da medula, mostram depósitos de mielina punctiformes e em placas na sua superfície e isto é particularmente mais visível nos axônios calibrosos (fig. 3 A). Este início de mielinização, envolve um maior número de fibras nas áreas mais afastadas do enxerto.

Ao longo das fibras se notam aglomerados de glóbulos e granulações de mielina, algumas com grande tamanho (fig. 3 B).

Nos dois côtos, existem zonas estendendo-se em faixas longitudinais, caracterizadas pela presença de grandes vácuos claros, formações mielínicas, células gliais e macrófagos e pela ausência de fibras. As células nestas regiões formam ninos e apresentam inclusões de mielina em seu citoplasma. As células gliais, de pequeno tamanho, destituídas de prolongamentos e de formato arredondado, agrupam-se nos pontos em que há maior quantidade de mielina.

#### *Cão Nº 6*

Na área de junção do enxerto com os cotos medulares há intensa proliferação conjuntivo-glial, formando uma densa faixa.

A periferia dos extremos medulares está carregada de pequenas células gliais, em meio às fibras. Os grânulos de mielina são raros e as células gliais contêm poucas inclusões (fig. 4).

Entre as fibras que vão em direção ao enxerto existem formações mielínicas (fig. 4 A e B) rarefeitas a partir do pon-

to em que o tecido conjuntivo estrangula as fibras. Notam-se, em alguns pontos, bolas e fusos de mielina de grande tamanho (fig. 4 C), cercadas por células gliais e macrófagos, que contêm granulações de mielina em seu citoplasma.

As células gliais apresentam identidade morfológica com as dos casos anteriores.

#### *Cão nº 8*

As porções adjacentes ao enxerto caracterizam-se pela presença de faixas de tecido conjuntivo-glial, que funcionam como obstáculo à passagem das fibras. Muitas fibras ultrapassam este obstáculo, penetrando no interior do enxerto, apresentando esboços de mielinização (fig. 5 A).

As zonas de vacuolização e gliose, descritas nos casos precedentes, são também visíveis aqui.

A mielina dispõe-se em bolas e fusos de grande diâmetro, e em granulações finas e difusas, entre as fibras. Em torno destas formações, as células gliais e macrófagos se dispõem em arranjos densos, fagocitando a mielina. Ao longo das fibras, em processo de mielinização, observamos as células gliais, de pequeno tamanho, dispostas em arranjos lineares ao longo das fibras.

Junto ao grupo de fibras que se mostram mielinizadas as formações mielínicas livres são menos visíveis. (fig. 5 B).

#### *Cão Nº 10*

Entre as superfícies de aproximação dos cotos medulares e do enxerto visualizamos tecido conjuntivo denso, com predomínio de fibras conjuntivas sobre os elementos celulares. Não há sinais de mielina neste tecido. Muitas fibras avançam em direção ao enxerto, por um trajeto tortuoso, através do tecido conjuntivo, penetrando na sua intimidade.

As fibras regeneradas são de diversos calibres, as finas mostram deposição de pequenas placas de mielina em sua superfície; as mais calibrosas encontram-se em fase mais adiantada de regeneração, vendo-se placas coalescentes entre si, sobre a sua superfície (fig. 6 A e B).

Junto as fibras regeneradas vêm-se arranjos lineares de pequenas células gliais, que contêm maior quantidade de grânulos de mielina em seu interior nas

zonas onde as fibras estão menos mielinizadas (fig. 6 C). As bolas e os fusos de mielina são menos encontradiças nas zonas onde as fibras estão providas de depósitos de mielina mais densa.

#### IV — CONSIDERAÇÕES

Reconhecendo que o material apresentado é sem dúvida numericamente pequeno, no entanto, frente aos resultados obtidos, julgamos serem eles merecedores de uma análise bastante minuciosa.

A medula do cão nº 9 foi desprezada em virtude do óbito do animal no trans-operatório e as dos cães ns. 3, 5, 7 e 11, não foram incluídas nos estudos histológicos, porque as comunicações de morte dos animais ocorreram em tempo muito tardio, quando, certamente, já teriam se processado modificações «post-mortem» nos tecidos.

Achamos que a mortalidade de 45,5%, neste grupo de cães, representa um obstáculo, em nosso meio, às pesquisas deste gênero. Apesar de nossa restrita participação na parte cirúrgica, somos de opinião que cuidados mais acurados no trans-operatório, entre os quais destacamos a reposição de perdas sanguíneas, reduziriam em muito esta mortalidade.

Outro comentário indispensável, deve ser feito sobre os métodos histológicos. O método de Marchi oferece os melhores resultados para o estudo da mielina, mas o custo proibitivo do ácido ôsmico, componente básico do método, impede o seu emprêgo. Escolhemos o método de Lison-Dagnelie como substitutivo para o de Marchi, por apresentar seletividade para a mielina e ser de fácil execução. Realmente, ele nos permite observar com clareza a mielina e também suas relações com as células gliais. Os métodos de Mallory e da Hematoxilina férrica foram utilizados como auxiliares, para a orientação topográfica nos cortes.

Os métodos de impregnação argêntica, além de cumprirem suas finalidades na evidenciação das células e fibras nervosas e gliais, foram de utilidade na identificação das relações da mielina com as células gliais. Podemos, com segurança, afirmar que algumas imagens, obtidas com o método de Bodian, podem ser consideradas como as melhores que obtivemos. No entanto, estes métodos de im-

pregnação pela prata são de difícil realização, o que limita sua aplicação.

Antes de iniciar os comentários sobre as observações, necessitamos esclarecer que o termo glia, células gliais ou ainda, elementos gliais foi empregado por nós, para designar somente as células gliais de origem ectodérmica constituintes da macroglia. As células da microglia transformam-se em macrófagos, durante o processo regenerativo, sendo designadas com este termo.

Um comentário complementar significativo, refere-se à constatação do feixe de fibras conectando os extremos medulares no cão nº 2, sacrificado no 10º dia do post-operatório. Excluímos a possibilidade de que estas fibras tenham ficado intactas, pois, tivemos cuidado ao visualizar os côtos medulares e assegurar-nos da completa secção dos feixes antes da colocação do enxerto.

Resta-nos, portanto, admitir, que são fibras regeneradas. Examinamos com atenção a peça anatômica e não encontramos na superfície medular nenhum feixe com posição anômala que justificasse a possibilidade de se tratar de fibras regeneradas a partir das raízes nervosas àquele nível. Somos levados assim a aceitar serem estas fibras nervosas regeneradas, constituintes, provavelmente do cordão anterior da medula.

Uma regeneração em tão curto prazo, encontra similar só em nervos periféricos, segundo Perroncito (92), que constatou evidências de regeneração em períodos de 3 horas após a secção de nervos. cremos, também que a contigüidade das fibras neoformadas com a pia-mater, estrutura ricamente vascularizada pode ser apontada como fator determinante na sua rápida regeneração, que contribuiu ainda na orientação das fibras, para o estabelecimento da conexão entre os dois extremos medulares. Recordamos aqui, a teoria dos organizadores aplicada à Embriologia e à Biologia Geral.

O primeiro ponto, a comentar sobre o comportamento da mielina na regeneração das fibras nervosas centrais, refere-se à sua origem. Nossas observações pessoais, permitem formular o conceito, de que a mielina constituinte das bainhas das fibras regeneradas tem sua origem nos componentes da mielina das bainhas das fibras seccionadas. Dizem nos com-

ponentes, porque as placas, que se desprendem das fibras seccionadas sofrem modificações morfológicas, constituindo as bolas e granulações livres ou fagocitadas pelas células gliais.

As modificações morfológicas acompanham-se de alterações das propriedades tintoriais da mielina que são interpretadas por Levi (93) como evidência de transformação química da mielina. Outra constatação, sobre a qual baseamos o conceito emitido, é o paralelismo observado, entre a crescente deposição da mielina em torno das fibras e a diminuição gradual das bolas e granulações de mielina. Esta relação foi observada tanto cronológica (em cães sacrificados em diferentes tempos) como topograficamente (em diferentes zonas de um mesmo corte).

Estes dados são, no entanto, insuficientes para permitir a transformação do conceito em afirmação. Vários passos do processo ficam a descoberto de uma comprovação objetiva. Julgamos, que a realização de um estudo com mielina marcada, forneceria informações de valor no esclarecimento deste ponto.

Sabemos que a mobilização da mielina nos nervos periféricos é feita pelas células de Schwann, de acordo com os trabalhos de SHAMBAUGH e FAITH (56), WEISS (38), LUSE (80), WOLMAN (51) e PETERS (83).

Muitos autores entre os quais LORETI (75), afirmam que o oligodendrócito é, no Sistema Nervoso Central o equivalente da célula de Schwann, desempenhando, entre outras, a função de mobilização da mielina.

Os fatos por nós observados, permitem apenas dizer, que, as células gliais de um modo geral, participam do processo em análise. Os fatos colhidos são: a formação de aglomerados e ninhos destas células em torno das bolas e granulações de mielina, a presença de grânulos de inclusão mielínica em seu citoplasma e a disposição linear ao longo das fibras nervosas, este último fato mais evidente no cão n° 4. Dizemos que todas as células gliais participam deste processo porque observamos já aos 10 dias após a secção das fibras que, estes elementos, apresentavam-se reduzidos de tamanho e em grande número, nos côtos medulares, achado este constante em todos os casos. Estas pequenas células examinadas com

métodos de impregnação argêntica revelaram alteração morfológica, que consistia basicamente na perda de suas fibras, na diminuição de seu tamanho (já referido) e na adoção de forma globóide.

Consideramos estas alterações como decorrência da multiplicação das células gliais, podendo ser estendidas a todos os casos embora só tenham sido constatadas nos cães n°s. 4, 6 e 10. Devido a esta morfologia incaracterística das células gliais, tornou-se impraticável a identificação dos oligodendrócitos, daí a afirmação de que todas as células da macróglia participam na mobilização da mielina.

As células micróglia de acordo com GLEES (94) transformam-se em macrófagos, cuja presença foi constatado nos casos por nós examinados.

A participação destes elementos no processo em foco nos parece limitada em função da reduzida frequência destes elementos, motivo pelo qual deixamos este ponto para ser desenvolvido em trabalhos ulteriores.

Ficamos assim inclinados a aceitar que todas as células da macróglia participam na mobilização da mielina, impressão que é revigorada pela constatação da presença da inclusão de mielina em quase todas as células gliais observadas nos cães ns. 2, 4, 6, 8 e 10.

O terceiro ponto, que vamos considerar é o problema da deposição da mielina em torno das fibras para constituir o arranjo, denominado como bainha mielínica.

Observamos, no material examinado, a deposição gradual da mielina, formando pequenos pontos na superfície da fibra, encontrando-se em estágio ulterior, sob a forma de placas coalescentes, que, de acordo com as observações de SHAMBAUGH e FAITH (56) vão formar as placas definitivas, constituintes da bainha de mielina completa.

Constatamos também que os axônios mais calibrosos apresentam depósitos mais consistentes de mielina em sua superfície, evidenciando início de mielinização em estágio precoce. Este fato é coincidente com as observações realizadas por SHAMBAUGH e FAITH (56).

A inquirição crucial que se impõe em relação ao assunto é a de saber qual o elemento responsável pela deposição de mielina na superfície da fibra regenerada.

Três são as teorias propostas para explicar este processo. LÖFSTROM e OLIVECRONA (45), CAJAL (95) e HILD (96) apontam o axônio em si, como o único elemento implicado na formação da bainha mielínica. BUNGE, BUNGE e PAPPAS (88), PETERS (83), CONTU (78), BAIRATI (76) e LUSE (80) por outro lado, negam a hipótese anterior e reivindicam para os oligodendrócitos, a responsabilidade de tal tarefa.

Em posição intermediária DEKABAN (79), AREY (97) e OUTROS AUTORES mostram-se mais ecléticos, defendendo a participação dos dois elementos: axônio e oligodendrócito na deposição da mielina em torno da fibra. No entanto, nenhum dos defensores destas teorias possui fatos suficientes para comprová-los.

Em nossas observações, chamou-nos a atenção a disposição das células gliais junto das fibras, em arranjos lineares, bem como o fato de que as inclusões de mielina no citoplasma das células gliais torna-se menos evidente à medida em que a mielinização progride.

A constatação de uma relação entre o diâmetro do axônio e o início e a intensidade da mielinização nos inclinam a admitir a última teoria acima representada como a mais provável para explicar o processo, ressalvada a participação do oligodendrócito que, substituímos pelas células da macróglia conforme discussão anterior.

## V — CONCLUSÕES

Baseado nos fatos por nós observados na medula dorso-lombar de 5 cães, submetidos a enxertos cruzados homólogos, utilizando métodos histológicos, chegamos às conclusões:

1 — Para a realização de estudos sobre a mielina, o método de Lison-Dagnelie, por sua simplicidade técnica e alta especificidade para a mielina oferece informações altamente satisfatórias, quando complementado por métodos auxiliares como o de Mallory e da Hematoxilina férrica.

2 — Dez dias após a secção de fibras da medula dorso lombar de cães, podem ser evidenciados crescimento e indícios de mielinização dos axônios, em regeneração.

3 — A mielina livre ou englobada pe-

los elementos celulares (macróglia e Macrófagos) diminui nos tecidos nervosos à medida que aumentam os depósitos de mielina sobre os axônios em regeneração na medula espinal do cão.

4 — As células da macróglia, parecem ter uma participação no processo de mobilização da mielina livre na regeneração das fibras da medula espinal.

5 — Tanto os axônios como os elementos macrogliais, parecem ter participação no processo de formação da bainha de mielina das fibras em regeneração na medula espinal do cão.

6 — Em vista da complexidade e importância do assunto, aconselhamos a realização de estudos mais aprofundados propiciando um conhecimento mais completo acerca da mielinização das fibras do Sistema Nervoso Central.

## SUMMARY

Based upon the facts observed in the dorso-lumbar spinal cord of five dogs, in which were realized crossed homografts, using histological methods, the authors conclude:

1. In studying myelin formations, the Lison-Dagnelie's method offers highly satisfactory informations, that become more complete in using complementary methods, (Mallory and F.H. methods).
2. Ten days after the transection of the spinal cord it could be seen evidence of growing and sign of myelinization of the regenerating axons of the spinal cord of dogs.
3. The free myelin or that existing into the cells (macroglia and macrophages) gradually disappears being this movement parallel to the increasing of the myelin formation around the regenerating axons.
4. The macroglial cells seem to have some kind of function in the process of myelin sheath formation of the regenerating axons.
5. The axons and macroglial cells seem to be involved in the myelin sheath formation of the regenerating fibers of spinal cord.
6. Because of the complexity and importance of this matter we advise more and more studies to take deeper informations about the myelinizations in the Central Nervous System.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — KRIMBERG; M. CONTU, P.; SAADI, T.: Pesquisas sobre enxertos de sistema nervoso central (no cão) 1. Observações morfológicas sobre enxertos na medula espinal dorso lombar.

- 2 — CONTU, P.; KRIMBERG, M.; SAADI, T.: Pesquisas sôbre enxêrto de sistema nervoso central (no cão) — 2. Observações morfológicas sôbre a regeneração de fibras, através de enxêrtos na medula espinhal dorso-lombar. *Arq. Inst. Anat.* Vol. V. 1962.
- 3 — HAIGHTON (1795) — Citado em GLEES.
- 4 — WALLER, A.: Degeneration et regeneration des nerfs. *Müller's Arch.* 1852.
- 5 — JASTROWITZ — Encephalitis und Myelitis des ersten Kinderalters. — Citado em Glees.
- 6 — BOLL, G.: Die histologie und histogenese der Nervösen Zentralorgan. citado em Glees.
- 7 — MAYER, S.: Regeneration des nerfs. *Med. Wochenschr. Prague* 1879. citado em Waller.
- 8 — KUHNE — Conduction dans les deux sens. *Zeitsch. für biol.* 1885. citado em Waller.
- 9 — WLASSAK, R.: Die Herkunft des Myelins. *Arch. F. Entwcklgs-mech* - 6:453-493, 1898, citado em Glees.
- 10 — NAGEOTTE, J.: Sur la structure microscopique et moleculaire des formations myéliniques. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 185 (20): 1021-1023, 1927. *Resumo do Biological Abstracts.*
- 11 — RENYL, G.: The structure of cells in tissues as revealed by micro-dissectio, III. Observations on the sheaths of myelinated nerve fibers of the frog *Jour. Comp. Neurol.* 48 (2): 293-310, 1929. *Resumo do Biological Abstracts.*
- 12 — SOKOLANSKI, G.: Die Morphogenese der Marksheide der peripherischen Nervenfasern bei manchen Wirbeltieren und beim Menschen. *Anat. Anz* 69 (7/12:161-184 — 1930). *Resumo do Biological Abstracts.*
- 13 — BRUNO, G.: Sulla struttura e su alcune proprietà fisiche della fibra nervosa midollata. *Arch. Ital. Anat. e Embriol.* 29 (1): 1-15 — 1931. *Resumo do Biological Abstracts.*
- 14 — SPIEGEL, E.A.: Die physikalischen Veränd der Marksheide in beginne der Waller'schen degeneration — 1922 — Citado em Dragnesco e Casangiu.
- 15 — SPEIDEL, C.C.: Studiens of living nerves. I. The movements of individual sheath cells and nerves spronts correlated with the process of myelin-sheath formation in amphibian larvae. *Jour. Exp. Zool.* 61 (2): 279-314 — 1932. *Resumo do Biological Abstracts.*
- 16 — SPEIDEL, C.C.: Nerve regeneration and readjustment as revealed by prolonged observation of individual fibres in living frog tadpoles. *Anat. Rec. (Supl. 1)* 52: 36 — 1932.
- 17 — SPEIDEL, C.C.: Studiens in living nerves. IV Growth, Regeneration and myelination of the peripheral nerves in salamanders. *Biol. Bull.* 68:140-161, 1935. citado em Ranson Clark.
- 18 — YOUNG, J.Z.: Structure, degeneration and repair of nerve fibers. *Nature (London)* 156 (3953): 132-136, 1945.
- 19 — BODIAN, D.: Note on Nodes of Ranvier in the Central Nervous System. *J. Comp. Neurol.* 94: 475-478, 1951. citado em Ranson, Clark.
- 20 — SCHWARZACHER, H.G. - Markscheidendicke und Aschsenzyylinder durchmesser in peripheren menschlichen Nerven. *Acta Anat.* 21(1):26, 1954.
- 21 — FOLCH, J.; CASALS, J.; POPE, A.; MEATH, J.S.; LEBARON, F.N. and LEES, M.: Chemistry of myelin development. *Progr. Neurobiol.* 4:122-137, 1959.
- 22 — KOENIG, H.: The proteolipide nature of the neurokeratin network and its tinctorial properties. *A. A. A.* — April, 1, 2, 3, 1959 — pág. 299.
- 23 — D'IORIO, A.U.: La biochimie de la myéline. *Union Med. Canadâ* 90(8): 834-836 — 1961.
- 24 — WEBSTER, G.R.: Some aspects of lipid metabolism in nervous tissue. *Intern. Rev. Neurobiol.* 3: 293-317, 1961.
- 25 — TOMASCH, J.: Dietary factors and nerve fiber myelination. *Jour. Anat.* 95 (2):180-190, 1961. *Resumo do Biological Abstracts* 36 — n° 59530

- 26 — WOLMAN, M.: Extraction of complexes from central and peripheral myelin of man. *Jour. Neurochem.* 9(1/2): 59-62, 1962. Resumo do Biol. Abstr.
- 27 — ADAMS, C.W.M.; DAVIDSON, A.N. and GREGSON, N.A.; Enzyme inactivity of Myelin: histochemical and biochemical evidence. *Jour. Neurochem.* 10 (6): 383-395, 1963.
- 28 — HARRISON, R.G.: Regeneration of peripheral Nerves. *Anat. Rec.* — 1209 — 1908.
- 29 — KIRK, E.G. and LEWIS, D.D.: Studies in peripheral nerve regeneration. *Anat. Rec.* — 10:216-1916.
- 30 — BALDI, F.: Ricerche sulla degenerazione walleriana. *Riv. di Neurologia fasc.* 1 — 1929 citado em Draganesco e Casangiu.
- 31 — EVELETH, D.P. and BIESTER: The significance of myelin sheath degeneration and its relation to incoordination. *Amer. Jour. Path.* 13(2): 257-266, 1937.
- 32 — DRAGANESO, S. et CASANGIU, D.: Étude sur la biréfringence dans les phénomènes de dégénérescence et régénérescence des nerfs périphériques au cours des lésions expérimentales et de Pathologie Humaine. *Arch. Roum. de Pathol. Exper.* 11 (1): 103-123, 1938.
- 33 — RADHAKRISHNA RAO, M.V.: Study myelin degeneration in polarized light. *Indian Jour. Med. Res.* 26 (1): 103-106, 1938.
- 34 — ROSENBLUET, A. and DEMPSEY, E.W. A study of Wallerian degeneration. *Amer. Jour. Physiol.* 128 (1): 19-30, 1939.
- 35 — WEISS, P.: Nerve patterns: The mechanics of nerve growth. *Growth*, (suppl. 3) 5:163-203, 1941. Citado em Basset, C.A.; Campbell, J. and Husby, J.
- 36 — WEISS, P.: Functional regeneration through frozen doied nerve grafts in cats and monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 54: 277, 1943.
- 37 — BENSLEY, S.H.: Cytological studies of the reaction of the nerve. *Anat. Rec.* 90 (1): 1-13, 1944.
- 38 — WEIS, P. and TAYLOR, C.A.: Impairment of growth and myelization in regenerating nerve fibers subject of construction. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 55 (1): 77-80, 1944
- 39 — WOOLSEY, D.: Minckler, J.; REZENDE, N. and KLEMME, R.: Human Spinal Cord Transplant. *Exp. Med. and Surgery* 2 (2): 93-101, 1944.
- 40 — FERNANDEZ GUARDIOLA, A.: Regeneración nerviosa periférica en el animal espinal II. *Bol. Inst. Est. Med. Biol.* 48-59, 1945.
- 41 — LEWIS, W.H.: Axon growth and regeneration. *Anat. Rec.* 91; 287, 1945.
- 42 — DENNY BROWN, D.: Importance of neural fibroblasts in the regeneration of nerve. *Arch. Neurol. Psychiat.* 55(3): 171-215, 1946.
- 43 — SANDERS, F.K. and WHITERIDGE, D.: Conduction velocity and myelin thickness in regenerating nerve fibers. *J. Phsycol.* 105:152, 1946.
- 44 — CLARK, E.R. and CLARK, E. L.: Microscopic studies on the regeneration of medullated nerves in the living mammal. *Amer. Jour. Anat.* 81 (2):233-262, 1947.
- 45 — LOFSTROM, B. and OLIVECRONA, H. Studies on the submicroscopical struture of the nerve fibre — 1. The orientation of proteins in the Schwann plasmodium degeneration, and the earliest Myelin formation during regeneration. *Acta. Anat.* 3 (2): 97-108, 1947.
- 46 — VAN HARREVELD, A. The Potassium permeability of the myelin sheath of a vertebrate nerve. *J. Cell. Comp. Physiol.* 35:331-340, 1950.
- 47 — FERNANDEZ GUARDIOLA, A.: Regeneración nerviosa periférica en el espina. *Bol. Inst. Estud. Med. e Biol.* 9 (1/3): 51-59, 1951.
- 48 — YOUNG, J.Z.: Early changes in degenerating mammalian nerves. *Proc. Roy. Soc. Ser. B: Biol. Sci.* 139 (897): 597-609, 1952.
- 49 — Mc. CODL, J. D. and Weston, J. K.: The effect of cortisone on peripheral nerve during Wallerian degeneration. *Rev. Canadiene biol.* 12(1): 68-76, 1953 .

- 50 — ADAMS, J. E.; KOHN, H. and MALMUD, N.: Treated rat embryos and Central Nerves System gliogenesis in Piromen. *Science* 119 (3092): 438-439, 1954.
- 51 — WOLMAN, M.: Study of the early changes occurring in degenerating myelin. *Neurology* 6(9): 636-639, 1956.
- 52 — WOLMAN, M.: Histochemical study of myelinization in the rat. *Bull. Res. Counc. Israel Sect. E.* 163-167, 1957.
- 53 — GAMBLE, H.J.: Effect of raised peripheral temperature upon the rate of regeneration in a mammalian peripheral nerve. *Nature* 181:287, 1958.
- 54 — NOBACK, C.R.; BASSET, C.A. and CAMPBELL, J.B.: Regeneration of axons a cross gaps in the transected spinal cords of adult cats. *A.A.A.* — 1958 April — pág. 349 Abstrat 3
- 55 — ROBERTIS, E. de; GERSHENFELD, H.M. and WALD, F.: Submicroscopic analysis of myelination in the Central Nervous System. *Anat. Rec.* 130 (2): 292, 1958.
- 56 — SHAMBAUG, G. Jr. and FAITHORR, M.: The problem of regenerating nerves as studied in tissue culture. *Ann. Otol. Rhinol. and Laringol.* 72(4): 1124-1134, 1963.
- 57 — WOLMANN, M. and WIENER, H.: Influence of calcium ions is stabilizing the structure of the myelin sheath *Bull. Res. Counc. Israel.* II (4): 297-301, 1963.
- 58 — MIGLIAVACCA, A.: La rigenerazione del midollo spinale nei feti e e nei neonati. *Boll. Med. — Chir. Pavia* 42(6): 1147-1151, 1928. *Resumo do Biological Abstracts.*
- 59 — CRAMER, F. and ALPERS, B. J.: The functions of glia in secondary degeneration of the spinal cord: the oligodendroglia as phagocytes. *Arch. Path.* 13(1): 23-55, 1932. *Resumo do Biological Abstracts.*
- 60 — SUGAR, O. and GERARD, R. W.: Spinal cord regeneration in the rat. *J. Neurophysiol.* 3:1-19, 1940. *Citado em Scot, D. Jr. and Clemente., C.*
- 61 — BROWN, O. J. and Mc. COUCH, G. P. Abortive regeneration of the transected spinal cord. *J. Comp. Neurol.* v. 87(2): 131-138, 1947.
- 62 — DAVIDOFF, L.M.: and RASO-NHOFF, J.: Absence of spinal cord regeneration in the cat. *Jour. Neurophis.* 11 (1): 9-11, 1948.
- 63 — BARNARD, J. and CARPENTER, W.: Lack of regeneration in the spinal cord of the rat. *J. Neurophysiol.* 13: 223-228, 1950.
- 64 — WINDLE, W. and CHAMBERS, W.: Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *Jour. Comp. Neurol.* 93 (2): 241, 257, 1950.
- 65 — FREEMAN, L.W.: Return of function after complete transection of the spinal cord in rat, cat and dog. *Ann. Surg.* 136: 193-205, 1952.
- 66 — WINDLE, W. CLEMENTE, C. SCOTT, D. Jr. and CHAMBERS, W.W.: Induction of neuronal-regeneration in the Central Nervous System of animals. *Translactions — Amer. Neurological Assoc.* — 1952.
- 67 — FREEMAN, I.W.; Mc. DOUGALL, J.; TURBES, C.C. and BOWMAN, D.E.: The treatment of experimental lesions of the spinal cord of dogs with trypsin (de fotocópia) — 1958.
- 68 — NOBACK, C.R.; BASSET, C.A. and CAMPBELL, J.B.: Regeneration of axons across gaps in the transected spinal cords of adult cats. *A.A.A.* — 1958 April — pág. 349 Abstrat 3
- 69 — BASSET, C.A.L.; CAMPBELL, J. and HUSBY, J.: Peripheral nerve and spinal cord regenerations: Factor leading to success of tubulation technique employing MILIPORE. *Exp. Neurol.* 1: 386-406, 1959.
- 70 — NOBACK, C.R.; BASSET, C.A. L.; THULIN, C.A.; HUSBY, J. and CAMPBELL, J.: Cytological similarity in regeneration across gaps in the adult feline spinal-cord and peripheral nerve. *Amer. Assoc. Anat.* 1, 2, 3: 317, 1959.
- 71 — HORTEGA, P. Del Rio: Tercera aportación al conocimiento morfológico y interpetation funcional de la oligodendroglia. *Mem. Real.*

- Soc. Esp. de Hist. Nat.: 14-5, 1928. Citado em Gless.
- 72 — ALPERS, B. J. and HAYMAKERS, W.: The participation of the neuroglia in the formation of mielin in the prenatal infantile brain. *Brain* 57: 195-205 — 1934. citado em Gless, P.
- 73 — ROBACK, H.N. et SCHERER, H.J. — *Virchoys Arch. Path. Anat.* 294: 365-413, 1935. Citado em Chevreau, J. et Marty, R.
- 74 — GUTNER, I.I. — *Über die entwicklung der perpherischen markaltingen nerven fasern. Zeitschr. Zellforsch. U. Mikrosk. Anat.* 25 (2): 259-282, 1936. Resumo do Biological Abstracts.
- 75 — LORETI, F.: Configurazione dell'oligodendroglia interfascicolare e sua omologia colla cellula dello Schwann. *Riv. Pat. Nerv. e Ment.* 52:135, 1938.
- 76 — BAIRATI, A. Osservazioni compa rate sulla glioarquitettonica. Memoria di Angelo Bairati, 1950.
- 77 — BAIRATI, A.: Appunti sulla glioarquitettonica del nevrasso del uomo. *Monitore Zool. Ital.* 57 (suppl.): 101-113, 1950.
- 78 — CONTU, P.: Ricerche sulla glioarquitettonica dei vertebrati: Mammiferi. *Arch. Ital. di Anat. e Embr.* Vol. LIX, 1:41, 1953.
- 79 — DEKABAN, A. Oligodendroglia and axis cylinders in rabbits before, during and after myelinization. *Anat. Rec.* 126(1): 111-122, 1956.
- 80 — LUSE, S.A.: Formation of myelin in the Central Nervous System of mice and cats, as studied with the electron microscope. *Journ. Biophys. and Biochem. Cytol.* 2 (6): 777-783, 1956.
- 81 — BUNGE, M.B. and Bunge, R.P.: Electron microscopic study of demyelination and remyelination in an experimentally induced lesion in adult spinal cord. *Anat. Rec.* 136 (2): 333, 1960.
- 82 — HYDEN, H.: Functional relationship oligodendroglia and nerve cells. *Acta Morphologica Neederlando-Scandinavica* 3 (2): 170-178, 1960.
- 83 — PETERS, A.: The formation and structure of myelin sheaths in Central nervous System. *Journ. Biophys. and Biochem. Cytol.* 8 (2): 43-446, 1960.
- 84 — BENETATO, G.: GABRIELES-CU, E. and BORDETANU, A.: Cytochemical changes in the neuroglia during the process of allergic demyelination. *Rumanian Med. Rev.* (1): 73-84, 1961.
- 85 — CHEVREAU, J. et MARTY, R.: Variations de la densité névroglie au cours du processus de Myélinisation. *Laboratoire de Biol. Clin. Psych. Infant. et Centre Rech. Neurophysiol. de L'Assoc. Claude Bernard. Hôpital de la Salpêtrière* — 1961. (Note présentée a la seance du mars 1961).
- 86 — LUBINSKA, L.: Demyelination remyelination in the proximal parts of regenerating fibers. *Jour. Comp. Neurol.* 11 (3): 275-289, 1961.
- 87 — OLHWEILER, R.R.: Observações anatômicas sobre a regeneração do nervo hipoglosso no cão. Tese, Porto Alegre, 1961.
- 88 — BUNGE, M. B. Bunge, R. and PAPAS, G.: Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian Central Nervous System. *Jour. Cell. Biol.* 12(2): 448-453, 1962.
- 89 — WINDLE, W.: Regeneration in the Central Nervous System. Charles Thomas, 1955.
- 90 — OLHWEILER, R.R., e CONTU, P. — Sobre o uso do método de Lison-Dagnellie no estudo da bainha mielínica. *Arq. Inst. Anat.*, vol. VI, 21, 1963/64.
- 91 — CONTU, P., PIRODDA, E., e LIPPARINI, R. — Procedimenti Tecnici di impregnazione delle Terminazione nervose dell'organo cocleare. *Monit. Zool. ital.* Vol. LX, 1952.

**FIGURA N° 1**

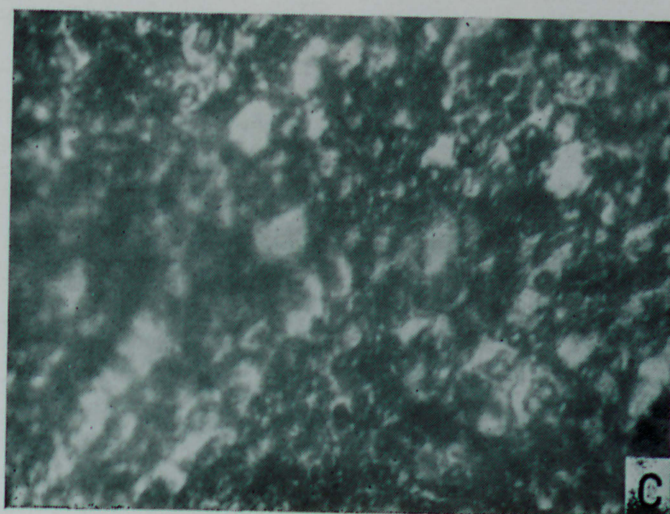
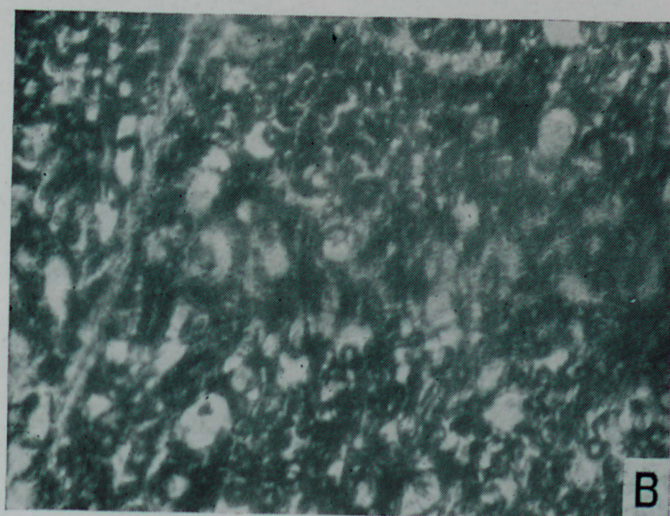
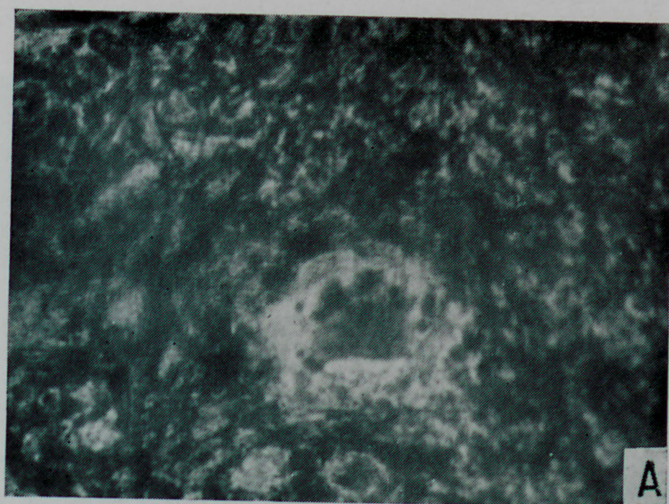
**Cão n° 1 — Medula espinhal dorso-lombar**

**Em A, corte longitudinal ao nível do funículo anterior.**

**Em B e C, corte transversal ao nível do funículo posterior**

**Aumento 45x**

**Método de Lison-Dagnelie.**



**FIGURA N° 2**

**Cão n° 2 — Área do enxerto, na medula dorso-lombar.**

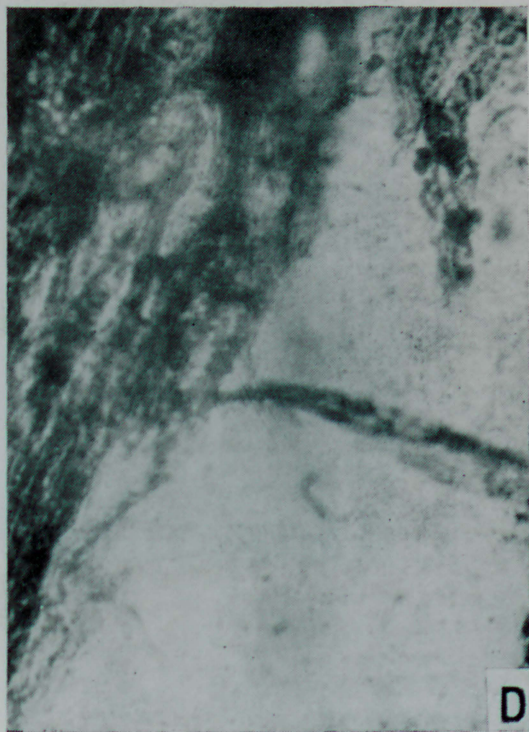
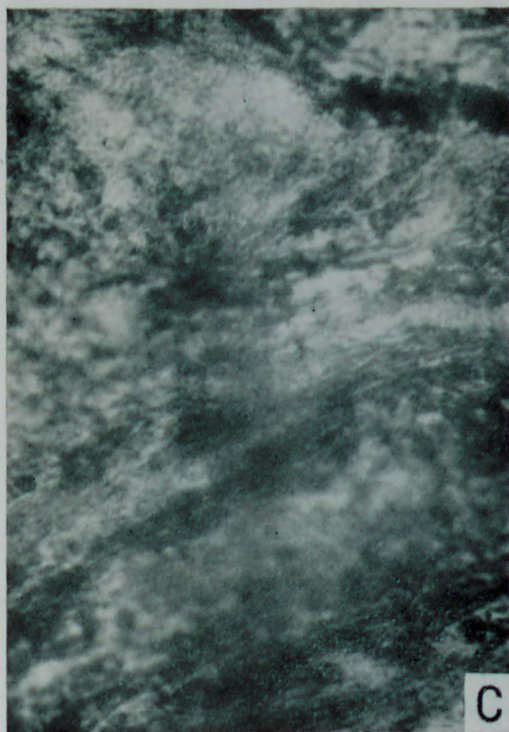
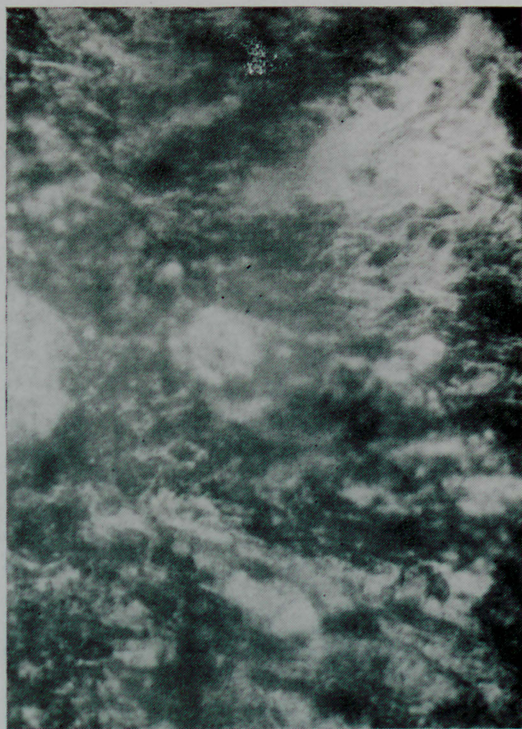
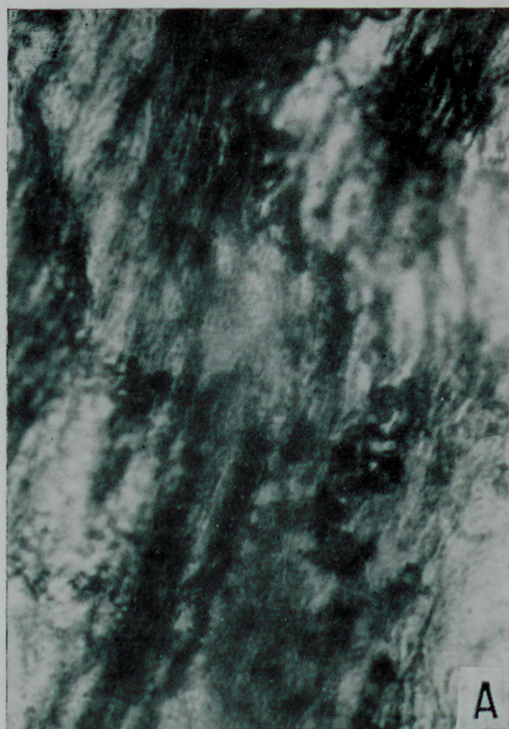
**Em A, fibras regeneradas com placas de mielina.**

**Em B e C, fibras regeneradas próximo ao enxerto e células gliais**

**Em D, faixa de tecido conjuntivo junto ao côto proximal do enxerto e fibras neo-formadas.**

**Aumento 45x**

**Método de Lison-Dagnelie.**



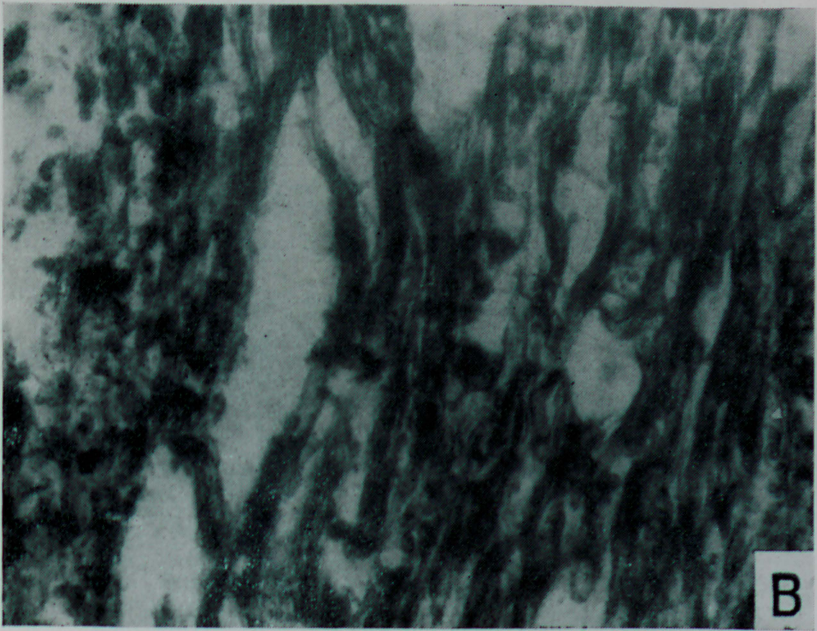
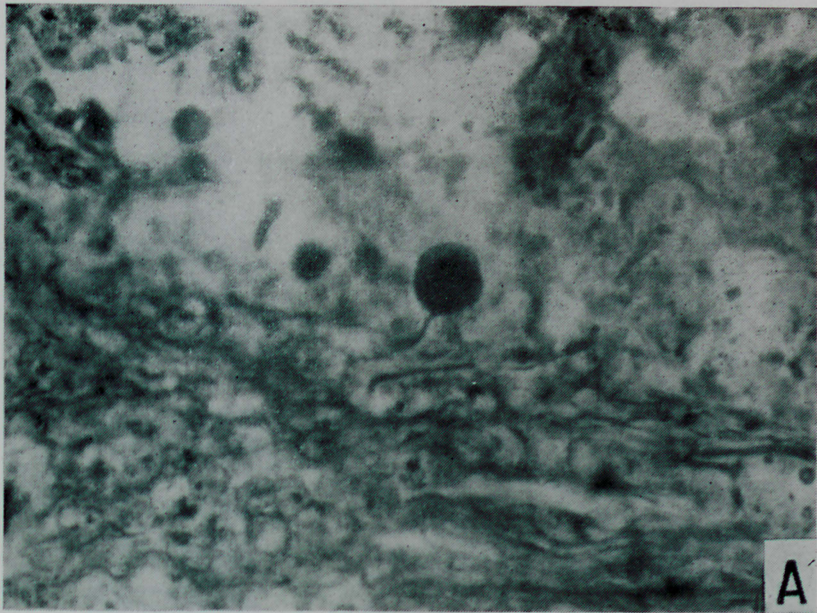
**FIGURA N° 3**

**Cão n.º 4 -- Área do enxêrto, na medula dorso-lombar.**

**Em A, corte longitudinal, fibras regeneradas com belas de mielina e células gliais.  
Método de Bielschowsky.**

**Em B, fibras regeneradas no início da mielinização.  
Método de Lison-Dagnelie.**

**Aumento 45x**



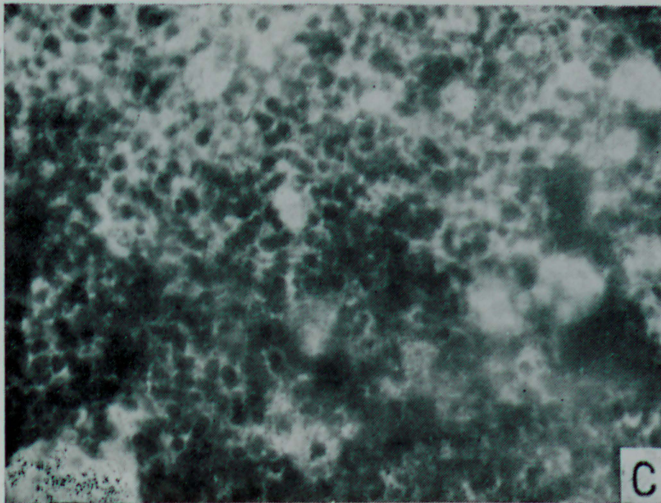
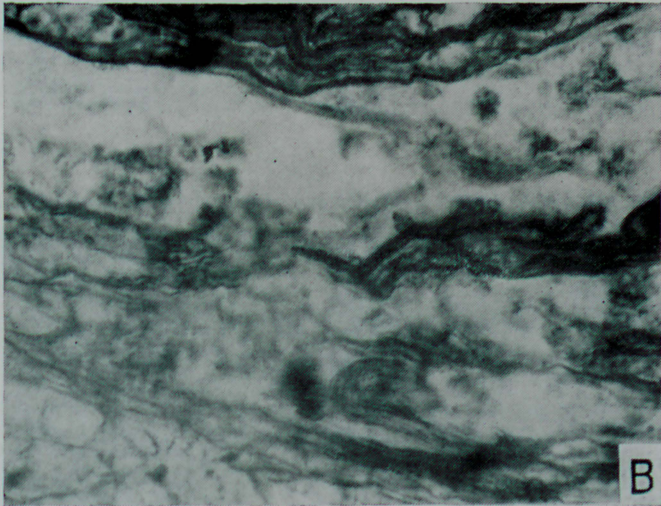
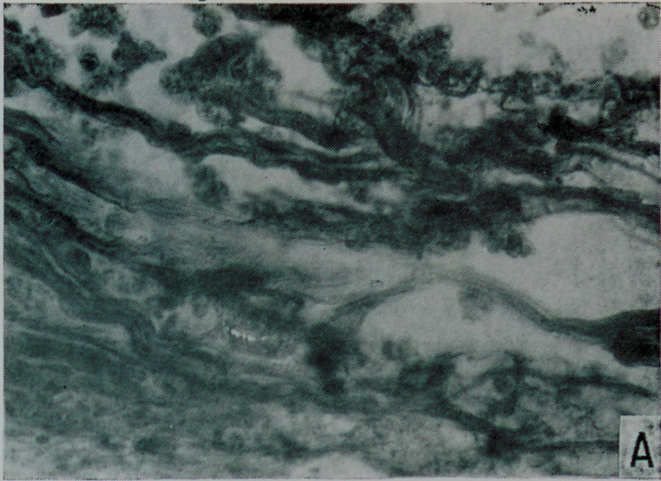
**FIGURA N° 4**

**Cão n° 6 --- Área do enxêrto na medula dorso-lombar.**

**Em A e B, corte longitudinal, com fibras regeneradas, com esbôços de mielinização  
--- Método de Cayal de Castro.**

**Em C, corte transversal com ninho de células gliais,  
Método de Del Rio-Hortega.**

**Aumento 45x**



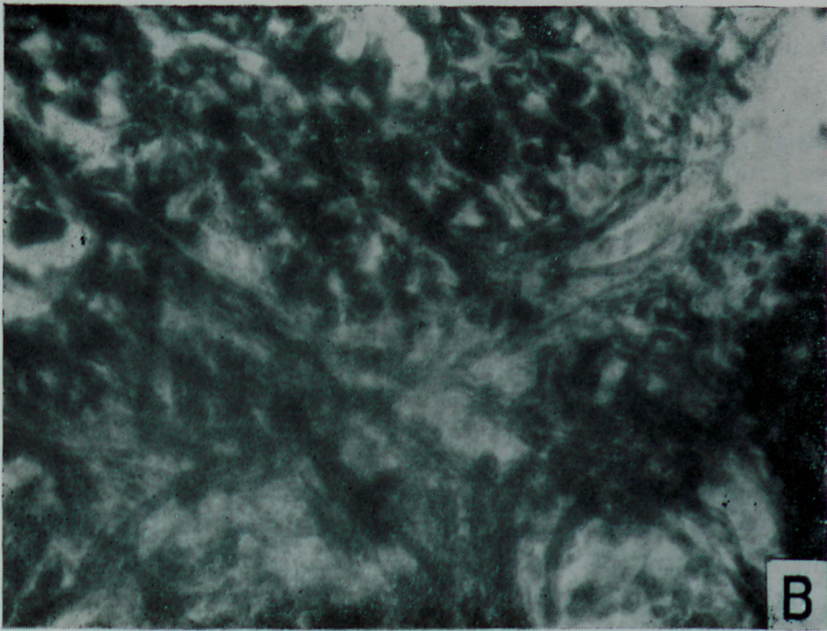
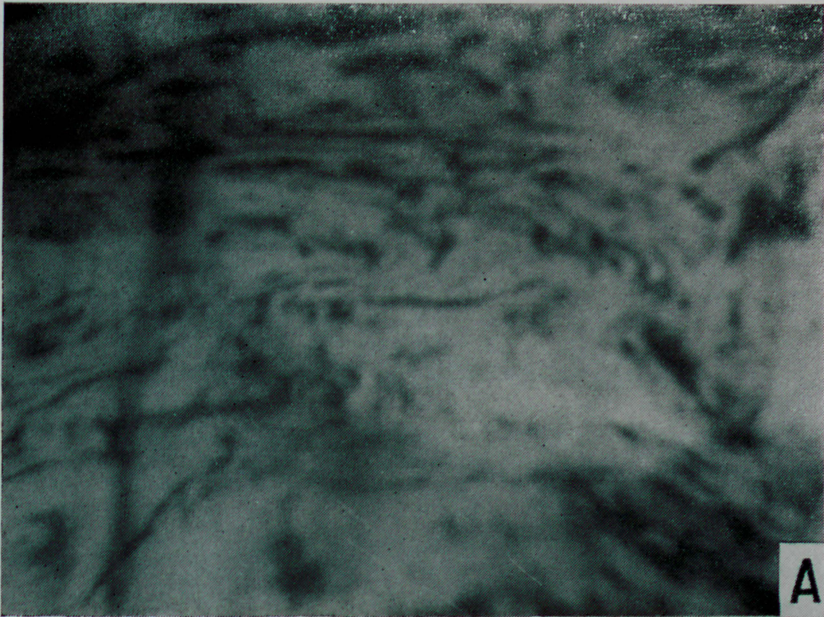
**FIGURA Nº 5**

**Área de enxêrto na medula dorso-lombar.**

**Em A, corte longitudinal, fibras regeneradas com esbôço de mielinização invadindo o tecido conjuntivo. Aumento 10x.**

**Em B, detalhe do mesmo campo. Aumento 45x.**

**Método de Lison-Dagnelie.**



**FIGURA N° 6**

**Cão n° 10 — Área do enxêrto na medula dorso-lombar.**

**Em A, corte longitudinal, fibras regeneradas atravessando a barreira conjuntiva.**

**Método de Lison-Dagnelie.**

**Aumento 10x.**

**Em B, corte longitudinal, fibras regeneradas e células gliais com inclusão de mielina.**

**Método de Lison-Dagnelie.**

**Aumento 45x.**

**Em C, corte longitudinal, fibras regeneradas, pouco mielinizadas e bolas de mielina.**

**Método de Bodian.**

**Aumento 45x.**

