

ELISANGELA JERONYMO STIPP BRAMBILLA

*“Dupla inervação muscular com neurografia
término-lateral: estudo em ratos”*

TESE DE DOUTORADO

**Botucatu
2008**

ELISANGELA JERONYMO STIPP BRAMBILLA

***“DUPLA INERVAÇÃO MUSCULAR COM
NEURORRAFIA TÉRMINO-LATERAL: ESTUDO
EM RATOS”***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Stipp Brambilla, Elisangela Jeronymo.

Dupla inervação muscular com neurorrafia término-lateral: estudo em ratos
/ Elisangela Jeronymo Stipp Brambilla. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2009

Orientador: Fausto Viterbo
Assunto CAPES: 40102084

1. Paralisia facial - Cirurgia - Estudos experimentais 2. Eletrofisiologia
3. Nervos - Enxerto

CDD 617.52

Palavras chave: Eletrofisiologia; Histologia; Neurorrafia término-lateral;
Nervo periférico; Ratos

ELISANGELA JERONYMO STIPP BRAMBILLA

**“DUPLA INERVAÇÃO MUSCULAR COM NEURORRAFIA
TÉRMINO-LATERAL: ESTUDO EM RATOS”**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

2º. Examinador: Dr. José Carlos Marques de Faria

3º. Examinador: Dr. Amilton Antunes Barreira

4º. Examinador: Dr. José Antonio Garbino

5º. Examinador: Dra. Suzana Fabíola Müller

Botucatu, 17 de fevereiro de 2009.

À minha filha Heloíse, fonte de amor e carinho, por quem todos os esforços são válidos.

“Menininha não cresça mais não,
Fique pequeninha na minha canção.”
(Toquinho)

Ao meu marido André por todo amor e compreensão, pelo incentivo e por todo o auxílio nos momentos difíceis.

“Foi a tua mão que encontrei estendida,
quando realmente precisei de um amigo.
Foram teus olhos que fixei, quando me senti só.
Tuas palavras me orientaram, mostrando o
caminho correto, que eu não encontrava.
Teu sorriso consolou-me.
Sua força interior era tudo que precisava.”
(Desconhecido)

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

Ao **Curso de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia** da Faculdade de Medicina de Botucatu por permitir o desenvolvimento deste projeto;

Aos **Departamentos de Cirurgia e Ortopedia e de Urologia** por possibilitarem a realização deste trabalho cedendo suas dependências e equipamentos;

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu em especial: à **Maria Cecília Salgado Mercadante** por ensinar-me a técnica de neurorrafia, essencial neste trabalho; e à **Irene Spago** pelo auxílio técnico durante as cirurgias, convívio que possibilitou o nascimento de uma grande amizade;

A todos os funcionários do Departamento de Urologia em especial ao **José Lucas de Carvalho** por todo o auxílio na confecção das lâminas histológicas;

Ao **Biotério Central da UNESP** por fornecer os animais utilizados neste estudo;

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu **Janete, Andrea, Lilian, Nathanael e Regina** por todo auxílio, dedicação e atenção sempre que necessitei;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, **Simone Barroso Corvino Camargo**.

Ao **Serviço de Biblioteca e Documentação** da UNESP, Campus de Botucatu, pelo auxílio na localização de artigos científicos.

A **Selma Maria de Jesus** pela elaboração da ficha catalográfica;

À **Rosangela** e à **Malu**, do ponto de apoio da FAPESP, por toda dedicação ao tirar dúvidas e resolver problemas relacionados aos relatórios e prestações de contas;

Aos colegas de curso **Susana Fabíola Mueller**, **Adriana Maria Romão** e **Fábio José Reis** que muitas vezes tornaram mais agradável a permanência no laboratório.

Aos funcionários do GAP – Grupo de Apoio à Pesquisa, em especial à **Liciana** pelo auxílio na análise;

À **FAPESP – Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo apoio financeiro;

Os meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais **Flavio** e **Ana Maria** por todo o amor, dedicação, por toda ajuda prestada nos momentos necessários, pelo exemplo de honestidade e retidão responsável pela formação do meu caráter.

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

(Bertrand Russell)

Ao **Prof. Dr. Fausto Viterbo** pela orientação que muito influenciou meu crescimento pessoal e maturidade profissional.

“Por mim continuaria aqui a conversar,
Com o mestre há sempre muito a aprender e estudar.
Amanhã já da Páscoa, aproveitando a vinda,
Permites que formule outras questões ainda?
Com muito esforço estou me dedicando a estudo,
Muito já sei, porém, almejo saber tudo.”

(JW Goethe)

Acima de tudo, a **Deus** por ter dado vida e saúde a mim e a todos os que me ajudaram na realização deste trabalho,

A mais profunda gratidão.

“Qualquer trabalho científico, qualquer descoberta, qualquer invenção é um trabalho universal. Ele está condicionado, em parte pela cooperação de contemporâneos, em parte pela utilização do trabalho de seus predecessores.”

K. Marx

PRÓLOGO

Durante realização do nosso curso de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, Área: Agressão, Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e de Órgãos junto ao Laboratório Experimental de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, participamos de várias atividades de pesquisa desenvolvidas, as quais permitiram a divulgação parcial dos resultados em Congressos e/ou enviados para publicações em anais e revistas, conforme indicado abaixo:

TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

STIPP EJ, ROMÃO AM, GARBINO JA, VITERBO F, SALGADO MH. Standardization of Neuro-physiological tests on the rat sciatic nerve. 9^o International Microsurgery Symposium, promovido pela Disciplina de Cirurgia Plástica da FMB, UNESP, Botucatu, realizado na Clínica de Cirurgia Plástica Dr. Fausto Viterbo nos dias 20 e 21 de outubro de 2005.

STIPP EJ. Bases gerais da EMG na experimentação. Curso de Regeneração de nervo periférico – aspectos cirúrgicos e experimentais, na X Semana da Bio, realizado no Instituto de Biociências da UNESP Campus de Botucatu, nos dias 18, 19 e 20 de Agosto de 2006.

STIPP EJ, VITERBO F. Dupla inervação muscular com neurorrafia término-lateral. Estudo em ratos. Curso de Regeneração de nervo periférico – aspectos cirúrgicos e experimentais, na X Semana da Bio, realizado no Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu, nos dias 18, 19 e 20 de Agosto de 2006.

STIPP EJ, VITERBO F, LABBÉ D, GARBINO JA. Analysis of tibial cranial muscle after muscular double innervation with end-to-side neurorrhaphy. III Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, realizado no período de 20 a 22 de setembro de 2007.

STIPP EJ, VITERBO F, LABBÉ D, GARBINO JA. Double muscular innervation with end-to-side neurorrhaphy. Experimental study in rats. 10th International Microsurgery Symposium, promovido pela Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu, realizado nos dias 19 e 20 de Setembro de 2008.

TRABALHOS PUBLICADOS EM REVISTAS

ROMÃO AM, VITERBO F, STIPP E, GARBINO JA, RODRIGUES JA. Muscle electro stimulation of the cranial tibial muscle after crushing of the common fibular nerve: neurophysiologic and morphometric study in rats. Revista Brasileira de Ortopedia 2007; 42(3): 41-6.

STIPP EJ, VITERBO F, LABBÈ D, GARBINO JA. Analysis of tibial cranial muscle after muscular double innervation with end-to-side neurorrhaphy. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2007, 13(4): 911.

ROMÃO AM, VITERBO F, STIPP EJ, GARBINO JA, RODRIGUES JA. Electro-stimulation of the tibial cranial muscle after fibular nerve crushing: study in rats. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2007, 13(4): 897.

TRABALHOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTAS

VITERBO F, ARM AH, STIPP EJ, REIS FJ. End to side neurorrhaphy: past, present and future. Reconstructive Microsurgery Supplement.

STIPP EJ, ROMÃO AM, GARBINO JA, VITERBO F, SALGADO MH. Effect of nerves and muscles exposition in neuro-physiological tests in rats.

RESUMO

Várias técnicas são utilizadas para o tratamento da paralisia facial, entre elas o enxerto de nervo transfacial e a transposição muscular. Estas técnicas foram associadas utilizando neurorrafia término-terminal (NTT) para tornar o músculo temporal duplamente innervado, porém, a secção de nervos saudáveis pode levar à atrofia ou enfraquecimento muscular. Os objetivos deste trabalho foram analisar a ocorrência da dupla innervação muscular através da neurorrafia término-lateral (NTL), avaliar a imediata innervação muscular através da NTL, evitando atrofia muscular e avaliar a ocorrência de degeneração Walleriana no segmento distal à NTL no nervo receptor. Foram utilizados 140 ratos Wistar divididos em sete grupos experimentais. O G1 foi o grupo controle de normalidade e o G2 o controle de desnervação. Em 80 ratos foi realizada a dupla innervação muscular (DIM) suturando o segmento proximal do nervo tibial (NT) na lateral intacta do nervo fibular comum (NFC). Estes ratos foram divididos em quatro grupos: G3 no qual os animais foram sacrificados após 120 dias; G4 onde 120 dias após a realização da DIM, o NFC foi seccionado proximal à NTL, estes animais foram sacrificados após 30 dias da secção; no G5 os animais foram sacrificados após 150 dias; no G6 120 dias após a realização da DIM, o NFC e o NT foram seccionados proximalmente à NTL e os animais foram sacrificados após 30 dias das secções; e no G7 o nervo fibular comum foi seccionado e, após 30 dias, o segmento proximal do NT foi suturado à lateral do coto distal do NFC e os animais foram sacrificados 120 dias após a NTL. Após realização dos testes da marcha e eletrofisiológico, os músculos tibiais craniais direitos (MTCD) foram removidos e pesados e os segmentos de nervo de interesse também foram coletados. Foram realizadas análises histomorfométricas das fibras do MTCD e fibras nervosas. Os resultados obtidos demonstraram que não houve alteração histológica do MTCD nos grupos de DIM; houve diminuição do diâmetro axonal nos segmentos de NFC distais à NTL no G3, G5 e G7. Os resultados obtidos no G4 mostraram que o NT não manteve a innervação muscular após a secção do NFC, observando-se atrofia das fibras musculares. Os resultados do teste eletrofisiológico e de diâmetro mínimo no G4 confirmaram a reinervação do NFC distal à NTL, após ocorrência de degeneração Walleriana. Foi observado no NT, proximal à NTL, diminuição do diâmetro mínimo axonal, indicando a ocorrência de degeneração da fibra axonal. Constatamos, pela primeira vez, a degeneração que ocorre quando o coto proximal de um nervo seccionado é

suturado à lateral de um nervo normal ou em degeneração. Algum fator deve ser liberado, causando a degeneração das fibras do coto proximal do nervo seccionado. Os resultados permitiram concluir que a DIM não ocorreu através da NTL; o NT não foi capaz de manter a inervação do MTCD após secção do NFC proximal à NTL; houve degeneração Walleriana do segmento de nervo distal à NTL e ocorrência de reinervação do NFC pelo NT.

Palavras chave: Eletrofisiologia; Histologia; Neurorrafia término-lateral; Nervos periféricos; Ratos

ABSTRACT

Among several techniques for facial palsy treatment, we have the transfacial nerve graft and the muscular transposition. Nowadays, these methods were associated using end-to-end neurorrhaphy (EEN). Even though the temporalis muscle became double innervated, the health nerve section possibly leads the muscular atrophy or even its weakness. The aim of this study was to analyze, through end-to-side neurorrhaphy (ESN), the double innervation of the muscle, the immediately muscular innervation and also evaluate the Wallerian degeneration occurrence in the distal segment of receptor nerve. One hundred forty Wistar rats were divided in seven experimental groups, 20 animals per group. The G1 was the sham group; G2 the control denervation group. In 80 rats the double muscular innervations (DMI) was performed, the proximal segment of tibial nerve (TN) was sutured laterally to the intact peroneal nerve (PN). These 80 rats were divided in four groups: in G3 the animals were killed after 120 days; in G4, post 120 days, the peroneal nerve was cut proximal the ESN and after more 30 days the animals were killed; in the group G5 the rats were killed after 150 days; in G6 post 120 days, the peroneal and also the tibial nerves were cut proximal to the ESN and the animals were killed 30 days after the second surgery. Finally in the G7 the fibular nerve was sectioned and after 30 days, the proximal end of tibial nerve was sutured laterally to the peroneal distal stump. These rats (G7) were killed 120 days post ESN. The animals were submitted to walking track analysis and electrophysiological tests. After that, the right tibial cranial muscle (RTCM) was removed and the aim nerve segments were collected and weighted. The rats were killed with high doses of intraperitoneal sodium pentobarbital. Histomorphometrical analysis of TCM and nervous fiber was performed. The results showed no histological RTCM alterations in DMI groups; the nerve fiber diameter was smaller at PN distal to the ESN in G3, G5 and G7. In G4 the results showed that TN did not keep the muscle innervations after PN section, led up to muscle fibers atrophy. The electrophysiological test and minor diameter results in G4 confirmed the PN reinnervation, after the Wallerian degeneration of the nerve fibers occurrence. An axonal diameter reduction was observed in the TN, proximal to the ESN, which suggest a nerve fiber degeneration. Probably, for the first time, we detect a phenomenon that occurs when the proximal stump is sutured at the side of a normal or degenerating nerve. Some factor may be released promoting the degeneration of the axonal proximal stump. The results allowed the following conclusions: the double muscular innervations did not occur through ESN, the TN did not keep the RTCM innervations after PN section proximal to the ESN, there is Wallerian degeneration of the nerve fibers in the segment distal to ESN and finally, the reinnervation occurred in the PN through ESN.

Key words: Electrophysiology; Histology; End-to-side-neurorrhaphy; peripheral nerve; rats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da cirurgia realizada no G1	45
Figura 2 – Esquema da cirurgia realizada no G2	46
Figura 3 – Esquema da cirurgia realizada no G3	46
Figura 4 – Esquema da cirurgia realizada no G4	47
Figura 5 – Esquema da cirurgia realizada no G5	47
Figura 6 – Esquema da cirurgia realizada no G6	48
Figura 7 – Esquema da cirurgia realizada no G7	49
Figura 8 – Esquemas das cirurgias realizadas nos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7	50
Figura 9 – Teste da marcha (walking track analysis)	51
Figura 10 – Medidas realizadas para cálculo do índice funcional do nervo ciático (IFC) e do índice funcional do nervo fibular comum (IFFC)	52
Figura 11 – Exemplo de teste para os quais foram atribuídos os valores arbitrários de ETOF, NTOF, EPL, ETS, EIT	53
Figura 12 – Teste eletrofisiológico	54
Figura 13 – Músculo tibial cranial e segmentos de nervo coletados e enviados para histologia conforme grupo experimental	56

Figura 14 – Escolha do corte histológico e das 10 imagens, de diferentes campos, salvas para posterior medida de área e menor diâmetro das fibras musculares	57
Figura 15 – Escolha aleatória de cinco fibras musculares em uma mesma imagem	58
Figura 16 – Processamento histológico dos segmentos de nervo (N1, N2 e N3) em resina Araldite®	60
Figura 17 – Seleção das fibras axoniais para medidas de área axonal, diâmetro axonal e área da bainha de mielina	62
Figura 18 – Massa dos ratos (g)	63
Figura 19 – Índice funcional do nervo ciático	64
Figura 20 – Índice funcional do nervo fibular comum	65
Figura 21 – Amplitude (mV) antes da secção e antes do sacrifício no G4	66
Figura 22 – Latência (ms) antes da secção e antes do sacrifício no G4	67
Figura 23 – Amplitude (mV) antes das secções e antes do sacrifício no G6	67
Figura 24 – Latência (ms) antes das secções e antes do sacrifício no G6	68
Figura 25 – Amplitude (mV) antes da NTL e antes do sacrifício no G7	68
Figura 26 – Latência (ms) antes da NTL e antes do sacrifício no G7	69
Figura 27 – Amplitude (mV)	70
Figura 28 – Latência (ms)	70
Figura 29 – Massa do músculo tibial cranial (g)	72
Figura 30 – Área das fibras do músculo tibial cranial direito (μm^2)	73
Figura 31 – Diâmetro mínimo das fibras do músculo tibial cranial direito (μm)	74

Figura 32 – Fibras do músculo tibial cranial direito	77
Figura 33 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) no segmento de nervo N1	78
Figura 34 – Área do axônio (μm^2) no segmento de nervo N1	79
Figura 35 – Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento de nervo N1	79
Figura 36 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento de nervo N1	80
Figura 37 – Imagens representativas do segmento de nervo N1 dos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7	82
Figura 38 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) no segmento de nervo N2	83
Figura 39 – Área do axônio (μm) no segmento de nervo N2	84
Figura 40 – Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento de nervo N2	84
Figura 41 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento de nervo N2	85
Figura 42 – Imagens representativas do segmento de nervo N2 dos grupos G1, G3, G4, G5, G6 e G7	87
Figura 43 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) no segmento de nervo N3	88
Figura 44 – Área do axônio (μm^2) no segmento de nervo N3	89
Figura 45 – Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento de nervo N3	90
Figura 46 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento de nervo N3	91
Figura 47 – Imagens representativas do segmento de nervo N3 dos grupos G3, G4, G5, G6 e G7	92
Figura 48 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G3	93
Figura 49 – Diâmetro mínimo axonal (μm) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G3	93

Figura 50 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5	94
Figura 51 – Diâmetro mínimo axonal (μm) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5	95
Figura 52 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7	96
Figura 53 – Diâmetro mínimo axonal (μm) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7	96
Figura 54 – Esquemas dos trabalhos de Battista et al. (1981); Al-Qattan (2000); Aszmann et al. (2003); Furukawa et al. (2008)	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massas iniciais e finais dos ratos	64
Tabela 2 – Índice funcional do nervo ciático	65
Tabela 3 – Índice funcional do nervo fibular comum	66
Tabela 4 – Amplitude e latência antes da secção/NTL ou do sacrifício nos grupos G4, G6 e G7	69
Tabela 5 – Teste eletrofisiológico: comparação entre os grupos	71
Tabela 6 – Massa do músculo tibial cranial	72
Tabela 7 – Análise morfométrica do músculo tibial cranial direito	74
Tabela 8 – Resultados obtidos nos testes funcionais e morfometria das fibras musculares	75
Tabela 9 – Densidade axonal no segmento de nervo N1	78
Tabela 10 – Análise morfométrica dos axônios do segmento de nervo N1	80
Tabela 11 – Área da bainha de mielina do segmento de nervo N1	81
Tabela 12 – Densidade axonal no segmento de nervo N2	83
Tabela 13 – Análise morfométrica dos axônios do segmento de nervo N2	85
Tabela 14 – Área da bainha de mielina do segmento de nervo N2	86
Tabela 15 – Densidade axonal no segmento de nervo N3	88
Tabela 16 – Análise morfométrica dos axônios do segmento de nervo N3	90
Tabela 17 – Área da bainha de mielina do segmento de nervo N3	91

Tabela 18 – Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G3	94
Tabela 19 – Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5	95
Tabela 20 – Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7	96
Tabela 21 – Resultados da morfometria das fibras nos segmentos de nervo N1, N2 e N3	98

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Anatomia do nervo	24
1.2. Lesão do nervo	25
1.3. Regeneração de nervo	27
1.4. Técnicas de Reparo Cirúrgico	29
1.5. Paralisia facial	35
2. OBJETIVOS	43
3. MÉTODO	44
3.1. Animais	44
3.2. Cirurgia	44
3.3. Testes realizados	51
3.4. Coleta das peças histológicas e sacrifício	55
3.5. Processamento histológico do músculo tibial cranial	56
3.6. Processamento histológico dos segmentos de nervo	58
3.7. Análise Estatística	62
4. RESULTADOS	63
4.1. Massa corporal	63
4.2. Teste de avaliação da marcha	64
4.3. Teste eletrofisiológico	66
4.4. Massa do músculo tibial cranial	71
4.5. Análise morfométrica do músculo tibial cranial	73

4.6. Análise morfológica do músculo tibial cranial	76
4.7. Análise morfométrica do segmento de nervo N1	76
4.8. Análise morfológica do segmento de nervo N1	81
4.9. Análise morfométrica do segmento de nervo N2	83
4.10. Análise morfológica do segmento de nervo N2	86
4.11. Análise morfométrica do segmento de nervo N3	88
4.12. Análise morfológica do segmento de nervo N3	91
4.13. Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no G3	93
4.14. Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no G5	94
4.15. Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no G7	95
5. DISCUSSÃO	99
5.1. Teste da Marcha	103
5.2. Teste Eletrofisiológico	105
5.3. Análise do músculo tibial cranial	107
5.4. Análise dos segmentos de nervo N1, N2 e N3	110
5.5. Nervo fibular comum distal à NTL (N1)	111
5.6. Nervo tibial proximal à NTL (N2)	113
5.7. Nervo fibular comum proximal à NTL (N3)	116
5.8. Considerações finais	117
6. CONCLUSÕES	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia do nervo

Os nervos são formados por diferentes tecidos que têm como função a nutrição e proteção das fibras nervosas preservando a continuidade axonal (Da-Silva, 1995a, 1995b).

As fibras nervosas são envolvidas por uma cadeia de células de Schwann justapostas. As células de Schwann existem no nervo em duas formas, as células formadoras da bainha de mielina e as não formadoras da bainha de mielina (Frostick & Kemp, 1998). Dependendo da presença da bainha de mielina, as fibras nervosas podem ser classificadas como mielínicas ou amielínicas (Hollinshead & Rose, 1991; Erhart, 1992; Da-Silva, 1995a). Nas fibras mielínicas um axônio está associado a uma célula de Schwann formadora da bainha de mielina; enquanto que, nas fibras amielínicas, uma célula de Schwann envolve grande número de axônios, sem formar a bainha de mielina.

As fibras mielínicas e as amielínicas estão envolvidas por uma matriz colagenosa frouxa denominada endoneuro (Lundborg, 1987). Esta matriz é constituída, principalmente, por fibras colágenas do tipo III (Da-Silva, 1995b). Também são observados fibroblastos, destituídos da membrana basal, células de Schwann, mastócitos e células endoteliais (Da-Silva, 1995a). O endoneuro tem uma relação especial com as fibras nervosas desde que as fibrilas colagenosas endoneurais estão distribuídas ao redor de cada fibra nervosa para formar a parede de sustentação chamada de tubos endoneurais (Lundborg, 1987).

As fibras nervosas estão reunidas em fascículos. Estes são envolvidos por uma camada multilamelar mecanicamente forte, o perineuro (Lundborg, 1987). O perineuro é formado por tecido conjuntivo dos tipos I e III (Montes et al., 1984), e por fibroblastos dispostos em lamelas que atuam como uma barreira difusora e mecânica ao trauma externo, ajudando a preservar o microambiente intrafascicular (Olsson & Kristensson 1971, 1973). O número de lamelas varia com o diâmetro dos fascículos (Lundborg, 1987).

Envolvendo todos os fascículos em um único feixe está o epineuro. Este serve como uma barreira protetora para os fascículos durante os movimentos corporais e protegem os fascículos de traumas externos. A quantidade de epineuro varia entre os nervos, e é mais abundante ao redor das articulações. No epineuro estão presentes fibroblastos, macrófagos e mastócitos como em qualquer tecido conjuntivo frouxo (Lundborg, 1987).

1.2. Lesão do nervo

Os nervos, assim como os demais tecidos do organismo, estão sujeitos a doenças inflamatórias, traumáticas, metabólicas, tóxicas, genéticas e neoplásicas (Girolami et al., 2000). Estas doenças levam a diferentes tipos e graus de lesões prejudicando os movimentos ou a função da área inervada (Ramón & Cajal, 1928; Politis et al., 1982; Lundborg et al., 1986). A perda da função de um nervo sensitivo provoca alterações da sensibilidade abrangendo desde a percepção exacerbada até redução ou ausência de sensibilidade na área afetada. Enquanto que a lesão das fibras de um nervo motor resulta na redução até a ausência dos movimentos ou do controle dos movimentos.

As lesões de nervos receberam diversas classificações. As mais conhecidas são a de Seddon (1943) e a de Sunderland (1968).

Seddon (1943) definiu três graus de lesão do nervo: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese.

A neuropraxia, ou lesão tipo I de Sunderland (1968), é caracterizada pela perda de condução sem alterações estruturais no axônio. A lesão apresenta-se exclusivamente na bainha de mielina (Ferreira, 1999) e as chances de recuperação funcional são altas (Lundborg, 1987). A velocidade de

condução pode apresentar-se diminuída se estiver associada à desmielinização, retornando ao normal com a remielinização (Kimura, 1987).

Axoniotmese, ou lesão tipo II de Sunderland (1968), é a perda da continuidade axonal resultando em degeneração Walleriana do segmento distal. Neste tipo de lesão os tubos endoneurais permanecem intactos, o que torna o prognóstico bom, apesar da ocorrência de degeneração axonal (Lundborg, 1987; Dimeglio, 1990). Segundo Kimura (1987), estudos de condução nervosa no local da lesão são inábeis em diferenciar neuropraxia de axoniotmese, pois o bloqueio total da condução pode ocorrer em ambas. Porém, a velocidade de condução pode permanecer normal na axoniotmese parcial, onde algumas fibras nervosas permanecem funcionais (Eyzaguirre & Fidone, 1977).

A neurotmese (Seddon, 1943) é a lesão que resulta da secção total do nervo. A regeneração é possível, porém incompleta e pobremente organizada (Kimura, 1987). Segundo Lundborg (1987) a neurotmese é a perda da continuidade de alguns ou de todos os elementos remanescentes do nervo, incluindo tubos endoneurais, perineuro e epineuro.

Sunderland (1968) propôs três subdivisões à neurotmese de Seddon. Na lesão do tipo III o perineuro e a arquitetura da bainha são preservados, enquanto que o axônio e o tecido circundante estão danificados. A regeneração ocorre, mas é menos efetiva que na axoniotmese. Na lesão do tipo IV o perineuro também é danificado, mas o nervo mantém sua continuidade. Neste tipo de lesão alguma regeneração pode ocorrer, porém, mal orientada e requer intervenção cirúrgica. Enquanto que a lesão do tipo V representa a completa separação dos cotos nervosos com perda de continuidade, o nervo deve ser suturado, frequentemente requerendo enxerto de nervo (Kimura, 1987).

1.3. Regeneração de nervo

Após uma lesão de nervo ocorre uma série de alterações celulares no segmento distal do nervo e em alguns nodos terminais do coto proximal (De Medinaceli & Merle, 1991; Frostick et al., 1998; Ferreira, 1999). Estas alterações foram relatadas por Waller, em 1850; futuramente, após estudos mais profundos de Ranvier, em 1878, e Ramón-y-Cajal, em 1928, foram possíveis a observação e a descrição da degeneração da bainha de mielina (Koeppen, 2004).

A evolução da degeneração Walleriana depende do animal utilizado (McDonald, 1972; Lubinska, 1975; Blundon et al., 1990; Chaudhry et al., 1992); da idade dos animais (Chaudhry et al., 1992; Perry et al., 1992); do tipo de fibra analisada, mielínica ou amielínica (Lubinska, 1975; Veronesi & Boyes, 1988; Martinez & Canavaro, 2000); do tipo de lesão (Lubinska, 1975; Bouldin & Cavanagh, 1979; Gold et al., 1992); e, até mesmo, de fatores ambientais, como a temperatura (Lubinska, 1975; Blundon et al., 1990; Perry et al., 1990; Chaudhry et al., 1992).

Segundo Beirowski et al. (2005), a degeneração é direcionada de proximal para distal, após secção do nervo, e de distal para proximal, após esmagamento das fibras.

No segmento distal do nervo lesado ocorre proliferação de células de Schwann, porém, estas não apresentam função fagocitária, que é realizada por macrófagos que migram de fora do nervo (Beuche & Friede, 1984). Além dos macrófagos, migram, em menor quantidade, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (Griffin et al., 1993; Mueller et al., 2003). Esta resposta imunológica facilita a remoção de axônios e debris de mielina (Perrin et al., 2005) e a produção de citocinas e fatores neurotróficos que são benéficos para a regeneração axonal (Dahlin, 1995).

Após degeneração dos constituintes neurais permanecem os tubos de células de Schwann e colágeno, ou bandas de Büngner, reiniciando o processo de remielinização de brotamentos axoniais (Koeppen, 2004).

A coluna de células de Schwann é uma via indispensável para o crescimento axonal, providenciando ambiente favorável para a regeneração. O

axônio em regeneração cessará de crescer caso adentre o tecido conectivo ao invés da coluna de células de Schwann (Ide, 1996).

Os axônios no coto proximal de um nervo lesado produzem grande número de brotamentos colaterais e terminais que avançam em direção ao coto distal (Lundborg, 1987).

Os brotamentos colaterais são produzidos nos nodos de Ranvier localizados próximos ao coto proximal da lesão (Hopkings & Slak, 1981; McQuarrie, 1985). Múltiplos brotamentos podem ser produzidos por nodo. Esta característica explica os achados de que muitos axônios são encontrados dentro do tubo de lâmina basal derivados das fibras mielinizadas no coto proximal (Ide & Kato, 1990).

Na porção mais distal de cada brotamento há o cone de crescimento onde podem ser observadas filopodias. Estas filopodias exploram o ambiente através de movimentos constantes. Os cones de crescimento preferem substratos que apresentem adesividade, sendo que as propriedades físicas e químicas do substrato são essenciais para o desenvolvimento dos cones de crescimento (Lundborg, 1987).

Os brotamentos crescem do coto proximal do nervo em direção ao segmento distal. Devido ao grande número de brotamentos que invadem as colunas de células de Schwann no coto distal, o número total de axônios no segmento distal pode exceder, consideravelmente, o número de axônios do coto proximal. No entanto, com o tempo, o número de axônios diminui, à medida que os brotamentos que não realizaram conexão com o órgão alvo desaparecem.

O primeiro relato de regeneração nervosa foi feito por Galen (131-201 d.C). No entanto, a primeira referência cirúrgica de reparo de lesões nervosas data de alguns séculos mais tarde, com Rhazes (850-932) e Avicenna (980-1037) (Brushart & Seiler, 1987; Sunderland, 1991; Zhao et al., 1992).

1.4. Técnicas de Reparo Cirúrgico

Quando a lesão no nervo causa interrupção da continuidade axonal, sem perda de tecido, com possibilidade de aproximação dos cotos, é utilizada neurorrafia para reaproximação direta destes cotos (Braun, 1982). Nestes casos a sutura livre de tensão é fundamental para evitar a isquemia e a fibrose (Terzis et al., 1975; Sunderland, 1978).

As técnicas de reparo cirúrgico do nervo alcançaram grande progresso após a introdução do uso do microscópio por Smith (1964), o que tornou possível a obtenção de melhores resultados funcionais.

Watchmaker & Mackinnon (1997) afirmaram que, para a obtenção de resultados satisfatórios em um reparo de nervo, é fundamental a utilização de equipamentos como lupa ou microscópios, material adequado e específico, conhecimento da técnica microcirúrgica, reparo primário sempre que possível, caso seja necessário, o reparo secundário deve ser realizado em até três semanas, com aproximação dos cotos livres de tensão, optar pela interposição de enxerto quando houver perda de tecido nervoso (“gap”) e realizar a reeducação sensitiva e motora para melhorar os resultados.

Em 1947, Seddon afirmou que o enxerto de nervo autógeno era a única alternativa eficaz no tratamento de lesões com perda de tecido nervoso, e que o diâmetro do enxerto não deveria ser maior que o do nervo receptor para evitar a necrose central.

Porém, muitos outros tecidos têm sido utilizados: enxerto de um segmento de vaso sanguíneo na posição normal (Bunnell & Boyes, 1939; Fields et al., 1989; Fawcett & Keynes, 1990) ou ao avesso (Ferrari et al., 1999); enxerto venoso preenchido com músculo esquelético (Battiston et al., 2000; Fornaro et al., 2001); tubo de pericárdio bovino (Virmond & Pereira, 2000); tubo fibrocolagenoso envolto em fáscia (Watanabe et al., 2001).

Por outro lado, o uso de material sintético no reparo de nervo, como polietileno, silicone, metal, plástico, celulose, polímero de ácido glicólico, combinados ou não com agentes bioquímicos neurotróficos, tem sido defendido por muitos autores (Lundborg et al., 1982; Fields et al., 1989; Evans et al.,

1991; Frykman, 1993; Dellon, 1994; Watchmaker & Mackinnon, 1997; Watanabe et al., 2001; Wang et al., 2005).

Em todas estas técnicas é importante a união adequada dos cotos para que o axônio em regeneração alcance a extremidade distal do nervo lesado. Esta observação levou muitos autores a estudar a regeneração nervosa através de adesivos biológicos (Cooper & Falb, 1968; Boedts & Boukaert, 1984; Boedts, 1987; Moy et al., 1988; Nishihira & McCafrey, 1989; Jin et al., 1990; Daunois & Sébille, 1991; Bertelli & Mira, 1993).

Dentre os adesivos biológicos utilizados que alcançaram boa regeneração nervosa, podemos citar a cola de fibrina derivada de veneno de serpente (Viterbo et al., 1993b; Reis et al., 1998; Vicente et al., 1998; Reis & Rodrigues, 2000).

Payne et al. (2002) utilizaram grampos de titânio e afirmaram que esta é uma alternativa rápida e que os resultados foram similares aos obtidos com fio monofilamentar de náilon.

Porém, havendo a possibilidade, a reaproximação dos cotos através de sutura direta do nervo, ou seja, neurorafia término-terminal (NTT), é preferível a todas estas técnicas, pois apresenta os melhores resultados (Terzis et al., 1975; Millesi, 1982; Ide, 1983; Lundborg, 1987; Zhao et al., 1997; Santamaria et al., 1999; Yüksel et al., 1999; Rovak et al., 2001).

Neurorafia término-terminal

A NTT pode ser realizada através de suturas epineurais, perineurais ou epiperineurais.

Segundo Braun (1982), a sutura epineural é relativamente não traumática e de fácil execução, devido às características do epineuro, que permitem aproximar os cotos distais e proximais sem entrar em contato direto com os elementos neurais verdadeiros. Além disso, esta sutura preserva o tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos existentes abaixo do epineuro, de grande importância para evitar a formação de tecido cicatricial.

Evans et al. (1991) compararam a NTT realizada com os fascículos alinhados ou não. Segundo estes autores, a recuperação funcional na

neurorrafia com o correto alinhamento dos fascículos foi superior, e afirmaram que o alinhamento fascicular é fator importante no reparo de um nervo. Porém, segundo Lundborg (1987, 2000), não é um fator imprescindível.

A sutura perineural foi realizada por diversos autores visando à obtenção de um perfeito alinhamento entre os fascículos de um nervo seccionado (Rosegay & Edwards, 1980; Braun, 1982; Stopiglia & Erhart, 1987).

Este tipo de sutura permite a boa orientação fascicular em nervos monofasciculares ou com poucos fascículos (Millesi, 1973; Bora et al., 1976; Orgel & Terzis, 1977; Terzis, 1979; Kline et al., 1981; Kutz et al., 1981; Millesi, 1981).

Segundo Bora (1967), esta técnica apresenta a desvantagem de causar lesões no suprimento vascular do nervo durante a dissecação dos fascículos para seu alinhamento.

Trabalhos realizados comparando as técnicas de neurorrafia epineural ou perineural não demonstraram diferença significativa entre as duas técnicas (Braun, 1982; Lundborg, 1987).

Ferreira et al. (1974) e Venault et al. (1981) afirmaram que, em nervos multifasciculares, uma melhor coaptação é obtida por meio da aproximação individual de fascículos através da associação de duas técnicas de sutura, a epineural e a perineural (fascicular). A sutura epiperineural foi proposta por Ferreira et al. (1974), aconselhando a utilização de mínima tensão na sutura.

A NTT é a forma mais compatível com o processo anatomopatológico da regeneração nervosa, ou seja, existência de um coto proximal com axônios em regeneração penetrando em um tubo endoneural vazio após degeneração Walleriana. Assim, esta técnica deve ser a técnica de escolha quando se dispõe de um coto proximal e outro distal (Viterbo, 1992a).

Em casos onde há perda do coto proximal, a opção é seccionar um nervo vizinho e suturar seu coto proximal ao coto distal do nervo lesado. Porém, esta técnica causa prejuízo funcional ao nervo doador e às estruturas por ele inervadas (Harris & Tindall, 1991; Lohman et al., 1997).

Uma opção para evitar o sacrifício do nervo doador é a neurorrafia término-lateral (NTL), onde um nervo é suturado na lateral de outro, este último servindo como nervo doador.

Neurorrafia término-lateral

A NTL foi executada pela primeira vez, em 1895, por Ballance (apud Ballance et al., 1903) que suturou o coto distal do nervo facial seccionado à uma incisão na lateral do nervo acessório espinhal para tratamento da paralisia facial. Estes autores observaram retorno dos movimentos faciais, associados com movimentos dos ombros. Kennedy (1899) sugeriu técnica similar à de Ballance et al. (1903), porém, realizou uma incisão maior no nervo doador deixando intacto apenas o epineuro do lado oposto à NTL, obtendo os mesmos resultados (apud Papalia et al. 2007).

Outros autores relataram o uso do nervo hipoglosso para a NTL (Sherren, 1906), mas a inconveniência dos movimentos associados persistiu. Sherren (1906) sugeriu que fosse realizada incisão longitudinal ou transversal no nervo doador para aumentar o contato entre os axônios deste e do nervo receptor.

Estes métodos apresentavam prejuízos funcionais como resultado da desnervação de músculos inervados pelos nervos acessório espinhal e nervo hipoglosso. Provavelmente, esta foi a causa que levou Babcock (1927) a sugerir o abandono desta técnica.

Desde então, houve uma interrupção no relato de utilização de NTL até a publicação de Krivolutskaia et al. (1989). Estes autores trataram alguns casos de paralisia do ramo mandibular suturando seu coto distal à lateral do ramo bucal do nervo facial. Antes da sutura, estes autores realizaram ranhuras na lateral do nervo doador com uma agulha. Estes autores afirmaram terem alcançado completa recuperação funcional em quatro dos sete pacientes operados.

May et al. (1991) suturaram o coto distal do nervo facial lesado ao nervo hipoglosso parcialmente seccionado e minimizaram subsequentes danos funcionais à língua.

Em todas estas técnicas foi criada uma lesão na lateral do nervo doador no local da NTL. Tanto as incisões (Ballance et al., 1903; Sherren, 1906; May et al., 1991) ou ranhuras (Krivolutskaia et al., 1989), quebraram as barreiras de tecido conectivo permitindo o crescimento de axônios para dentro dos nervos receptores. Além disso, a secção de fibras axoniais do nervo doador no local da incisão levava a uma união término-terminal entre os tubos endoneurais do nervo doador e do nervo receptor.

Em 1992, Viterbo et al. introduziram a NTL sem lesão no nervo doador. No primeiro estudo em ratos, eles suturaram o coto distal do nervo fibular comum na lateral do nervo tibial, sem incisão ou abertura de janela epineural. Nenhum prejuízo ao nervo doador ou às estruturas por ele inervadas foi observado. Estes autores relataram um novo fenômeno, o crescimento de axônios do nervo intacto para o coto distal do nervo receptor.

Os resultados obtidos por Viterbo et al. (1992) foram confirmados por trabalhos posteriores (Lundborg et al., 1994b; Lohman et al., 1997; Ting et al., 1998; Rovak et al., 2000; Matsuda et al., 2005).

A grande discussão passou a ser a possível contaminação motora do coto distal por axônios originários do coto proximal, pois isto invalidaria a conclusão apresentada por Viterbo et al. (1992, 1994a).

Para prevenir a contaminação do coto proximal, Viterbo et al. (1992, 1994a); Zhang et al. (1998) e Kalliainen et al. (1999), inseriram o coto proximal do nervo fibular comum em músculos adjacentes.

Outros modelos foram apresentados como o modelo de mínima lesão de Terzis (Noah et al., 1997a). Neste modelo, os autores utilizaram um enxerto de nervo cruzando para o lado contralateral, isolando a área da NTL do coto proximal do nervo obturador, evitando sua contaminação. Variações desta técnica foram apresentadas (Rovak et al., 2000; Goheen-Robillard et al., 2002). Estes trabalhos confirmaram a reinervação do nervo receptor, sem a possibilidade de contaminação motora.

Após confirmação da eficácia da NTL através de diversos estudos experimentais, que demonstraram que brotamentos colaterais, tanto de nervos sensoriais quanto de nervos motores, reinervaram nervos receptores (Noah et al., 1997b; Shah et al., 1997; Zhao et al., 1997) e que os resultados eram

comparáveis aos obtidos com NTT (Lohman et al., 1997; Yüksel et al., 1999; Kalliainen et al., 1999) vários trabalhos surgiram relatando seu uso clínico.

Aplicação clínica da neurografia término-lateral

A NTL tem sido utilizada para recuperação de lesões de nervos nos membros superiores. Viterbo et al. (1995) realizaram vários enxertos utilizando NTL para unir o nervo frênico aos troncos C5 e C6 do plexo braquial avulsionado. Os autores relataram que exames de eletromiografia revelaram o aumento de uma para três unidades motoras nos músculos tríceps, peitoral maior e infra-espinhal após um ano da cirurgia. Afirmaram que pacientes com lesões graves de plexo braquial podem esperar melhoras motoras no membro superior devido às neurotizações obtidas com NTL.

Franciosi et al. (1998) relataram o tratamento de três pacientes com rupturas das raízes C5, C6 e C7 usando NTL. O nervo musculocutâneo foi cortado e suturado à lateral do nervo ulnar. Os autores relataram o retorno de contração do músculo bíceps após um período de quatro a seis meses.

No mesmo ano, Mennen (1998a) sugeriu a utilização de NTL no reparo de lesões do plexo braquial. Ele concluiu que, na maioria dos casos, esta técnica demonstrou-se simples e com bons resultados. Outros dois trabalhos publicados por Mennen, em 2003, relataram a recuperação quase total da sensibilidade e/ou da função motora (Mennen, 2003; Mennen et al., 2003).

Ogun et al. (2003) utilizaram NTL para unir o nervo mediano lateralmente ao nervo ulnar. Após 38 meses, eles obtiveram recuperação da sensibilidade em todos os pacientes. No entanto, a recuperação motora foi observada em apenas um de três pacientes. Eles concordaram que a NTL é uma boa alternativa para o enxerto de nervo em pacientes que apresentem grande distância entre as extremidades dos nervos lesados.

Voche (2005) e Voche & Ouattara (2005) trataram lesões traumáticas nas mãos e dedos utilizando NTL com janela epineural, com resultados comparados aos de enxertos de nervos ou veias, confirmando os

resultados de Mennen (1998a, 2003) e Mennen et al. (2003). Millesi (2004) também utilizou NTL em trauma de plexo braquial relatando bons resultados.

A NTL também tem sido utilizada na recuperação da sensibilidade. Viterbo et al. (1993a) relataram o uso de NTL, após remoção de enxerto de nervo sural, entre o coto distal do nervo sural e a lateral do nervo fibular comum superficial. Afirmaram que, apesar da remoção do nervo sural, os pacientes não apresentaram área de anestesia naquela região, mostrando que esta técnica previne sequelas sensoriais.

Santamaria et al. (1999) compararam NTT e NTL sem remoção de janela epineural para promover a recuperação de sensibilidade ao toque, dor, sensações térmicas após utilização de retalhos inervados pelo nervo radial para reconstrução de hemiglossectomia. Os resultados de sensibilidade à dor, obtidos com o uso de NTL, foram inferiores aos obtidos com o uso de NTT, mas a recuperação sensorial ocorreu em todos os pacientes.

Viterbo & Ripari (2002, 2008) descreveram o uso de NTL para restaurar a sensibilidade em pacientes paraplégicos. Estes autores ligaram, através de enxerto de nervo sural, os nervos intercostais acima da lesão e o nervo ciático com NTL, em dois pacientes. O primeiro paciente recuperou, após quatro anos, sensibilidade de 2 g em T10 a L1 e 300 g em L2 e L3. O segundo, após três anos, recuperou sensibilidade de 2 g em T10, 4 g em T11 e 300 g em T12, e relatou que podia sentir quando a bexiga urinária estava cheia. Após a cirurgia, os pacientes não apresentaram mais úlceras de pressão.

Outra utilização clínica da NTL tem sido no tratamento da paralisia facial (Viterbo, 1993; Yoleri et al., 2000; Galli et al., 2002; Koh et al., 2002; Kumar & Hassan, 2002; Yamamoto et al., 2003; Frey et al., 2006).

1.5. Paralisia facial

Pacientes com paralisia facial perdem o movimento da musculatura da mímica facial, de grande importância na comunicação, pois é através dela que se expressam sentimentos e emoções. Os efeitos da paralisia facial são debilitantes com uma variabilidade de possíveis problemas funcionais e estéticos (Tate & Tollefson, 2006). Além disso, o impacto da desfiguração facial

pode resultar em medo de lugares públicos e prejudicar a socialização. Portanto, a paralisia facial pode alterar a vida social do paciente, assim como determinar importante prejuízo psicológico, principalmente em crianças (Millesi, 1990; Lenert et al., 1998).

A paralisia facial caracteriza-se por perda da competência oral através da dificuldade na fala e incontinência salivar e para líquidos. Lacrimejamento, ectropio paralítico da pálpebra inferior e lagoftalmo podem levar à exposição da córnea, com ulceração e mesmo amaurose. Disfunção da válvula nasal também é frequente (Tate & Tollefson, 2006).

A causa mais comum de paralisia facial é idiopática (paralisia de Bell). Outras etiologias variam com o nível de lesão do nervo facial. As lesões intracranianas podem ser congênitas (agenesia do núcleo do nervo facial ou anomalias vasculares) ou adquiridas (doenças degenerativas do sistema nervoso central, trauma ou tumores como o neurinoma do nervo acústico). No segmento intratemporal do nervo facial, as lesões são, em sua maioria, traumáticas, devido a fraturas na base do crânio ou infecções, relacionadas com patologias do ouvido médio, ou são iatrogênicas durante cirurgias otológicas. E, no segmento extratemporal do nervo facial, o trauma é a principal causa da paralisia facial, seguida de neoplasias benignas ou malignas e cirurgia da glândula parótida (Vlastou, 2006).

A paralisia facial pode ser unilateral ou bilateral, total ou parcial, e pode ter diversas etiologias que devem ser estudadas antes de um possível tratamento cirúrgico (Alix et al., 2002).

Segundo Falcione et al. (2003), os fatores que influenciam o resultado do tratamento são a etiologia da paralisia, tipo de lesão, grau de perda tecidual, vascularidade dos tecidos circundantes, idade e condição geral do paciente, o local da lesão e, principalmente, a duração da paralisia. De acordo com Vlastou (2006), estes dois últimos fatores determinam o método de reconstrução e conseqüente resultado dos procedimentos cirúrgicos.

Atualmente, apesar do desenvolvimento de técnicas e instrumentos, não existe método para recuperação, totalmente satisfatória, de uma função tão delicada e complexa como a dos músculos da mímica facial (Jergovic et al.,

2001). Portanto, todo o esforço deve ser feito no sentido de preservar ou restabelecer as unidades neuromusculares (Vlastou, 2006).

Entre os diversos métodos para o tratamento da paralisia facial estão os métodos de regeneração neural e os de transposição muscular.

Métodos neurais

Os métodos de regeneração neural utilizados para o tratamento da paralisia facial são: reparo primário do nervo facial, interposição de enxertos de nervo, e enxerto de nervo transfacial.

O reparo primário do nervo facial é realizado em situações de trauma através de neurografia término-terminal. Segundo Tate & Tollefson (2006), muitos fatores limitam o uso desta técnica incluindo perda de segmentos de nervo e acesso cirúrgico para manuseio de segmentos intracraniano e intratemporal.

A interposição de enxertos de nervo é utilizada quando há a necessidade de sacrifício do nervo facial durante ressecção de tumores da glândula parótida, lesões no osso temporal e cânceres de pele invasivos, onde há a necessidade de obtenção de adequadas margens oncológicas (Tate & Tollefson, 2006). Muitos nervos doadores estão disponíveis, mas o auricular maior e o sural são ideais em termos de acessibilidade, conteúdo axonal e comprimento (Bascom et al., 2000).

Segundo Vlastou (2006), o enxerto de nervo transfacial é indicado quando o coto proximal do nervo facial não está acessível. A utilização do nervo facial contralateral fornece impulsos neurais do lado normal para o lado paralisado através do enxerto de nervo transfacial, provendo a reinervação dos grupos musculares correspondentes.

Scaramella (1971) foi o primeiro a utilizar o enxerto de nervo transfacial. Ele suturou o ramo cervical do nervo facial normal a um enxerto de nervo sural, passando sob o mento, e conectado à extremidade distal do tronco do nervo facial paralisado. Em um segundo caso ele utilizou o ramo bucal como nervo doador.

No mesmo ano, Smith (1971) descreveu a técnica em que posicionou o enxerto de nervo sural na região supra-labial, ligando o ramo bucal-zigomático do nervo facial normal aos ramos periféricos no lado paralisado. Este autor afirmou ter obtido melhor simetria em três pacientes operados.

Esta técnica foi modificada por Anderl (1973) através da utilização de múltiplas neurorrafias entre os ramos do nervo facial. Em 23 pacientes foram utilizados quatro enxertos de nervo sural, o primeiro posicionado na região frontal ligando o ramo zigomático do lado doador e o lado paralisado; dois enxertos foram posicionados acima do lábio, ligando diferentes grupos de fascículos, ao lado paralisado; e o último enxerto foi utilizado para tratar o segmento mandibular marginal. O autor afirmou que apenas quatro dos 23 pacientes apresentaram resultado pobre.

Conley & Backer (1979) suturaram o coto proximal do nervo hipoglosso ao coto distal do tronco do nervo facial utilizando NTT. Os autores classificaram os movimentos como bons em 77% dos pacientes. Afirmaram que as vantagens desta técnica são, entre outras, melhora do tono facial e movimentos faciais voluntários controlados pela língua.

Todas estas técnicas utilizaram enxerto de nervo transfacial com NTT em ambos os lados. No lado sadio, a neurorafia é utilizada em ramos menos calibrosos, pois a secção de ramos mais calibrosos causariam paralisia facial também no lado normal. No lado paralisado é realizada secção do tronco do nervo facial, onde o enxerto é suturado. A desvantagem deste método é necessidade de aplicação tardia, pois, o tempo ideal de aplicação da NTT, é de seis meses a um ano após o início da lesão, para certificar de que não há nervos distais sadios (Tate & Tollefson, 2006); necessidade de secção de nervos normais para realização da NTT, o que limita o número de enxertos a serem utilizados, pois um grande número de enxertos poderia provocar uma paralisia facial no lado normal (Viterbo, 1992b).

Viterbo (1992b) propôs a técnica do enxerto de nervo transfacial com neurorafia término-lateral. Nesta técnica é realizada uma incisão pré-auricular, e o enxerto de nervo sural é suturado ligando o tronco do nervo facial sadio ao tronco do nervo facial lesado através de NTL, sem seccioná-los. De acordo

com o autor, a vantagem desta técnica é possibilitar uma aplicação precoce, pois não há necessidade de secção de nervos, possivelmente funcionais, no lado lesado, e não causar lesão no nervo doador, o que permitiria a utilização de inúmeros enxertos.

Em 1993, Viterbo descreveu uma modificação desta técnica para utilização em pacientes com paralisia facial superior a um ano. Nesta técnica uma das extremidades do nervo sural é suturada à lateral intacta do nervo facial sadio através de NTL, e a outra extremidade é suturada, após secção, ao coto distal do tronco do nervo facial lesado com NTT. A vantagem desta técnica é não causar lesão no nervo facial sadio e, teoricamente, aumentar a qualidade da inervação no lado lesado.

Se a paralisia facial estiver instalada há mais de um ano e meio, não existe mais possibilidade de reconstrução nervosa (Chuang & Wei, 1989; Tate & Tollefson, 2006; Vlastou, 2006), pois, após este tempo a atrofia das placas motoras já está estabelecida, e, portanto, não é possível a reinervação neuromuscular das unidades funcionais da face (Gagnon & Molina-Negro, 1989). Assim, novos complexos neuromusculares deverão ser transferidos para reabilitação do lado facial paralisado (Vlastou, 2006). Uma alternativa é a transposição muscular.

Transposição muscular

Muitos músculos têm sido utilizados na transposição muscular, dentre eles: o platisma (Edgerton et al., 1975); músculos do pé, como o extensor dos dedos (Vedung et al., 1984) e o abductor do hálux (Jiang et al., 1995); músculo esternocleidomastóideo (Schottstaedt et al., 1955); reto abdominal (Koshima et al., 1997a); reto femoral (Koshima et al., 1994; Koshima et al., 1997b); latíssimo dorsal (Harii et al., 1998); gracilis (Gousheh et al., 1995; Ferreira & Marques de Faria, 2002; Kumar & Hassan, 2002); serratus anterior (Buncke et al., 2002) e peitoral menor (Terzis, 1989; Scevola et al., 2003).

Outra técnica utilizada na reabilitação do movimento da mímica facial é a transposição de músculos da mastigação, conhecida desde o início do século XX, como o músculo masseter (Baker & Conley, 1979; Correia &

Zani, 1973) e o temporal (Gilles, 1934; May & Drucker, 1993). A vantagem desta técnica é que estes músculos são inervados pelo nervo trigêmeo, portanto, não são comprometidos pela lesão no nervo facial. Através desta técnica, ao morder, o paciente sorri (Baker & Conley, 1979; May, 1984).

O músculo temporal é geralmente o escolhido para transposição, pois seu vetor de tração coincide com o do músculo zigomático, responsável pelo sorriso. Gilles (1934) propôs a liberação da parte posterior do músculo temporal de sua origem rebatendo-o por cima do arco zigomático, sendo suturado ao sulco nasolabial, após alongamento com enxerto de fásia lata. A desvantagem deste método é o volume antiestético na região zigomática, causado pelo rebatimento do músculo temporal.

Em 1953, MacLaughlin propôs a mobilização ortodrômica do músculo temporal, onde o músculo era deslizado por baixo do arco zigomático após osteotomia do processo coronóide, via incisão intra-oral. O músculo temporal era, então, ligado ao músculo orbicular da boca através de uma tira de fásia lata. Diferentemente da técnica de Gilles, o músculo não tinha seu sentido invertido.

Breidahl (1996) sugeriu procedimento semelhante ao de MacLaughlin, porém, com abordagem extra-oral e retirada do arco zigomático. Um enxerto de fásia lata era suturado ao tendão do músculo temporal e ao músculo orbicular da boca, próximo à comissura labial.

Posteriormente, Viterbo & Faleiros (1999) propuseram técnica semelhante à de Breidahl, porém sem ressecção do arco zigomático. Segundo os autores, a vantagem desta técnica é que o tempo cirúrgico é menor e a cirurgia pode ser feita com anestesia local, além de possibilitar melhor resultado estético.

Labbé & Huault (2000) descreveram a técnica chamada mioplastia de alongamento do músculo temporal, suturando seu tendão diretamente ao músculo orbicular da boca, sem enxerto de fásia lata. O arco zigomático é removido para expor o processo coronóide, e novamente posicionado e fixado após a anteriorização do músculo temporal. Segundo os autores, os resultados obtidos foram excelentes.

Em 2003, Labbé et al. relataram aperfeiçoamento em sua técnica de alongamento do temporal adicionando um enxerto de nervo transfacial. A extremidade superior do nervo sural foi suturada de maneira término-terminal a um dos ramos do nervo temporal profundo, que foi seccionado. A outra extremidade foi suturada a um ramo distal do nervo facial sadio (palpebral inferior ou zigomático) realizando uma dupla inervação do músculo temporal, via seus nervos originais e via enxerto transfacial.

Esta técnica permite que o músculo temporal seja acionado precocemente, após algumas semanas, ao morder, determinando o sorriso voluntário e, tardiamente, após a regeneração dos axônios via enxerto de nervo transfacial, de forma espontânea. Labbé et al. (2003) afirmaram que o enxerto de nervo parece ajudar a transposição muscular a obter melhor função facial e, portanto, aumenta a qualidade do sorriso espontâneo. Indicaram a dupla inervação do músculo temporal para crianças, adultos jovens ou naqueles pacientes onde a realização de fisioterapia é dificultada.

Ao seccionar um dos ramos do nervo temporal profundo Labbé et al. (2003) realizaram uma desnervação de parte do músculo temporal. Desta maneira, estas fibras musculares estão sujeitas a uma reinervação através do enxerto de nervo sural, que, se tratando de um enxerto longo, pode não ocorrer adequadamente ou mesmo não ocorrer, levando a uma atrofia muscular e, consequentes prejuízos funcionais ao paciente.

Uma alternativa para evitar a secção de um dos ramos do nervo temporal profundo e risco de atrofia muscular, seria a realização da dupla inervação muscular através de NTL, suturando a extremidade do enxerto de nervo sural à lateral do ramo do nervo temporal profundo. Assim, o músculo temporal não correria o risco de perder sua força ou sofrer desnervação. Porém, seria possível a ocorrência de dupla inervação muscular através de NTL? Ou seja, o enxerto de nervo sural e o nervo temporal profundo inervariam, simultaneamente, o músculo temporal?

Se a dupla inervação não ocorresse, o nervo temporal profundo poderia ser seccionado proximalmente à NTL em um segundo tempo cirúrgico. Nesta situação, seria possível que o enxerto inervasse imediatamente o músculo temporal evitando sua atrofia?

Sabendo-se que as colunas de células de Schwann ou bandas de Bügner, formadas após degeneração Walleriana, é uma via indispensável para que ocorra reinervação do órgão alvo (Cajal, 1928 apud Ide, 1996), o nervo receptor sofreria degeneração Walleriana anterior à inervação pelo enxerto de nervo?

2. Objetivos

1. Analisar a ocorrência de dupla inervação muscular através de NTL, ou seja, se tanto a NTL quanto a inervação original do músculo, interferem, simultaneamente, na contração e trofismo muscular.
2. Avaliar a imediata inervação muscular através da NTL, após secção do nervo receptor, evitando atrofia muscular. Ou seja, se o enxerto é capaz de determinar a inervação logo após a secção do nervo receptor proximalmente à neurorrafia.
3. Avaliar a ocorrência de degeneração Walleriana no segmento distal à NTL no nervo receptor.

3. MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu, no Laboratório de Cirurgia e Ortopedia (cirurgias e teste da avaliação da marcha) e no Laboratório de Urologia (teste eletrofisiológico, coleta das peças histológicas, sacrifício dos animais e confecção das lâminas histológicas).

3.1. Animais

Todo o procedimento está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob o protocolo nº. 427 da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu (Anexo 1).

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizados 140 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, pesando, em média, 195,6 (\pm 18,8) g. Os animais foram divididos, através de sorteio, em sete grupos experimentais. As cirurgias foram realizadas conforme o grupo no qual o animal foi incluído.

3.2. Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador, padronizando-se o método.

Precedendo cada procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.), realizada tosquia e assepsia com PVPI (polivinilperrolidona-iodo).

Em todos os animais foi realizada incisão de dois centímetros no membro posterior direito. Os nervos ciático, fibular comum e tibial foram dissecados.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, entre os grupos experimentais.

No grupo G1 ou controle de normalidade, nenhum outro procedimento foi realizado além da dissecação nervosa (Fig. 1). Os animais foram sacrificados aos 120 dias.

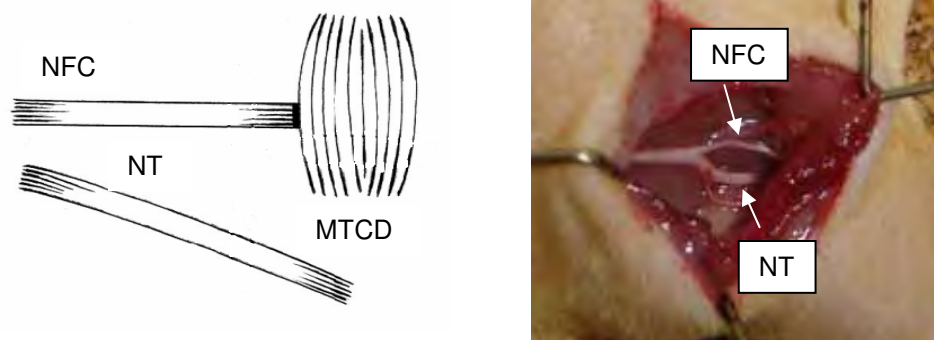


Figura 1 – Esquema da cirurgia realizada no G1. NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; MTCD = músculo tibial cranial direito.

No grupo G2 ou controle de desnervação, o nervo fibular comum foi seccionado e os cotos proximal e distal foram invertidos 180 graus, inseridos em musculatura adjacente e fixados de forma a não permitir a reinervação (Fig. 2). Os animais foram sacrificados aos 120 dias.

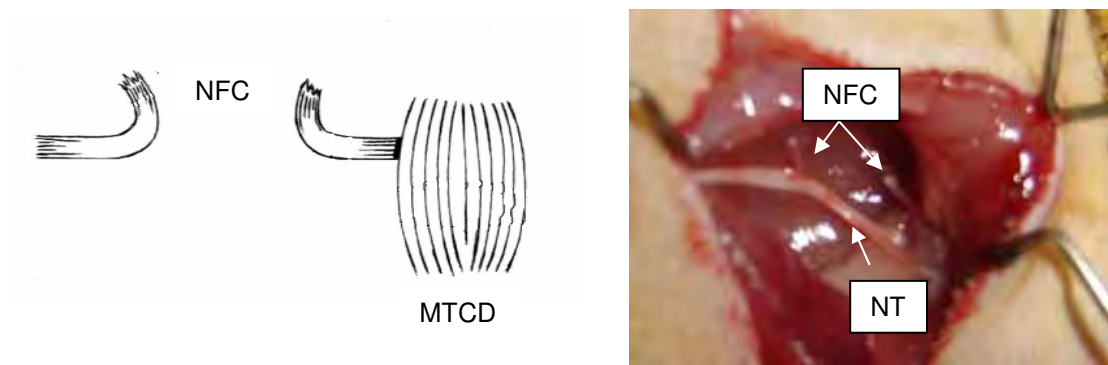


Figura 2 – Esquema da cirurgia realizada no G2. NFC = nervo fibular comum; MTCD = músculo tibial cranial direito.

No grupo G3 o nervo tibial foi seccionado e o coto proximal suturado na face lateral do nervo fibular comum, sem abertura de janela epineural. Os animais foram sacrificados após 120 dias (Fig. 3).

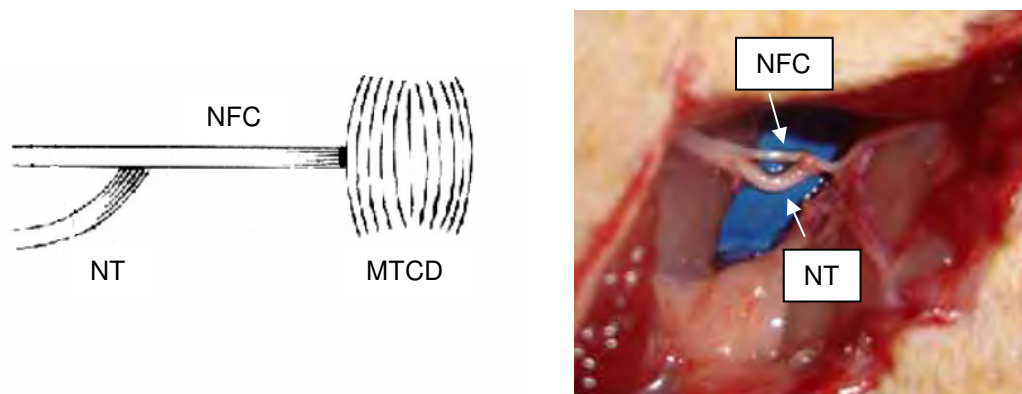


Figura 3 – Esquema da cirurgia realizada no G3. NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; MTCD = músculo tibial cranial direito.

No grupo G4 foi realizado o mesmo procedimento do grupo G3, ou seja, secção do nervo tibial e sutura de seu coto proximal na lateral intacta do nervo fibular comum. Após 120 dias, o nervo fibular foi seccionado proximal à neurorrafia e os cotos invertidos e suturados em musculatura adjacente. Os animais foram sacrificados após 30 dias da segunda cirurgia (Fig. 4). Este grupo foi criado para verificar se a dupla inervação seria capaz de manter a inervação do músculo tibial cranial após secção do nervo fibular comum.

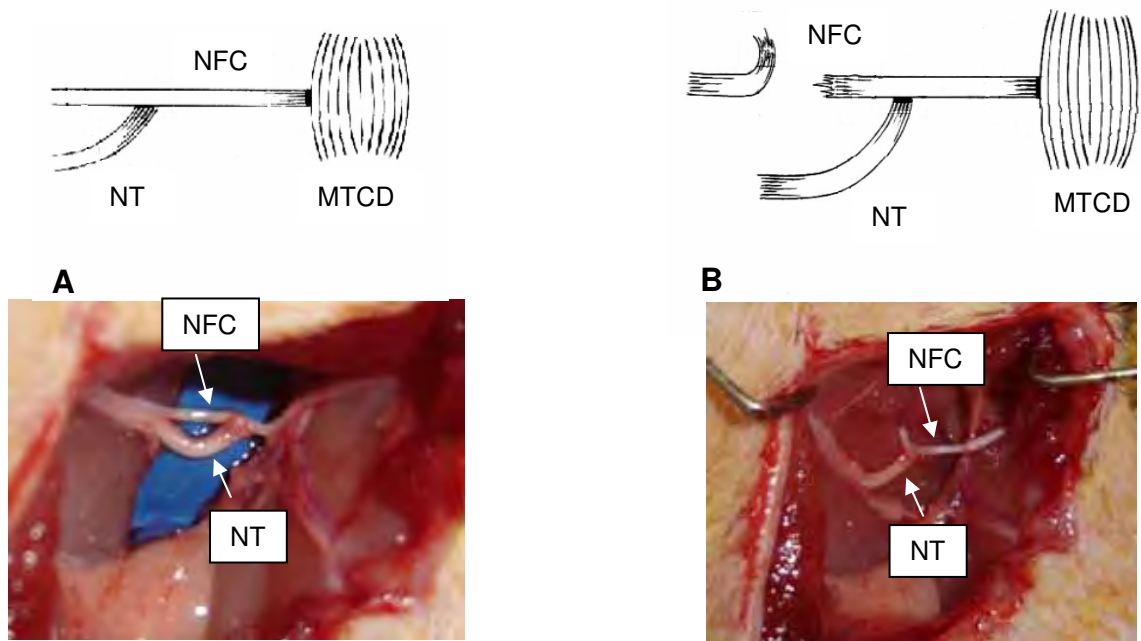


Figura 4 – Esquema da cirurgia realizada no G4. **A** = cirurgia realizada conforme G3; **B** = cirurgia realizada após 120 dias; NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; MTCD = músculo tibial cranial direito.

No grupo G5 foi realizado o mesmo procedimento do grupo G3, ou seja, secção do nervo tibial e sutura de seu coto proximal na lateral intacta do nervo fibular comum, porém, neste grupo, os animais, diferentemente do G3, foram sacrificados com 150 dias (Fig. 5). Este grupo foi criado porque no grupo G4 os animais mantiveram a neurografia término-lateral por 150 dias.



Figura 5 – Esquema da cirurgia realizada no G5. NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; MTCD = músculo tibial cranial direito.

No grupo G6 foi realizado o mesmo procedimento do grupo G3, ou seja, secção do nervo tibial e sutura de seu coto proximal na lateral intacta do nervo fibular comum. Após 120 dias, os nervos tibial e fibular comum foram seccionados proximal à neurografia, invertidos 180 graus, inseridos em musculatura adjacente e fixados para evitar a reinervação. Os animais foram sacrificados 30 dias após as secções (Fig. 6). Este é um grupo desnervado para comparação ao G4.

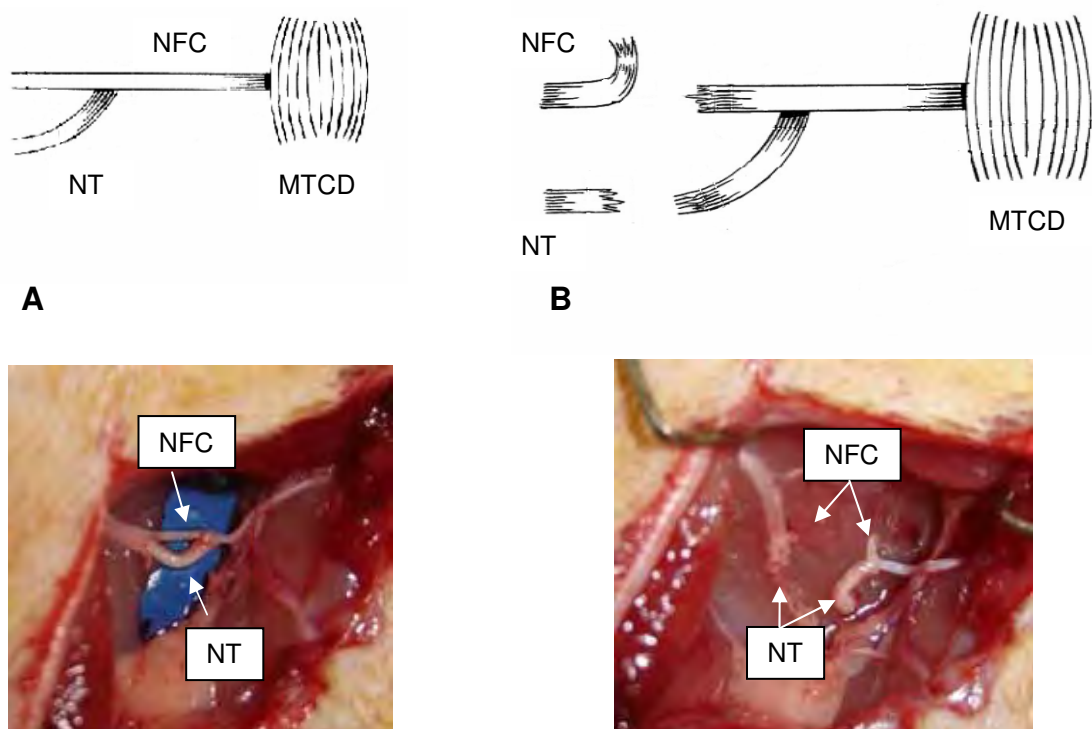


Figura 6 – Esquema da cirurgia realizada no G6. **A** = cirurgia realizada conforme G3; **B** = cirurgia realizada após 120 dias; NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; MTCD = músculo tibial cranial direito.

No grupo G7 o nervo fibular comum foi seccionado 30 dias antes da cirurgia proposta no grupo G3, ou seja, secção do nervo tibial e sutura de seu coto proximal na lateral intacta do nervo fibular comum. Os animais foram sacrificados após 120 dias da realização da NTL (Fig. 7). Este grupo foi criado para comparar a dupla inervação com a reinervação através de NTL.

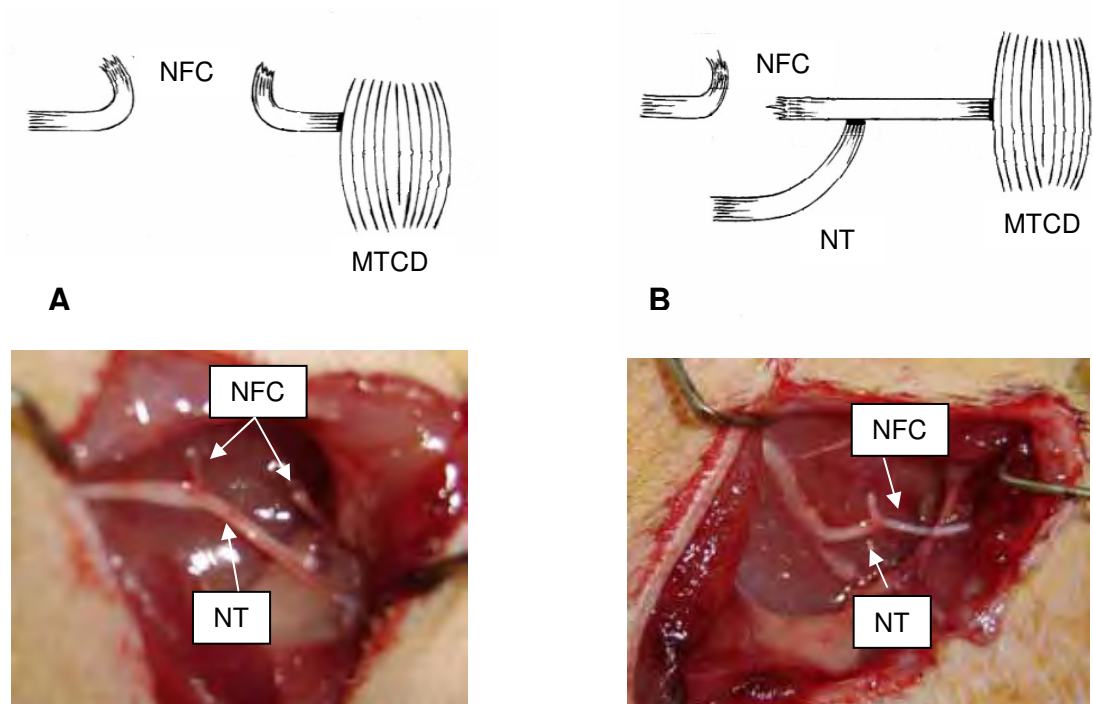


Figura 7 – Esquema da cirurgia realizada no G7. **A** = desnervação do músculo tibial cranial direito; **B** = cirurgia realizada após 30 dias; NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; MTCD = músculo tibial cranial direito.

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcelos com aumento de 16 vezes.

Para as neurorrafias foram utilizados quatro pontos simples com fio de náilon 10-0. Após o procedimento descrito, a incisão foi suturada com pontos simples utilizando fio mononáilon 4-0.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas contendo cinco animais cada, em temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas com ração e água *ad libitum*, até o momento do sacrifício.

A Figura 8 mostra os esquemas das cirurgias realizadas nos grupos utilizados neste trabalho.

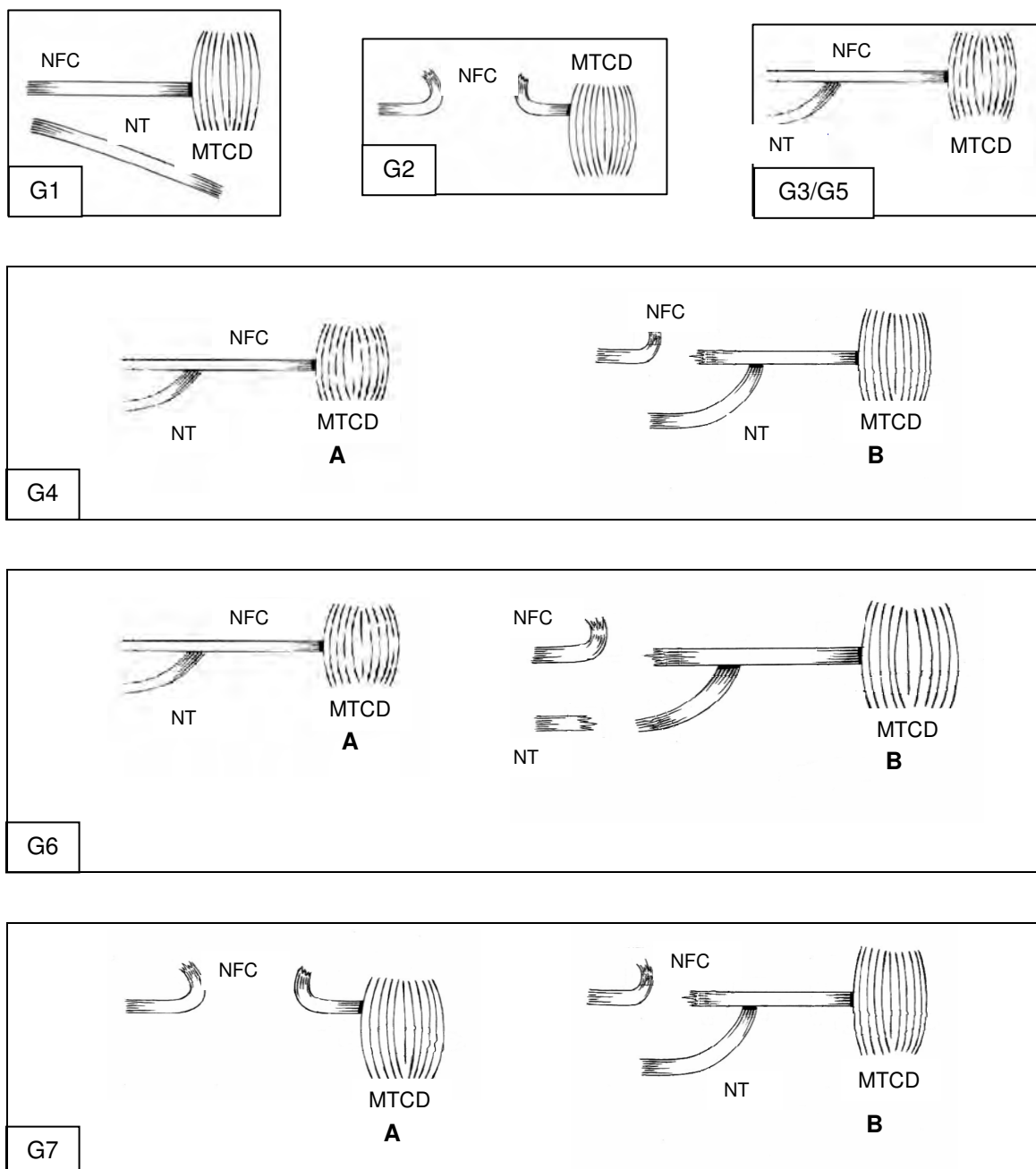


Figura 8 – Esquemas das cirurgias realizadas nos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7.

3.3. Testes realizados

Todos os testes foram realizados e os resultados analisados pelo pesquisador padronizando-se o método.

Teste de avaliação da marcha

O teste de avaliação da marcha (*Walking track analysis*) foi realizado no dia pré-determinado para o sacrifício de cada animal, de acordo com a data de realização da cirurgia.

As patas traseiras de cada animal foram umedecidas em tinta nanquim preta, e, os animais induzidos a andar por um corredor de 78 cm X 9 cm, sobre uma folha de papel branco com dimensões apropriadas (Fig. 9).



Figura 9 – Teste da marcha (walking track analysis).

As pegadas deixadas na folha de papel branco foram analisadas através das medidas da distância entre os dedos da pata experimental (E) e os dedos da pata normal (N) à frente (TOF); a distância do calcanhar aos dedos (PL); distância entre o primeiro e quinto dedos (TS); distância entre o segundo e quarto dedos (IT) (Fig. 10). A partir destas medidas foram realizados os

cálculos do índice funcional do nervo ciático (IFC), segundo De Medinacelli et al. (1982)¹ e o índice funcional do nervo fibular comum (IFFC), segundo Bain et al. (1989)²:

$$(1) \text{ IFC} = \frac{\text{ETOF} - \text{NTOF}}{\text{NTOF}} + \frac{\text{NPL} - \text{EPL}}{\text{EPL}} + \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} + \frac{\text{EIT} - \text{NIT}}{\text{NIT}} \times \frac{220}{4}$$

$$(2) \text{ IFFC} = 174,9 \times \left(\frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} \right) + 80,3 \times \left(\frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} \right) - 13,4$$

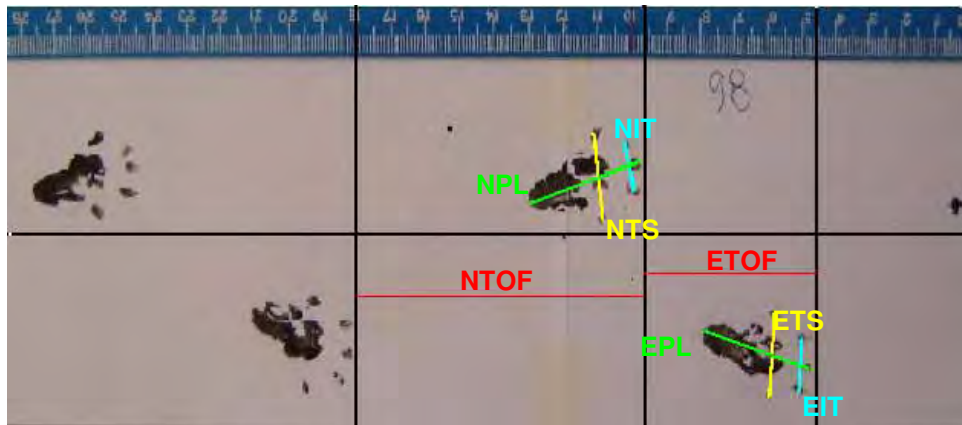


Figura 10 – Medidas realizadas para cálculo do índice funcional do nervo ciático (IFC) e do índice funcional do nervo fibular comum (IFFC).

Em alguns casos, os animais caminharam sobre o dorso da pata (Fig. 11) e, portanto, nenhuma medida pôde ser feita no lado experimental. Nestes casos, atribuíram-se os seguintes valores arbitrários: ETOF = um terço da distância entre duas pegadas normais; NTOF = dois terços da mesma distância; EPL = 80 mm; ETS = 6 mm e EIT = 6 mm, conforme De Medinacelli et al. (1982).

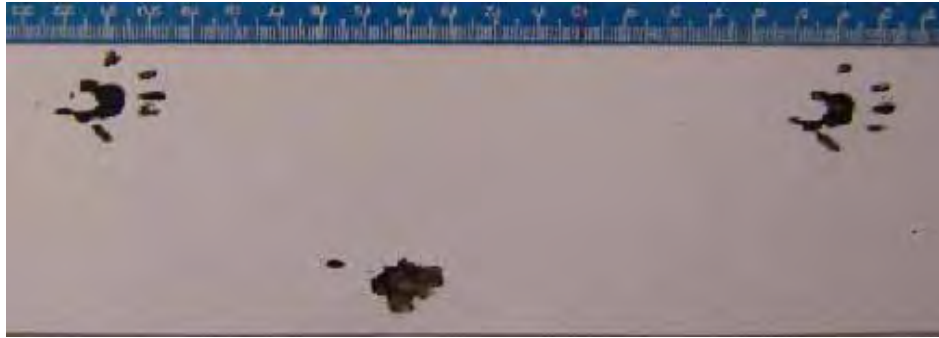


Figura 11 – Exemplo de teste para os quais foram atribuídos os valores arbitrários de ETOF, NTOF, EPL, ETS, EIT.

Teste eletrofisiológico

Para a realização do teste eletrofisiológico a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C.

Nos grupos G1, G2, G3 e G5, o teste eletrofisiológico foi realizado em um único momento: imediatamente antes do sacrifício dos animais. E nos grupos G4, G6 e G7 em dois momentos, antes da secção nervosa (G4 e G6) ou da neurorrafia (G7) e imediatamente antes do sacrifício dos animais.

Após anestesia com pentobarbital sódico (30 mg/kg, i.p.), os animais foram imobilizados em decúbito ventral. Foi realizada, após tosquia e assepsia, uma ampla incisão no membro posterior direito permitindo acesso aos nervos ciático, fibular comum e tibial, e músculo tibial cranial. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência (Fig. 12c). O eletrodo ativo foi implantado no centro do músculo tibial cranial, e o de referência próximo ao tendão de inserção do músculo (Fig. 12a). A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita através de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2 mm (Fig. 12b). O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo ciático, de modo que, nos grupos G3, G4, G5, G6 e G7, a estimulação foi feita proximal à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através dela (Fig. 12a).

A frequência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 μ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts.

Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os sete grupos. Foi utilizado o eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (Fig. 12d).

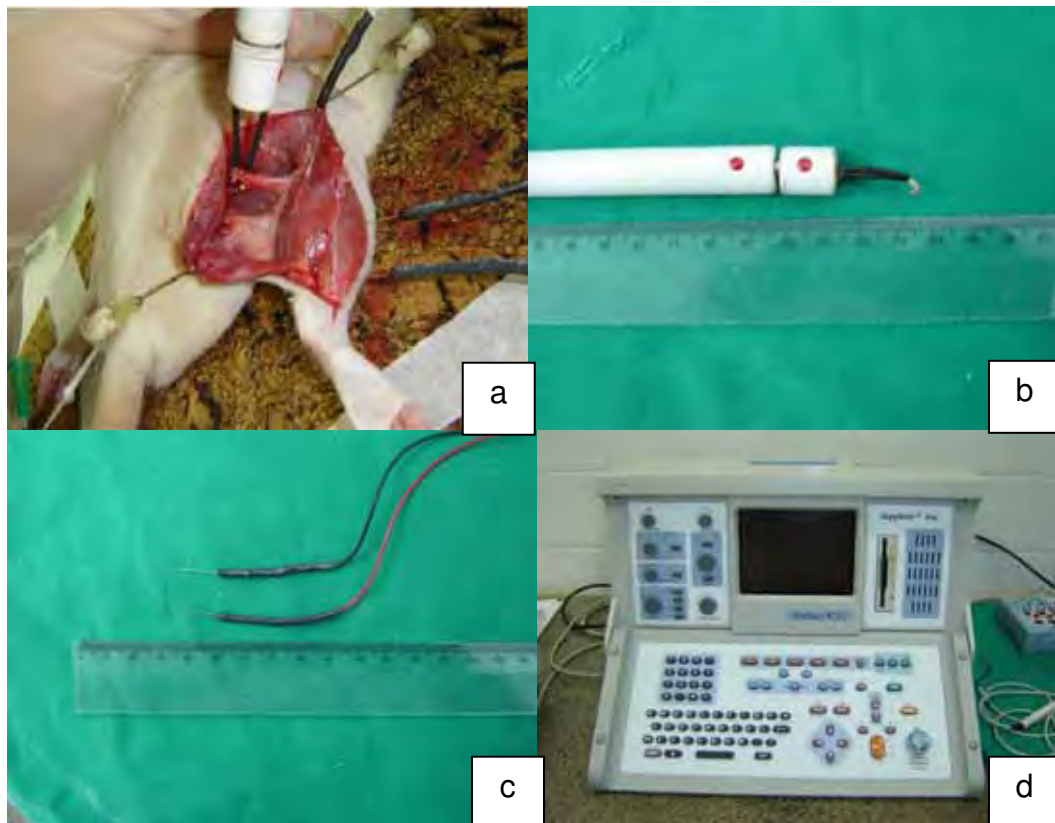


Figura 12 – Teste eletrofisiológico. a – posicionamento dos eletrodos; b – eletrodo de estimulação bipolar; c – eletrodos de captação em agulha; d – eletromiógrafo.

Nos animais que não apresentaram resposta muscular ao estímulo elétrico os valores de latência tenderam ao infinito, sendo atribuído um valor altíssimo (1000 ms) para efeito de cálculo.

3.4. Coleta das peças histológicas e sacrifício

Após a realização do teste eletrofisiológico, procedeu-se à coleta de segmentos dos nervos fibular comum e tibial, assim como à coleta do músculo tibial cranial direito e esquerdo de cada rato.

Os músculos tibiais craniais esquerdos foram pesados sem o tendão e descartados. A média das massas destes músculos (E) foi utilizada para comparação com os grupos experimentais.

Os músculos tibiais craniais direitos foram pesados sem o tendão e mantidos imersos em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento do processamento histológico.

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovisk e refrigerados a 4°C até o momento do processamento histológico. N1 é o segmento de nervo fibular comum distal à NTL; N2 é o segmento de nervo tibial proximal à NTL; N3 é o segmento de nervo fibular comum proximal à NTL; N4 é o segmento "T" correspondente à NTL; os cotos inseridos em musculatura adjacente também foram coletados, N5 coto proximal do nervo fibular comum; N6 coto distal do nervo tibial e N7 coto proximal do nervo tibial (Fig. 13).

Após a coleta das peças histológicas de interesse, os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, administrado intraperitonealmente.

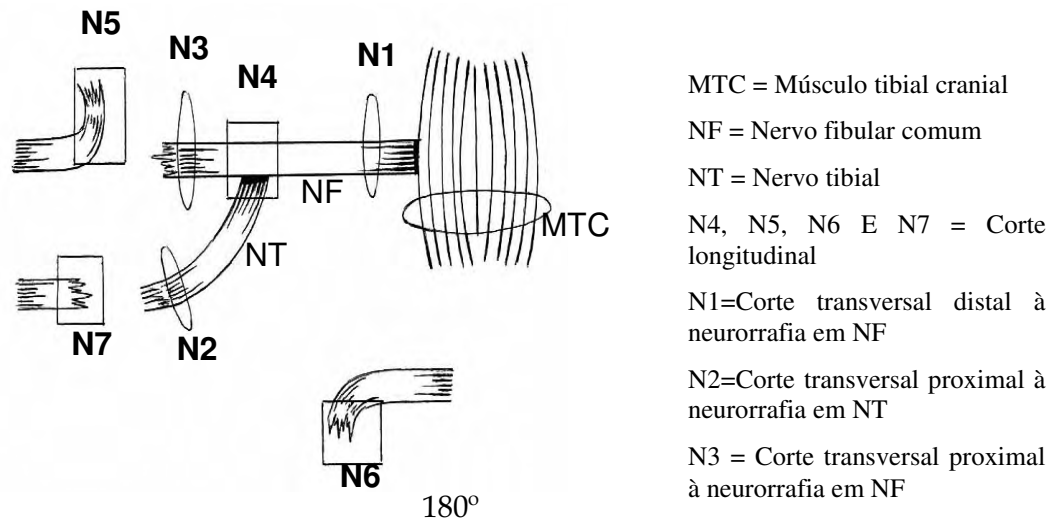


Figura 13 – Músculo tibial cranial e segmento de nervo coletados e enviados para histologia conforme grupo experimental.

3.5. Processamento histológico do músculo tibial cranial

Os músculos tibiais craniais direitos, congelados em nitrogênio líquido, foram submetidos a secções transversais de 7 μm em criostato *Leica* CM1850. As secções foram realizadas na região central, transversalmente ao maior eixo do músculo. Foram realizados de 4 a 6 cortes de um mesmo músculo possibilitando a escolha de um corte com menos artefatos histológicos durante a análise. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE).

As lâminas foram identificadas com o número de registro no laboratório para que o pesquisador não soubesse a que animal ou grupo pertencia. A numeração real foi revelada apenas para a análise estatística.

Digitalização das imagens da lâmina histológica do músculo tibial cranial.

As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio óptico em menor aumento (50 vezes) para escolha do corte histológico com menos artefatos. Foi utilizado aumento de 200 vezes para a análise das fibras musculares.

As imagens foram capturadas por uma câmera digital *Leica* DFC 280 e salvas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1 GB DDR, HD 80 GB. Foram salvas, aleatoriamente, 10 imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico (Fig. 14).

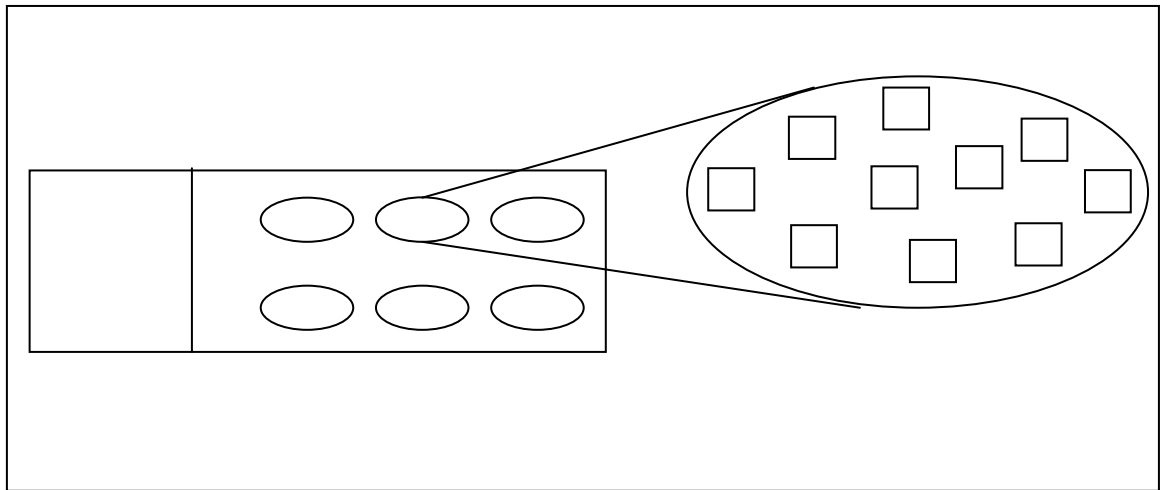


Figura 14 – Escolha do corte histológico e das 10 imagens, de diferentes campos, salvas para posterior medida de área e menor diâmetro das fibras musculares.

Medidas de área e menor diâmetro das fibras musculares

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área e menor diâmetro das fibras musculares.

As medidas foram feitas de modo semi-automático utilizando-se software Sigma Pro Image Analysis, versão 5 da Jandel Scientific Corporation.

As fibras foram medidas, aleatoriamente, tomando-se uma fibra de cada quadrante da imagem e uma central. Portanto, foram medidas 5 fibras por imagem salva (Fig. 15), ou seja, 50 fibras por lâmina.

Os resultados obtidos de área e menor diâmetro das fibras foram organizados em uma tabela e, então, calculada a média das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos.

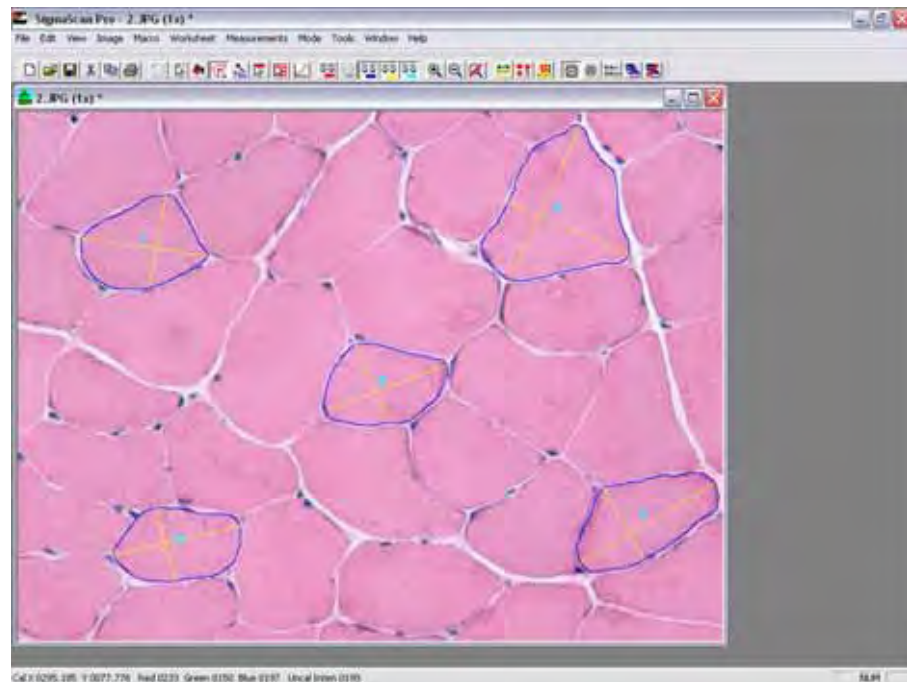


Figura 15 – Escolha aleatória de cinco fibras musculares em uma mesma imagem.

3.6. Processamento histológico dos segmentos de nervo

Os segmentos de nervo N1, N2 e N3 (Fig. 13), fixados em solução de Karnovisk, foram processados pela técnica de resina Araldite 502[®] para microscopia eletrônica.

Após fixação por um período superior a 24 horas em solução de Karnovisk, e lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por três vezes com duração de cinco minutos cada vez, os segmentos de nervo sofreram uma pré-coloração com tetróxido de ósmio (1:1) por duas horas. Após nova lavagem com tampão fosfato, foi realizada desidratação por uma bateria de concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). A inclusão em resina Araldite[®] foi realizada em duas etapas: em uma solução de resina e acetona (1:1), permanecendo por 24 horas em dissecador; e em resina, após 10 minutos em dissecador, permanecendo em estufa a 37°C por uma hora. O emblocamento foi realizado posicionando-se o segmento de nervo em resina Araldite[®] e mantido em estufa a 60°C por 48 horas para polimerização (Fig. 16).

Antes do corte histológico os blocos foram trimados, ou seja, preparados para o corte através da eliminação do excesso de resina ao redor do segmento de nervo. Esta trimagem foi realizada em lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6 x, com auxílio de uma lâmina Gillette®.

Com o bloco preparado foram realizados cortes transversais semi-finos (0,5 µm) em micrótomo *Leica* MZ6. Após o corte, a lâmina foi aquecida sobre uma chapa a 45°C para secagem e pré-aderência. A seguir a lâmina permaneceu em estufa a 60°C por 12 horas para aderência do corte à lâmina de vidro.

A coloração foi realizada manualmente, lâmina por lâmina, com azul de toluidina 1% durante 5 minutos. Após a secagem a lâmina foi colada e a lâmina identificada com o número de registro no laboratório.

Os segmentos de nervo N5, N6 e N7 (Fig. 13), foram incluídos em parafina e corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina. Estes segmentos foram avaliados quanto à formação de neuromas de amputação.

Os segmentos de nervo N4 foram corados pelo método de Bielschowsky e analisados quanto ao crescimento dos axônios do nervo doador para dentro do nervo receptor.

Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos

As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 100 vezes para escolha do corte histológico com menos artefatos. Foi utilizado aumento de 400 vezes para a análise das fibras nervosas.

As imagens foram capturadas por uma câmera digital *Leica* DFC 280 e salvas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1 GB DDR, HD 80 GB. Foram salvas duas imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico.

PROCESSAMENTO DE NERVOS

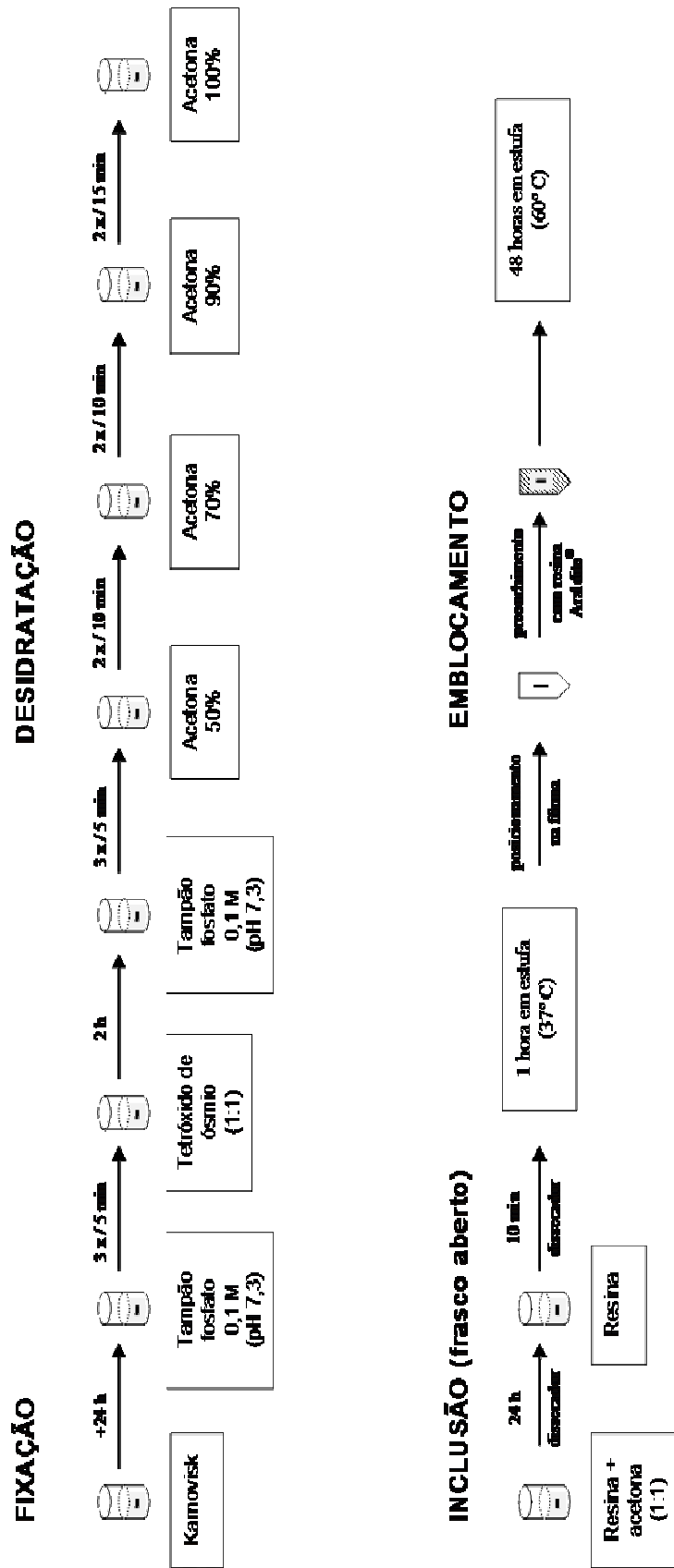


Figura 16 – Processamento histológico dos segmentos de nervo (N1, N2 e N3) em resina Araldite®

Medidas de área e menor diâmetro das fibras nervosas

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área e menor diâmetro dos axônios, densidade axonal e área da bainha de mielina.

As medidas foram feitas de modo semi-automático utilizando-se software Sigma Pro Image Analysis, versão 5 da Jandel Scientific Corporation.

Após abrir a imagem a ser analisada, foi realizado um aumento (“zoom”) e este campo foi medido em 50 imagens, obtendo-se uma área média de 5128,17 μm^2 . Todas as fibras nervosas inteiras presentes nesta área, com exceção das fibras que apresentaram artefatos de fixação, foram medidas e contadas.

Após contagem das fibras nervosas calculou-se a densidade axonal, medida em axônio/ μm^2 , através da fórmula:

$$\text{Densidade axonal} = \text{número de axônios} / 5128,17 \mu\text{m}^2$$

Foram realizadas as medidas da área e diâmetro mínimo da fibra nervosa e do axônio (Fig. 17). As medidas da área da bainha de mielina foram obtidas subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa.

Os resultados obtidos de área e menor diâmetro axonal foram organizados em uma tabela e, então, calculada a média das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos.

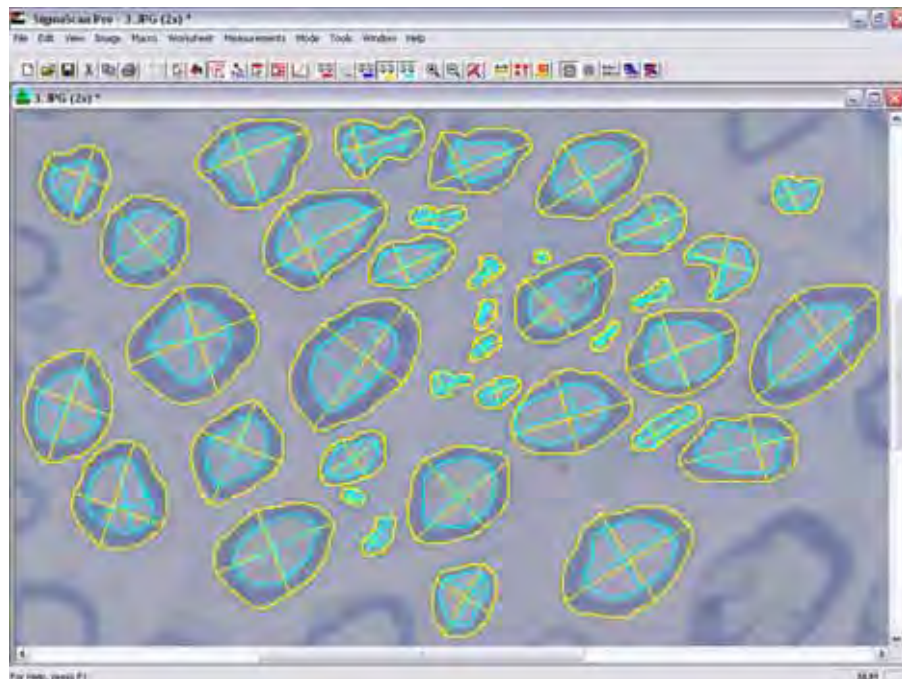


Figura 17 – Seleção das fibras axoniais para medidas de área axonal, diâmetro axonal e área da bainha de mielina. Fibras inteiras circulado internamente (axônio) em azul e externamente (fibra nervosa) em amarelo.

3.7. Análise Estatística

Para a comparação dos sete grupos entre si, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey, se detectada diferença estatística.

Quando comparados as massas iniciais às massas finais dos ratos, ou os dados do estudo eletrofisiológico antes das secções nervosas (G4 e G6) ou da NTL (G7) e antes do sacrifício dos animais, foi utilizado teste “t” pareado.

Para comparação das medidas de diâmetro mínimo nos segmentos N1 e N3 nos grupos G3, G5 ou G7, foi utilizado teste “t” de Student.

Em todas as análises foi utilizado nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Massa corporal

Quando avaliadas as massas corporais, medidas antes da cirurgia (inicial) e antes do sacrifício (final) dos ratos, não foi observada diferença estatística. Houve aumento significativo de massa, em todos os animais observados, quando comparadas as massas iniciais com as finais (Fig. 18 e Tabela 1).

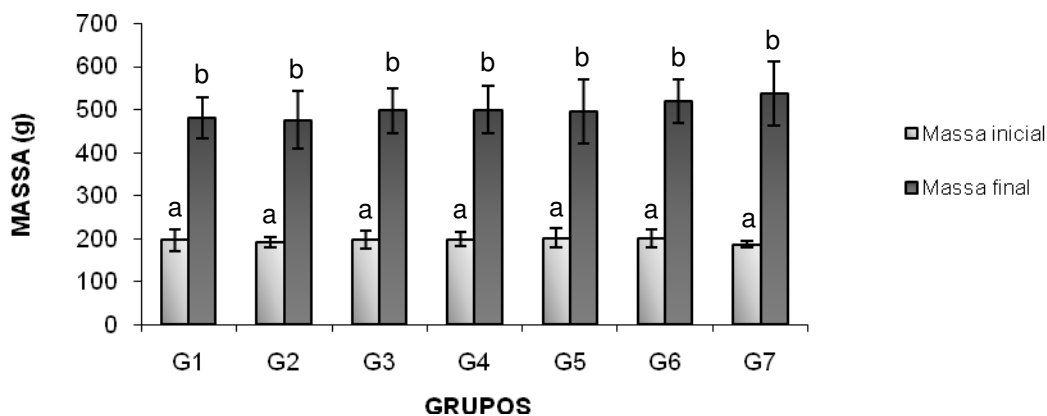


Figura 18 – Massa dos ratos (g). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Massas iniciais e finais dos ratos

<i>Grupo</i>	<i>Massa (g)</i>	
	Inicial	Final
G1	196 ± 25 ^a	479 ± 47 ^b
G2	192 ± 12 ^a	475 ± 67 ^b
G3	197 ± 20 ^a	497 ± 53 ^b
G4	198 ± 17 ^a	499 ± 56 ^b
G5	201 ± 22 ^a	494 ± 75 ^b
G6	199 ± 21 ^a	519 ± 52 ^b
G7	186 ± 8 ^a	537 ± 74 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.2. Teste de avaliação da marcha

A Figura 19 e Tabela 2 mostram os resultados do índice funcional do nervo ciático (IFC) de cada grupo, expressos como porcentagem de perda da função normal. Os grupos G3 (-38,4 ± 8,8) e G5 (-45,1 ± 12,2) não diferiram, estatisticamente, entre si ou dos grupos G6 (-77,2 ± 13,5) e G7 (-70,8 ± 7,7). O G4 (-83,1 ± 6,0) não diferiu do grupo G7 ou dos grupos G2 (-109,3 ± 7,2) e G6.

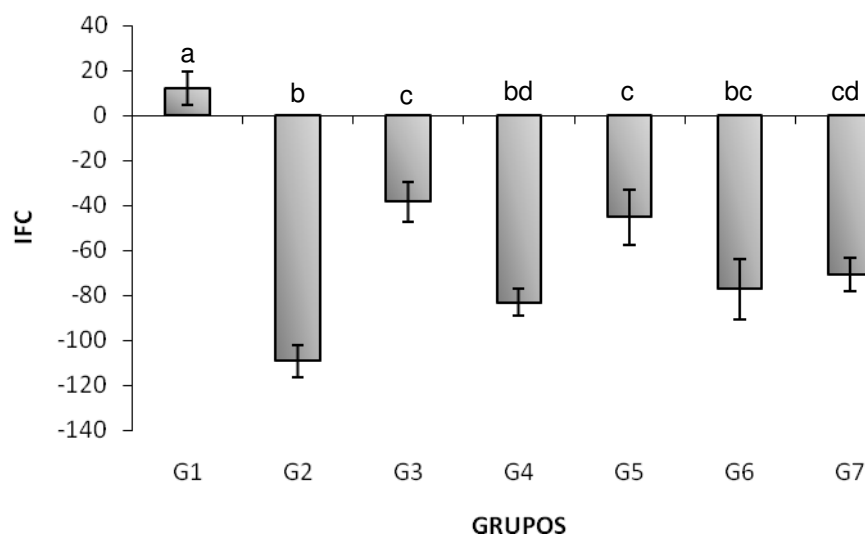


Figura 19 – Índice funcional do nervo ciático. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Índice funcional do nervo ciático

GRUPO	IFC
G1	11,9 ± 7,5 ^a
G2	-109,3 ± 7,2 ^b
G3	-38,4 ± 8,8 ^c
G4	-83,1 ± 6,0 ^{bd}
G5	-45,1 ± 12,2 ^c
G6	-77,2 ± 13,5 ^{bc}
G7	-70,8 ± 7,7 ^{cd}

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Os resultados do índice funcional do nervo fibular comum (IFFC) estão representadas na Figura 20 e Tabela 3. Apenas o grupo G2 (-81,5 ± 9,0) diferiu dos demais grupos.

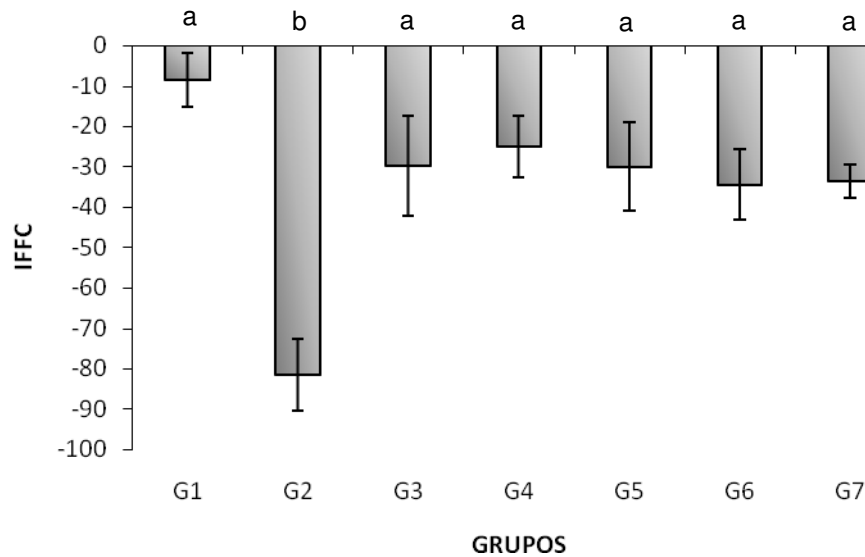


Figura 20 – Índice funcional do nervo fibular comum. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Índice funcional do nervo fibular comum

GRUPO	IFFC
G1	-8,5 ± 6,7 ^a
G2	-81,5 ± 9,0 ^b
G3	-29,8 ± 12,4 ^a
G4	-25,0 ± 7,6 ^a
G5	-30,0 ± 10,9 ^a
G6	-34,5 ± 8,7 ^a
G7	-33,7 ± 4,1 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.3. Teste eletrofisiológico

As Figuras 21 e 22 mostram, respectivamente, os resultados obtidos de amplitude e latência dos testes eletrofisiológicos realizados antes da secção do nervo fibular comum e, após 30 dias, imediatamente antes do sacrifício dos animais do grupo G4. A amplitude diminuiu significativamente, de 18,7 (± 1,7) mV para 4,6 (± 1,5) mV, após a secção do nervo fibular comum (Fig. 21 e Tabela 4), porém não foi observada diferença estatística quando analisados os resultados de latência (1,6 ± 0,1 ms e 1,8 ± 0,3 ms) (Fig. 22 e Tabela 4).

Amplitude antes da secção e antes do sacrifício - G4

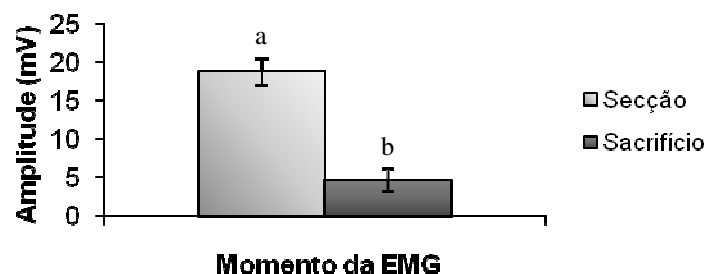


Figura 21 – Amplitude (mV) antes da secção e antes do sacrifício no G4. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Latência antes da secção e antes do sacrifício - G4

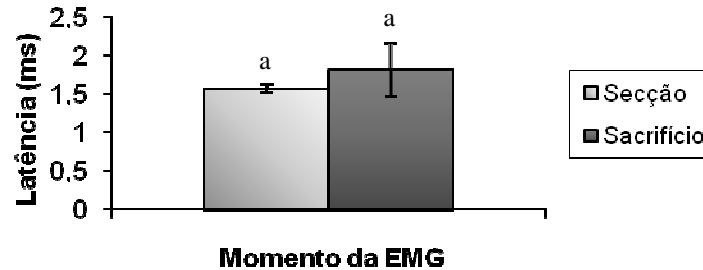


Figura 22 – Latência (ms) antes da secção e antes do sacrifício no G4. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

O teste eletrofisiológico realizado antes das secções dos nervos fibular comum e tibial e, após 30 dias, imediatamente antes do sacrifício, dos animais do grupo G6 mostrou diminuição significativa da amplitude, de 17,4 ($\pm 2,0$) mV para 0,5 ($\pm 0,5$) mV, após as secções (Fig. 23 e Tabela 4). Observou-se também diferença estatisticamente significativa entre os resultados de latência, que aumentou de 1,7 ($\pm 0,2$) ms tendendo para o infinito, ou seja, ausência de latência (Fig. 24 e Tabela 4).

Amplitude antes das secções e antes do sacrifício - G6

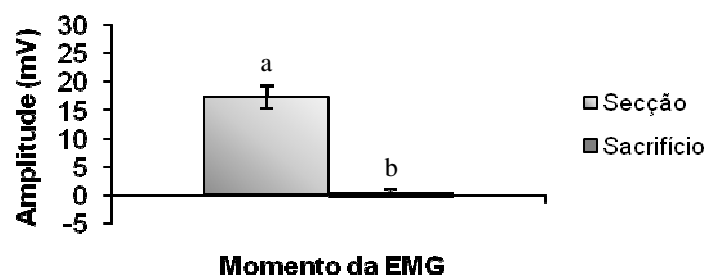


Figura 23 – Amplitude (mV) antes das secções e antes do sacrifício no G6. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Latência antes das secções e antes do sacrifício - G6

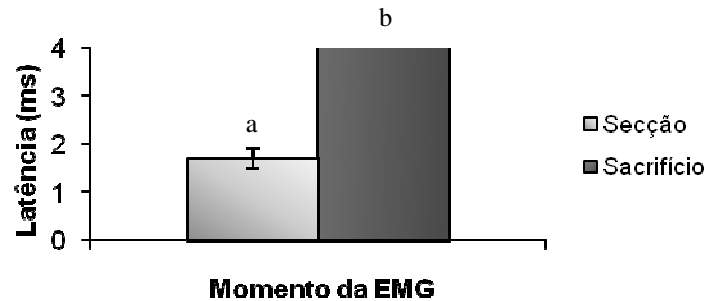


Figura 24 – Latência (ms) antes das secções e antes do sacrifício no G6. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Quando analisados os resultados do grupo G7 observou-se aumento significativo da amplitude, de zero para $11,2 (\pm 0,9)$ mV (Fig. 25 e Tabela 4), e uma diminuição estatisticamente significativa na latência de infinito para $2,3 (\pm 0,1)$ ms (Fig. 26 e Tabela 4).

Amplitude antes da NTL e antes do sacrifício - G7

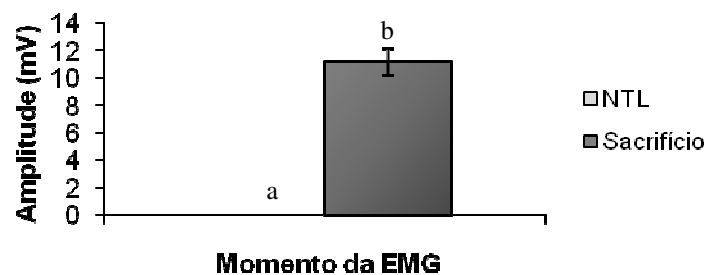


Figura 25 – Amplitude (mV) antes da NTL e antes do sacrifício no G7. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

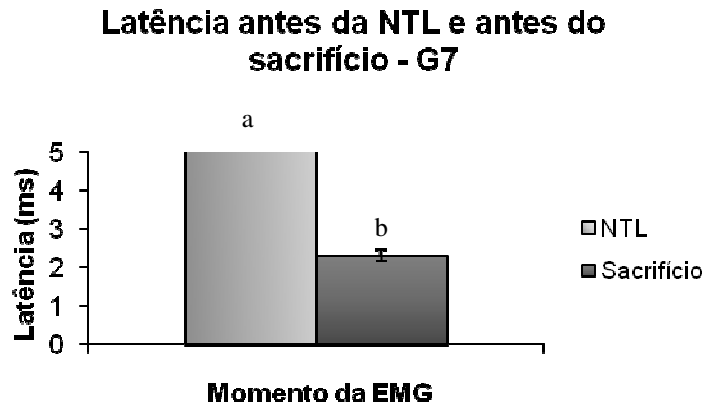


Figura 26 – Latência (ms) antes da NTL e antes do sacrifício no G7. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Amplitude e latência antes da secção/NTL ou do sacrifício nos grupos G4, G6 e G7

Grupo		Secção/NTL	Sacrifício
G4	Amplitude (mV)	$18,7 \pm 1,7^a$	$4,6 \pm 1,5^b$
	Latência (ms)	$1,6 \pm 0,1^a$	$1,8 \pm 0,3^a$
G6	Amplitude (mV)	$17,4 \pm 2,0^a$	$0,5 \pm 0,5^b$
	Latência (ms)	$1,7 \pm 0,2^a$	∞^b
G7	Amplitude (mV)	0^a	$11,2 \pm 0,9^b$
	Latência (ms)	∞^a	$2,3 \pm 0,1^b$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Quando todos os grupos foram comparados entre si, não foi observada diferença estatística de amplitude entre os grupos G1 ($29,1 \pm 1,8$ mV) e G3 ($22,1 \pm 2,7$ mV). O grupo G3 não se diferenciou do grupo G5 ($21,5 \pm 1,9$ mV). Os grupos G2 (zero), G4 ($4,9 \pm 1,6$ mV) e G6 ($0,5 \pm 0,5$ mV) apresentaram amplitude estatisticamente menor que os grupos G1, G3 e G5 (Fig. 27 e Tabela 5). O grupo G4 não se diferenciou do grupo G7 ($11,1 \pm 0,98$).

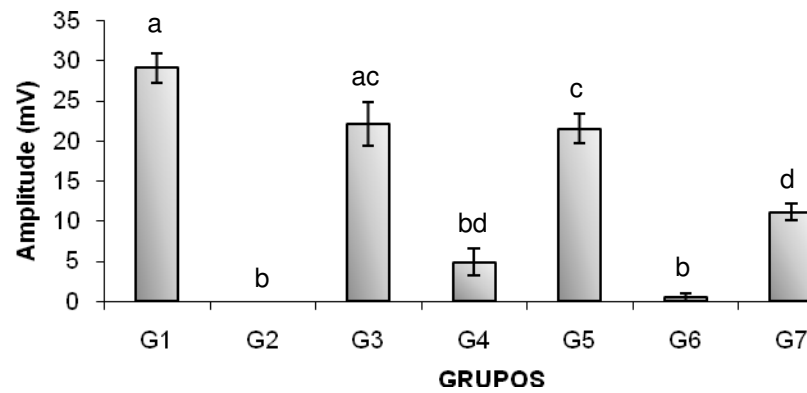


Figura 27 – Amplitude (mV). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os resultados de latência antes do sacrifício dos animais em cada grupo estão representados na Figura 28 e Tabela 5. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos G1 ($1,6 \pm 0,1$ ms), G3 ($1,9 \pm 0,1$ ms), G4 ($1,9 \pm 0,3$ ms), G5 ($1,8 \pm 0,04$ ms) e G7 ($2,3 \pm 0,1$ ms). Os grupos G2 e G6 não diferiram entre si, mas diferiram dos demais.

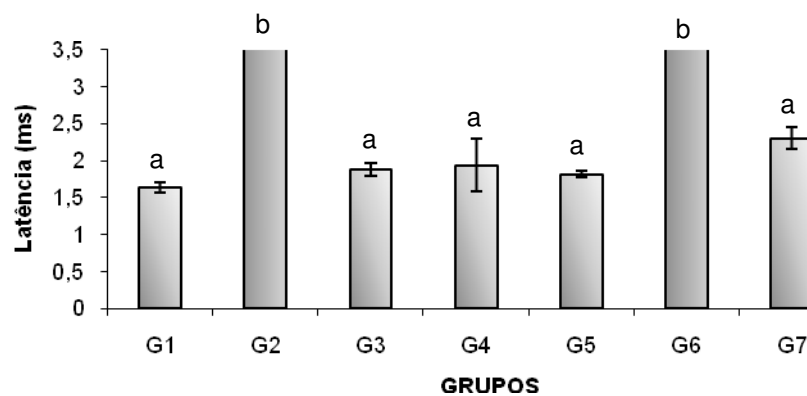


Figura 28 – Latência (ms). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Teste eletrofisiológico: comparação entre os grupos

Grupo	Amplitude (mV)	Latência (ms)
G1	29,1 ± 1,8 ^a	1,6 ± 0,1 ^a
G2	0 ^b	∞ ^b
G3	22,1 ± 2,7 ^{ac}	1,9 ± 0,1 ^a
G4	4,9 ± 1,6 ^{bd}	1,9 ± 0,3 ^a
G5	21,5 ± 1,9 ^c	1,8 ± 0,04 ^a
G6	0,5 ± 0,5 ^b	∞ ^b
G7	11,1 ± 0,98 ^d	2,3 ± 0,1 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Em todos os animais, exceto os dos grupos G2 e G6, ao se deflagrar estímulos no nervo ciático foi observada extensão do pé com contração do músculo tibial cranial.

4.4. Massa do músculo tibial cranial

Não foi observada diferença estatística entre as massas dos músculos tibiais craniais dos grupos G1 (0,897 ± 0,02g), G3 (0,818 ± 0,03 g), G5 (0,885 ± 0,04 g) e grupo Média MTCE (E) (0,859 ± 0,01 g). Estes grupos apresentaram massa muscular significativamente maior comparado aos grupos G2 (0,187 ± 0,03 g), G4 (0,431 ± 0,04 g), G6 (0,345 ± 0,02 g) e G7 (0,469 ± 0,03 g) (Fig. 29 e Tabela 6). Todos os grupos apresentaram massa muscular maior que o grupo G2 (controle de desnervação).

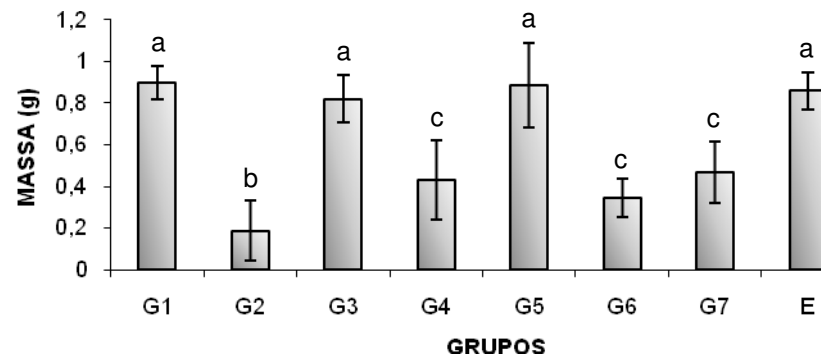


Figura 29 – Massa do músculo tibial cranial (g). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Massa do músculo tibial cranial

Grupos	Massa MTCD (g)	Massa MTCE (g)	(MTCD/MTCE x 100) %
G1	0,897 ± 0,02 ^a	0,826 ± 0,02*	109
G2	0,187 ± 0,03 ^b	0,798 ± 0,02*	23
G3	0,818 ± 0,03 ^a	0,850 ± 0,01	96
G4	0,431 ± 0,04 ^c	0,873 ± 0,02*	49
G5	0,885 ± 0,04 ^a	0,871 ± 0,02	102
G6	0,345 ± 0,02 ^c	0,866 ± 0,02*	40
G7	0,469 ± 0,03 ^c	0,922 ± 0,02*	51
Média MTCE (E)	0,859 ± 0,01 ^a	-	-

Letras diferentes indicam diferença estatística. * diferença estatística quando comparado ao grupo correspondente.

A massa do MTCE dos animais do grupo G1 ($0,826 \pm 0,02$ g) apresentou valor estatisticamente menor ($p = 0,014$) quando comparado à massa do MTCD ($0,897 \pm 0,02$ g) no grupo G1. Não foi observada diferença estatística quando comparados os MTCD e MTCE nos grupos G3 e G5 (Tabela 6).

4.5. Análise morfométrica do músculo tibial cranial

Quando comparadas as medidas das áreas das fibras do músculo tibial cranial de cada grupo (Fig. 30 e Tabela 7), os grupos G3 ($1942,3 \pm 153,0 \mu\text{m}^2$) e G5 ($2131,4 \pm 166,2 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si ou do grupo G1 ($2044,3 \pm 184,9 \mu\text{m}^2$). Estes grupos apresentaram fibras musculares com áreas estatisticamente maiores que os grupos G2 ($290,5 \pm 36,3 \mu\text{m}^2$) e G6 ($648,8 \pm 37,6 \mu\text{m}^2$), grupos desnervados, e grupos G4 ($1135,4 \pm 157,8 \mu\text{m}^2$) e G7 ($1216,7 \pm 105,9 \mu\text{m}^2$), onde ocorreu reinervação.

O grupo G2 ($290,5 \pm 36,3 \mu\text{m}^2$) apresentou fibras musculares menores que os demais grupos. O grupo G4 ($1135,4 \pm 157,8 \mu\text{m}^2$) não apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos G6 ($648,8 \pm 37,6 \mu\text{m}^2$) e G7 ($1216,7 \pm 105,9 \mu\text{m}^2$).

Os resultados obtidos nas medidas dos diâmetros mínimos das fibras do músculo tibial cranial de cada grupo estão representadas na Figura 31 e Tabela 7. Estes resultados confirmam os obtidos nas medidas de área das fibras musculares (Fig. 30).

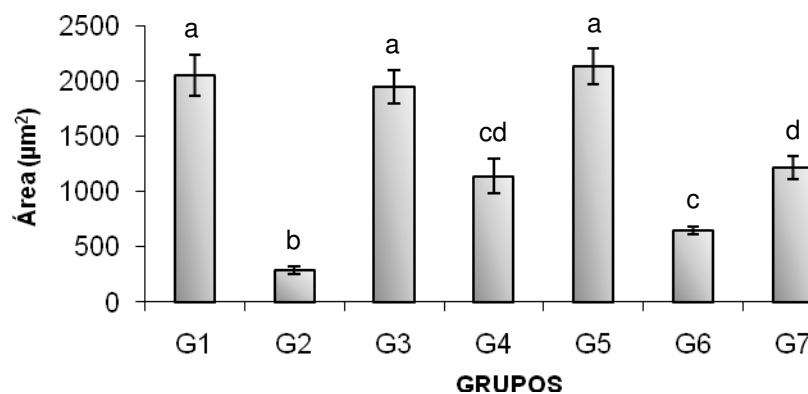


Figura 30 – Área das fibras do músculo tibial cranial direito (μm^2). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

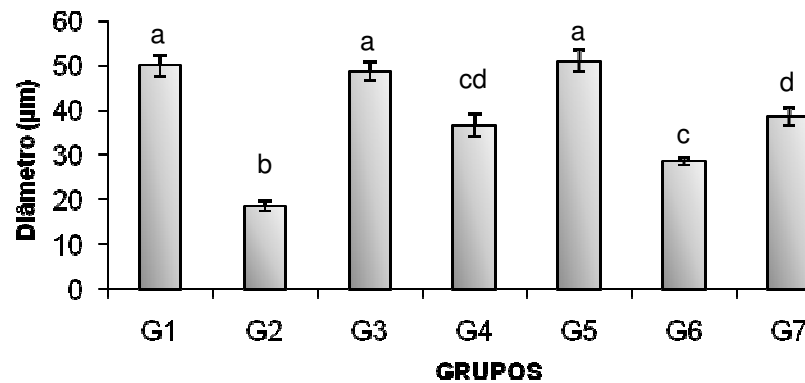


Figura 31 – Diâmetro mínimo das fibras do músculo tibial cranial direito (μm). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Análise morfométrica do músculo tibial cranial direito

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro Mínimo (μm)
G1	2044,3 ± 184 ^a	50,1 ± 2,4 ^a
G2	290,5 ± 36,3 ^b	18,5 ± 1,2 ^b
G3	1942,3 ± 153,0 ^a	48,8 ± 2,2 ^a
G4	1135,4 ± 157,8 ^{cd}	36,6 ± 2,5 ^{cd}
G5	2131,4 ± 166,2 ^a	51,1 ± 2,3 ^a
G6	648,8 ± 37,6 ^c	28,6 ± 0,8 ^c
G7	1216,7 ± 105,9 ^d	38,7 ± 1,9 ^d

Letras diferentes indicam diferença estatística.

A coletânea dos resultados obtidos nos testes funcionais e na morfometria das fibras musculares está representada na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos nos testes funcionais e morfometria das fibras musculares

GRUPO	MIR (g)	MFR (g)	IFC	IFFC	AMP (mV)	LAT (ms)	MMTC (g)	AFM (μm^2)	DMFM (μm)
G1	196 ± 25 ^a	479 ± 47 ^b	11,9 ± 7,5 ^a	-8,5 ± 6,7 ^a	29,1 ± 1,8 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	0,897 ± 0,02 ^a	2044,3 ± 184 ^a	50,1 ± 2,4 ^a
G2	192 ± 12 ^a	475 ± 67 ^b	-109,3 ± 7,2 ^b	-81,5 ± 9,0 ^b	0 ^b	- ^b	0,187 ± 0,03 ^b	290,5 ± 36,3 ^b	18,5 ± 1,2 ^b
G3	197 ± 20 ^a	497 ± 53 ^b	-38,4 ± 8,8 ^c	-29,8 ± 12,4 ^b	22,1 ± 2,7 ^{bc}	1,9 ± 0,1 ^a	0,818 ± 0,03 ^a	1942,3 ± 153,0 ^a	48,8 ± 2,2 ^a
G4	198 ± 17 ^a	499 ± 56 ^b	-83,1 ± 6,0 ^{bd}	-25,0 ± 7,6 ^b	4,9 ± 1,6 ^{bd}	1,9 ± 0,3 ^a	0,431 ± 0,04 ^c	1135,4 ± 157,8 ^{cd}	36,6 ± 2,5 ^{cd}
G5	201 ± 22 ^a	494 ± 75 ^b	-45,1 ± 12,2 ^c	-30,0 ± 10,9 ^a	21,5 ± 1,9 ^c	1,8 ± 0,04 ^a	0,885 ± 0,04 ^a	2131,4 ± 166,2 ^a	51,1 ± 2,3 ^a
G6	199 ± 21 ^a	519 ± 52 ^b	-77,2 ± 13,5 ^{bc}	-34,5 ± 8,7 ^a	0,5 ± 0,5 ^b	- ^b	0,345 ± 0,02 ^c	648,8 ± 37,6 ^c	28,6 ± 0,8 ^c
G7	186 ± 8 ^a	537 ± 74 ^b	-70,8 ± 7,7 ^{cd}	-33,7 ± 4,1 ^a	11,1 ± 0,98 ^d	2,3 ± 0,1 ^a	0,469 ± 0,03 ^c	1216,7 ± 105,9 ^d	38,7 ± 1,9 ^d
MTCE							0,859 ± 0,01 ^a		

Letras diferentes indicam diferença estatística. MIR = massa inicial do rato; MFR = massa final do rato; FC = índice funcional do nervo ciático; IFFC = índice funcional do nervo fibular comum; AMP = amplitude; LAT = latência; MMTC = massa do músculo tibial cranial; AFM = área da fibra muscular; DMFM = diâmetro mínimo da fibra muscular.

4.6. Análise morfológica do músculo tibial cranial

A Figura 32 mostra as imagens representativas das fibras musculares de cada grupo. Observou-se grande semelhança entre os grupos G1, G3 e G5 quanto ao tamanho e forma das fibras musculares e quantidade de tecido conjuntivo.

Quando comparados os grupos G4 e G7 aos grupos G1, G3 e G5, observaram-se fibras musculares menores e arredondadas, e aumento de tecido conjuntivo, porém não comparável ao grupo G2 (desnervado), que apresentou as menores fibras musculares e tecido conjuntivo abundante.

O grupo G6 mostrou-se comparável aos grupos G4 e G7 quanto ao tamanho das fibras musculares.

4.7. Análise morfométrica do segmento de nervo N1 (nervo fibular comum distal à neurorrafia)

Na Figura 33 está representada a densidade axonal no segmento de nervo N1. Não houve diferença estatística quando comparados os grupos G1 ($0,013 \pm 0,002$ axônio/ μm^2), G3 ($0,016 \pm 0,002$ axônio/ μm^2) e G5 ($0,015 \pm 0,002$ axônio/ μm^2). Os grupos G3 e G5 também não foram diferentes do grupo G7 ($0,019 \pm 0,003$ axônio/ μm^2). O grupo G6 ($0,005 \pm 0,005$ axônio/ μm^2) não diferiu, estatisticamente, do grupo G4 ($0,004 \pm 0,0008$ axônio/ μm^2) e do grupo G2 ($0,001 \pm 0,0005$ axônio/ μm^2) (Tabela 9).

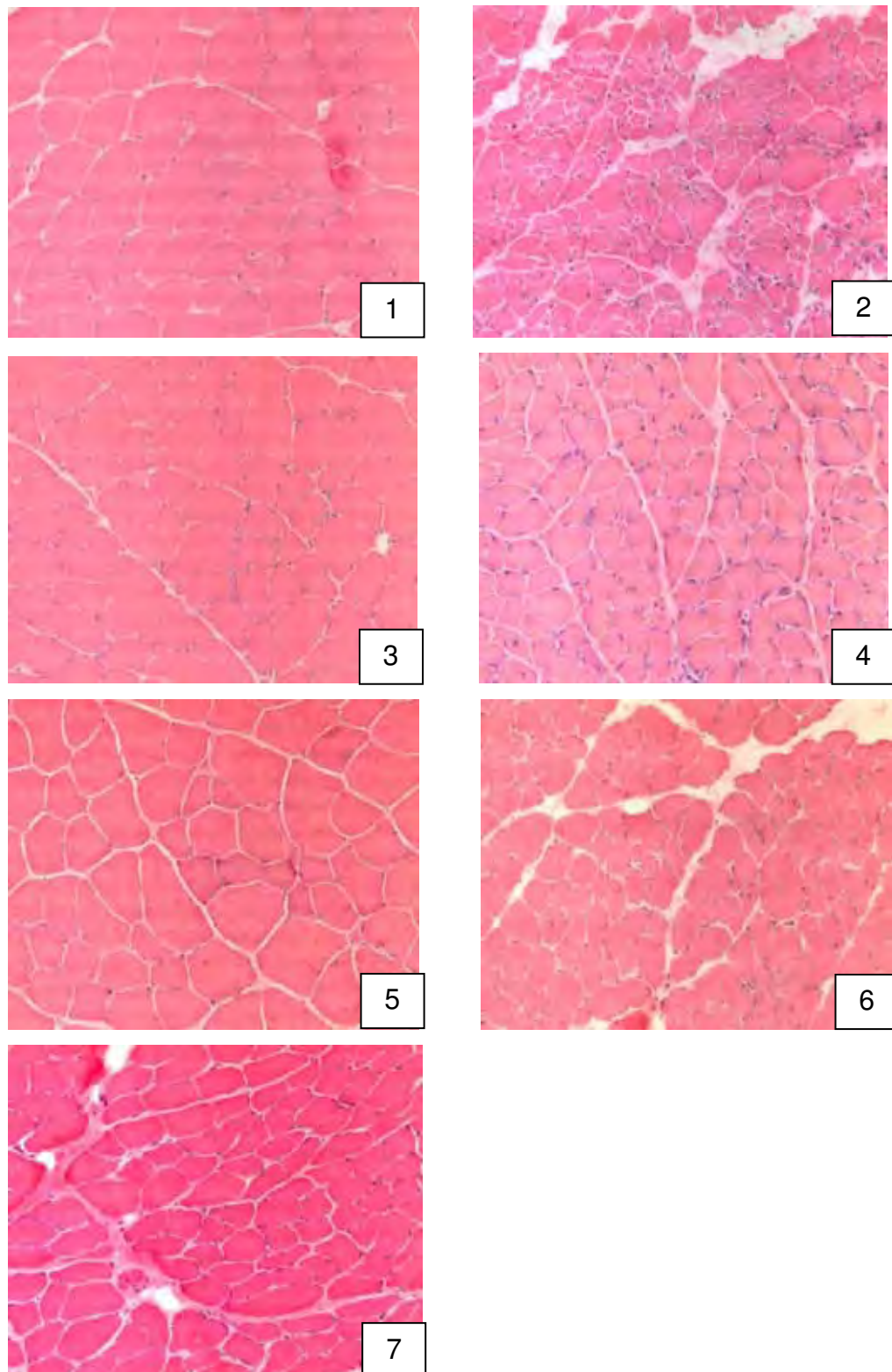


Figura 32 – Fibras do músculo tibial cranial direito. Cortes corados pela técnica de HE. (1) grupo G1; (2) grupo G2; (3) grupo G3; (4) grupo G4; (5) grupo G5; (6) grupo G6; (7) grupo G7. Microscopia óptica com aumento de 200 vezes.

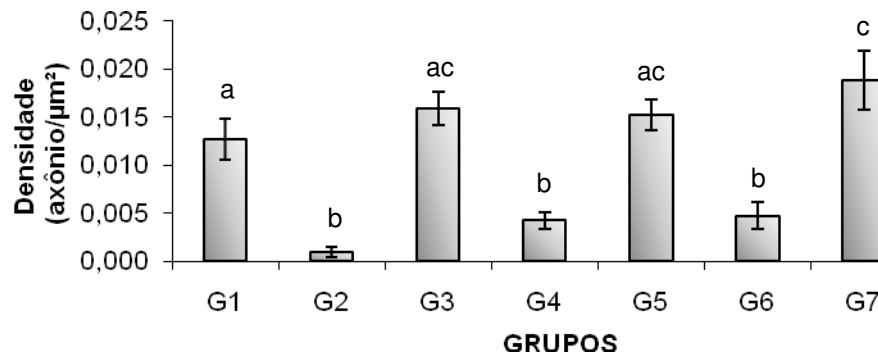


Figura 33 – Densidade axonal (axônio/μm²) no segmento de nervo N1. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Tabela 9 – Densidade axonal no segmento de nervo N1

Grupo	Densidade axonal (axônio/μm²)
G1	0,013 ± 0,002 ^a
G2	0,001 ± 0,0005 ^b
G3	0,016 ± 0,002 ^{ac}
G4	0,004 ± 0,0008 ^b
G5	0,015 ± 0,002 ^{ac}
G6	0,005 ± 0,005 ^b
G7	0,019 ± 0,003 ^c

Letras diferentes indicam diferença estatística.

As medidas de área e de diâmetro mínimo dos axônios dos segmentos de nervo N1 estão representadas, respectivamente, nas Figuras 34 e 35. Os resultados de área dos grupos G3 ($5,3 \pm 0,9 \mu\text{m}^2$) e G5 ($4,4 \pm 0,6 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si. Também não foi observada diferença estatística quando comparado o grupo G7 ($1,4 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) aos grupos G2 ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$), G4 ($1,3 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$) e G6 ($1,3 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$).

Quanto às medidas do diâmetro mínimo, o grupo G3 ($2,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$) não diferiu dos grupos G1 ($3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$) e G5 ($2,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$). Os grupos G4 ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$), G6 ($1,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$) e G7 ($1,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$) não diferiram entre si,

mas apresentaram médias maiores que as do grupo G2 ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$), conforme mostra a Tabela 10.

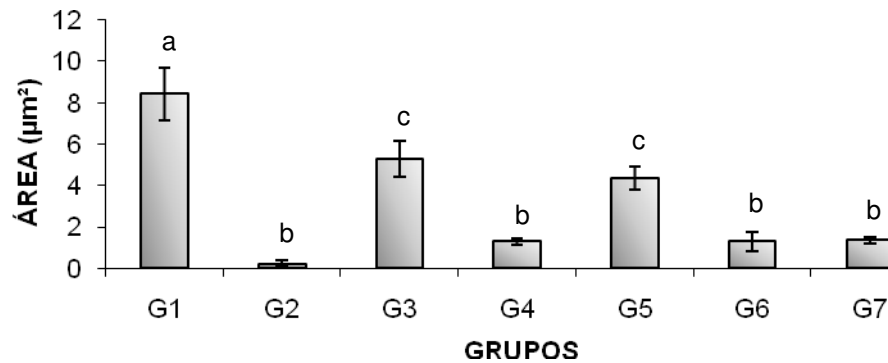


Figura 34 – Área do axônio (μm^2) no segmento de nervo N1. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

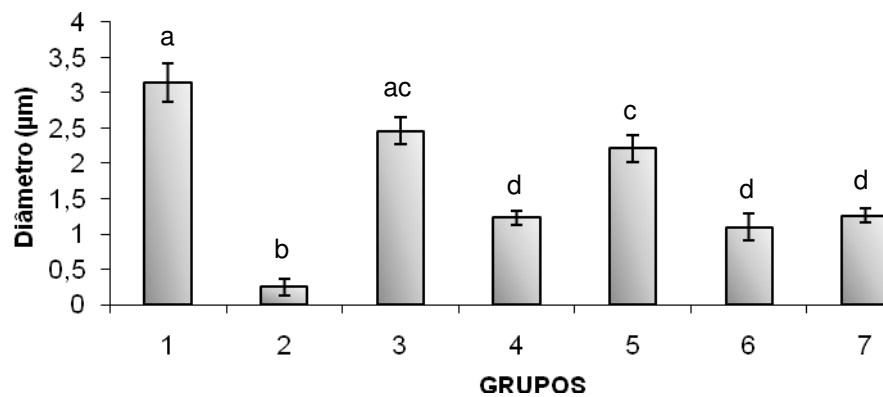


Figura 35 – Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento de nervo N1. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Análise morfométrica dos axônios do segmento de nervo N1

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro mínimo (μm)
G1	$8,4 \pm 1,2^a$	$3,1 \pm 0,3^a$
G2	$0,2 \pm 0,1^b$	$0,2 \pm 0,1^b$
G3	$5,3 \pm 0,9^c$	$2,4 \pm 0,2^{ac}$
G4	$1,3 \pm 0,1^b$	$1,2 \pm 0,1^d$
G5	$4,4 \pm 0,6^c$	$2,2 \pm 0,2^c$
G6	$1,3 \pm 0,5^b$	$1,1 \pm 0,2^d$
G7	$1,4 \pm 0,2^b$	$1,3 \pm 0,1^d$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Na análise da bainha de mielina os grupos G3 ($2,6 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) e G5 ($2,2 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) não diferiram estatisticamente entre si. Também não houve diferença quando o grupo G4 ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$) foi comparado aos grupos G5 ($2,2 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$), G6 ($1,0 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) e G7 ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$). Os grupos G4, G6 e G7 também não diferiram estatisticamente do grupo G2 ($0,4 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) conforme Figura 36 e Tabela 11.

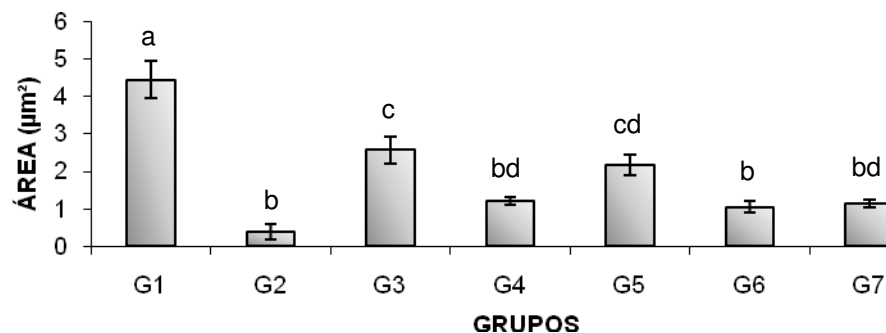


Figura 36 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento de nervo N1. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Área da bainha de mielina do segmento de nervo N1

<i>Grupo</i>	<i>Área da bainha de mielina (μm^2)</i>
G1	4,4 ± 0,5 ^a
G2	0,4 ± 0,2 ^b
G3	2,6 ± 0,3 ^c
G4	1,2 ± 0,1 ^{bd}
G5	2,2 ± 0,3 ^{cd}
G6	1,0 ± 0,2 ^b
G7	1,2 ± 0,1 ^{bd}

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.8. Análise morfológica do segmento de nervo N1 (nervo fibular comum distal à NTL)

A Figura 37 mostra imagens representativas dos segmentos de nervo N1. Os grupos G3 e G5 apresentaram fibras nervosas de tamanhos variados e bainhas de mielina bem delimitadas e regulares, porém, com grande quantidade de fibras de menor calibre quando comparadas às fibras do grupo G1. Os grupos G4 e G6 apresentaram poucas fibras com diâmetros pequenos e aumento de tecido conjuntivo. As fibras do grupo G7 apresentaram-se com menor diâmetro, porém, em maior quantidade quando comparadas às dos grupos G4 e G6. O grupo G2 apresentou degeneração das fibras, grande quantidade de tecido conjuntivo e atrofia do segmento de nervo fibular comum.

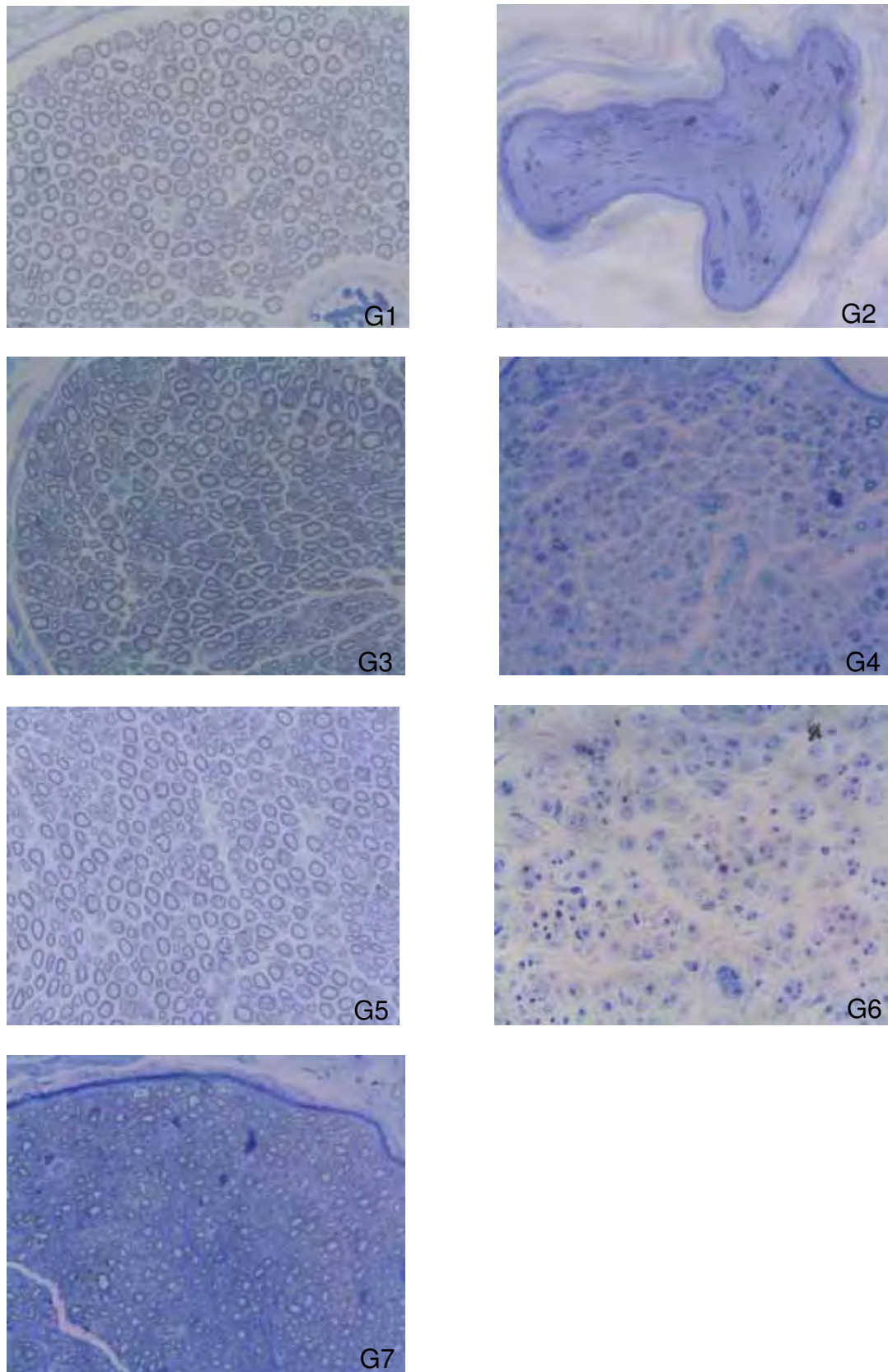


Figura 37 – Imagens representativas do segmento de nervo N1 dos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7. Coloração por tetróxido de ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400 X.

4.9. Análise morfométrica do segmento de nervo N2 (nervo tibial proximal à NTL)

Os grupos G3 ($0,016 \pm 0,001$ axônio/ μm^2), G4 ($0,013 \pm 0,001$ axônio/ μm^2), G5 ($0,017 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) e G7 ($0,016 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) não diferiram entre si, e apresentaram densidade axonal significativamente maior quando comparados ao grupo G1 ($0,008 \pm 0,0008$ axônio/ μm^2). O grupo G1 não diferiu do grupo G6 ($0,005 \pm 0,001$ axônio/ μm^2), como mostram a Figura 38 e Tabela 12.

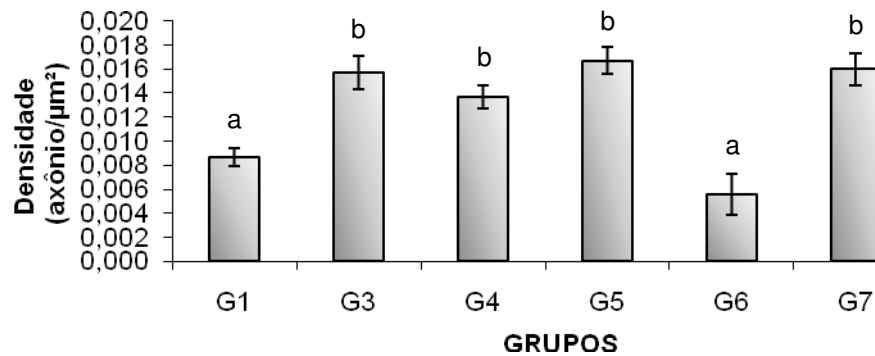


Figura 38 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) no segmento de nervo N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Densidade axonal no segmento de nervo N2

Grupo	Densidade axonal (axônio/μm^2)
G1	$0,008 \pm 0,0008^a$
G3	$0,016 \pm 0,001^b$
G4	$0,013 \pm 0,001^b$
G5	$0,017 \pm 0,001^b$
G6	$0,005 \pm 0,001^a$
G7	$0,016 \pm 0,001^b$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

A área e o diâmetro mínimo dos axônios estão representadas, respectivamente, nas Figuras 39 e 40. O grupo G1 apresentou valores maiores nos parâmetros analisados (Tabela 13). Quando analisados a área e o diâmetro mínimo, os grupos G3 e G5 não diferiram dos grupos G4, G6 e G7.

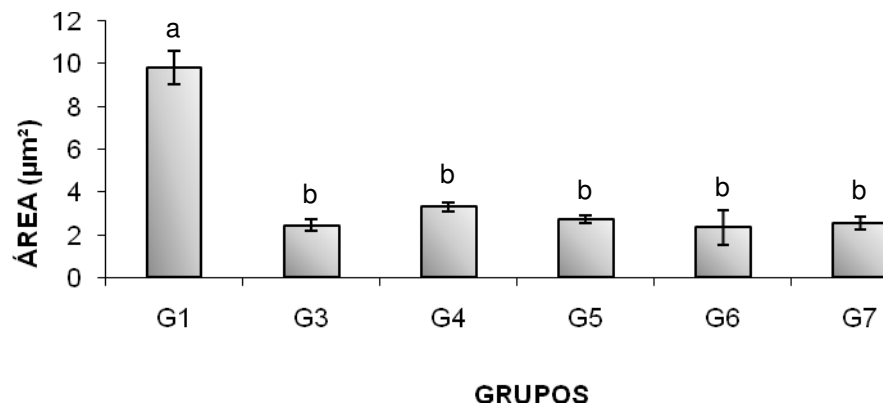


Figura 39 – Área do axônio (μm^2) no segmento de nervo N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

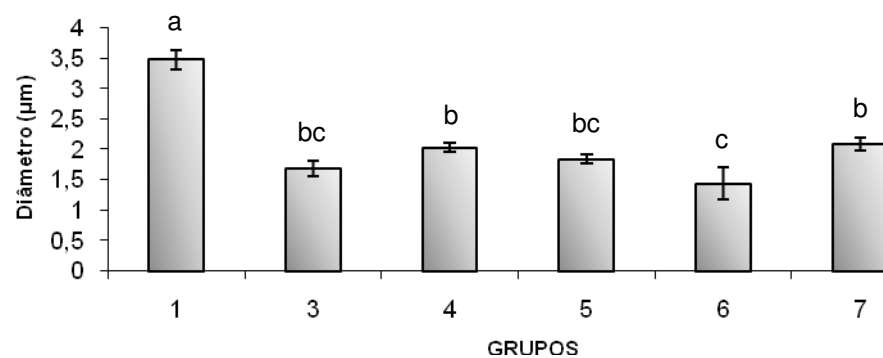


Figura 40 – Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento de nervo N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 13 – Análise morfométrica dos axônios do segmento de nervo N2

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro mínimo (μm)
G1	$9,8 \pm 0,8^a$	$3,5 \pm 0,2^a$
G3	$2,4 \pm 0,2^b$	$1,7 \pm 0,1^{bc}$
G4	$3,3 \pm 0,2^b$	$2,0 \pm 0,07^b$
G5	$2,7 \pm 0,2^b$	$1,8 \pm 0,07^{bc}$
G6	$2,3 \pm 0,8^b$	$1,4 \pm 0,3^c$
G7	$2,5 \pm 0,3^b$	$2,1 \pm 0,1^b$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

A área da bainha de mielina está representada na Figura 41. O grupo G1 apresentou a maior área ($5,6 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$). Os grupos G3 ($3,1 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$), G4 ($3,3 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$), G5 ($3,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) e G7 ($2,6 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si (Tabela 14). O grupo G6 apresentou a menor área ($1,3 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) quando comparado aos demais grupos.

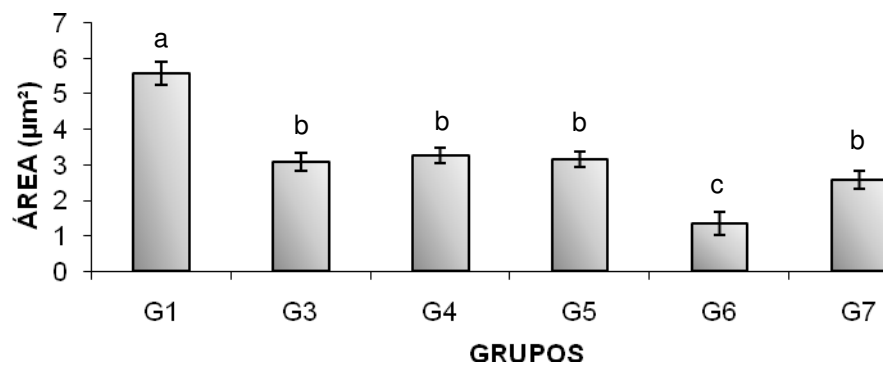


Figura 41 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento de nervo N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 14 – Área da bainha de mielina do segmento de nervo N2

Grupo	Área da bainha de mielina (μm^2)
G1	$5,6 \pm 0,3^a$
G3	$3,1 \pm 0,2^b$
G4	$3,3 \pm 0,2^b$
G5	$3,2 \pm 0,2^b$
G6	$1,3 \pm 0,3^c$
G7	$2,6 \pm 0,2^b$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.10. Análise morfológica do segmento de nervo N2 (nervo tibial proximal à NTL)

As imagens representativas dos segmentos de nervo N2 (Fig. 42) mostraram grande semelhança entre os grupos G3, G4, G5 e G7, com maior número de fibras de menor calibre quando comparados ao grupo G1. O grupo G6 mostrou, visualmente, maior quantidade de tecido conjuntivo com menor número de fibras, comparado aos grupos G3, G4, G5 e G7.

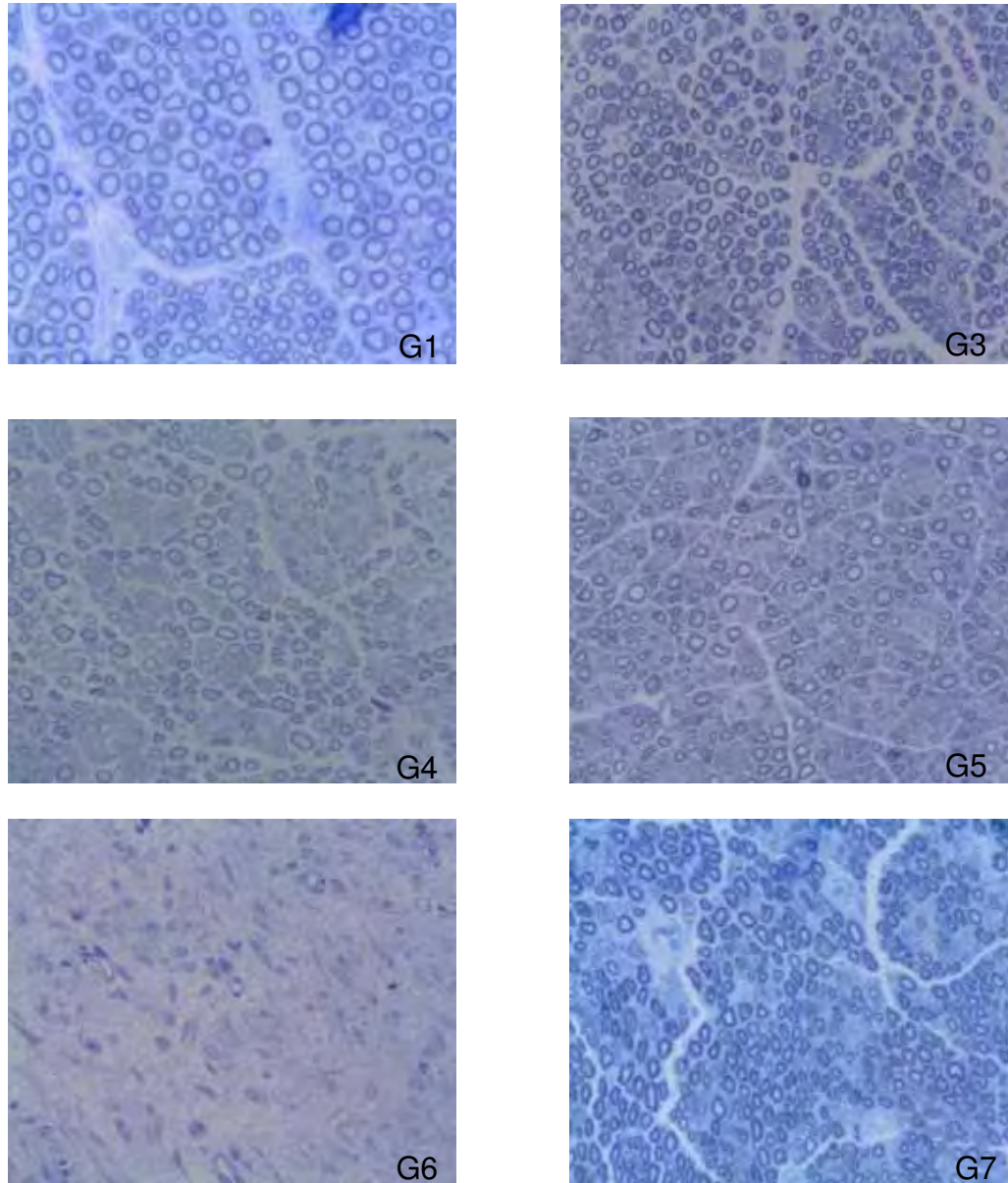


Figura 42 – Imagens representativas do segmento de nervo N2 dos grupos G1, G3, G4, G5, G6 e G7. Coloração de tetróxido por ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400 X.

4.11. Análise morfométrica do segmento de nervo N3 (nervo fibular comum proximal à NTL)

Quanto à densidade axonal no segmento de nervo N3, não foi observada diferença estatística quando comparados os grupos G1 ($0,013 \pm 0,002$ axônio/ μm^2), G3 ($0,009 \pm 0,0007$ axônio/ μm^2), G5 ($0,01 \pm 0,0008$ axônio/ μm^2) e G7 ($0,014 \pm 0,002$ axônio/ μm^2). O grupo G4 ($0,005 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) não diferiu do grupo G3 ou dos grupos G2 ($0,0009 \pm 0,0005$ axônio/ μm^2) e G6 ($0,003 \pm 0,0007$ axônio/ μm^2) como mostram a Figura 43 e a Tabela 13.

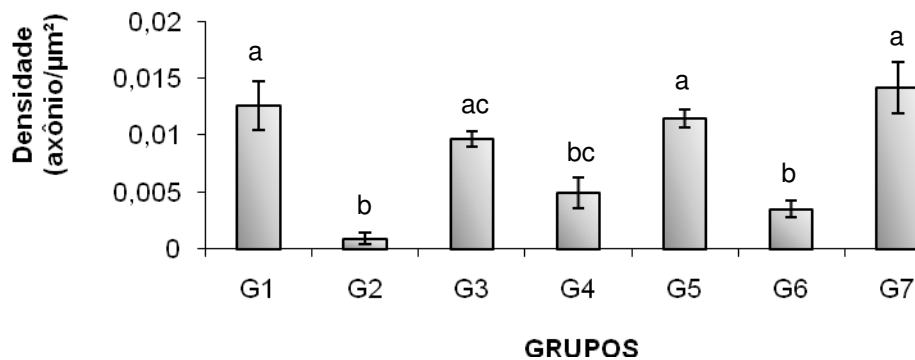


Figura 43 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) no segmento de nervo N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 15 – Densidade axonal no segmento de nervo N3

Grupo	Densidade axonal (axônio/μm^2)
G1	$0,013 \pm 0,002^a$
G2	$0,0009 \pm 0,0005^b$
G3	$0,009 \pm 0,0007^{ac}$
G4	$0,005 \pm 0,001^{bc}$
G5	$0,01 \pm 0,0008^a$
G6	$0,003 \pm 0,0007^b$
G7	$0,014 \pm 0,002^a$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

A área e o diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N3 estão representadas, respectivamente, nas Figuras 44 e 45. Os grupos G1 ($8,4 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$), G3 ($7,7 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) e G5 ($8,0 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si, porém, apresentaram axônios estatisticamente maiores que os grupos G2 ($0,2 \pm 0,13 \mu\text{m}^2$), G4 ($1,1 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$), G6 ($2,0 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) e G7 ($1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) (Tabela 15). Quando analisados os resultados de diâmetro mínimo, os grupos G4 ($1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$), G6 ($1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$) e G7 ($1,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$) diferiram do grupo G2 ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$), o que não aconteceu quando comparados os resultados de área.

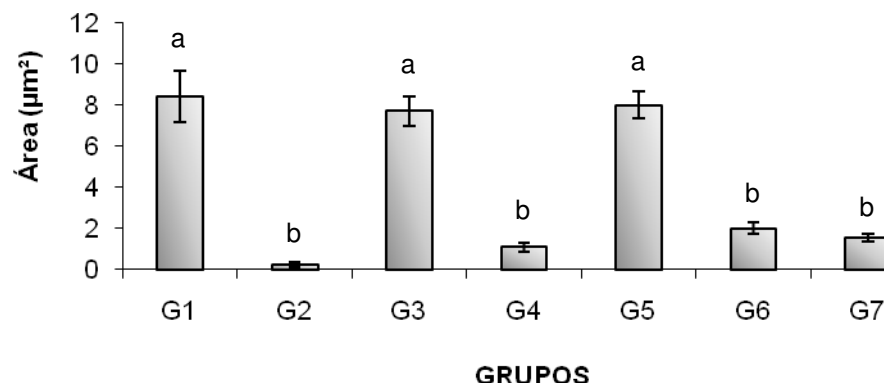


Figura 44 – Área do axônio (μm^2) no segmento de nervo N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

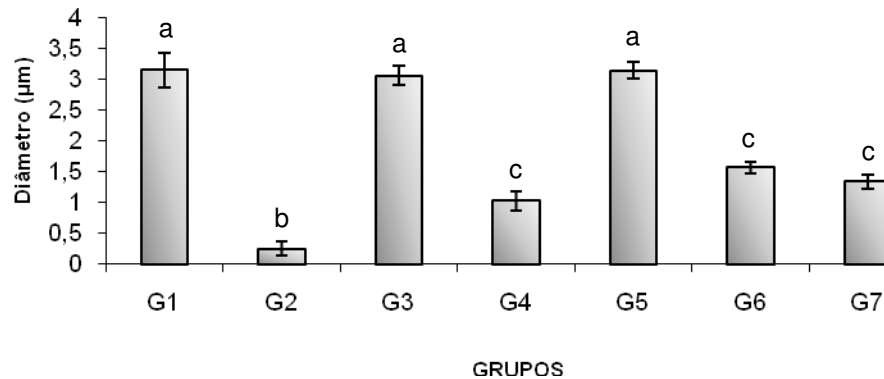


Figura 45 – Diâmetro mínimo do axônio (μm) no segmento de nervo N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 16 – Análise morfométrica dos axônios do segmento de nervo N3

<i>Grupo</i>	<i>Área (μm^2)</i>	<i>Diâmetro mínimo (μm)</i>
G1	$8,4 \pm 1,2^a$	$3,1 \pm 0,3^a$
G2	$0,2 \pm 0,13^b$	$0,2 \pm 0,1^b$
G3	$7,7 \pm 0,7^a$	$3,1 \pm 0,1^a$
G4	$1,1 \pm 0,2^b$	$1,0 \pm 0,1^c$
G5	$8,0 \pm 0,7^a$	$3,1 \pm 0,1^a$
G6	$2,0 \pm 0,3^b$	$1,6 \pm 0,1^c$
G7	$1,5 \pm 0,2^b$	$1,3 \pm 0,1^c$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Os resultados da análise da bainha de mielina (Fig. 46 e Tabela 17) confirmam os resultados apresentados anteriormente na análise da área axonal (Fig. 44).

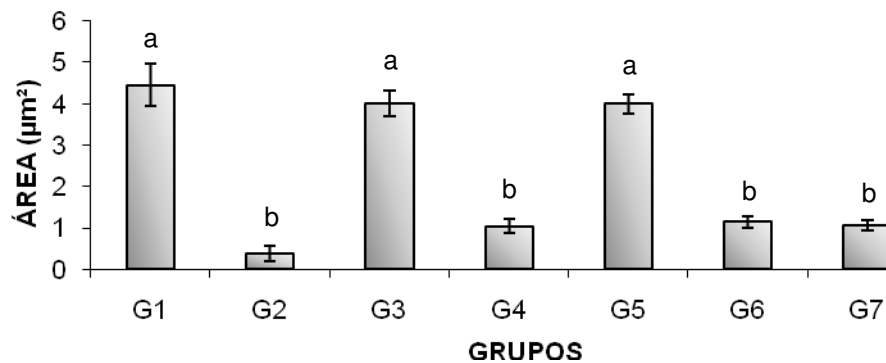


Figura 46 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento de nervo N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 17 – Área da bainha de mielina do segmento de nervo N3

<i>Grupo</i>	<i>Área da bainha de mielina (μm^2)</i>
G1	4,4 ± 0,5 ^a
G2	0,4 ± 0,2 ^b
G3	4,0 ± 0,3 ^a
G4	1,0 ± 0,2 ^b
G5	3,4 ± 0,2 ^a
G6	1,1 ± 0,1 ^b
G7	1,2 ± 0,1 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.12. Análise morfológica do segmento de nervo N3 (nervo fibular comum proximal à NTL)

Os segmentos de nervo N3 representados na Figura 47 mostraram grande semelhança entre os grupos G3 e G5. Os grupos G4 e G6 mostraram fibras de tamanho reduzido e grande quantidade de tecido conjuntivo. As fibras nervosas do grupo G7 apresentaram-se em grande número assemelhando-se aos grupos G3 e G5, porém, com tamanho reduzido, próximo às dos grupos G4 e G6.

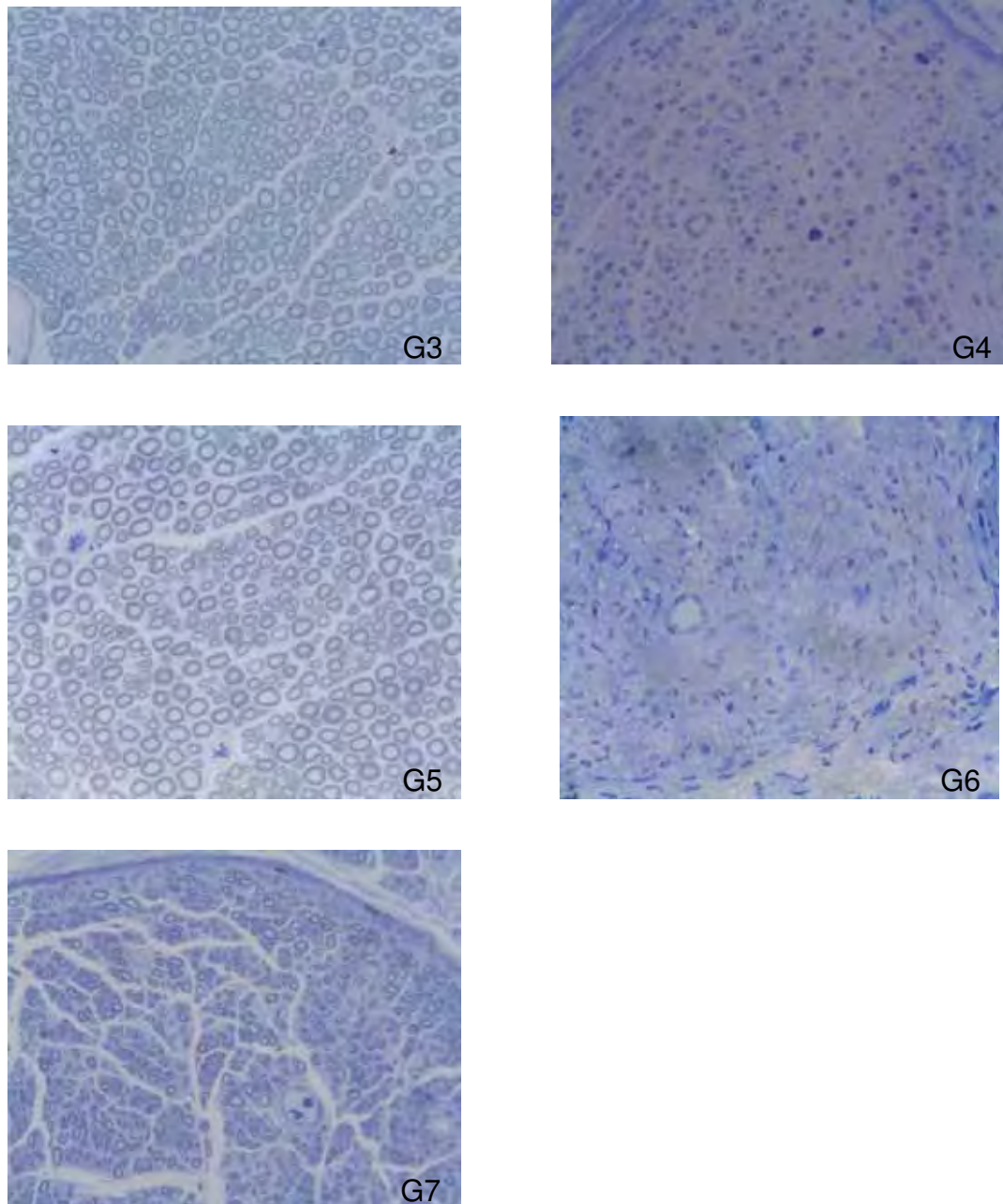


Figura 47 – Imagens representativas do segmento de nervo N3 dos grupos G3, G4, G5, G6 e G7. Coloração por tetróxido de ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400 X.

4.13. Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no G3

Quando comparados os segmentos N1 e N3 no grupo G3, observou-se aumento da densidade axonal no segmento N1 ($0,015 \pm 0,002$ axônio/ μm^2) em relação ao N3 ($0,009 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) (Fig. 48 e Tabela 18). A análise do diâmetro mínimo axonal mostrou uma diminuição da fibra axonal no segmento N1 ($2,5 \pm 0,2$ μm) quando comparado ao N3 ($3,1 \pm 0,1$ μm) (Fig. 49 e Tabela 18).

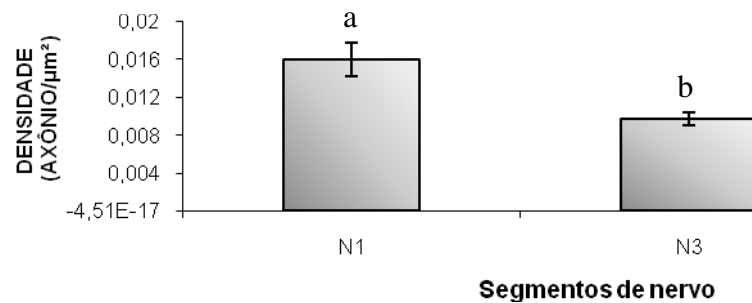


Figura 48 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

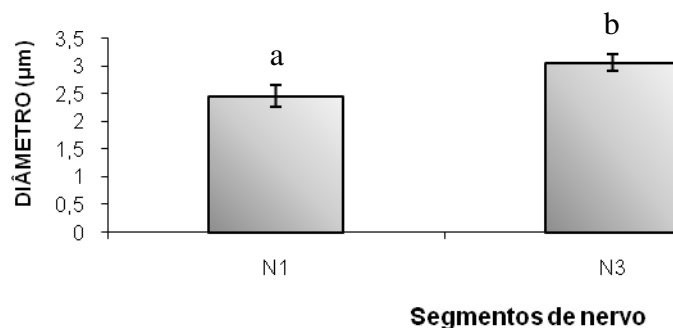


Figura 49 – Diâmetro mínimo axonal (μm) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 18 – Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G3

Segmento de nervo	Densidade axonal (axônio/μm^2)	Diâmetro mínimo axonal (μm)
N1	$0,015 \pm 0,002^a$	$2,5 \pm 0,2^a$
N3	$0,009 \pm 0,001^b$	$3,1 \pm 0,1^b$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.14. Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no G5

Quando comparados os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5, a densidade aumentou no N1 ($0,015 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) em relação ao N3 ($0,011 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) (Fig. 50 e Tabela 19); enquanto que a medida do diâmetro mínimo axonal mostrou menores fibras mielínicas no segmento N1 (Fig. 51 e Tabela 19).

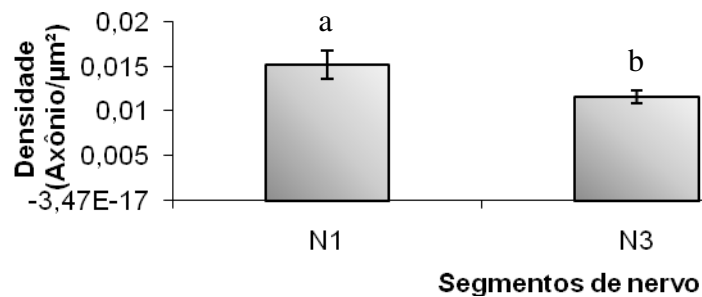


Figura 50 – Densidade axonal (axônio/ μm^2) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

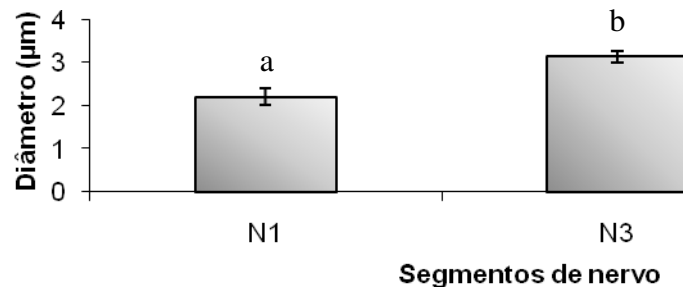


Figura 51 – Diâmetro mínimo axonal (μm) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 19 – Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G5

<i>Segmento de nervo</i>	<i>Densidade axonal (axônio/μm^2)</i>	<i>Diâmetro mínimo axonal (μm)</i>
N1	$0,015 \pm 0,001^a$	$2,2 \pm 0,2^a$
N3	$0,011 \pm 0,001^b$	$3,1 \pm 0,1^b$

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.15. Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no G7

Quando comparadas as medidas de densidade e diâmetro mínimo axonal nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7, não foi observada diferença estatística (Fig. 52 e 53, e Tabela 20).

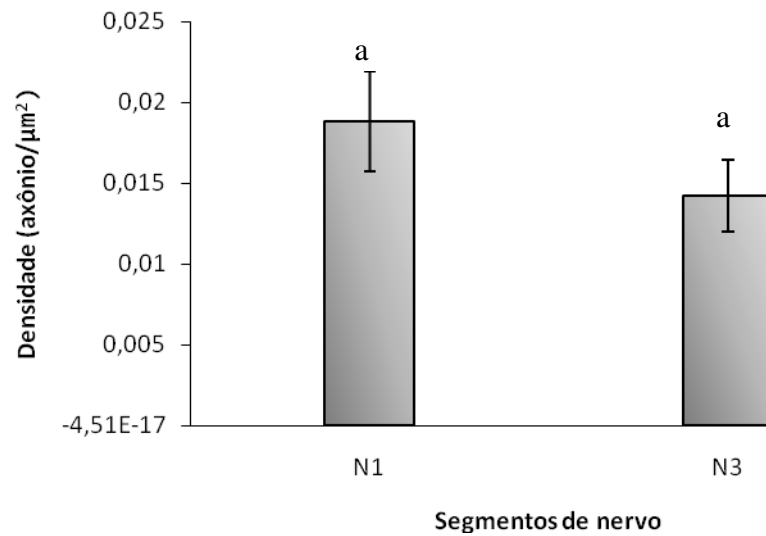


Figura 52 – Densidade axonal (axônio/μm²) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

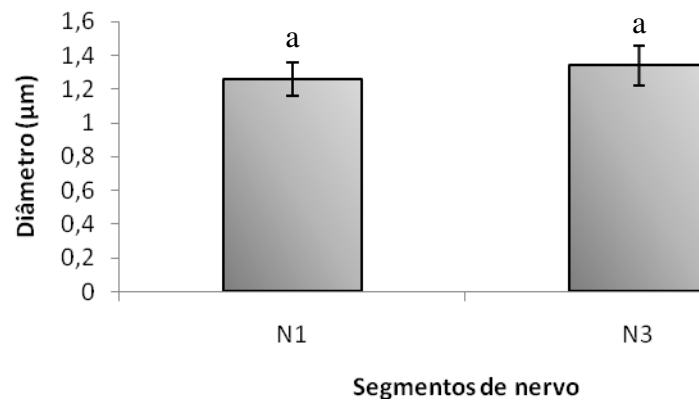


Figura 53 – Diâmetro mínimo axonal (μm) nos segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

Tabela 20 – Comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 no grupo G7

Segmento de nervo	Densidade axonal (axônio/μm²)	Diâmetro mínimo axonal (μm)
N1	0,019 ± 0,003 ^a	1,259 ± 0,1 ^a
N3	0,014 ± 0,002 ^a	1,34 ± 0,1 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Não foram obtidos cortes longitudinais inteiros dos segmentos de nervo N4 ("T" da NTL), N5 (coto proximal do nervo fibular comum), N6 (coto distal do nervo tibial) e N7 (coto proximal do nervo tibial) impossibilitando a visualização e análise das fibras nervosas.

A coletânea dos resultados obtidos na morfometria das fibras nervosas está representada na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados da morfometria das fibras nos segmentos de nervo N1, N2 e N3

GRUPO	DA-N1 (axônio/ μm^2)	AA-N1 (μm^2)	DMA-N1 (μm)	ABM-N1 (μm^2)	DA-N2 (axônio/ μm^2)	AA-N2 (μm^2)	DMA-N2 (μm)	ABM-N2 (μm^2)	DA-N3 (axônio/ μm^2)	AA-N3 (μm^2)	DMA-N3 (μm)	ABM-N3 (μm^2)
G1	0,013 ± 0,002 ^a	8,4 ± 1,2 ^a	3,1 ± 0,3 ^a	4,4 ± 0,5 ^a	0,008 ± 0,0008 ^a	9,8 ± 0,8 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	5,6 ± 0,3 ^a	0,013 ± 0,002 ^a	8,4 ± 1,2 ^a	3,1 ± 0,3 ^a	4,4 ± 0,5 ^a
G2	0,001 ± 0,0005 ^b	0,23 ± 0,13 ^b	0,2 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,2 ^b	-	-	-	-	0,0009 ± 0,0005 ^b	0,2 ± 0,13 ^b	0,2 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,2 ^b
G3	0,016 ± 0,002 ^c	5,3 ± 0,9 ^c	2,4 ± 0,2 ^c	2,6 ± 0,5 ^c	0,016 ± 0,001 ^b	2,4 ± 0,2 ^b	1,7 ± 0,1 ^{bc}	3,1 ± 0,2 ^b	0,009 ± 0,0007 ^c	7,7 ± 0,7 ^a	3,1 ± 0,1 ^a	4,0 ± 0,3 ^b
G4	0,004 ± 0,0006 ^d	1,3 ± 0,15 ^b	1,2 ± 0,1 ^d	1,2 ± 0,1 ^{bd}	0,013 ± 0,001 ^c	3,3 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,07 ^b	3,3 ± 0,2 ^b	0,005 ± 0,001 ^d	1,1 ± 0,2 ^b	1,0 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,2 ^b
G5	0,015 ± 0,002 ^e	4,4 ± 0,6 ^c	2,2 ± 0,2 ^c	2,2 ± 0,3 ^{cd}	0,017 ± 0,001 ^b	2,7 ± 0,2 ^b	1,8 ± 0,07 ^{bc}	3,2 ± 0,2 ^b	0,01 ± 0,0008 ^a	8,0 ± 0,7 ^a	3,1 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,2 ^b
G6	0,005 ± 0,005 ^d	1,3 ± 0,5 ^b	1,1 ± 0,2 ^d	1,0 ± 0,2 ^b	0,005 ± 0,001 ^d	2,3 ± 0,6 ^b	1,4 ± 0,3 ^f	1,3 ± 0,3 ^f	0,003 ± 0,0007 ^e	2,0 ± 0,3 ^b	1,6 ± 0,1 ^c	1,1 ± 0,1 ^b
G7	0,019 ± 0,003 ^f	1,4 ± 0,2 ^b	1,3 ± 0,1 ^d	1,2 ± 0,1 ^{bd}	0,016 ± 0,001 ^b	2,5 ± 0,3 ^b	2,1 ± 0,1 ^b	2,6 ± 0,2 ^b	0,014 ± 0,002 ^f	1,5 ± 0,2 ^b	1,3 ± 0,1 ^c	1,2 ± 0,1 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatística. DA-N1 = densidade axonal no N1; AA-N1 = área axonal no N1; DMA-N1 = diâmetro mínimo axonal no N1; ABM-N1 = área da bainha de mielina no N1; DA-N2 = densidade axonal no N2; AA-N2 = área axonal no N2; DMA-N2 = diâmetro mínimo axonal no N2; ABM-N2 = área da bainha de mielina no N2; DA-N3 = densidade axonal no N3; AA-N3 = área axonal no N3; DMA-N3 = diâmetro mínimo axonal no N3; ABM-N3 = área da bainha de mielina no N3.

5. DISCUSSÃO

Segundo Marques et al. (2005), no Brasil não havia regulamentação para utilização de animais na pesquisa científica. Porém, o Decreto Federal nº 24.645 de 1934 já advogava a inviolabilidade do animal e previa infrações com multa e prisão pelos maus tratos, mas reconhecia a atividade praticada no interesse da ciência (Schnaider & Silva, 2004).

Com o intuito de dirimir os conflitos existentes entre instituições de pesquisa e organizações de proteção aos animais, foi aprovado pela Câmara dos Deputados, em 20 de maio de 2008, o Projeto de Lei 1.153/95, conhecido como Lei Arouca, que regulamentou o uso de cobaias em pesquisas científicas no Brasil (Agência Câmara da Folha Online).

Atualmente em vigor há os Princípios Éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), cujos artigos englobam três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência (Schnaider & Souza, 2003).

Segundo Pereira et al. (1998), na escolha do animal de experimentação deve-se considerar a espécie mais utilizada na literatura e em quantidade mínima para obtenção de resultados válidos.

Várias espécies animais são utilizadas no estudo de regeneração do nervo, entre eles primatas (Mennen, 1998b; Auba et al., 2006), cães (Sundine et al., 2003), gatos (Moldovan et al., 2006), coelhos (Askar et al., 2001; Jabery et al., 2003), ratos (Akedo et al., 2006; Bertelli et al., 2006) e camundongos (Myckatyn et al., 2004).

Neste trabalho foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar por serem de fácil obtenção, manipulação e manutenção. Além disso, são animais que ocupam pouco espaço, facilitando estudos de

longa duração (Ellis & McCaffrey, 1984). Segundo Viterbo (1992a), estes animais apresentam estruturas anatômicas adequadas para estudos sobre neurorrafias e regeneração muscular. Ratos Wistar têm sido utilizados em muitos estudos experimentais com neurorrafia término-lateral (Viterbo et al., 1992; Lundborg et al., 1994b; Viterbo et al. 1994a, 1998; Schultes et al., 2001; Papalia et al., 2001; Gravvanis et al., 2004; Hayashi et al., 2004; Okuyama et al., 2004; Manasseri et al., 2007).

Ratos do sexo masculino são mais fáceis de adquirir, pois as fêmeas são utilizadas como matrizes. Além disso, estas são mais suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e hormônios gonadais, como o estrógeno e a progesterona (Lincoln, 1980; Carandente et al., 1989). Conforme Kovačič et al. (2003), pesquisas têm mostrado que os hormônios sexuais exercem efeitos neurotróficos em várias regiões do sistema nervoso adulto, incluindo aquelas não especificamente envolvidas com reprodução, como o brotamento de axônios sensoriais mielínicos. Por isto, neste trabalho, optou-se por utilizar todos os animais do sexo masculino.

Segundo Nahas & Ferreira (2005) o número de animais utilizados em um projeto de pesquisa deve ser superestimado considerando que alguns animais podem evoluir para óbito durante um experimento longo. Além disso, em experimentos com regeneração nervosa a variabilidade é grande. Desta forma, neste trabalho foram utilizados 140 animais, ou seja, 20 animais por grupo experimental. Nove animais (4 do G6, 3 do G4 e 2 do G7) morreram imediatamente após a anestesia na segunda cirurgia.

Foram utilizados animais jovens (45 dias) pois vários autores demonstraram que a idade pode prejudicar a regeneração tecidual (Bharalli & Lisney, 1990; Fawcett, 1992; Vaughan, 1992), diminuir a velocidade da regeneração nervosa (Fawcett, 1992; Vaughan, 1992), assim como diminuir a liberação dos fatores neurotróficos (Andrews, 1996).

Os animais utilizados não diferiram quanto à massa inicial, demonstrando homogeneidade nas amostras, como recomendado por Vieira & Hossne (2001). Especificamente em trabalhos que avaliam a massa do músculo tibial cranial, é importante que as amostras sejam homogêneas, pois certamente a massa do animal repercutirá na massa muscular. Houve aumento

de massa significativo, em todos os ratos observados, quando comparadas massas iniciais e finais. Portanto, a cirurgia não alterou o desenvolvimento normal dos animais.

Os nervos fibular comum e tibial foram escolhidos por serem de fácil acesso, apresentarem-se anatomicamente próximos e por inervarem músculos distintos, respectivamente, músculo tibial cranial e músculo gastrocnêmio (Hebel & Stromberg, 1976).

O nervo fibular comum atuou como receptor por ser o único a inervar o músculo tibial. Este modelo experimental, utilizando o nervo fibular comum e o músculo tibial cranial, foi proposto por Viterbo (1992a) para o estudo da NTL a partir de então, tem sido utilizado em diversos trabalhos (Viterbo et al., 1994a,b, 1998; McCallister et al., 1999; Goheen-Robillard et al., 2002; De Sá et al., 2004; Stipp et al., 2007) por apresentar as vantagens do nervo fibular comum ser um nervo predominantemente motor e do músculo tibial cranial ser superficial, portanto, de fácil acesso aos exames e à coleta, além disso, é inervado apenas pelo nervo fibular comum, não sofrendo a atuação de inervações secundárias. Como nervo doador, o nervo cutâneo sural caudal poderia ser utilizado, porém, este é predominantemente sensorial (Swett et al., 1991). Desta maneira, para analisar a possibilidade de dupla inervação muscular, optou-se pela utilização do nervo tibial por ser um nervo predominantemente motor.

Após exposição dos nervos de interesse realizou-se um sorteio para determinar a qual grupo o animal pertenceria, evitando-se, assim, a tendenciosidade, conforme sugerido por Berkuo et al. (1981).

O microscópio cirúrgico foi utilizado para diminuir a possibilidade de lesões nos nervos durante a manipulação e sutura. Sua utilização é recomendada por diversos autores por aumentar a precisão, o que diminui o trauma operatório e, conseqüentemente, oferece melhor recuperação funcional (Ferreira et al., 1974; Terzis, 1979; Braun, 1982; Millesi, 1990; Noah et al., 1997b; Watchmaker & Mackinnon, 1997).

Para alcançar nosso objetivo, suturamos o coto proximal do nervo tibial à lateral intacta do nervo fibular comum (G3).

O G4 foi realizado para analisar se o nervo tibial seria capaz de manter a inervação do músculo tibial cranial após secção do nervo fibular comum proximal à NTL, 120 dias após a cirurgia.

Como o G4 manteve a NTL por 150 dias, o G5 foi criado para obtenção de um parâmetro de comparação do G4 com a dupla inervação (G5).

O grupo G6 é o grupo desnervado para comparação com o grupo G4. Neste grupo os nervos fibular comum e tibial foram seccionados após 120 dias da NTL.

O G7 foi criado para comparar a dupla inervação muscular com a reinervação do músculo tibial cranial através da NTL realizada 30 dias depois da secção do nervo fibular comum.

Foram utilizados dois grupos controles para verificar se a dupla inervação muscular apresentaria resultados próximos ao normal (G1) ou de desnervação (G2).

Todos os cotos de nervos seccionados foram invertidos e inseridos em musculatura adjacente com o objetivo de evitar regeneração espontânea e, conseqüente, reinervação muscular, conforme recomendação de Frey et al. (1982).

O nervo tibial foi suturado na lateral do nervo fibular comum perpendicularmente ao nervo tibial sem retirada de epineuro, porque se uma janela de epineuro é aberta (Viterbo et al., 1994 a, b) ou não (Viterbo et al., 1992), não parece influenciar o resultado final, desde que regeneração morfológica foi observada nas duas situações, mostrando que as fibras regeneradas após a NTL têm a capacidade de transpor o endoneuro e o perineuro (Zhao et al., 1997).

Quanto ao número de pontos de sutura, encontramos na literatura trabalhos realizados utilizando dois pontos (Caplan et al., 1999; Schultes et al., 2001), três pontos (Mackinnon, 1989; Viterbo, 1992a; Lundborg et al., 1994a) ou quatro pontos (Lundborg et al., 1994b; Goheen-Robillard et al., 2002; Yan et al., 2002b; Kovačič et al., 2003). Neste trabalho as neurorrafias foram realizadas com quatro pontos simples para promover contato adequado entre os nervos suturados devido ao maior calibre do nervo tibial em relação ao nervo fibular comum.

Na literatura não foi encontrado um consenso quanto ao tempo de observação pós-operatória variando de sete dias (Matsumoto et al., 1999; Tiangco et al., 2001) até 15 meses (Rab et al., 2002). Alguns autores optaram por uma faixa de 3 meses (Tham & Morrison, 1998; Yan et al., 2002a; Jaber et al., 2003) a seis meses (Viterbo et al., 1998; McCallister et al., 1999; Gohen-Robillard et al., 2002). Todos obtiveram reinervação muscular.

Foi determinado um período de 120 dias para o sacrifício dos animais dos grupos G1, G2 e G3; e de 150 dias para os grupos G4, G5, G6 e G7, pois, segundo literatura, reinervação muscular foi obtida entre três e seis meses. Este prazo demonstrou-se satisfatório para os grupos de dupla inervação muscular, considerando que em todos os parâmetros analisados não foi observada diferença estatística entre os grupos G3 e G5. Porém, este prazo não foi satisfatório para que ocorresse completa reinervação do músculo tibial cranial no grupo G4, ou degeneração axonal e atrofia muscular no grupo G6. Talvez, se os animais dos grupos G4 e G6 fossem mantidos por um período maior, fosse possível a observação de uma maior taxa de reinervação no G4 e de degeneração Walleriana no G6.

Para avaliar a ocorrência de dupla inervação muscular utilizamos a massa dos MTC, dois métodos funcionais (o teste da marcha e o teste eletrofisiológico), análises morfométricas e morfológicas dos MTC e dos segmentos de nervo N1, N2 e N3.

5.1. Teste da Marcha

O teste da marcha analisa o modo de andar do animal através do cálculo do IFC, expresso como porcentagem de perda da função normal (De Medinaceli et al., 1982). Segundo Monte-Raso et al. (2008) o IFC parece ser o mais versátil e, apesar de apresentar alguns inconvenientes, é um teste de baixo custo e facilmente aplicável.

O G1 apresentou média próxima ao zero, portanto, maior que as médias dos demais grupos. Os demais grupos não diferiram entre si. Segundo De Medinaceli et al. (1982), a porcentagem zero ($\pm 11\%$) representa função normal e, -100%, perda da função que resulta da completa transecção do nervo

ciático; esta indicação corrobora o resultado obtido para o G1 (controle de normalidade), porém não confirma o resultado obtido para o G6, onde foi realizada transecção do nervo fibular comum e do nervo tibial, determinando a perda total da função do nervo ciático; e o resultado do G2, grupo que teve apenas o nervo fibular comum seccionado, portanto, desnervação parcial do nervo ciático, e obteve resultado inferior a – 100%.

Os grupos G3, G4, G5 e G7 apresentavam um dos nervos, fibular comum ou tibial, funcionais, o que determinava perda parcial da função do nervo ciático. Este teste não foi sensível o suficiente para detectar diferença entre estes grupos. Goheen-Robillard et al. (2002), ao utilizarem NTL para unir o nervo tibial intacto ao nervo tibial seccionado contralateral através de um enxerto longo de nervo ciático, afirmaram que o teste falhou em demonstrar qualquer evidência de lesão funcional no nervo doador e que o teste da marcha não foi sensível o suficiente para detectar pequenas alterações funcionais nervosas, confirmando nossos resultados.

O índice funcional do nervo ciático (IFC) é dado por quatro variáveis: a TOF (distância entre os dedos da pata experimental e os dedos da pata normal à frente) mede a capacidade da pata experimental em suportar o peso do animal; a PL (distância do calcanhar aos dedos) é curta em animais normais que caminham sobre os dedos; e TS (distância entre o primeiro e quinto dedos) e IT (distância entre o segundo e quarto dedos) são indicadores da condição do nervo fibular (De Medinaceli et al., 1982). Segundo Bain et al. (1989), as medidas de PL, TS e IT seriam as mais sensíveis e de maior utilidade. Estes autores utilizaram apenas as medidas de PL e TS para realizar o cálculo do IFFC.

O cálculo do IFFC foi sensível em detectar a lesão no nervo fibular comum no grupo G2, diferenciando-o dos demais grupos. Os grupos G3, G4, G5 e G7 não diferiram do grupo normal (G1), mostrando que não houve perda funcional nos grupos G3 e G5, mas houve recuperação funcional nos grupos G4 e G7. Hare et al. (1992) observaram que o nervo fibular comum com reparo término-terminal ou com lesão por esmagamento recuperou 100% da função normal em oito semanas. Neste trabalho não houve lesão intencional no nervo fibular comum, o que pode explicar a não diferenciação entre os grupos.

Porém, no grupo G6, o IFFC não foi sensível para diferenciá-lo dos demais grupos (G1, G3, G4, G5 e G7), pois o nervo fibular comum foi transecionado, assim como o nervo tibial. Segundo Hare et al. (1992), o nervo tibial contribui predominantemente na determinação das características das pegadas. Assim, o teste não foi sensível para diferenciar os grupos G3, G4, G5, G6 e G7, porque, em todos eles, o nervo tibial estava seccionado.

5.2. Teste Eletrofisiológico

Outro teste funcional é o teste eletrofisiológico. Este fornece dados de latência e amplitude. A latência nos fornece informações sobre a condução nervosa, ou seja, o número de fibras mielinizadas. Já, a amplitude, nos informa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico e, conseqüentemente, ao número de axônios excitáveis (Robinson & Snyder-Mackler, 2001).

Para a realização do teste eletrofisiológico optou-se pela utilização de eletrodos de captação em agulhas, pois, apesar do eletrodo de agulha registrar apenas uma parte do potencial de ação muscular, com ele a interferência dos músculos vizinhos é menos visível, sendo preferível no registro do potencial de ação composto de pequenos músculos e músculos atroficos (Kimura, 1987). A frequência, duração e intensidade do estímulo foram constantes para que a única variável fosse o grupo experimental.

O teste realizado antes da secção do nervo fibular comum e após 30 dias, imediatamente antes do sacrifício dos animais do grupo G4, mostrou que a secção causou, em 30 dias, uma diminuição da amplitude, porém, não alterou significativamente a latência. Segundo Kimura (1987), uma redução da amplitude com latência normal é vista quando ocorre lesão parcial do nervo, causando neuropraxia ou início de axoniotmese antes de iniciar a degeneração distal. Porém, neste trabalho, o estímulo nervoso foi dado no nervo ciático, portanto, proximal à NTL, o que indica que, apesar de ter ocorrido uma diminuição da amplitude, ou seja, diminuição do número de axônios excitáveis, o estímulo elétrico passou pela NTL desencadeando potencial de ação no músculo tibial cranial, mostrando haver reinervação muscular através da NTL.

No grupo G6 o teste eletrofisiológico foi realizado antes da secção dos nervos fibular comum e tibial e, após 30 dias, ou seja, antes do sacrifício dos animais. Os resultados mostraram que houve diminuição da amplitude a, aproximadamente, zero ($0,5 \pm 1,8$ mV) e aumento da latência tendendo ao infinito, ou seja, não foram obtidos valores de amplitude e latência após a secção dos nervos. Segundo Kimura (1987) a ausência de resposta indica que a maioria das fibras não está conduzindo o impulso nervoso através da lesão. Isto é comumente visto em casos de neurotmesa, confirmando, assim a secção realizada nos nervos tibial e fibular comum. A pequena amplitude ($0,5 \pm 1,8$ mV) encontrada foi devida a uma possível reinervação espontânea ocorrida em um dos animais observados (rato nº 35).

Nos animais do G7 o teste eletrofisiológico foi realizado antes da segunda cirurgia (NTL) e, após 120 dias, ou seja, antes do sacrifício. Antes da NTL não foram obtidos resultados de amplitude e latência indicando a completa desnervação do MTCD através da secção do nervo fibular comum. O teste realizado antes do sacrifício mostrou aumento da amplitude e diminuição da latência, portanto, ocorrência de reinervação muscular através da NTL num período de 120 dias.

Quando todos os grupos foram comparados entre si, o grupo G3 não se diferenciou dos grupos G1 ou G5. A amplitude no grupo G5 foi significativamente menor que no grupo G1 (normal), demonstrando uma possível lesão no nervo fibular comum no grupo G5, acompanhado pelo grupo G3, já que não houve diferença estatística entre estes grupos. Esta lesão pode ter ocorrido durante a realização da NTL. Devido ao calibre do nervo tibial ser cerca de duas vezes maior que o do nervo fibular comum, isto torna a NTL realizada, suturando o nervo tibial na lateral do nervo fibular comum, um problema técnico (De Sá et al., 2004), podendo ocasionar uma lesão no nervo fibular devido à necessidade de maior número de pontos.

O G7 apresentou amplitude maior que os grupos G2 e G6, mostrando reinervação muscular no grupo G7.

O G4 não se diferenciou dos grupos G2 e G6, mas também não se diferenciou do G7, mostrando um início de reinervação em 30 dias de NTL. O

grupo G6 não se diferenciou do grupo G2 mostrando desnervação do músculo tibial cranial.

Yan et al. (2002b) suturaram o nervo fibular comum à lateral do nervo tibial com abertura de janela de epineuro helicoidal (nervo suturado na diagonal) ou padrão (nervo suturado em ângulo de 90º) através de NTL. Após estimular o nervo tibial proximal à NTL e o nervo fibular comum distal à NTL, observaram uma amplitude de $10.8 \pm 5,3\text{mV}$, no grupo onde foi realizada a NTL padrão, 11 meses após a cirurgia. Este resultado foi semelhante ao resultado observado no G7 ($11,1 \pm 0,98\text{ mV}$), indicando que este grupo obteve excelente reinervação em apenas quatro meses.

Em todos os animais, exceto os do G2 e do G6, ao se deflagrar estímulos no nervo ciático foi observada extensão do pé com contração do músculo tibial cranial. O mesmo foi observado por MacCallister et al. (1999), após suturar o coto distal do nervo fibular comum à lateral do nervo tibial e estimular o nervo fibular comum distal à NTL, 20 semanas após a cirurgia. Os autores afirmaram que a eletroestimulação indicou reinervação do músculo alvo, mas não forneceu informação sobre a origem dos axônios regenerados. Hayashi et al. (2004) realizaram diferentes técnicas de NTL e observaram contração muscular ao estimular pontos antes e depois da NTL. Afirmaram que este estímulo foi conduzido por fibras nervosas regeneradas por brotamento colateral.

Na avaliação da latência observou-se que apenas os grupos G2 e G6 se diferenciaram dos demais. Estes resultados indicaram, nos grupos G4 e G7, ocorrência de lesão parcial do nervo (Kimura, 1987) mostrando, mais uma vez, a confiabilidade do teste eletrofisiológico, pois estes são grupos onde ocorreu reinervação muscular.

5.3. Análise do músculo tibial cranial (MTC)

Após o teste eletrofisiológico os músculos tibiais craniais direitos e esquerdos foram coletados, enxutos com uma gaze, para remoção de sangue e outros fluídos, e pesados sem o tendão (Yan et al., 2002a; Yan et al, 2002b).

Os músculos tibiais craniais direitos foram congelados em nitrogênio líquido. Os cortes foram realizados em criostato e corados com hematoxilina e eosina.

Quando comparadas as massas dos MTC, não houve diferença estatística entre os grupos G1 (normal), G3 e G5 (grupos com dupla inervação muscular) e grupo Média MTCE (média da massa de todos os MTCE), mostrando que a dupla inervação muscular não prejudicou o músculo tibial cranial quanto à sua massa. Estes mesmos grupos foram diferentes dos demais grupos, mostrando atrofia do músculo tibial cranial nos grupos G2, G4, G6 e G7. Todos os grupos apresentaram massa muscular maior que o grupo G2 (controle de desnervação) demonstrando que o procedimento realizado neste grupo foi efetivo como método de desnervação.

O cálculo da massa do MTC mostrou maior massa muscular no MTCD (109%) em relação ao MTCE no grupo G1. Esta diferença indica a necessidade de sorteio entre os lados direito e esquerdo, no momento da cirurgia, nos próximos trabalhos. Não foi encontrado, na literatura, trabalho que corrobore este achado.

A atrofia observada no grupo G2 era esperada sendo este o grupo controle de desnervação.

No grupo G4 o resultado da massa muscular mostra que a dupla inervação muscular por 120 dias não foi capaz de manter a inervação do MTC, haja vista a atrofia observada quando analisada a massa do MTCD (49% da massa do MTCE).

No grupo G6 foram realizadas secções dos nervos tibial e fibular comum, porém os 30 dias de desnervação não foram suficientes para a atrofia completa do músculo, já que a massa do músculo no G6 foi maior que no grupo G2.

No grupo G7 ocorreu atrofia muscular antes que a reinervação fosse completada, tendo em vista que o MTCD apresentou uma massa de 51% da massa do MTCE.

Viterbo et al. (1998) compararam a neurorafia término-lateral realizada com e sem epineuro. Estes autores obtiveram resultado de massa do MTC de 0,47 (\pm 0,18) g nos animais com NTL sem epineuro, e 0,45 (\pm 0,15) g nos animais com NTL com epineuro. Estes resultados foram comparáveis aos

obtidos nos G4 ($0,4 \pm 0,04$ g) e G7 ($0,47 \pm 0,03$ g), grupos onde ocorreu a reinervação. Os G3 ($0,8 \pm 0,03$ g) e G5 ($0,9 \pm 0,04$ g) apresentaram médias de massa do MTC maiores que as observadas por Viterbo et al. (1998). Nestes grupos não ocorreu reinervação, portanto, não houve início de atrofia muscular como no grupo de Viterbo.

A avaliação morfométrica do MTCD mostrou não haver diferença entre os grupos G1, G3 e G5 nos parâmetros avaliados (área e menor diâmetro das fibras musculares). Estes grupos apresentaram fibras musculares maiores que os demais grupos. Os resultados sugerem que a dupla inervação muscular não prejudicou o MTC confirmando os resultados da massa muscular e do teste eletrofisiológico.

O G2 apresentou fibras musculares menores que os demais grupos mostrando a atrofia causada pela secção do nervo fibular comum 120 dias antes do sacrifício.

O grupo G4 foi estatisticamente diferente dos grupos G1, G2, G3 e G5, mas não do grupo G7. Este resultado mostrou ter havido uma atrofia muscular após a secção do nervo fibular proximal à NTL, ou seja, a neurorrafia realizada 120 dias antes da secção não foi capaz de evitar a atrofia muscular, porém, esta atrofia foi pequena, visto que o G4 foi estatisticamente diferente do G2 (grupo controle de desnervação). O G4 não foi diferente do G7, o que mostrou que houve reinervação através da NTL em apenas 30 dias.

O G6 apresentou diferença estatística quando comparado ao G2, mas não ao G4. Este resultado mostrou que 30 dias não foram suficientes para a atrofia completa do MTCD. Este grupo apresentou fibras musculares estatisticamente menores que o G7 confirmando a reinervação no G4.

Viterbo et al. (1992), ao estudar a regeneração de nervo através de NTL sem retirada de epineuro, obtiveram, no grupo onde foi realizada NTL, um valor de diâmetro máximo de $38,37 (\pm 1,4)$ μm quando o nervo contralateral era normal, e $55,75 (\pm 18,48)$ μm quando o nervo contralateral era desnervado. Em outro estudo onde foi realizada retirada de epineuro (Viterbo et al., 1994a), obtiveram medidas de diâmetro mínimo das fibras do músculo tibial cranial de $37,45 (\pm 5,92)$ μm , quando o nervo contralateral era normal, e $36,34 (\pm 8,00)$ μm , quando o nervo contralateral era desnervado.

Neste trabalho obtivemos resultados semelhantes aos obtidos por Viterbo et al. (1994a) quando medidos os diâmetros mínimos nos grupos G4 ($36,6 \pm 2,5 \mu\text{m}$) e G7 ($38,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$), grupos onde ocorreu reinervação muscular indicando que em apenas 30 dias (G4), ou 120 dias (G7), foi obtida uma boa regeneração do nervo comparado aos, em média, 7,8 meses dos grupos de Viterbo, com retirada de epineuro.

É importante destacar que a medida de diâmetro mínimo é mais confiável que a medida de área ou de diâmetro máximo, pois o mesmo não sofre alteração da inclinação da navalha durante o corte histológico, conforme ressaltado por Romão et al., 2007.

Os resultados obtidos nas avaliações do MTCD (massa muscular, área e diâmetro mínimo) podem ser comprovados na visualização das fibras musculares na análise morfológica. Nesta análise, observou-se a grande semelhança entre os grupos G1, G3 e G5 quanto ao tamanho e forma das fibras musculares e quantidade de tecido conjuntivo.

Nos grupos G4 e G7 observaram-se, quando comparados aos grupos G1, G3 e G5, diminuição do calibre das fibras musculares, que se tornaram mais arredondadas, e aumento de tecido conjuntivo, o que caracteriza atrofia das fibras. Esta atrofia foi pequena quando comparada ao G2, grupo desnervado, que apresentou fibras musculares menores e maior quantidade de tecido conjuntivo. Estas observações indicaram que nos grupos G4 e G7 houve início de atrofia muscular após secção do nervo fibular comum, porém, houve reinervação muscular através da NTL, o que não permitiu que esta atrofia progredisse e se igualasse à observada no grupo G2.

O G6 mostrou-se comparável aos grupos G4 e G7 quanto ao tamanho das fibras musculares, confirmando que 30 dias foram insuficientes para determinar a atrofia destas fibras.

5.4. Análise dos segmentos de nervo N1, N2 e N3

Os segmentos de nervo N1 (nervo fibular comum distal à NTL), N2 (nervo tibial proximal à NTL) e N3 (nervo fibular comum proximal à NTL), foram

coletados e, após corte e coloração, realizadas medidas da densidade axonal, área e diâmetro mínimo dos axônios, e área da bainha de mielina.

As fibras nervosas foram analisadas quanto ao número de fibras mielinizadas por muitos autores. Alguns realizaram a contagem do número total de fibras no corte transversal do nervo (Viterbo et al., 1994b; Noah et al., 1997a; Viterbo et al., 1998; Hayashi et al., 2004). McCallister et al. (1999) optaram por realizar a análise da razão da densidade axonal, dividindo a densidade axonal do nervo experimental pela densidade axonal do nervo normal, após suturar o coto distal do nervo fibular na lateral do nervo tibial.

Hayashi et al. (2004) analisaram, além da contagem do número de fibras, a medida do menor diâmetro da fibra mielinizada.

5.5. Nervo fibular comum distal à NTL (N1)

Na análise do diâmetro mínimo axonal, o grupo G2 apresentou os menores valores. Este resultado era esperado já que, neste grupo houve desnervação por 120 dias, prazo suficiente para observação de degeneração Walleriana.

Não houve diferença estatística quando comparados os diâmetros mínimos dos grupos G4, G6 e G7, sugerindo que, no grupo G6, os 30 dias de desnervação não foram suficientes para diferenciá-lo dos grupos G4 e G7. No grupo G4 este resultado indicou ocorrência de reinervação. Estes três grupos não diferiram do grupo G2 quando analisados os resultados de área axonal, talvez devido à inclinação do corte histológico que aumentou a área destas fibras. O grupo G7 apresentou maior densidade axonal quando comparado aos grupos G1, G2, G4 e G6. Este resultado indicou ocorrência de regeneração axonal no grupo G7 maior que a ocorrida no grupo G4 devido ao maior tempo de reinervação, 120 dias no grupo G7 e apenas 30 dias no grupo G4.

O grupo G3 não se diferenciou dos grupos G1 e G5 quando comparados os resultados de diâmetro mínimo. O grupo G5 apresentou calibre axonal menor que o do grupo G1, demonstrando ocorrência de possível lesão no nervo fibular comum durante a realização da NTL. Esta lesão pode ter ocorrido também em alguns animais do grupo G3, pois, embora não diferisse

do grupo G1 (normal), apresentou uma média menor, o que não o diferenciou do grupo G5. Os valores de área confirmam estes resultados.

Segundo De Sá et al. (2004), a medida do diâmetro mínimo das fibras axoniais é o parâmetro mais confiável na regeneração nervosa. Estes autores obtiveram medidas de diâmetro mínimo das fibras regeneradas do nervo fibular comum de 1,51 μm , após suturar o coto distal o nervo fibular comum à lateral do nervo tibial. Este resultado é comparável ao valor obtido na medida de diâmetro mínimo das fibras do G7 (1,3 \pm 0,1 μm) deste estudo, e indica reinervação axonal.

Quanto à área da bainha de mielina não houve diferença entre os grupos G3 e G5. Também não houve diferença entre os grupos G4, G5 e G7, indicando a ocorrência de reinervação nos grupos G4 e G7. O grupo G6 não apresentou diferença estatística quando comparado ao G2 demonstrando início da degeneração ocorrida em decorrência da secção do nervo fibular comum.

Os resultados morfométricos podem ser comprovados na análise morfológica. Imagens representativas dos segmentos de nervo N1 mostraram fibras nervosas de tamanhos variados e bainhas de mielina bem delimitadas e regulares nos grupos G3 e G5, porém, com grande número de fibras de pequeno calibre quando comparadas às fibras do grupo G1, mostrando que pode ter ocorrido uma lesão no nervo fibular comum durante a realização da NTL com posterior regeneração das fibras lesadas.

Os grupos G4 e G6 apresentaram fibras em pequena quantidade e diâmetros pequenos com grande quantidade de tecido conjuntivo entre elas. Este resultado indica ocorrência de degeneração Walleriana após secção do nervo fibular comum, porém, não comparável à ocorrida no grupo G2. As fibras do grupo G7 apresentaram-se com menor diâmetro, porém em maior quantidade quando comparadas às dos grupos G4 e G6. Esta diferença pode ser devida ao maior tempo de reinervação (120 dias) comparado ao grupo G4 (30 dias), e ocorrência de degeneração Walleriana nos grupos G4 e G6 .

5.6. Nervos fibular tibial proximal à NTL (N2)

Analisando o atributo diâmetro mínimo, que é o mais confiável, pois não sofre interferência da inclinação do corte, observa-se que o grupo G1 apresentou resultados maiores que os demais grupos. Este resultado foi surpreendente, pois era esperado que não houvesse diferença entre os grupos.

O fato de um nervo ser seccionado e seu coto proximal suturado na lateral de um nervo íntegro ou mesmo em degeneração, como no grupo G7, levou à hipótese de que nenhuma alteração ocorresse. Porém, os resultados do diâmetro mínimo mostraram diminuição do calibre das fibras nervosas no segmento proximal do nervo tibial.

Quando observados os outros atributos observou-se que a área da bainha de mielina confirmou os resultados do diâmetro mínimo. Os resultados de área e densidade axonal confirmaram os do diâmetro mínimo exceto no grupo G6.

Os grupos G3 e G5 não diferiram dos grupos G4 e G7 quando comparados os resultados de diâmetro mínimo axonal. Quando comparados ao grupo G1, estes quatro grupos apresentaram diminuição do diâmetro mínimo das fibras nervosas. Os resultados de área e densidade axonal confirmam estes dados. Esta diminuição do calibre das fibras nervosas, acompanhada do aumento da densidade axonal, indica uma possível atrofia das fibras nervosas nos grupos G3, G4, G5 e G7.

Nos grupos G3 e G5, o coto proximal do nervo tibial foi suturado à lateral do nervo fibular comum intacto. Na literatura foram encontrados trabalhos que realizaram o mesmo tipo de neurorafia (Battista et al., 1981; Al-Qattan, 2000; Aszmann et al., 2003; Furukawa et al., 2008), porém, apenas em um deles (Aszmann et al., 2003) foi realizada morfometria do nervo correspondente ao segmento de nervo N2 do presente trabalho. Aszmann et al. (2003), em estudo para prevenção de neuroma, suturaram o coto proximal do nervo safeno à lateral do nervo tibial intacto (Fig. 54B). Observaram que os axônios do nervo safeno atravessaram o epineuro do nervo tibial e dispersaram-se entre os axônios tibiais mielinizados. Os autores apresentaram valores do número total de fibras mielinizadas (1573 ± 999), diâmetro das fibras

axoniais ($4,46 \pm 0,612 \mu\text{m}$) e espessura da mielina ($1,13 \pm 0,18 \mu\text{m}$) no nervo safeno, porém, não compararam com um controle de normalidade. Assim, não foi possível saber se o nervo safeno sofreu a mesma alteração observada no nervo tibial do presente trabalho.

Outros dois trabalhos sobre prevenção de neuroma contradizem o trabalho de Aszmann et al. (2003). Battista et al. (1981) seccionaram o nervo ciático e seu coto proximal foi dobrado e suturado em si mesmo (Fig. 54A). Após 16 meses observaram que a porção terminal do nervo estava constituída, principalmente, de tecido conjuntivo com ausência de elementos neurais. Em outro trabalho, Al-Qattan (2000), seccionou o nervo tibial e suturou o coto proximal à lateral do nervo fibular comum após abertura de janela epineural (Fig. 54C). Observou continuidade do epineuro do nervo tibial com o epineuro do nervo fibular comum, mas não continuidade entre os axônios, sendo que poucos axônios do nervo tibial alcançaram a junção com o nervo fibular comum. Estes trabalhos mostraram que houve uma inibição do crescimento axonal, na linha de sutura, não permitindo que os axônios penetrassem o nervo.

Furukawa et al. (2008) suturaram o coto proximal do nervo hipoglosso à lateral do nervo facial com abertura de janela epineural (Fig. 54D). Utilizaram marcadores retrógrados (Fast Blue e Diamino Yellow) para estudar a dupla inervação muscular. Sugeriram que os neurônios intactos poderiam inibir o brotamento de axônios do nervo doador na porção “T” da NTL, e que terminais neurais seccionados poderiam esperar pela chance de inervação até que ocorresse desnervação do nervo receptor. Estes autores também não realizaram morfometria das fibras axoniais, não sendo possível confirmar os resultados do presente trabalho.

Uma hipótese para explicar a possível degeneração constatada pelo aumento da densidade axonal e diminuição da área e diâmetro mínimo das fibras axoniais no nervo tibial (N2), no presente trabalho, seria de que o nervo fibular comum, por estar íntegro, não aceitaria influência pelo nervo tibial, e produziria algum fator inibitório do crescimento axonal. Desta forma, estas fibras axoniais do nervo tibial entrariam em um processo de degeneração,

iniciando pela atrofia das fibras axoniais. Trabalhos futuros poderão elucidar esta hipótese.

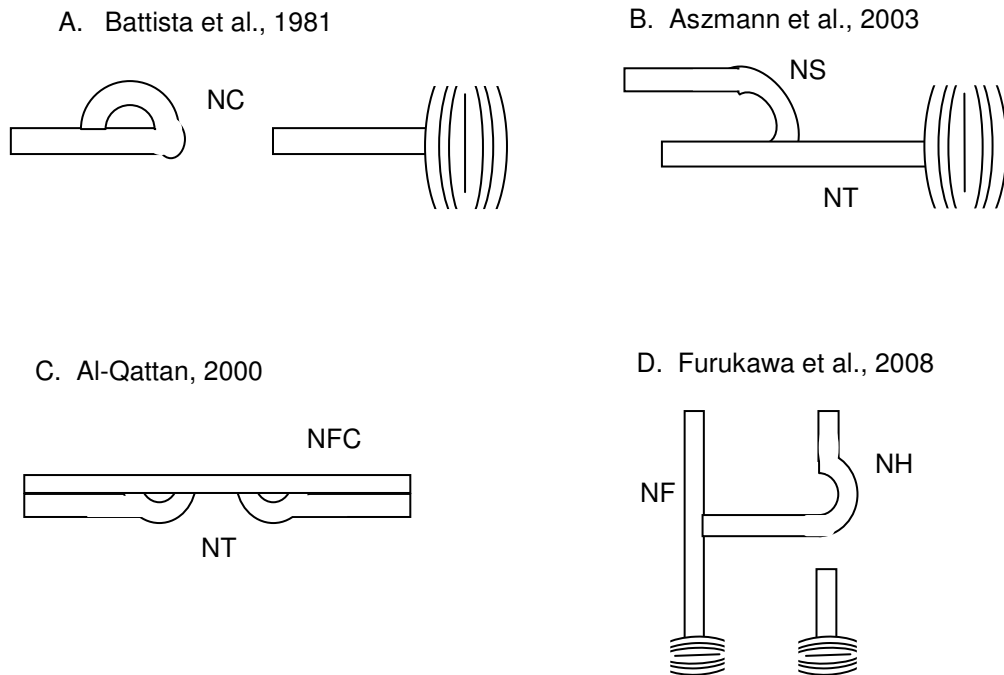


Figura 54 – Esquemas dos trabalhos de A. Battista et al. (1981); B. Al-Qattan, 2000; C. Aszmann et al., 2003; D. Furukawa et al., 2008. NC = nervo ciático; NFC = nervo fibular comum; NT = nervo tibial; NS = nervo safeno; NF = nervo facial; NH = nervo hipoglosso.

No grupo G4, o coto proximal do nervo tibial foi suturado à lateral do nervo fibular comum, neste momento, poderia ter ocorrido liberação de fatores inibitórios do crescimento axonal, levando a atrofia das fibras nervosas como nos grupos G3 e G5. Após 120 dias, o nervo fibular comum foi seccionado proximal à NTL. O nervo fibular lesado liberaria fatores de crescimento axonal, o que estimularia a reinervação do nervo fibular comum pelo nervo tibial.

No grupo G6, os resultados de diâmetro mínimo, que são os mais confiáveis, mostraram redução do calibre axonal em relação ao grupo G1 (normal), porém, não foi observada diferença estatística quando o G6 foi

comparado aos grupos G3 e G5. Este resultado indica que 30 dias não foram suficientes para ocorrer degeneração Walleriana no segmento de nervo N2 após secção do nervo tibial proximal à NTL.

No grupo G7, os parâmetros observados também não foram diferentes dos grupos G3 e G5. Este fato demonstra que a hipótese de que há liberação de algum fator que levasse à atrofia axonal no segmento de nervo proximal à NTL, quando o coto proximal de um nervo é suturado à lateral de um nervo intacto, também ocorreria quando esse coto fosse suturado à lateral de um nervo lesado, porém, esta atrofia axonal não impediria que a reinervação do nervo receptor ocorresse.

5.7. Nervo fibular comum proximal à NTL (N3)

Segmentos do nervo fibular comum proximal à NTL (N3) foram coletados dos grupos G3, G4, G5, G6 e G7. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados morfométricos do segmento de nervo N1 dos grupos G1 e G2.

O G2 apresentou os menores valores morfométricos. Este resultado deve-se à secção do nervo fibular comum 120 dias antes do sacrifício dos animais e, conseqüente degeneração Walleriana no segmento distal do nervo fibular comum.

Quando comparados os resultados de diâmetro mínimo, não foram observadas diferenças entre os grupos G1, G3 e G5, mostrando que, como era esperado, a NTL não prejudicou o nervo fibular comum em sua porção proximal. Estes resultados foram confirmados pelos resultados de densidade, área axonal e área da bainha de mielina.

Também não foi observada diferença estatística entre os grupos G4, G6 e G7, quanto ao diâmetro mínimo, mostrando que o prazo de 30 dias foi insuficiente para causar a degeneração Walleriana, que diferenciasse o G6 dos grupos G4 e G7, e o igualasse ao grupo G2. Estes resultados foram confirmados pelas medidas de área axonal e área da bainha de mielina. Na análise da densidade axonal, o grupo G7 não se diferenciou do grupo G1.

A comparação entre os segmentos de nervo N1 e N3 do grupo G7 mostrou não haver diferenças estatísticas entre os resultados de diâmetro mínimo ou entre os resultados de densidade axonal.

Estes resultados despertaram a atenção porque, no grupo G7, o nervo fibular comum foi seccionado e seus cotos inseridos na musculatura adjacente para evitar contaminação axonal pelo coto proximal. Esperava-se que, no segmento de nervo N3 do grupo G7, ocorresse degeneração Walleriana maior que a observada no grupo G6 no mesmo segmento, e valores de densidade axonal e de diâmetro mínimo das fibras nervosas menores que no segmento de nervo N1 do próprio grupo G7. Entretanto, isto não ocorreu.

Este resultado é importante, pois mostra, pela primeira vez, uma possível reinervação retrógrada do segmento de nervo proximal à NTL. Novos estudos deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

Os resultados da análise morfométrica dos segmentos de nervo fibular comum proximal à NTL nos grupos G3, G4, G5, G6 e G7, são confirmados pela análise das imagens representativas das fibras dos segmentos de nervo N3, mostrando grande semelhança entre os grupos G3 e G5, cujas fibras apresentaram-se com as bainhas de mielina bem definidas e, em quantidade e tamanhos comparáveis às fibras dos segmentos de nervo N1 do grupo G1. Os grupos G4 e G6 mostraram poucas fibras de tamanho reduzido e grande quantidade de tecido conjuntivo. As fibras nervosas do grupo G7 apresentaram-se em grande número e pequeno calibre, assemelhando-se às encontradas no segmento de nervo fibular comum distal à NTL no próprio G7.

5.8. Considerações finais

A observação de que as fibras axoniais nos grupos G3 e G5 apresentaram-se com menor calibre, e tendência a uma maior densidade axonal no segmento distal à NTL (N1), quando comparados ao grupo G1, demonstra a ocorrência de uma possível lesão no nervo fibular comum, provavelmente durante a cirurgia para a realização da NTL e, conseqüente, regeneração axonal, como a ocorrida no grupo G7 (grupo de reinervação).

Contudo, os músculos tibiais craniais destes grupos não apresentaram prejuízos, haja vista os resultados de massa, área e diâmetro mínimo das fibras do MTCD.

A presença de lesão no nervo fibular comum e ausência de prejuízo ao músculo tibial cranial também foram observadas por Cederna et al. (2001). Estes autores observaram que ocorre lesão no nervo doador durante a realização da NTL, mesmo quando técnicas cirúrgicas meticulosas são usadas para evitar lesões nos fascículos nervosos. Estas lesões causaram uma desnervação aguda no músculo doador (músculo originalmente inervado pelo nervo doador), porém, sem déficit no poder de contração do mesmo. Após seis meses, não foi encontrada nenhuma diferença estatística quando comparados massa corporal, massa do músculo doador e força de contração, demonstrando que a lesão no momento da coaptação não produz déficits funcionais ou estruturais ao músculo doador, confirmando os resultados obtidos neste trabalho. Outros autores comprovaram ausência de déficits funcionais no músculo inervado pelo nervo doador (Giovanoli et al., 2000; Ozmen et al., 2004).

A maior densidade e menor calibre axonal no segmento de nervo N1 nos grupos G3 e G5, mostram também a ocorrência de reinervação das fibras lesadas. Para elucidar a origem das fibras regenerativas, realizamos a comparação entre os segmentos proximal (N3) e distal (N1) à NTL, nos grupos G3 e G5.

O segmento de nervo N1 apresentou maior densidade e menor calibre axonal quando comparado ao segmento de nervo N3 nos grupos G3 e G5. Esta observação evidencia o fato de que não ocorreu regeneração a partir de brotamentos colaterais no segmento de nervo N3, haja vista o número de axônios neste segmento igual ao do G1 (grupo normal).

Não foram obtidos cortes longitudinais inteiros dos segmentos de nervo N4, porque as amostras foram retiradas com os fios de sutura e, no momento do corte histológico, estes rasgavam o corte, não sendo possível comprovar se a regeneração nervosa ocorreu a partir de fibras do nervo fibular comum ou do nervo tibial. Desta maneira foram lançadas duas hipóteses para explicar o ocorrido.

A primeira hipótese é de que a regeneração tenha ocorrido a partir de brotamentos colaterais ou terminais das próprias fibras do nervo fibular comum lesadas durante a NTL, portanto, em um ponto distal ao analisado no segmento de nervo N3. Neste caso, porém, não se pode falar em dupla inervação muscular.

Outra hipótese é a de que a regeneração tenha ocorrido a partir dos brotamentos terminais no segmento de nervo tibial proximal à NTL (N2).

Segundo Cajal (1928 apud Ide, 1996), para que a reinervação de um nervo aconteça, é necessário que ocorra, após lesão nervosa, degeneração Walleriana para formação das bandas de Büngner, ou colunas de células de Shwann, que é uma via indispensável pela qual os axônios em regeneração crescem em direção aos órgãos alvo.

Assim, para haver regeneração axonal a partir do nervo tibial (N2), deve ter ocorrido degeneração Walleriana das fibras lesadas, durante a realização da NTL, no nervo fibular comum, semelhante ao ocorrido na técnica de Ballance et al. (1903) que suturaram o nervo lesado a uma incisão na lateral do nervo doador, realizando na verdade uma reinervação término-terminal das fibras seccionadas na incisão.

Considerando-se, então, que tenha acontecido uma reinervação das fibras lesadas durante a neurorrafia nos grupos G3 e G5. E que esta reinervação possa ter ocorrido a partir do nervo tibial de maneira término-terminal, não podemos falar em dupla inervação muscular através de NTL.

Estas observações contradizem o trabalho de Furukawa et al. (2008) que mostrou haver dupla inervação muscular após suturar o coto proximal do nervo hipoglosso à lateral do nervo facial com abertura de janela epineural, em ratos. Estes autores realizaram sutura com seis pontos, o que poderia ter causado uma lesão no nervo facial. Além disso, os autores obtiveram sincinesias e movimentos faciais em massa no grupo com neurorrafia término-terminal (NTT), enquanto que sincinesias foram observadas em apenas dois dos seis animais onde foi realizada NTL. Os autores afirmaram, ainda, que oito semanas após a realização da neurorrafia, o nervo facial foi seccionado proximal à NTL e os animais apresentaram fenótipo de paralisia facial, e que, os ratos começaram a apresentar as mesmas sincinesias do grupo com NTT

após duas a quatro semanas, ou seja, quando começou a reinervação do nervo facial pelo nervo hipoglosso.

Assim, podemos considerar que estes autores também causaram uma lesão no nervo facial nos dois ratos do grupo com NTL e que, portanto, como neste trabalho, obtiveram uma reinervação e não uma dupla inervação muscular.

Estas observações nos permitem concluir que a dupla inervação muscular não ocorreu através da NTL, neste modelo experimental.

Além disso, os resultados obtidos na avaliação do grupo G4, onde o nervo fibular comum foi seccionado proximal à NTL, mostraram que no segmento de nervo N1 ocorreu degeneração Walleriana, evidenciado por apresentar uma densidade axonal menor que no grupo G7 (reinervação) e não diferente do grupo G6 (desnervado).

A degeneração Walleriana ocorrida no segmento de nervo N1 do grupo G4 determinou desnervação temporária do músculo tibial cranial, o que permitiu a ocorrência de atrofia muscular, mostrando que o nervo tibial não foi capaz de manter a inervação muscular após secção do nervo fibular comum.

Por outro lado, a medida da área das fibras musculares mostrou não haver diferença entre os grupos G4 e G7, confirmando a reinervação através da NTL, o que impediu que a atrofia muscular progredisse. A reinervação pode ser confirmada pelo teste eletrofisiológico que mostrou diminuição da amplitude, porém, manutenção da latência, demonstrando que a estimulação elétrica chegou ao músculo tibial cranial através da NTL; enquanto que no grupo G6 (desnervado), a diminuição da amplitude foi acompanhada por ausência de latência após secção dos nervos fibular comum e tibial.

É importante ressaltar que foram encontrados, neste trabalho, dois possíveis fenômenos, a atrofia das fibras axoniais do segmento proximal do nervo seccionado e suturado na lateral de um nervo íntegro ou em degeneração; e a reinervação retrógrada ocorrida no segmento do nervo receptor proximal à NTL.

Não há, na literatura, descrição de fatos semelhantes. Trabalhos futuros poderão esclarecer estes aspectos.

6. Conclusões

Com este modelo experimental podemos concluir que:

1. A dupla inervação muscular não ocorreu através de NTL.
2. O nervo tibial não foi capaz de manter a inervação do músculo tibial cranial após secção do nervo fibular comum proximalmente à NTL, não impedindo a atrofia muscular.
3. Após secção do nervo fibular comum, houve degeneração Walleriana do segmento de nervo distal à NTL.
4. A regeneração nervosa ocorrida através da NTL, após degeneração do nervo receptor, permitiu a reinervação muscular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Câmara da Folha Online. Câmara aprova projeto que regulamenta uso de cobaias no Brasil, 20/05/2008. Acesso em 08/jul/2008.

Akeda K, Hirata H, Matsumoto M, Fukuda A, Tsuji M, Nagakura T, Yoshida SOT, Uchida A. regenerating axons emerge far proximal to the coaptation site in end-to-side nerve coaptation without a perineurial window using a T-sharped chamber. 2006; 117(4):1194-203.

Alix T, Carluer L, Bénateau H, Labbé D. Lês troubles cinétiques labiaux. Ann Chir Plast Esthét. 2002; 47:390-401.

Al-Qattan MM. Prevention and treatment of painful neuromas of the superficial radial nerve by the end-to-side nerve repair concept: an experimental study and preliminary clinical experience. Microsurg. 2000; 20:99-104.

Anderl H. Reconstruction of the face through cross-face nerve transplantation in facial paralysis. Chir. Plast. 1973, 2:17-46.

Andrews TJ. Autonomic nervous system as a model of neuronal aging: the role of target tissues and neurotrophic factors. Microsc. Res. Tech. 1996; 35:2 - 19.

Askar I, Sabuncuoglu BT, Yormuk E, Saray A. The fate of neurotization techniques on reinnervation after denervation of the gastrocnemius muscle: an experimental study. J Reconstr Microsurg. 2001; 17(5):347-55.

- Aszmann OC, Korak KJ, Rab M, Grünbeck M, Lassmann H, Frey M. Neuroma prevention by end-to-side neurorrhaphy: an experimental Study in rats. *J Hand Surg.* 2003; 28A(6):1022-8.
- Auba C, Hontanilla B, Arcocha J, Gorria O. Peripheral nerve regeneration through allografts compared with autografts in FK506-treated monkeys. *J Neurosurg.* 2006; 105(4): 602-9.
- Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps. *Surg. Gynecol. Obstetr.* 1927; 45:364-78.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconst Surg.* 1989; 83(1):129-136.
- Baker DC, Conley J. Regional muscle transposition for rehabilitation of the paralysed face. *Clin Plast Surg.* 1979, 6:317-31.
- Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J.* 1903; 2:1009-13.
- Bascom DA, Schaitkin BM, May M, Klein S. Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast Surg.* 2000; 16(4):309-13.
- Battista A, Cravioto H, Budzilovich G. Painful neuroma: changes produced in peripheral nerve after fascicle ligation. Case reports. *Neurosurg.* 1981; 9(5):589-600.
- Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. I. Clinical results. *Microsurg.* 2000; 20(1):32-6.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wld^s) nerves. *BMC Neurosc.* 2005, 6(1):6.

- Berkuo ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. 2.ed. São Paulo: EPU, 1981.
- Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurg.* 1993; 14:135-40.
- Bertelli JA, Taleb M, Mira JC, Ghizoni MF. Functional recovery improvement is related to aberrant reinnervation trimming. A comparative study using fresh or predegenerated nerve grafts. *Acta Neuropathol.* 2006; 111: 601–9.
- Beuche W, Friede RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol.* 1984;13:767–96.
- Bharalli LA, Lisney SJW. Success of regeneration of peripheral nerve axons in the rats after injury at different postnatal ages. *J Neurol Sci.* 1990; 100:203-10.
- Blundon JA, Sheller RA, Moehlenbruck JW, Bittner GD. Effect of temperature on long-term survival of anucleate giant axons in crayfish and goldfish. *J Comp Neurol.* 1990; 297:377-91.
- Boedts D, Bouckaert JI. Nerve anastomoses. Sutures or fibrinogenic glue? Preliminary results. *Acta Otorhinolaryngol.* 1984; 38:107-12.
- Boedts D. A comparative experimental study on nerve repair. *Arch. Otorhinolaryngol.* 1987; 244(1):1-6.
- Bora FW, Pleasure DE, Didizian NA. A study of nerve regeneration and neuroma formation after suture by various techniques. *J. Hand Surg. [Am].* 1976; 1:138-43.
- Bora W. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1967; 49:659-66.
- Bouldin TW, Cavanagh JB. Organophosphorous neuropathy. I. A teased-fiber study of the spatio-temporal spread of axonal degeneration. *Am J Pathol.* 1979; 94:241-52.

- Braun RM. Epineural nerve suture. *Clin Orthop*. 1982; 163:50-6.
- Breidahl AF, Morrison WA, Donato RR, Riccio M, Theile DR. A modified surgical technique for temporalis transfer. *Brit J Plast Surg*. 1996; 49:46-51.
- Brushart TME, Seiler WA. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*. 1987; 97:289-300.
- Buncke HJ, Buncke GM, Kind GM, Buntic RF, Brooks D, Chin BT. Cross-facial and functional microvascular muscle transplantation for longstanding facial paralysis. *Clin Plast Surg*. 2002; 29:551–66.
- Bunnell S, Boyes JH. Nerve grafts. *Am J Surg*. 1939; 44(1):64-75.
- Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK. Efeitos do IGF-H em novo modelo termino-lateral (Effects of IGF-H in new end-to-side model). *J Reconstr Microsurg*. 1999; 15:351-8.
- Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammascco F, De Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiol*. 1989; 16(4):353-63.
- Cederna PS, Kalliainen LK, Urbanchek MG, Rovak JM, Kuzon WM. “Donor” muscle structure and function after end-to-side neuroorrhaphy. *Plast Reconst Surg*. 2001; 107:789-96.
- Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW. Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin*. 1992; 10:613-27.
- Chuang DC, Wei FC, Noordhoff MS. “Smile” reconstruction in facial paralysis. *Ann Plast Surg*. 1989; 23:56–65.
- Conley J, Baker DC. Hypoglossal-facial nerve anastomosis for reinnervation of the paralyzed face. *Plast Reconstruct Surg*. 1979; 63(1):63-72.
- Cooper CW, Falb RD. Surgical Adhesives. *Ann NY Acad Sci*. 1968; 146:214-24.

- Correia PC, Zani R. Masseter muscle rotation in the treatment of inferior facial paralysis. *Plast Reconst Surg.* 1973; 52:370.
- Dahlin LB. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. *Brain Res.* 1995; 679:274–80.
- Da-Silva C. *Biologia Celular e Molecular da regeneração do sistema nervoso periférico.* Atualiz Neurociênc. 1995b; 1-16.
- Da-Silva CF. Fatores Neurotróficos: estrutura, função e aplicações clínicas. *Atual. Neurociênc.* 1995a; 1:1-20.
- Daunois O, Sébille A. Amélioration de la réinnervation musculaire par utilisation de colle biologique enrichie chez le rat. *Ann Chir Main.* 1991; 10:113-118.
- De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77:634-43.
- De Medinaceli L, Merle M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by “cell surgery”. *J Hand Surg.* 1991; 16(5):495-8.
- De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosc Meth.* 2004; 136(1):45-53.
- Dellon AL. Alternatives to nerve grafting. Bioabsorbable conduits. Vienna Nerve Symposium. *J Reconstr Microsurg.* 1994; 10(5):356-7.
- Dimeglio A. *Ortopedia pediátrica.* São Paulo: Santos, 1990.
- Edgerton MT, Tuerk DB, Fisher JC. Surgical treatment of Moebius syndrome by platysma and temporalis muscle transfers. *Plast Reconstr Surg.* 1975; 55:305.
- Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur.* 1984; 92(5):546-50.

- Erhart EA. Elementos de anatomia Humana. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- Evans P J, Bain J R, Mackinnon SE, Makino AP, Hunter DA. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Microsurg.* 1991; 15:502-5.
- Eyzaguirre C, Fidone SJ. Fisiologia do sistema nervoso. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 398p.
- Falcioni M, Taibah A, Russo A, Piccirillo E, Sanna M. Facial nerve grafting. *Otol Neurotol.* 2003; 24:486–9.
- Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral Nerve Regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990; 13:43-60.
- Fawcett, J.W. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *Trends Neurosci.* 1992; 15(1):5-8.
- Ferrari F, Rodrigues AC, Malvezzi CK, Silva MDP, Padovani CR. Inside-out vs. Standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. *Anat Rec.* 1999; 256:227-32.
- Ferreira AS. Lesões nervosas periféricas. Santos: Livraria Editorial Santos, 1999. 253p.
- Ferreira MC, Erhart EA, Tedesco-Marchese A. Microcirurgia de nervo periférico. Novas técnicas. *Rev Paul Med.* 1974; 84:52-3.
- Ferreira MC, Marques de Faria JC. Result of microvascular gracilis transplantation for facial paralysis-personal series. *Clin Plast Surg.* 2002; 29:515–22.
- Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989; 33:87-134.
- Fornaro M, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MAG, Battiston B. Confocal imaging of Schwann-cell migration along muscle-vein combined grafts used to bridge nerve defects in the rat. *Microsurg.* 2001; 21:153-5.

- Franciosi LF, Modestti C, Mueller SF. Neurotization of the biceps muscle by end-to-side neurorrhaphy between ulnar and musculocutaneous nerves. A series of five cases. *Ann Hand Surg.* 1998; 17(4):362-7.
- Frey M, Giovanoli P, Michaelidou M. Functional upgrading of partially recovered facial palsy by cross-face nerve grafting with distal end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(2):597-608.
- Frey M, Gruber H, Holle J, Freilinger G. An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization. *Plast Reconstr Surg.* 1982; 69:656-69.
- Frostick SP; Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurg.* 1998 18:397-405.
- Frykman GK. The quest for better recovery from peripheral nerve injury: current status of nerve regeneration research. *J Hand Ther.* 1993; 6(2):83-8.
- Furukawa H, Saito A, Mol W, Sekido M, Sasaki S, Yamamoto Y. Double innervation occurs in the facial mimetic muscles after facial-hypoglossal end-to-side neural repair: rat model for neural supercharge concept. *J Plast Reconstr Aesth Surg.* 2008; 61:257-64.
- Gagnon NB, Molina-Negro P. Facial reinnervation after facial paralysis: is it ever too late? *Arch Otorhinolaryngol.* 1989; 246:303-7.
- Galli SK, Valauri F, Komisar A. Facial reanimation by cross-facial nerve grafting: report of five cases. *Ear Nose Throat J.* 2002; 81(1):25-9.
- Gilles HD. Experiences with facia lata grafts in the operative treatment of facial paralysis. *Proc R Soc Med.* 1934; 27:1372-8.
- Giovanoli P, Koller R, Meuli-Simmen C, Rab M, Haslik W, Mittlböck M, Meyer Ve, Frey M. Functional and morphometric evaluation of end-to-side neurorrhaphy for muscle reinnervation. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 106(2):383-92.

- Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. Nervo periférico e músculo esquelético. In: Cotran RS, Kuman V, Collins T, Robbins. Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.1135-54.
- Goheen-Robilard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. *Laringosc.* 2002; 112:899-905.
- Gold BG, Griffin JW, Price DL. Somatofugal axonal atrophy precedes development of axonal degeneration in acrylamide neuropathy. *Arch Toxicol.* 1992; 66:57-66.
- Gousheh J, Hosseinnian MA, Saadatian Fard E. Reconstruction of chronic facial paralysis by free gracilis muscle transfer. Apropos of 59 cases. *Ann Chir Plast Esthet.* 1995; 40:121–129.
- Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis C, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurg.* 2004; 24:408-15.
- Griffin JW, George R, Ho T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993; 52:553–60.
- Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89(2):251-8.
- Harii K, Asato H, Yoshimura K, Sugawara Y, Nakatsuka T, Ueda K. One-stage transfer of the latissimus dorsi muscle for reanimation of a paralyzed face: a new alternative. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 102:941–51.
- Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin North Am.* 1991; 2:93-104.

-
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast reconstr surg* 2004; 114:129-37.
- Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy of the laboratory rat*. The Williams & Wilkins Company: Baltimore, 1976.
- Hollinshead WH, Rose S. *Anatomia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991.
- Hopkins WG, Slack JR. The sequential development of nodal sprouts in mouse muscles in response to nerve degeneration. *J Neurocytol*. 1981; 10:537-56.
- Ide C, Kato S. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res (Suppl)*. 1990; 13:S157-S164.
- Ide C. Nerve regeneration and Schwann cell basal lamina: observations of the long-term regeneration. *Arch Histol Jap*. 1983; 46:243-57.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res*. 1996; 25:101-21.
- Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurg*. 2003; 23:359-62.
- Jergovic D, Stål P, Lidman D, Lindvall B, Hildebrand C. Changes in a rat facial muscle after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve*. 2001; 24:1202-12.
- Jiang H, Guo ET, Ji ZL, Zhang ML, Lu V. One-stage microneurovascular free abductor hallucis muscle transplantation for reanimation of facial paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 1995; 96:78-85.
- Jin T, Dehesdin D, Hemet J, Bagot D'Arc C, Creissard P, Tadie M. Comparative experimental study of nerve repairs by classical suture or biological adhesive. *Neuroch*. 1990; 36:378-82.
- Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 103:1919-27.

- Kimura J. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. F.A.Davis Company 1987.
- Kline DG, Hudson AR, Bratton BR. Experimental study of fascicular nerve repair with and without epineural closure. *J Neurosurg*. 1981; 54:513-20.
- Koeppen AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Scienc*. 2004; 220:115–7.
- Koh KS, Kim JK, Kim CJ, Kwun BD, Kim SY. Hypoglossal-facial crossover in facial-nerve palsy: pure end-to-side anastomosis technique. *Brit J Plast Surg*. 2002; 55(1):25-31.
- Koshima I, Moriguchi T, Soeda S, Hamanaka T, Tanaka H, Ohta S. Free rectus femoris muscle transfer for one-stage reconstruction of established facial paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 1994; 94:421–30.
- Koshima I, Tsuda K, Hamanaka T, Moriguchi T. One-stage reconstruction of established facial paralysis using a rectus abdominis muscle transfer. *Plast Reconstr Surg*. 1997a; 99:234–8.
- Koshima I, Umeda N, Handa T, Moriguchi T, Orita Y. A double muscle transfer using a divided rectus femoris muscle for facial paralysis reconstruction. *J Reconstr Microsurg*. 1997b; 13:157–62.
- Kovačič U, Sketelj J, Bajrović FF. Sex-related difference in collateral sprouting of nociceptive axons after peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol*. 2003; 184:479-88.
- Krivotlutskaia EG, Chumasov EI, Matina VN, Mel'tsova GM, Kirillov AL. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. *Stomatol (Mosk)*. 1989; 68(6):35-8.
- Kumar PA, Hassan KM. Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralysed face: a comparative study of the single stage and two-stage procedures. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109(2):451-62.

- Kutz JE, Shealy G, Lubbers L. Interfascicular nerve repair. *Orthop Clin North Am.* 1981; 9:277-86.
- Labbé D, Bénateau H, Hamel M. Myoplastie d'allongement du muscle temporal et greffe nerveuse transfaciale (VII-V). Note technique. *Ann Chir Plast Esthét.* 2003; 48(1):31-5.
- Labbé D, Huault M. Lengthening temporalis myoplasty and lip reanimation. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105:1289-97.
- Lenert JJ, Viterbo F, Johnson PC. Pediatric facial paralysis. In: BENTZ ML. *Ped Plast Surg.* 1.ed. Pittsburgh: Appleton & Lange, 1998. p. 427-61.
- Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Reprod. Prog. Horm. Res.* 1980; 36:1-52.
- Lohman R, Bullock F, McNaughton T, Siemionow M. End-to-end vs. end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:135.
- Lubinska L. On axoplasmic flow. *Int Rev Neurobiol.* 1975; 17:241-96.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol.* 1982; 76:361-75.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J. Reconstr. Microsurg.* 1994a; 10(5):345-54.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconst Surg.* 1986; 20:279-83.
- Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg (Brit Europ Vol).* 1994b, 19B:277-82.

- Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. *J. Hand Surg. [Am.]*. 2000; 25:391-413.
- Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop. Scan*. 1987; 58:145-69.
- Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann. Plast. Surg*. 1989; 22(3):257-73.
- Manasseri B, Raimondo S, Geuna S, Risitano G, D'Alcontres FS. Ulnar nerve repair by end-to-side neurorrhaphy on the median nerve with interposition of a vein: an experimental study. *Microsurg*. 2007; 27:27-31.
- Marques RG, Miranda ML, Caetano CER, Biondo-Simões MLP. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cirúrg Bras*. 2005; 20(3):262-7.
- Martinez AM, Canavarro S. Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33:1477-82.
- Matsuda K, Kakibuchi M, Fukuda K, Kubo T, Madura T, Kawai K, Yano K, Hosokawa K. End-to-side nerve grafts: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 2005; 21(8):581-91.
- Matsumoto M, Hirata H, Nishiyama M, Morita A, Sasaki H, Uchida A. Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. *J Reconstr Microsurg*. 1999; 15:281-6.
- May M, Drucker C. Temporalis muscle for facial reanimation. A 13 year experience with 224 procedures. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993; 119:378-82.
- May M, Sobol SM, Mester SJ. Hypoglossal-facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991; 104(6):818-25.

- May M. Muscle transposition for facial reanimation. *Arch Otolaryngol.* 1984; 110:184-9.
- McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15(8):597-603.
- McDonald WI. The time course of conduction failure during degeneration of a central tract. *Exp Brain Res.* 1972; 14:550-6.
- McLaughlin CR. Surgical support in permanent facial paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1953; 11:302-14.
- McQuarrie GI. Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation of nodes of Ranvier. *J Comp Neurol.* 1985; 231:239-49.
- Mennen U, Van Der Westhuizen MJ, Eggers IM Re-innervation of M. biceps by end-to-side nerve suture. *Hand Surg.* 2003; 8(1):25-31.
- Mennen U. End-to-side nerve suture in clinical practice. *Hand Surg.* 2003; 8(1):33-42.
- Mennen U. End-to-side nerve suture in primate (Chacma Baboon). *Hand Surgery*, 21:1-6, 1998b.
- Mennen U. End-to-side nerve suture in the human patient. *Hand Surgery* 3(1):7-15, 1998a.
- Millesi H. Microsurgery of peripheral nerve repair. *Hand.* 1973; 5:157-60.
- Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1982; 19:25-37.
- Millesi H. Peripheral nerve surgery today: turning point or continuous development? (Review article). *J Hand Surg [Am.].* 1990; 15:281-287.
- Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am.* 1981; 61:321-40.

- Millesi H. Surgery of post-traumatic brachial plexus lesions (personal approach in 2003). *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2004; 36(1):29-36.
- Moldovan M, Sorensen J, Krarup C. Comparison of the fastest regenerating motor and sensory myelinated axons in the same peripheral nerve. *Brain.* 2006; 129:2471–83.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosc Meth.* 2008; 170:255-61.
- Montes GS, Cotta-Pereira G, Junqueira LCU. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Adv. Cell Neurobiol.* 1984; 5:177-218.
- Moy OJ, Peimer C A, Koniuch MP, Howard C, Zielezny M, Katikaneni DR. Fibrin seal adhesive versus nonabsorbable microsuture in peripheral nerve repair. *J Hand Surg [Am].* 1988;13:273-8.
- Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab. Invest.* 2003; 83:175–85.
- Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadonian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(7):533-44.
- Nahas FX, Ferreira LM. Análise dos itens de um trabalho científico. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(Supl.):13-6.
- Nishihira S, Mccaffrey T. Repair of motor nerve defects: Comparison of suture and fibrin adhesive techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989; 100:17-21.

- Noah EM, Williams A, Fortes W, Terzis JK. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997a; 13:317-25.
- Noah EM, Williams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorrhaphy: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve grafts. *J Reconstr Microsurg.* 1997b; 13:99-106.
- Ogun TC, Ozdemir M, Senaran H, Ustun ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. Technical note. *J Neurosurg.* 2003; 99(1):180-5.
- Okuyama N, Nakao Y, Takayama S, Toyama Y. Effect on number of fascicle on axonal regeneration in cable grafts. *Microsurg.* 2004; 24:400-7.
- Olsson Y, Kristensson K. Permeability of blood vessels and connective tissue sheaths in the peripheral nervous system to exogenous proteins. *Acta Neuropathol Berlin Suppl.* 1971; 5:61-9.
- Olsson Y, Kristensson K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. *Acta Neuropathol.* 1973; 23:105-11.
- Orgel MG, Terzis JK. Epineurial vs perineurial repair: An ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1977; 61:80-91.
- Ozmen S, Latifoglu O, Ayhan S, Yavuzer R, Nurlu G, Sezer C, Atabay K. Impact of epineural excision of the distal recipient nerve in terminolateral neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(5):385-97.
- Papalia I, Geuna S, D'Alcontres FS, Tos P. Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. *Microsurg.* 2007; 27(1):56-61.
- Papalia I, Lacroix C, Brunelli F, D'alcontres FS. Direct muscle neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(4):237-46.

- Payne CE, Hunt S P, Lamberty GH. Primary sciatic nerve repair using titanium staples. *Br J Plast Surg*. 2002; 55:330-4.
- Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras*, [serial online]. 1998; 13(2) [cited 2008 set 20]. Available from: [HTTP://probe.br/science.html](http://probe.br/science.html).
- Perrin FE, Lacroix S, Aviles-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain*. 2005; 128:854–66.
- Perry VH, Brown MC, Tsao JW. The effectiveness of the gene which slows the rate of wallerian degeneration in C57BL/Ola mice declines with age. *Eur J Neurosc*. 1992; 4:1000-2.
- Perry VH, Lunn ER, Brown MC, Cahusac S, Gordon S. Evidence that the rate of Wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. *Eur J Neurosc*. 1990; 2:408-13.
- Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res*. 1982; 253:1-12.
- Rab M, Koller R, Haslik W, Kamolz LP, Beck H, Meggeneder J, Frey M. The influence of timing on the functional and morphological result after nerve grafting: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg*. 2002; 55:628-34.
- Ramón Y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford University Press, 1928.
- Reis FA, Rodrigues AC, Vicente EJD, Eleutério ML, Dal Pai Silva M. Study of collateral sprouting from intact vagus nerve into a autologous nerve graft by using two different techniques: neuroraphy and coaptation with fibrin glue derivated of the snake venom. In: Congresso Pan-Americano de Anatomia 1998 São Paulo: SBA; 1998. n.130.

- Reis FA, Rodrigues AC. Comparative Study of Axonal Sprouting from the Vagus Nerve in Autologous Nerve Graft. *J Venom Anim Toxins*. 2000; 6(1):120 -120.
- Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia Clínica: Eletroterapia e teste eletrofisiológico*. 2 ed – Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- Romão AM, Viterbo F; Stipp EJ, Garbino JA, Rodrigues JA. Muscle electro stimulation of the cranial tibial muscle after crushing of the common fibular nerve: neurophysiologic and morphometric study in rats. *Rev Bras Ortop*. 2007; 42(3):41-6.
- Rosegay H, Edwards MS. The language of neurorrhaphy. *J Neurosurg*. 1980; 52:143-4.
- Rovak JM, Cederna PA, Kuzon WM. Terminolateral neurorrhaphy: a review of literature. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(8): 615-24.
- Rovak JM, Cederna PS, Macionis V, Urbanchek MS, Van Der Meulen JH, Kuzon WM. Terminolateral neurorrhaphy: the functional axonal anatomy. *Microsurg*. 2000; 20:6-14.
- Santamaria E, Wei F, Chen I, Chuang DC. Sensation recovery on innervated radial forearm flap for hemiglossectomy reconstruction by using different recipient nerves. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 105:450.
- Scaramella L. L'anastomosi tra i due nervi facciali. *Arch Otolaryngol*. 1971; 82:209.
- Scevola S, Cowan J, Harrison DH. Does the removal of pectoralis minor impair the function of pectoralis major? *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112:1266–73.
- Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras* [serial online]. 2004 jul-Ag; 19(4). Disponível em URL: [HTTP://www.Scielo.br/acb](http://www.Scielo.br/acb).

-
- Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53(2): 278 – 85.
- Schottstaedt EK, Larsen LG, Bost TC. Complete muscle transposition. *J Bone Joint Surg.* 1955; 37A:897.
- Schultes G, Gaggl A, Kleinert R, Kärcher H. Vascularized vs non-vascularized nerve transfers : histologic study in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(8):637-42.
- Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; 66:237.
- Seddon, H.J. Use of autogenous grafts for repair of large nerve gaps in peripheral nerves. *Br J Surg.* 1947; 35:151-67.
- Shah MH, Kasabian AK, Karp NS, Kolker AR, Dublin BA, Zhang L, Sakuma J. Axonal regeneration through an autogenous nerve bypass: an experimental study in the rat. *Ann Plast Surg.* 1997; 38(4):408-14:discussion 414-5.
- Sherren J. Some points in the surgery of the peripheral nerves. *Edinb Med J.* 1906; 20:297-332.
- Smith JN. A new technique of facial animation. In: *International Congress Of Plastic And Reconstructive Surgery, 5, 1971, Chatswood. Transactions. Chatswood, 1971. p. 83.*
- Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg.* 1964; 33:317.
- Stipp EJ, Viterbo F, Labbé D; Garbino JA. Analysis of tibial cranial muscle after muscular Double innervation with end-to-side neurorrhaphy. *J Venom Anim Toxins Trop Dis.* 2007; 13(4):911.
- Stopiglia AJ, Erhart EA. Utilização de técnica microcirúrgica na neurorrafia de animais domésticos. Estudo experimental da reparação fascicular no nervo ulnar de cão (*canis familiaris*). *Rev Fac Méd Vet Zootec Univ S Paulo, São Paulo.* 1987; 24(2):193-208.

- Sunderland S. Nerve injuries and their repair: a critical appraisal. NY:Churchill Livingstone, 1991.
- Sunderland S. Nerves and nerves injuries. Edinburg: Churchill Livingstone, 1978. p.483-650.
- Sunderland, S. Nerves and nerves injuries. Baltimore: Williams and Wilins Co., 1968. p.5, 26, 58,200-202.
- Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, Harralson TG, Gossman MD, Maldonado CJ, Barker JH. The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(7):2255-64.
- Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1991; 114:82-103.
- Tate JR; Tollefson TT. Advances in facial reanimation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 14:242-8.
- Terzis J, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap, suture under tension versus graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975; 56:166-70.
- Terzis J. Clinical microsurgery of the peripheral nerve: the state of the art. *Clin Plast Surg.* 1979; 6:247-67.
- Terzis JK. Pectoralis minor: a unique muscle for correction of facial palsy. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83(5):767-76.
- Tham SKY, Morrison WA. Motor collateral sprouting through na end-to-side nerve repair. *JHand Surg.* 1998; 23A(5):844-51.
- Tiangco DA, Papakonstantinou KC, Mullinax KA, Terzis, JK. IGF-I and end-to-side nerve repair: a doseresponse study. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17:247-56.

- Ting J, Huo G, Marin V, Rogers L, Gorlick N, Ascherman J, Chiu DTW. End-to-side neurorrhaphy using autogenous vein nerve conduits. *Surgical forum* XLIX:637-638, 1998.
- Vaughan DW. Effects of advancing age on peripheral nerve regeneration. *J Comp Neurol.* 1992; 323:219-37.
- Vedung S, Hakelius L, Stalberg E. Cross-face nerve grafting followed by free muscle transplantation in young patients with longstanding facial paralysis. Reanimation of the cheek and the angle of the mouth. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1984; 18:201–8.
- Venault B, Roffe JL, Magalon G, Chrestian M, Bureau H. Régénération nerveuse. Etude expérimentale chez Le chien. Trois techniques de suture nerveuse. *Ann Chir.* 1981; 35(6):441-6.
- Veronesi B, Boyes WK. Morphometric and electrophysiological evidence for a diameter-based rate of degeneration in the optic nerve of the rat. *Exp Neurol.* 1988; 101:176-89.
- Vicente EJD, Rodrigues AC, Gallacci M. Avaliação funcional da regeneração de nervo periférico induzida pela cola de fibrina derivada do veneno de serpente e pela neurorrafia. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 13., 1998, Caxambu. Anais. Caxambu, 1998a. p.190-1.
- Vieira S, Hossne WS. Metodologia científica para a área de saúde. Rio de Janeiro: Campus, 2001. 192p.
- Virmond M, Pereira HR. Tubular repair of the sciatic nerve in the rat with preserved bovine pericardium. In: Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão, 17., 2000, Botucatu. Anais. São Paulo: UNESP, 2000. p.27.
- Viterbo F, Faleiros HRP. Transposição ortodrômica do músculo temporal para tratamento da paralisia facial. Contribuição para melhor resultado estético. XXXVI Congresso Brasileiro de Cirurgia Plástica, Rio de Janeiro, 16 de novembro de 1999.

- Viterbo F, Franciosi LF, Palhares A. Nerve grafting and end-to-side neurorrhaphies connecting the phrenic nerve to the brachial plexus. *Plast Reconstruct Surg.* 1995; 96(2):494-5.
- Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve – a new application of lateral-terminal neurorrhaphy (Case Report). *Rev Soc Bras Cir Plást Est Reconstr.* 1993a; 8:85-7.
- Viterbo F, Ripari WT. Nerve grafts prevent paraplegic pressure ulcers. *J Reconstruct Microsurg.* 2008; 24(4):251-3.
- Viterbo F, Ripari WT. Sensation recovery in paraplegics – a new way, apresentado no 71th ASPRS/PSEF/ASMA Annual Scientific Meeting (Congresso Americano de Cirurgia Plástica) – San Antonio, de 2 a 6 de novembro de 2002. (anais p. 181-182).
- Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Rev Paul Med.* 1998; 116:1808-14.
- Viterbo F, Tohmazini IA, Gianini MJSM. Reparação de nervos periféricos com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Resultados preliminares. *Acta Cir Bras.* 1993b; suppl.2:85.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstruct Surg.* 1994a; 94:1038-47.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineurial sheath: experimental study in rats. *Rev Paul Med.* 1992; 110:267-75.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Two end-to side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineurial sheath: experimental study in rats. *Brit J Plast Surg.* 1994b; 47:75-80.

- Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorraphy. *Rev Soc Bras Cir Plást Est Reconstr.* 1993; 8:29-35.
- Viterbo F. *Neurorrafia Látero-terminal: Estudo experimental no rato.* [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1992.
- Viterbo, F. Cross-face termino-lateral neurorrhaphy: a new method for treatment of facial palsy. 61st Annual Scientific Meeting of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons, the Plastic Surgery Educational Foundation, and the American Society of Maxillofacial Surgeons, Washington, DC, Sep 20th, 1992b; p. 356-8.
- Vlastou C. Facial paralysis. *Microsurg.* 2006; 26:278-87.
- Voche P, Ouattara D. End-to-side neurorrhaphy for defects of palmar sensory digital nerves. *Brit J Plast Surg.* 2005; 58(2):239-44.
- Voche P. Notre experience de dix sutures latéroterminales de nerfs sensitifs de la main. *Ann Chir Plast Esthét.* 2005; 50(4):264-9.
- Waller AV. Experiments on the section of the glosso-pharyngeal and hypoglossal nerve of the frog and observation of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philosophical transactions.* Royal Society of London. 1850; 140:423.
- Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain.* 2005; 128:1897-910.
- Watanabe K, Tsukagoshi T, Kuroda M, Hosaka Y. Nerve conduit using fascia-wrapped fibrocollagenous tube. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(5):183-90.
- Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advances in peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg.* 1997; 24:63-73.

- Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurg.* 2003; 23:251-6.
- Yan JG, Matloub HS, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Jaradeh SS, Milwaukee. A modified end-to-side method for peripheral nerve repair: large epineurial window helicoids technique versus small epineurial window standard end-to-side technique. *J Hand Surg.* 2002b, 27A(3):484-92.
- Yan YH, Yan JG, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Matloub HS. Nerve repair at different angles of attachment: experiment in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2002a; 18(8):703-8.
- Yoleri L, Songur E, Yoleri O, Vural T, Cagdas A. Reanimation of early facial paralysis with hypoglossal/facial end-to-side neurorrhaphy: a new approach. *J Reconstr Microsurg.* 2000; 16(5):347-55.
- Yüksel F, Karacaoglu ME, Guler M. Nerve regeneration through side-to-side neurorrhaphy sites in a rat model: a new concept in peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104:2092-9.
- Zhang F, Cheng C, Chin BT, Ho PR, Weibel TJ, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Results of termino-lateral neurorrhaphy to original and adjacent nerves. *Microsurg.* 1998; 18:276-81.
- Zhao J, Chen Z, Chen T. Nerve regeneration after termino-lateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:31-37.
- Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G, Lu SB. Axonal projections and functional recovery following fascicular repair of the rat sciatic nerve with Y-tunneled silicone chambers. *Rest Neurol Neurosc.* 1992; 4(1):13-9.

