

Revista Matéria, v. 12, n. 2, pp. 298 – 306, 2007 http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10851

Estudo da degradação "in vivo" de poli(L-co-D,L-ácido láctico) aplicado como prótese para regeneração nervosa periférica

Grazielle S. Baraúna¹, Amauri Pierucci², Alexandre de Oliveira², Márcia A. T. Duarte¹, Eliana A.R. Duek ¹

¹ Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, FEM/UNICAMP, CEP 13083-860, Campinas / SP – Brasil

RESUMO

A regeneração nervosa periférica auxilia na regeneração axonal e reorganização das fibras, atuando em lesões resultantes de esmagamento e secção do nervo. Nesse trabalho estudou-se a regeneração do nervo ciático utilizando-se tubos de poli(L-co-D,L-ácido láctico) preparados a partir de membranas obtidas por evaporação de solvente. Os tubos foram implantados no nervo ciático de 20 ratos da linhagem Spreague Dawley, durante 4, 8 e 12 semanas, sendo analisados por Calorimetria diferencial de varredura (DSC), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Cromatografia de permeação a gel (GPC), Análise termogravimétrica (TGA). O nervo regenerado foi avaliado pela técnica de Microscopia de luz (MO). Verificou-se um aumento do diâmetro do nervo em função do processo de degradação do tubo. Análises de DSC e GPC do PLDLA mostraram Tg em 57°C e massa molar (Mw) de 197 989 gmol⁻¹, respectivamente. Foram observadas nítidas variações nesses valores após 8 semanas de degradação, com Tg em 40°C e Mw de 170000 g.mol⁻¹. Dados de TGA também indicaram o processo de degradação com Ti em 333 °C, antes da degradação e 305°C, após 12 semanas. MEV mostrou formação de poros após 8 semanas de degradação. Esse estudo mostrou que tubos de PLDLA são promissores para a regeneração do nervo ciático.

Palavras chaves: Poli(L-co-D,L-ácido lático), degradação in vivo, regeneração nervosa, membrana.

Study of "in vivo" degradation of poly(L-co-D,L-lactide acid) applied as prosthesis for peripherical nervous regeneration

ABSTRACT

The peripherical nervous regeneration can help the axonal regeneration and fiber reorganization, performing in nerve injury after trauma. In the present study the regeneration of sciatic nerve was observed inside the poly(L-lactide acid-co-D,L-lactide acid) tubes made with membranes obtained by solvent evaporation The tubes were implanted around the sectioned sciatic nerves of 20 rats Spreague Dawley and analized after 4, 8 and 12 weeks by differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy (SEM), gel permeation chromatography (GPC), thermogravimetric analysis (TGA) and the nerve regeneration was analyzed by light microscopy (LM). It was verified an increase of nerve diameter in function of tube degradation process. DSC and GPC analysis of PLDLA showed Tg at 57°C and molar mass (Mw) of 197 989 gmol⁻¹, respectively. Nitid variations of these values were observed after 8 weeks of degradation, with Tg at 40°C and Mw of 170000 gmol⁻¹. TGA data also indicated degradation process with Ti at 333 °C before degradation and 305°C after 12 weeks. SEM showed formation of pores after 8 weeks of degradation This study indicated that the PLDLA tubes are promissing to regeneration of sciatic nerves.

Keywords: Poly(L-co-D,L-lactide acid), in vivo degradation, nervous regeneration, membranes.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, polímeros bioreabsorvíveis têm sido utilizados em experimentos biomédicos a fim de buscar materiais com propriedades físicas e mecânicos cada vez mais adequados para a sua aplicação no corpo humano [18].

Os poli $(\alpha$ -hidróxi ácidos) são considerados uma das famílias de polímeros mais promissoras na área dos bioreabsorvíveis. A grande vantagem desses polímeros está na sua forma de degradação que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos gerados completamente absorvidos pelo organismo. Os polímeros bioreabsorvíveis mais estudados são: o poli (ácido glicólico) (PGA), a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), a poli(para-dioxanona) (PPD) e o poli(ϵ -caprolactona) (PLLA) e seu copolímero poli (ϵ -co-D,L- ácido lático) (PLDLA) [10].

O PLA é um polímero semi-cristalino, com temperatura de transição vítrea de 57 °C e ponto de fusão de 174 – 184 °C, o grupo metil do PLA faz com que ele seja hidrofóbico e mais resistente a hidrólise. O PLLA, tem se destacado, pela suas excelentes propriedades mecânicas [1, 2, 11], porém, o longo período requerido para a sua degradação total, associado à alta cristalinidade de seus fragmentos pode causar reações inflamatórias no corpo, o que restringe seu uso em algumas aplicações clínicas. Buscando diminuir essa cristalinidade do PLLA, uma combinação dos monômeros L- láctico e D, L láctico resultam no copolímero poli(L-co-D, L ácido láctico) (PLDLA), sendo que esse tem como característica ser rapidamente degradado e não gerar fragmentos cristalinos, aliando as particularidades mecânicas do poli(L-ácido láctico) sem o inconveniente do elevado tempo de degradação requerido por esse homopolímero decorrente de sua alta cristalinidade. Isso é possível, pois o D, L ácido láctico, ao contrário, apresenta maior taxa de degradação. Com a combinação do L-ácido láctico com o D, L ácido láctico é possível se obter um copolímero com boas propriedades mecânicas e com tempo de degradação adequado a aplicações em regeneração nervosa periférica.

Muitas das aplicações dos poli(α-hidróxi ácidos) na área médica tem sido possível através de membranas poliméricas. Algumas técnicas são empregadas para obtenção de membranas densas e porosas de polímeros bioreabsorvíveis como: evaporação de solvente utilizando sal com granulometria controlada [6], inversão de fase [17], borbulhamento de gás [8] e adição de plastificante [12]. Membranas densas e porosas servem como substrato para que células isoladas possam fixar-se e crescer até formar o tecido, sendo que este suporte pode agir tanto como apoio físico, quanto como substrato aderente para as células isoladas durante cultura in vitro ou subseqüente implante para promover a regeneração natural dos tecidos [20, 9].

As membranas de PLDLA auxiliam na regeneração periférica através da técnica de tubulização que foi desenvolvida com o sentido de reparar o nervo lesionado que pode ser resultante de esmagamento, transecção parcial ou completa do nervo [7, 15, 16]. Os neurônios do Sistema Nervoso Periférico são células potencialmente capazes de iniciar a regeneração de seus axônios após uma axotomia. Assim, brotamentos axonais originados do coto proximal têm a capacidade de atingir o coto distal denervado e, desenvolvendo-se através das bandas de Bünger, podem restabelecer as conexões com o órgão alvo. É consenso que, para o sucesso deste processo, além de outros pré-requisitos há necessidade do estabelecimento, no coto distal, de um microambiente propício para receber e sustentar o processo regenerativo [3, 13, 14, 19].

Neste trabalho, membranas de poli (L-co-D,L- ácido lático) foram preparadas pelo método de evaporação de solvente através técnica de tubulização, com o objetivo de estudar as propriedades do PLDLA *in vivo* para serem utilizadas na obtenção de próteses tubulares para regeneração de nervos.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Preparação das membranas

O polímero utilizado para preparação das membranas foi o Poli (L-co-D,L-ácido láctico)(70:30, MM 282700 gmol⁻¹) (Sintetizado no Labiomat/PUC-Sorocaba).

Foram preparadas membranas de dimensões 50x30x5mm utilizando a técnica de evaporação de solvente. Soluções poliméricas contendo copolímero na concentração 2,5% m/V, foram preparadas, dissolvendo-se, respectivamente 0,825g de PLDLA em 33mL de diclorometano (Merck. KGaA, Darmstadt, Alemanha). Após completa dissolução do copolímero sob agitação por 2 horas, a solução foi vertida em uma placa de vidro 50x30x5mm e colocadas dentro de uma cuba durante 24 horas, as membranas foram secas a vácuo por 8 horas e mantidas nesta condição até a caracterização.

2.2 Degradação e Caracterização in vivo

Nas membranas de PLDLA preparadas por evaporação de solvente empregou-se a técnica de tubulização e foram moldadas em um suporte com diâmetro de 1,6mm e 10mm de comprimento. Os tubos

foram esterilizados por imersão em álcool 70% por 24 horas e lavagem em solução tampão fosfato pH 7,4 a 37°C, por 2 horas antes da cirurgia.

2.1.1 Estudo in Vivo

O estudo envolveu 20 ratos da linhagem Spreague Dawley, fêmeas adultas com aproximadamente 8 semanas de idade e 0,25 kg de massa corpórea. Após, anestesia (0,2mL de ketamina e 0,2mL xylazina, 0.2mL/100g massa corpórea, ip), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, procedeu-se a exposição do nervo ciático. O nervo foi transeccionado e, após a retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados, com um ponto cirúrgico (fio mononylon 10-0, ethicon), no interior de um tubo de PLDLA (Clay Adams, comprimento=10mm, diâmetro interno=1,6mm e diâmetro externo=3,2mm), deixando-se um espaço de 6-7mm entre eles.

Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele fechada com 2 ou 3 grampos cirúrgicos. O nervo ciático direito permaneceu intacto sendo empregado para fins de controle morfológico. Os animais foram mantidos em biotério do Departamento de Anatomia - IB-Unicamp, por um período de 4, 8 e 12 semanas (n=5 para cada tempo de sobrevida), recebendo ração e água *ad libitum*. Para sacrificar os animais foi utilizado como anestésico o hidrato de Cloral 10% (0,1ml/20g, i.p) os animais foram submetidos a toracotomia e a seguir perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando a lavagem dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 150ml de uma solução salina tamponada e heparinizada NaCL 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38. A fixação foi realizada pela subseqüente perfusão de 300ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeido (1%) em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38 [Pierucci, 2004].

Os tubos de PLDLA foram removidos, e os nervos removidos cuidadosamente e dissecados sob microscópio cirúrgico,em seguida processados para inclusão em resina, os tubos foram caracterizados antes e após a degradação, pelas técnicas descrita a seguir:

2.1.1.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas de DSC foram realizadas utilizando-se o equipamento modelo 2820 da Ta Instruments. As amostras, pesando em torno de 10 mg, foram aquecidas entre 25 a 210°C a 10°C min $^{-1}$ seguida de isoterma por 5 minutos; após isto, as amostras foram resfriadas à 0°C a 10°C min $^{-1}$, isoterma de 5 minutos em 0°C, e reaquecidas até 210°C.

2.1.1.2 Cromatografia de Permeação a Gel (GPC)

As massas molares médias em número (Mn), em massa (Mw) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos em um cromatógrafo líquido CLWA-1, utilizando colunas ultrastyragel e detector de índice de refração Waters 410. Foram utilizados padrões de poliestireno para a calibração e THF (tetrahidrofurano) como fase móvel.

2.1.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As amostras de membrana pesando cerca de 20 mg foram aquecidas de 25 a 450°C à 10°C.min⁻¹ sob atmosfera de argônio, utilizando o equipamento STA 409C, marca Netzsch.

2.1.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de superfície de membranas e fraturas (obtidas em nitrogênio líquido) foram metalizadas com ouro (Sputter Coater BAL-TEC SCD 050) e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA 860) operado a 10kV.

2.1.1.5 Microscopia Óptica Invertida (MO)

Em relação aos nervos regenerados, estes foram fixados em solução de tetróxido de ósmio (1% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,38) por 2 horas, em seguida lavados e desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS) e posteriormente, desbastados em secções semi-finas (0,5µm; Ultramicrótomo LKB, Bromma 8800) e coradas com azul de toluidina 0,25%, foram observados através de um microscópio óptico invertido da marca (Nikon, Eclipse TS100).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Degradação in Vivo

Todos os animais sobreviveram até as datas previstas para o sacrifício. Não foram observadas infecções pós-operatórias nem evidências de reação inflamatória local desencadeada pelo biomaterial. Observou-se uma recuperação funcional do membro denervado, nos períodos de sobrevida superiores a 4 semanas, demonstrando a ocorrência do processo de reinervação sensitiva e motora. Contudo, a funcionalidade do membro posterior denervado foi sempre inferior a do membro contralateral não lesado.

3.2 Caracterização do tubo de PLDLA

A Tabela 1 mostra os dados obtidos a partir das análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), antes e após a degradação dos tubos de PLDLA *in vivo* nos tempos 0, 4, 8, 12 semanas.

Tabela 1. Valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm), temperatura de cristalização (Tc), entalpia de fusão (ΔHm) e entalpia de cristalização (ΔHc) para as membranas de PLDLA obtidas por evaporação de solvente e degradadas *in vivo*.

Membrana PLDLA	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔHm (J/g)	Tc (°C)	ΔHc (J/g)
0	57	-	-	-	-
4	52	-	-	-	-
8	40	-	-	-	-
12	56	175	50	103	26

Os termogramas avaliados até o tempo de degradação 8 semanas apresentaram apenas a temperatura de transição vítrea (Tg), o que está de acordo com as características amorfas do copolímero. O valor da Tg antes da degradação é de 57 °C. Verifica-se que após 8 semanas de degradação a Tg decresce para 40 °C. Após 12 semanas de degradação, o termograma apresenta um pico bem definido de fusão (175°C), e um pico de cristalização (103 °C), cujos valores das entalpias de fusão e cristalização são, respectivamente, ΔHm= 50J/g e ΔHc= 26J/g (Fig. 1). Esses dados indicam que apesar do material ser amorfo, antes da degradação, à medida que o processo de degradação ocorre, o material torna-se cristalino, dificultando a mobilidade das cadeias das regiões amorfas, causando um aumento no valor de Tg (56 °C).

Esse comportamento já foi verificado para outros polímeros bioreabsorvíveis. Os autores afirmam que para polímeros parcialmente cristalinos, a degradação ocorre preferencialmente nas regiões amorfas e verifica-se um aumento do grau de cristalinidade do material devido à formação de novos cristais, através do rearranjo das cadeias de menor massa molar, originadas no processo de degradação [4]. No caso do copolímero amorfo, à medida que ocorre a fragmentação das cadeias, elas se rearranjam e formam novos cristais.

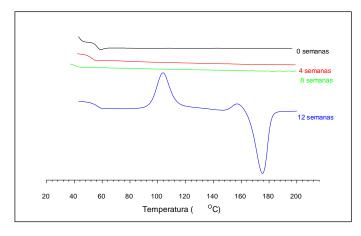


Figura 1: Curvas de DSC para as membranas de PLDLA obtidas por evaporação de solvente em função do tempo de degradação *in vivo*.

A análise de GPC possibilitou verificar a variação das massas molares devido a quebra das cadeias poliméricas, em função do tempo de degradação, Tabela 2. Verifica-se uma queda na massa molar das amostras a medida que a degradação ocorre e que a perda expressiva de massa molar é verificada após 8 semanas de degradação.

Tabela 2. Dados de GPC para os tubos de PLDLA degradadas *in vivo* Mw = Massa molar Média ponderada, Mn = Massa mola Média numérica

Tempo de degradação	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)
(semanas)		
0	197 989	112 250
4	174 051	97 452
8	170 865	97 385
16	128 356	68 890

Os tubos de PLDLA foram analisados por TGA (análise termogravimétrica) para avaliar a temperatura de início da degradação em função do tempo de implante. A Tabela 3, ilustra os dados obtidos por TGA em função do tempo de degradação comparando-se os valores de Ti (temperatura de início de degradação) e Td (temperatura na qual a perda de massa é máxima), verifica-se um decréscimo nas temperaturas de perda de massa em função do tempo de degradação até 8 semanas. Após esse período, nota-se um aumento desses valores, o que pode estar relacionado ao aumento da cristalinidade à medida que a degradação ocorre, conforme verificado nas análises de DSC.

Tabela 3: Dados determinados por TGA para os tubos de PLDLA degradadas in vivo.

Membrana	Ti*	Td**
PLDLA	(°C)	(°C)
0	333	361
4	314	349
8	310	330
12	305	336

^{*} Ti = temperatura de início de degradação, ** Td = temperatura na qual a perda de massa é máxima.

Na análise por microscopia eletrônica de varredura, observou-se o comportamento da degradação em função do tempo. No tempo 0 semanas (sem degradação) as amostras apresentavam uma morfologia densa, ausência de poros e uma superfície de fratura lisa, Figura 2(b). Após 4 semanas de implante do tubo de PLDLA, observou-se uma degradação parcial do tubo, a presença de um esfoliamento em camada observado na Figura 2 (c), e sua superfície de fratura apresenta uma grande quantidade de poros evidenciando a degradação do material o que se acentua após 8 e 12 semanas Figura 2(e, f, g, h). A superfície de fratura das amostras após 12 semanas Figura 2 (h) tem aparência fragmentada.

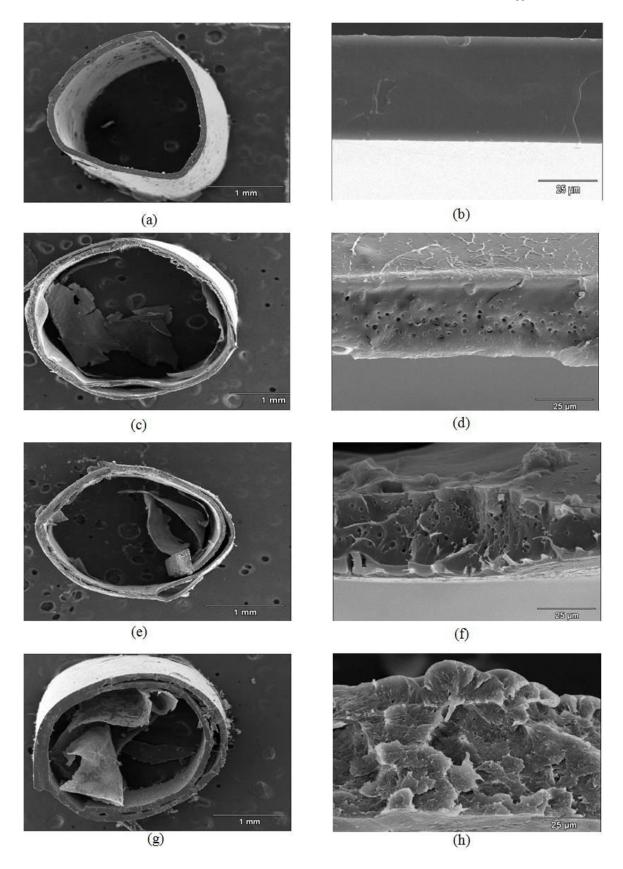


Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura de tubos PLDLA obtidas nos diferentes momentos do estudo *in vivo*. Foram analisados cortes transversais do tubo (coluna da esquerda) e fratura da membrana (coluna da direita) nos períodos de 0 (a; b), 4 (c; d), 8 (e; f) e 8 semanas (g; h).

3.3 Caracterização do Nervo Ciático Periférico

Através da microscopia de luz (MO) foi possível observar a regeneração do nervo após o período de 4, 8, 12 semanas, além de ter sido constatado a presença um espesso epineuro (seta vermelha), presença vasos epineirais e perineurais (setas pretas), e endoneuro repleto de axônios (seta amarela) indicando a regeneração do nervo periférico Fig. 3. Após o período de 8 e 12 semanas, foi possível observar que o tubo de PLDLA apresentou o avanço considerável da degradação, não desenvolveu resposta inflamatória local, mostrando assim uma ótima biocompatibilidade do copolímero, já que a biocompatibilidade dos tubos é fortemente influenciada pelo comportamento de degradação do material [5]. O estudo *in vivo* mostrou que as membranas contribuíram isolando o local da lesão, orientando a reorganização das fibras e possibilitando assim a regeneração do nervo ciático.

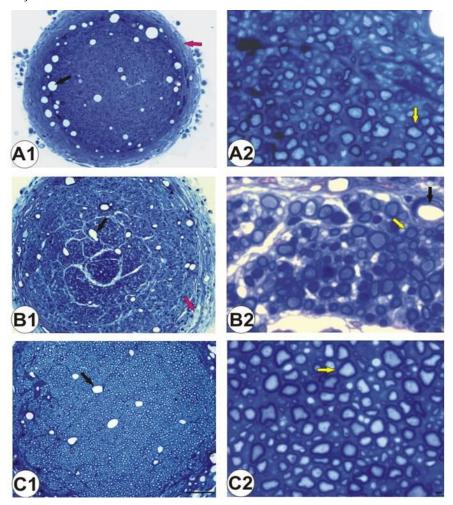


Figura 3: Fotomicrografia dos nervos ciáticos regenerados após tubulação. A1) No interior do tubo de PLDLA confeccionado pelo método do solvente, 4 semanas após o implante. B1) Após o período de 8 semanas e 12 semanas (C1), respectivamente; escala = 59μm. Observe a maior área do nervo regenerado em relação ao tempo de sobrevida do animal (C1). Em destaque, a espessura do epineuro do nervo regenerado (seta vermelha) no interior do tubo de PLDLA construído pelo método de evaporação de solvente. Em maior aumento (A2, B2 e C2), note a quantidade de vasos sanguíneos perineurais (seta preta) e o número de axônios mielínicos regenerados (seta amarela); escala = 2 μm.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo *in vivo* mostraram que a Tg do material diminui e verifica-se o aparecimento dos picos de fusão e cristalização como conseqüência da cristalização do material em função do tempo de degradação. O processo de degradação é confirmado através dos dados de GPC, os quais mostram uma diminuição da massa molar devido a quebra da cadeia polimérica. Através das micrografias obtidas por MEV notou-se uma degradação inicial na superfície, sendo mais acentuada no centro com a

presença de poros durante a degradação, o que proporciona maior interação tecido-matriz, sendo demonstrado nos tempos de 8 e 12 semanas.

Através da MO pode-se concluir que a técnica de tubulização é eficaz para o processo de regeneração do nervo evidenciada pela presença dos componentes da matriz.

Este estudo mostrou que tubos de PLDLA são promissores para promover a regeneração nervosa periférica, propiciando proteção, isolamento do local da lesão e reorganização das fibras nervosas.

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] BERGSMA, J.E., BRUIJN, W.C., ROZEMA, F.R., BOS, R.R., BOERING, G., "Late Degradation Tissue Response to poly(L-lactide) Bone Plates and Screws", *Biomaterials*, v. 16, pp. 25, 1995.
- [2] BESSHO, K., IIZUKA, T., MURAKAMI, K., "A Bioabsorbable poly-L-lactide Miniplate and Screw System for Osteosynthesis in Oral and Maxillofacial Surgery", *Journal Oral Maxillofac Surg*, v. 55, pp. 941, 1997.
- [3] BEUCHE, W., FRIED, R.L., "The role of Non-residente Cells in Wallerian Degeneration", *Journal Neurocytol*, v. 13, pp. 767-796, 1984.
- [4] DUEK, E.A.R., ZAVAGLIA, C.A.C., BELANGERO, W.D., "In *vitro* Study of poly(lactic acid) Pin Degradation" *Polymer*, v. 40, pp. 6465-6473, 1999.
- [5] LAM, K.H., NIEUWENHUIS, P., MOLENAAR, I., ESSELBRUGGE, H., FEIJEN, J., DIJKSTRA, P. J. and Schakeraad, J. M., "Biodegradation of Porous Versus Non Porous poly(L-lactic acid) Films", *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, v. 5, pp. 181-189, 1994.
- [6] LAM, K. H., SCHAKENRAAD, J. M., GROEN, H., ESSELBRUGGE, H., DIJKSTRA, P. J., FEIJEN, J., NIEUWENHUIS, P., *Journal of Biomedial Materials Research*, v. 29, pp. 929, 1995.
- [7] LUNDBORG, G., "Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and Strategies for Treatment", *Journal of Hand Therapy*, v. 6, n.3, pp. 179-188, 1993.
- [8] MOONEY, D.J., BALDWIN, D.F., SUH, N.P., VACANTI, J.P., LANGER, R., "Novel Approach to Fabricate Porous Sponges of poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) without the use of Organic Solvents" *Biomaterials*, v. 17, pp. 1417-1422, 1996.
- [9] PETER, S.J., MILLER, M.J., YASKO, A.W., YASZEMSKI, M.J., MIKOS, A.G., *Journal of Biomedial Materials Research*, v. 43, pp. 422, 1998.
- [10] REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER J.J., BOCCACCIN, A. R., "Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, v. 27, pp. 3413–3431, 2006.
- [11] ROKKANEN, P., BOSTMAN, O., VAINIONPAA, S., MAKELA, E.A., HIRVENSALO, E., PARTIO, E.K., VIHTONEN, K., PATIALA, H., TORMALA, P., "Absorbable Devices in the Fixation of Fractures", *Journal Trauma*, v. 40, pp. 123, 1996.
- [12] SCAPIN, S.M.N., SILVA, D.R.M., JOAZEIRO, P.P., ALBERTO-RINCON, M.C., LUCIANO, R.M., DUEK, E.A.R., "Use de triethylcitrate Plasticizer in the Production of poly-L-lactid acid Implants with Different Degradations Time", *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, v. 14, pp. 635-640, 2003.
- [13] SON, Y. J., THOMPSON, W. J., "Schwann Cell Process Guide Regeneration of Peripheral Axons", *Neuron*, v. 14, pp. 125-132, 1995.
- [14] STOLL, G., GRIFFIN, J. W., LI, C. Y., TRAPP, B. D., "Wallerian Degeneration in the Peripheral Nervous System: Participation of Both Schwann cells and macrophages in myelin degradation", *Journal of Neurocytol*, v. 18, pp. 671-683, 1989.

- [15] SUNDERLAND, S. S., "The Anatomy and Physiology of Nerve Injury", *Muscle & Nerve*, v.13, pp. 771-784, 1990.
- [16] TERENGHI, G., "Peripheral Nerve Regeneration and Neurotrophic Factors", *Journal of Anatomy*, v. 194, pp. 1-14, 1999.
- [17] VAN DE WITTE, P., ESSELBRUGGE, H., DIJKSTRA, P.J., VAN DEN BERG, J.W.A., FEIJEN, J., *Journal of Membrane Science*, v. 113, pp. 223, 1996.
- [18] YUEHUEI, H.A., SHANE K.W., RICHARD, J.F., Biomaterials, v. 21, pp. 2635, 2000.
- [19] ZOCHODNE, D. W., "The Microenvironment of Injured and Regenerating Peripheral Nerves", *Muscle & Nerve*, supplement 9, pp. S33-S38, 2000.
- [20] ZOPPI, R.A., CONTANT, S., DUEK, E.A.R., MARQUES, F.R., WADA, M.L.F., NUNES, S.P., *Polymer*, v. 40, pp. 3215, 1999.