

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA CATUAMA E DO BILOBALIDE NA  
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA DE RATOS  
SUBMETIDOS À SECÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO**

*Rodrigo Norberto Pereira*  
**Médico Veterinário**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA CATUAMA E DO BILOBALIDE NA  
REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA DE RATOS  
SUBMETIDOS À SECÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO**

*Rodrigo Norberto Pereira*

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**2008**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**RODRIGO NORBERTO PEREIRA** – nascido em 24 de julho de 1980 em São Paulo – SP. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus Araçatuba em dezembro de 2003. Concluiu o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP em janeiro de 2006 na área de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais e ingressou no curso de Mestrado do programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP em março de 2006.

**“Dê-me uma alavanca e um ponto de apoio e moverei o mundo de seus eixos”**

*Arquimedes*

***Dedico...***

*À **Deus** pelas chances que me dá todos os dias.  
Ao meu pai **Adelino** pela paixão pelos animais e à minha mãe **Eufrazia**  
pelo paixão pela educação.  
À minha irmã **Carolina** por todo amor e carinho.  
Às **pessoas boas** que conheci que me inspiram a ser melhor, entre  
elas, **Bruno Bonaventura**.  
E a todos os meus **amigos**, os que estão perto e os que estão longe.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, pelos ensinamentos, incentivo e amizade, e principalmente pelo exemplo de vida e profissional que é.

Aos Professores Márcia Rita Fernandes Machado, José Luiz Laus e Gervásio Henrique Bechara por colocar à disposição seus equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos pós-graduandos Nádia Delistoianov, João Henrique Perotta, Geórgia Modé Magalhães, Paulo Alécio Canola e Larissa Gabriela Ávila, que contribuíram para a realização deste experimento.

À graduanda Samantha Mesquita Favoretto pela contribuição na realização do experimento e especialmente, pela paciência e apoio em todas as fases deste trabalho.

Aos funcionários da Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” FCAV – UNESP pela colaboração durante a realização da parte experimental deste trabalho.

Às Sras. Maria I. Y. Campos e Francisca de A. Ardison, do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela confecção das lâminas histológicas.

Aos Srs. Narciso Batista Tel e Edgard Homem, do Departamento de Patologia Veterinária FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Catarinense por ceder a Catuama para nosso experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, por ter me concedido à oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” me fez Médico Veterinário, Residente e Mestre.

À Fapesp, pela concessão de bolsa de mestrado (Processo: 05/03457-5).

E a todos que, involuntariamente, deixei de mencionar, mas que, da mesma forma, tem meu reconhecimento.

## SUMÁRIO

		Página
RESUMO.....		ii
SUMMARY.....		iii
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.	OBJETIVOS.....	10
3.1.	Objetivos gerais.....	10
3.2.	Objetivos específicos.....	10
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1.	Animais.....	11
4.2.	Procedimento cirúrgico.....	11
4.3.	Grupos experimentais.....	12
4.4.	Avaliação funcional.....	13
4.5.	Avaliação eletrofisiológica.....	14
4.6.	Biópsias dos nervos e músculos e processamento do material.....	15
4.7.	Análise histológica.....	16
4.8.	Análise estatística.....	16
5.	RESULTADOS.....	17
5.1.	Avaliação funcional.....	17
5.2.	Formação do cabo de regeneração.....	19
5.3.	Avaliação eletrofisiológica.....	21
5.4.	Análise histológica.....	22
6.	DISCUSSÃO.....	33
7.	CONCLUSÕES.....	37
8.	REFERÊNCIAS.....	38



## **EFEITO DA CATUAMA E DO BILOBALIDE NA REGENERAÇÃO NERVOSA PERIFÉRICA DE RATOS SUBMETIDOS À SECÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO**

**RESUMO** – Lesões no Sistema Nervoso Periférico (SNP) são relativamente freqüentes. Apesar do SNP apresentar capacidade regenerativa em muitas situações não ocorre regeneração nervosa adequada levando a perdas funcionais. A Catuama é a associação de quatro extratos hidroalcoólicos obtidos de plantas brasileiras (*Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*) com conhecida ação neuroprotetora, antiinflamatória, anti-oxidante e anti-depressiva. O bilobalide é um componente extraído das folhas de *Ginkgo biloba* que tem demonstrada ação neuroprotetora nos sistemas nervosos central e periférico. O presente estudo avaliou a ação da Catuama e do bilobalide na regeneração nervosa periférica de ratos submetidos à secção do nervo isquiático e reparação com implante de tubo de silicone preenchido por colágeno deixando um intervalo entre os segmentos nervosos de 10mm. A Catuama foi administrada por via oral nos primeiros 28 dias de pós-operatório, nas doses de 100, 200 e 400mg/kg e comparada ao bilobalide na dose de 200µM adicionado ao colágeno líquido do implante e ao grupo controle. Os animais foram avaliados na primeira, quinta e décima semana de pós-operatório pelo teste de marcha e na décima semana pela avaliação eletrofisiológica e pelas análises quantitativa e qualitativa dos cortes histológicos de amostras do nervo isquiático e do músculo gastrocnêmio. Em todas as análises utilizadas não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais o que indica que a Catuama e o bilobalide não interferiram na regeneração nervosa periférica nas condições experimentais.

**Palavras-chave:** catuama, bilobalide, regeneração nervosa periférica, nervo isquiático, colágeno

## EFFECT OF CATUAMA AND BILOBALIDE ON PERIPHERAL NERVE REGENERATION IN RATS FOLLOWING SCIATIC NERVE SECTION

**SUMMARY** – Peripheral nerve lesions are common. Functional recovery after peripheral nerve injuries is frequently poor, despite the capacity for axonal regeneration, resulting in most cases in a functional loss of the nerve. The Catuama is composed of four Brazilian plants extracts (*Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*). The Catuama is known as having neuroprotector, anti-inflammatory, antioxidant and antidepressive effects. Bilobalide, extraction of the leaves of *Ginkgo biloba*, is known by its neuroprotector effect in the central and peripheral nervous system. The present study evaluates the effect of Catuama and bilobalide on peripheral nerve regeneration in rats following a sciatic nerve section. Sciatic nerve of adult rats was transected with a 10-mm gap and the proximal and distal nerve stumps were fixed in a silicone tube filled with collagen. The Catuama was orally administered along 28 days after the surgery. Three different treatment groups using doses of 100, 200 and 400mg/kg of Catuama were compared with one group using 200µM bilobalide associated with the liquid collagen in the silicone tube and the control group. Animals evaluations were done by a walk test on the first, fifth and tenth week after the surgery. Electrophysiologic stimulation and quantitative and qualitative histologic analysis of the sciatic nerve and gastrocnemius muscle were also realized on the tenth week after the surgery. No statistical difference was found in these variables between the five groups ( $P > 0.05$ ). These results suggest that there was no effect of Catuama or bilobalide on peripheral nerve regeneration.

**Key words:** catuama, bilobalide, peripheral nerve regeneration, sciatic nerve, collagen

## 1. INTRODUÇÃO

Lesões do sistema nervoso periférico (SNP) são relativamente freqüentes e podem levar, entre outras complicações, a paralisia de membros (CHAMBERLAIN et al., 1998a). Apesar de o SNP apresentar capacidade regenerativa, em muitos casos não ocorre regeneração nervosa adequada e, nesta situação, complicações tais como neuromas e perdas funcionais são comuns (LEWIN-KOWALICK et al., 2006).

A reparação nervosa periférica é a combinação do processo de crescimento axonal e da remielinização pelas células de Schwann (AKASSOGLU et al., 2003). Por isto a orientação do crescimento axonal tem resultado direto na reparação do nervo. Esse tema é objeto freqüente de pesquisa, pois, a ligação entre os segmentos nervosos ainda é o maior problema na regeneração nervosa periférica (YUAN et al., 2004).

O crescimento e remielinização axonal dependem da interação entre a matriz extracelular, o neurônio e as células da glia. O colágeno é um dos componentes mais utilizados nas matrizes extracelulares (CHEN et al., 2000).

O processo de tubulização utilizando câmara de silicone já foi amplamente estudado e apresenta-se como um bom modelo para o estudo da influência de fatores de crescimento e de outras substâncias que possam facilitar e acelerar a regeneração axonal. Diferentes substâncias neuro-estimulantes vêm sendo testadas com sucesso com o fim de promover o crescimento axonal na reparação das injúrias nervosas.

Substâncias como o bilobalide, que apresentam efeito neuroprotetor em doenças degenerativas como as Doenças de Alzheimer e de Parkinson, também foram utilizadas com sucesso na regeneração de lesões de nervos periféricos (CHEN et al., 2004)

A Catuama é a associação de quatro extratos hidroalcoólicos obtidos de plantas brasileiras (*Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* e *Zingiber officinale*) vendido comercialmente a mais de 20 anos e usado no tratamento de várias desordens, incluindo fadiga mental e física, estresse e astenia muscular (CAMPOS et al., 2004). Seus componentes tem conhecida ação neuroprotetora, antiinflamatória, anti-oxidante e antidepressiva, além de aumentar a capacidade cognitiva.

No presente estudo foi testado o efeito da Catuama na regeneração de nervos periféricos em lesões experimentais a fim de incrementar as técnicas de reparação nervosa periférica e estudar as possibilidades de emprego de um extrato de plantas brasileiras nas lesões nervosas periféricas. Investigou-se o efeito da catuama na regeneração de nervos espinhais, quando administrada por via oral, comparada a um conhecido agente estimulante da regeneração nervosa periférica, o bilobalide.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A reparação nervosa é a combinação do processo de crescimento axonal e de remielinização pelas células de Schwann (AKASSOGLU et al., 2003). As células de Schwann são conhecidas por darem suporte à regeneração nervosa, orientando o direcionamento da fibra nervosa (DEZAWA et al., 2001; THOMPSON & BUETTNER, 2004; SCHMALENBERG & UHRICH, 2005).

A capacidade das células de Schwann darem suporte ao crescimento axonal, em contraste aos oligodendrócitos no sistema nervoso central, tem levado à falsa concepção de que o SNP sempre se regenera. Períodos prolongados em que o axônio lesado permanece sem orientação e que as células de Schwann do segmento nervoso distal permanecem denervadas, reduzem progressivamente o número de motoneurônios que poderão se regenerar (GORDON et al., 2003) diminuindo as chances de uma recuperação funcional bem sucedida. Por esse fato ocorrem freqüentes complicações, tais como perdas funcionais e os neuromas dolorosos. A dor neuropática é altamente desagradável e resistente a diversas terapias, podendo persistir por semanas ou anos, reduzindo claramente a qualidade de vida do paciente (LEWIN-KOWALICK et al., 2006).

O papel do microambiente na regeneração das fibras nervosas, em particular, tem sido intensamente investigado, permitindo a caracterização de várias substâncias produzidas por células presentes nos nervos e nos órgãos alvo que, desempenham um papel importante na regeneração axonal. A caracterização do microambiente tem possibilitado antever uma abordagem mais farmacológica e menos mecanicista no reparo de nervos traumatizados (DA-SILVA, 1993).

As lesões de nervos espinhais podem ser resultantes de uma simples compressão, esmagamento, estiramento ou de uma secção completa. Essas lesões ocorrem comumente em animais porque a localização anatômica de muitos nervos os torna vulneráveis a traumas. Entre as causas de lesões de nervos periféricos estão os acidentes de rua, fraturas, ferimentos com armas de fogo, mordidas, lacerações e causas iatrogênicas como injeções aplicadas em locais inapropriados ou acidentes cirúrgicos. Embora as lesões de nervos espinhais raramente tragam risco de morte ao paciente, as conseqüências podem ser graves se não tratadas adequadamente (CONTESINI et al. 1992).

Após o trauma em um nervo, originam-se dois segmentos: um contendo axônios unidos aos corpos celulares dos neurônios e metabolicamente viáveis, chamado de segmento proximal, e outro distal, apresentando fibras separadas de seus corpos celulares de origem. As fibras nervosas do segmento proximal possuem capacidade intrínseca de regeneração e, decorridas poucas horas da lesão, dão origem a grande número de brotos axonais. Já os axônios presentes no segmento distal entram em processo de degeneração juntamente com suas bainhas de mielina, poucos dias após o trauma (DA-SILVA, 1993).

Quando um nervo é seccionado, ocorre degeneração walleriana do segmento distal, enquanto no segmento proximal a degeneração não é extensa, sendo chamada de degeneração traumática ou retrógrada (SWAIN, 1974). A degeneração walleriana progride em direção ao órgão efector ou sinapse. Independente do tipo de trauma, essa porção do nervo passa por completa degeneração (HAINES, 1972). A degeneração retrógrada pode ser definida como processo que progride a partir do ponto proximal à lesão, através do corpo celular contra o fluxo axoplasma. A extensão da degeneração retrógrada é relativamente menor e depende do tipo de dano ao nervo (HAINES, 1972).

Segundo ARIAS et al. (1997) após a compressão ou secção nervosa, todas as fibras distais à lesão sofrem degeneração walleriana, seguida ou não pelo processo de regeneração. Após 24 horas, ocorre desintegração da mielina e fragmentação axonal, produzindo fragmentos que serão removidos por macrófagos e, entre 12 e 36 horas após a lesão, são formadas câmaras de digestão, contendo fragmentos de axônios e mielina degenerada. A produção de mielina cessa e ocorre aumento da população de células de Schwann, formando colunas conhecidas como bandas de Bungner, que atuarão como guia para os axônios do coto proximal, que porventura regenerarem, e como fonte de células para a mielinização destes novos axônios. Se não ocorrer a regeneração, estas bandas persistem por meses até ocorrer atrofia.

A restauração com retorno funcional satisfatório continua sendo um desafio nos casos de lesão nervosas (OH et al., 2007; KALBERMATTEN et al., 2008) e a ligação adequada entre os cotos nervosos, o maior problema na regeneração nervosa periférica (YUAN et al., 2004). Injúrias causando longos intervalos entre os segmentos nervosos geralmente requerem enxertos para facilitar a reparação

axonal. Todavia o uso de auto-enxertos é geralmente limitado pela falta de disponibilidade de material e pelos danos causados ao doador (KIM et al., 2004; OH et al., 2007).

Enxertos biológicos foram extensivamente utilizados no passado (BELKAS et al., 2004). Enxertos utilizando nervos, ou veias (CHUI, 1995; RISITANO et al., 2002; CHOI et al., 2005) como canais para a orientação do crescimento nervoso apresentam bons resultados, facilitando a regeneração axonal, todavia apresentam limitações quanto à disponibilidade de material. Mais recentemente, o uso de tubos sintéticos para a orientação nervosa vem ganhando popularidade (BELKAS et al., 2004).

As características de um material ideal para a tubulização são: ser inerte (biocompatível), fino, flexível, translúcido, bioabsorvível, inibidor de processos patológicos como fibrose, glioma, neuroma, edema, isquemia e aderências e facilitador do processo de cicatrização e regeneração como vascularização e acúmulo de fatores de crescimento (FIELDS et al., 1989).

O processo de tubulização utilizando canais de silicone já foi descrito com sucesso em cães e chimpanzés por DUCKER & HAYES no ano de 1968 e amplamente estudado desde então por apresentar-se como uma alternativa clínica e como um bom modelo para o estudo da influência de fatores de crescimento e de outras substâncias que possam facilitar e acelerar a reparação axonal (DIAZ-FLORES et al., 1995; CHEN et al., 2000; CHEN et al., 2001a; CHEN et al., 2001b; CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2005).

Tubos de diversos materiais biodegradáveis vêm sendo testados a fim de fornecer alternativas para a orientação axonal (MLIGILICHE et al., 2002; MOSAHEBI et al., 2002; MLIGILICHE et al., 2003; BINI et al., 2004; GALLA et al., 2004; HARLEY et al., 2004; HSU et al., 2004; OH et al., 2007).

As moléculas da matriz extracelular são fator crítico para a reparação nervosa, pois o crescimento e remielinização axonal dependem da interação entre a matriz extracelular, o neurônio e as células da glia. Os componentes mais utilizados nas matrizes extracelulares são o colágeno, a laminina e a fibronectina (CHEN et al., 2000; RUMMLER; GUPTA, 2004).

O colágeno favorece a migração e adesão das células de Schwann no processo de regeneração nervosa e vem sendo muito utilizado em diversos modelos

experimentais (CHAMBERLAIN et al., 1998b; CHAMBERLAIN et al., 2000; CHEN et al., 2000; CHEN et al., 2002; MURAKAMI et al., 2003; RUMMLER & GUPTA, 2004; CHOI et al., 2005).

Vários fatores neurotróficos incluindo o fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia e as neurotrofinas 3 e 4, têm sido estudados por seu potencial em promover a regeneração nervosa periférica (RUMMLER & GUPTA, 2004).

Diferentes substâncias neuro-estimulantes vêm sendo usadas a fim de investigar sua capacidade de promover o crescimento axonal nas injúrias periféricas. Além das substâncias supracitadas, vários fatores que possam favorecer o crescimento nervoso vêm sendo testados (FINE et al., 2002; OHTA et al., 2004; ZHANG et al., 2004; OZAY et al., 2007; SIERPINSK et al., 2008).

Substâncias como o bilobalide, extraído das folhas do *Ginkgo biloba*, que apresenta efeito neuroprotetor em doenças degenerativas como as Doenças de Alzheimer e de Parkinson, também vêm sendo utilizadas com sucesso na regeneração de lesões de nervos espinhais (BRUNO et al., 1993; AHLEMEYER; KRIEGLSTEIN, 2003; CHEN et al., 2004). O bilobalide apresenta múltiplos mecanismos de ação associados à neuroproteção, incluindo: preservação da síntese de ATP mitocondrial; inibição de danos induzidos pela apoptose e deterioração de membranas induzida por isquemia, no cérebro. Esses mecanismos indicam a utilização do bilobalide em desordens como isquemia cerebral e neurodegeneração (DEFEUDIS 2002; CHANDRASEKARAN et al., 2003).

A Catuama é um produto de plantas brasileiras vendido comercialmente a mais de 20 anos e é usado no tratamento de várias desordens, incluindo fadiga mental e física, estresse e astenia muscular. É a associação de quatro extratos hidroalcoólicos obtidos das seguintes plantas: *Paullinia cupana* (guaraná; Sapindaceae) 40,31%; *Trichilia catigua* (catuaba; Meliaceae) 28,23%; *Ptychopetalum olacoides* (muirapuama; Olacaceae) 28,23% e *Zingiber officinale* (gingibre; Zingiberaceae) 3,26% (CAMPOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

A Catuama administrada oralmente por longos períodos em ratos interferiu nos níveis de serotonina e dopamina sugerindo que pode ser usada clinicamente em estágios de depressão leve e moderada, sozinha ou em associação com as drogas antidepressivas tradicionais (CAMPOS et al., 2004).



PONTIERI et al. (2007) observaram que a Catuama reverteu a fibrilação ventricular, prevenindo sua re-indução e prolongando a condução intraventricular quando testada em coração de coelho.

O *Ptychopetalum olacoides*, conhecido como muirapuama, é utilizado na medicina tradicional brasileira em pacientes que apresentam sintomas associados à idade ou em pacientes que estão em recuperação de condições causadas por danos ao sistema nervoso central. O extrato alcoólico de *P. olacoides* demonstrou aumentar a atividade mitocondrial em relação ao grupo controle, quando adicionado a porções de hipocampo de ratos. Quando adicionado a porções de hipocampo durante e depois da privação de oxigênio e glicose causou aumento da viabilidade celular e preveniu o aumento de radicais livres (SIQUEIRA et al., 2004).

O extrato etílico de *P. olacoides* (EEPO) facilita a recuperação da memória, inibindo significativamente a atividade da acetilcolinesterase *in vitro* no córtex frontal e no hipocampo de ratos. A inibição significativa da atividade da acetilcolinesterase também foi encontrada em áreas semelhantes do cérebro após administração aguda de EEPO sugerindo que suas propriedades terapêuticas estejam relacionadas a este mecanismo (SIQUEIRA et al., 2003; DA SILVA et al., 2004).

A administração oral de gengibre (*Z. officinale*) tem ação antiinflamatória e anti-trombótica, diminuindo os níveis séricos de Prostaglandina E<sub>2</sub>, Tromboxano B<sub>2</sub> e inibindo a agregação plaquetária. Quando administrado por via intraperitoneal reduz significativamente os níveis de colesterol sérico (THOMSON et al., 2002). A diminuição da produção de mediadores inflamatórios também foi constatada em outros estudos (SHEN et al., 2003; PENNA et al., 2003). A administração de extrato de gengibre reduziu de forma moderada os sintomas associados à dor nos casos de osteoartrite (ALTMAN & MARCUSSEN, 2001). O gengibre também apresenta atividade antioxidante (MASUDA et al., 2004).

Foi constatado o aumento do desempenho cognitivo de voluntários humanos após a administração de extrato de guaraná (*P. cupana*) em testes de atenção e de verificação de sentenças (KENNEDY et al., 2004). Camundongos que ingeriram suspensão de guaraná mostraram aumento na capacidade física quando submetidos ao estresse pela natação forçada, com baixa toxicidade após os 23 dias de tratamento (ESPINOLA et al., 1997). Propriedades gastroprotetoras foram

encontradas em camundongos quando da administração de extrato de guaraná (CAMPOS et al., 2003).

A *P. cupana* apresenta também comprovada ação anti-trombótica diminuindo a síntese de tromboxano e a agregação plaquetária (BYDLOWSKI et al., 1991).

A catuaba (*Trichilia catigua*) inibiu completamente a atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> sugerindo apresentar propriedades antiinflamatórias (BARBOSA et al., 2004). A atividade antidepressiva mediada por mecanismos dopaminérgicos da catuaba ficou evidenciada em roedores (CAMPOS et al., 2005).

OLIVEIRA et al. 2005 não encontraram reações adversas severas ou mudanças hematológicas ou bioquímicas em pacientes humanos que receberam a administração crônica de 25mL de catuama duas vezes ao dia por 28 dias, indicando segurança no tratamento crônico nestas condições.

GUTMANN & GUTMANN (1942) demonstraram que a perda da capacidade de esticar os dígitos do membro pélvico esta relacionada ao comprometimento do nervo isquiático e é um parâmetro confiável para avaliar o gravidade da lesão, bem como para acompanhar sua recuperação.

DE MEDINACELI et al. (1982) desenvolveram um método quantitativo, confiável e de fácil reprodução da condição funcional do nervo isquiático de ratos, para a avaliação do grau de lesão e da recuperação, denominado de Índice Funcional do Ísquiático (IFI), e que foi posteriormente modificado por BAIN et al. (1989). O IFI apresentou estreita correlação com os achados histológicos e histomorfométricos do nervo isquiático indicando que a perda funcional resultante das lesões produzidas no nervo isquiático de rato pode ser acompanhada pelo IFI (MONTE-RASO et al., 2008; ABREU et al., 2002). A confiabilidade do método IFI foi analisada por BROWN et al. (1991) onde quatro examinadores analisaram as medidas em seqüências e momentos diferentes, concluindo que o IFI é um bom método não invasivo. O método do IFI é ainda muito versátil, pois é de fácil aplicação e de custo baixo, prováveis motivos de sua ampla aplicação (MONTE-RASO et. al., 2008).

Entretanto, MONTE-RASO et. al. (2008) demonstraram que as alterações morfológicas do membro causadas pelo esmagamento do nervo isquiático não permitiram definir adequadamente a impressão da pegada, sendo praticamente impossível fazer a marcação dos parâmetros, lançando dúvida sobre a confiabilidade

do método nesse período. Os autores constataram a dificuldade de avaliação nas primeiras semanas após a produção da lesão do nervo ciático, porque as impressões das pegadas eram invariavelmente de má qualidade, visto que a paralisia imposta ao membro do animal impedia a pisada bem marcada. Com a regeneração subsequente do nervo e a recuperação funcional do animal, as pegadas tornavam-se mais claras, permitindo a marcação mais adequada dos pontos-chave das pegadas. As dificuldades observadas, então, nas semanas iniciais após a produção da lesão lançaram dúvidas sobre a fidelidade do método nessa fase todavia sendo plenamente reprodutível e confiável quando aplicado após a segunda semana da indução da lesão por esmagamento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Investigar os efeitos neuro-estimulantes de novas substâncias na regeneração de nervos periféricos a fim de incrementar os mecanismos de auxílio à reparação nervosa periférica.

Aumentar o conhecimento sobre os efeitos da Catuama suas possíveis aplicações terapêuticas, comparado-a ao bilobalide.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Investigar os efeitos da Catuama, em diferentes doses, e do bilobalide na regeneração nervosa periférica de ratos submetidos à secção do nervo isquiático e subsequente reparação tubo de silicone preenchido com solução de colágeno.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS\*

### 4.1. Animais

Foram utilizados cinquenta ratos Wistar, machos, clinicamente sadios e pesando entre 250 e 350g. Os animais foram acomodados em gaiolas individuais em ambiente controlado à temperatura de 22°C e em ciclos diários de 12h de luz. Água e ração comercial foram oferecidas *ad libitum*.

### 4.2. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com associação de cetamina (75mg/kg I.M.) e xilazina (10mg/kg I.M.). Após anti-sepsia adequada foi realizada a incisão de pele na face lateral da coxa direita. Fáscias e grupos musculares foram separados por dissecação roma. Após a exposição do nervo isquiático direito, foi realizada sua transecção completa como modelo experimental de trauma. Em seguida, os segmentos nervosos, proximal e distal, foram introduzidos e fixados ao tubo de silicone com ponto único em “U” ao epineuro utilizando náilon 9-0 deixando um espaço de 10mm entre os segmentos (figura 1). O espaço entre os segmentos foi preenchido com solução contendo uma parte de colágeno em fase líquida (Vitrogen 3mg/ml) para uma parte de solução fisiológica com o auxílio de agulha 26G, inserida no lúmen da câmara de silicone, evitando a formação de bolhas. A camada muscular foi reaproximada com fio de náilon 4-0 e a sutura de pele em pontos simples separados com fio de náilon 2-0 (CHEN et al., 2004; HSU et al., 2004).

\*Aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da FCAV-Unesp, protocolo nº. 021338-06.

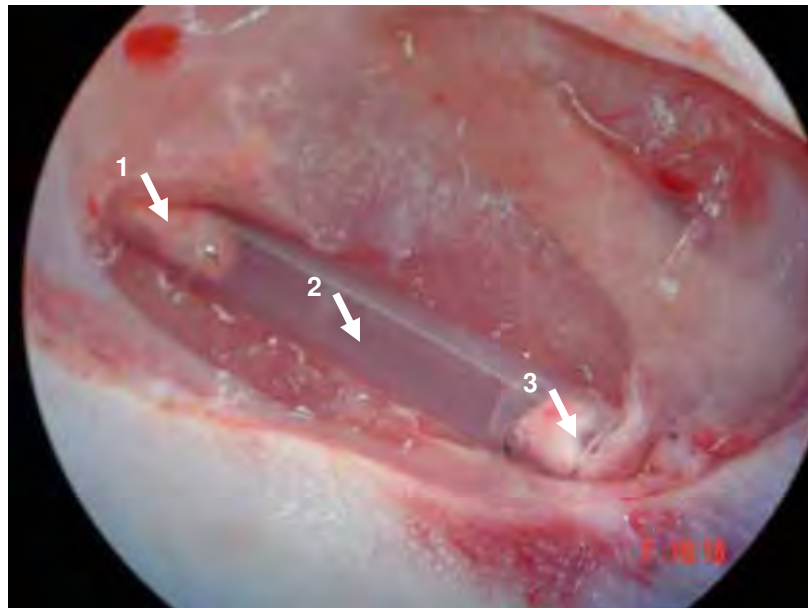


Figura 1. Fotografia do nervo isquiático de rato Wistar após secção e sutura em tubo de silicone. Notar os segmentos nervosos proximal (1) e distal (2) fixados ao tubo preenchido por colágeno e o intervalo de 10mm entre eles (2). Aumento de 16 x.

Para a realização da técnica cirúrgica foram utilizados instrumentos empregados em microcirurgias oftálmicas: porta agulha forte para fio 10-0, pinça Colibri 0,12 mm curva com plataforma longa, tesoura westcott curva para conjuntiva, pinça de ponto castroviejo curva e microscópio cirúrgico DF Vasconcelos modelo DFV # 11904 com aumento de 16 x.

### 4.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 5 grupos, com dez animais cada, segundo tabela 1. Nos grupos A e E os animais receberam solução salina via oral (10 ml/kg) nos primeiros 28 dias após a cirurgia. Nos grupos B, C e D os animais foram cronicamente tratados respectivamente, com 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg de Catuama (Laboratório Catarinense, Joinville, SC, Brasil) nos primeiros 28 dias de pós-operatório (VAZ et al., 1997; CAMPOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). Nos animais do grupo E foram adicionados 200 $\mu$ M de bilobalide (Sigma) à solução de colágeno (Vitrogen) (CHEN et al., 2004).

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamentos dos ratos Wistar submetidos à secção do nervo isquiático seguida por reparação com tubo de silicone.

Grupo	Tratamento oral	Tratamento local do enxerto	Finalidade
A (n=10)	Solução salina	Solução colágeno**	Grupo controle
B (n=10)	Catuama* 100mg/kg	Solução colágeno	Grupo dose baixa de catuama
C (n=10)	Catuama 200mg/kg	Solução colágeno	Grupo dose intermediária de catuama
D (n=10)	Catuama 400mg/kg	Solução colágeno	Grupo dose alta de catuama
E (n=10)	Solução salina	Solução colágeno + bilobalide(200µM)***	Grupo bilobalide

\* Laboratório Catarinense, Joinville, SC, Brasil

\*\* Vitrogen 100 FXP-019 (concentração de colágeno 3.0 mg/ml)

\*\*\* Sigma – B9031

#### 4.4 Avaliação funcional

A avaliação funcional foi realizada no pré-operatório, na primeira, quinta e décima semanas de pós-operatório por meio da análise do teste de marcha (figura 2) introduzido por DE MEDINACELI et al. 1982 e modificado posteriormente por BAIN et al. 1989. Segundo ABREU et al. 2002, deve-se proceder à pintura da face plantar dos membros pélvicos dos animais com tinta preta. Coloca-se o animal para deambular num corredor sobre uma folha de papel branco (figura 2).

Os parâmetros mensurados no teste foram: o tamanho da pata (TP), distância medida em milímetros da extremidade caudal da face plantar até a extremidade distal do terceiro dígito; a separação dos dígitos (SD), distância medida em milímetros entre a extremidade medial do primeiro dígito até a extremidade lateral do quinto dígito e a separação intermédia (SI), distância medida em milímetros entre a extremidade medial do segundo dígito e a extremidade lateral do quarto dígito.

O sufixo O é utilizado para identificar o membro operado e o sufixo N para identificar o membro não operado. O índice de função do nervo isquiático (IFI) é calculado através da fórmula:

$$\text{IFI} = -38,3 \frac{(\text{TPO} - \text{TPN})}{\text{TPN}} + 109,5 \frac{(\text{SDO} - \text{SDN})}{\text{SDN}} + 13,3 \frac{(\text{SIO} - \text{SIN})}{\text{SIN}} - 8,8$$



Figura 2. Rato Wistar deambulando no corredor sobre papel branco para avaliação funcional, teste de marcha.

#### 4.5 Avaliação eletrofisiológica

Na décima semana do pós-operatório os animais dos grupos A, B, C, D e E foram submetidos à anestesia e os nervos isquiáticos direitos foram novamente expostos nos pontos das intervenções cirúrgicas. Para avaliar a recuperação motora foram realizadas, com eletro-estimulador modelo AP585 (VMV Biotherapy),



estimulações dos segmentos nervosos proximais e distais e do cabo de regeneração (figura 3) formado entre os cotos, conforme descrito por STOPIGLIA (1992).

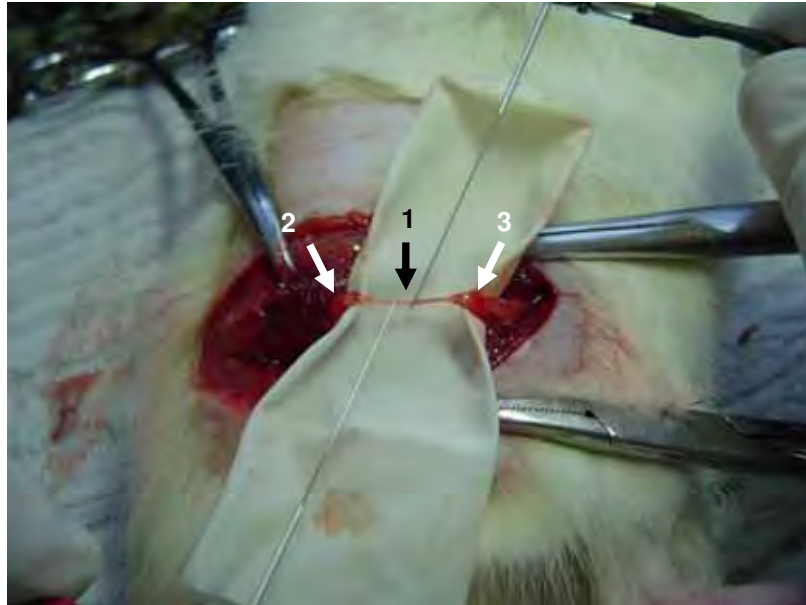


Figura 3. Aspecto macroscópico do cabo de regeneração (1) formado entre os segmentos proximal (2) e distal (3) do nervo isquiático de rato do grupo E (bilobalide) na décima semana de pós-operatório no momento da estimulação elétrica na região do cabo de regeneração.

#### 4.6 Biopsias dos nervos e músculos e processamento do material

Após o exame eletro-fisiológico foi realizada a eutanásia dos animais e foram removidas as porções dos nervos isquiáticos do local do implante com tubo de silicone com as margens proximal e distal (5 mm) do nervo. Os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo foram colhidos. As amostras musculares colhidas foram fixadas em formalina a 10%, incluídas em parafina e, em cortes transversais, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM), segundo rotina do laboratório.

As amostras dos nervos foram fixadas em formalina 10%, tamponada com fosfato pH 7,2. Após período de fixação de 24h, as amostras foram seccionadas em cortes transversais e incluídas em parafina. Foram realizados cortes transversais com 3 $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina/eosina e Tricrômico de Masson. Amostras semelhantes também foram fixadas em glutaraldeído, pós-fixadas em

Tetróxido de Ósmio e incluídas em histo-resina à base de metacrilato, cortadas com 1µm de espessura e coradas com Azul de Toluidina (AT).

#### **4.7 Análise histológica**

As amostras foram avaliadas em microscópio de luz. Foram observadas as alterações morfológicas dos músculos gastrocnêmios e seu grau de atrofia. Os cortes transversais dos segmentos nervosos foram avaliados quanto à presença de axônios mielinizados, proliferação axonal, infiltrado de células inflamatórias e degeneração walleriana. Os cortes transversais dos cabos de regeneração formados entre os segmentos nervosos foram avaliados quanto à área e presença de axônios mielinizados.

Foram observadas as alterações histológicas no local da intervenção cirúrgica, avaliando os fenômenos vasculares e celulares da inflamação e o processo de reparação. Foram observados, em especial, os seguintes aspectos: integridade da bainha de mielina e dos axônios, presença de degeneração walleriana, proliferação axonal.

Foi mensurada a área do cabo de regeneração e feita a contagem do número de axônios por área utilizando o microscópio Leica DM 5000B com o software *Leica Application Suite* (LAS) 2.5.1R1.

#### **4.8 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS (*Statistical Analysis System*), aplicando-se o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para dados paramétricos e o teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) para os dados não paramétricos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação funcional

Foram excluídas as avaliações de todos os animais que apresentaram amputação total ou parcial de qualquer um dos dígitos (figura 4), lesões no membro não operado devido à aplicação intramuscular da anestesia ou morte. A figura 5 apresenta a evolução do índice de função do nervo isquiático por grupo.



Figura 4. Aspecto macroscópico de lesão durante o pós-operatório no membro operado em rato do grupo C (catuama 200mg). Presença de úlcera e perda dos dígitos IV e V. Animal excluído da avaliação funcional.

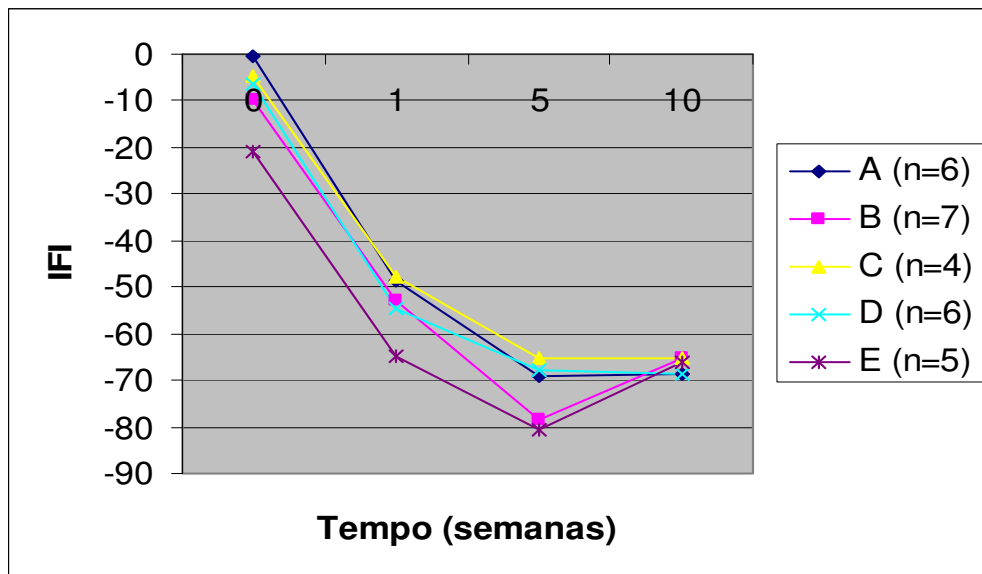


Figura 5. Representação gráfica do índice da função do isquiático (IFI) por grupo no pré-operatório, e nas primeira, quinta e décima semanas de pós-operatório. A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

O IFI variou entre os tempos observados mantendo o mesmo padrão de distribuição entre os grupos, não havendo diferença ( $P > 0,05$ ) entre eles (tabela 2). Indicando que os diferentes tratamentos realizados não interferiram na recuperação funcional do nervo isquiático avaliado pelo teste. Como descrito a seguir, os achados do teste de função do isquiático estão de acordo com os achados histológicos e morfométricos demonstrando a estreita relação entre eles.

Tabela 2. Médias dos valores de IFI para cada grupo experimental em cada semana.

Semana	Grupo				
	A	B	C	D	E
0	-0,501 <sup>a</sup>	-9,599 <sup>a</sup>	-4,554 <sup>a</sup>	-6,216 <sup>a</sup>	-20,827 <sup>a</sup>
1	-48,422 <sup>b</sup>	-53,023 <sup>b</sup>	-47,981 <sup>b</sup>	-54,495 <sup>b</sup>	-64,769 <sup>b</sup>
5	-69,089 <sup>c</sup>	-78,299 <sup>c</sup>	-65,377 <sup>c</sup>	-67,892 <sup>c</sup>	-80,596 <sup>c</sup>
10	-68,498 <sup>c</sup>	-65,35 <sup>c</sup>	-65,371 <sup>c</sup>	-68,777 <sup>c</sup>	-65,941 <sup>c</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste TUKEY ( $P < 0,05$ ). A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

## 5.2 Formação de cabo de regeneração

Os cabos de regeneração (CR) formados apresentavam mesma coloração do nervo, mas com diâmetro visivelmente inferior aos segmentos nervosos (figuras 7 e 8). Nas figuras 6, 7 e 8 verificam-se os animais que tiveram formação de cabo de regeneração entre os segmentos proximal e distal. Houve formação de cabo de regeneração em todos os animais do grupo B, enquanto que no grupo C, apenas 60% dos animais formaram cabo de regeneração. Todavia esta diferença não foi significativa ( $P>0,05$ ), indicando que a presença ou ausência de cabo de regeneração independe do grupo testado.

Tabela 3. Porcentagem de animais que formaram cabo de regeneração (CR) no intervalo de 10mm entre os segmentos nervosos proximal e distal. A: grupo controle, B: grupo Catuama 100mg, C: grupo Catuama 200mg, D: grupo Catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

Tratamento	Presença de CR	Ausência de CR	Total animais	% de animais com CR
A	8	2	10	80,00%
B	10	0	10	100,00%
C	6	4	10	60,00%
D	8	1	9	88,89%
E	8	1	9	88,89%

Não houve diferença significativa entre os valores pelo teste Qui-quadrado ( $P>0,05$ ). A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

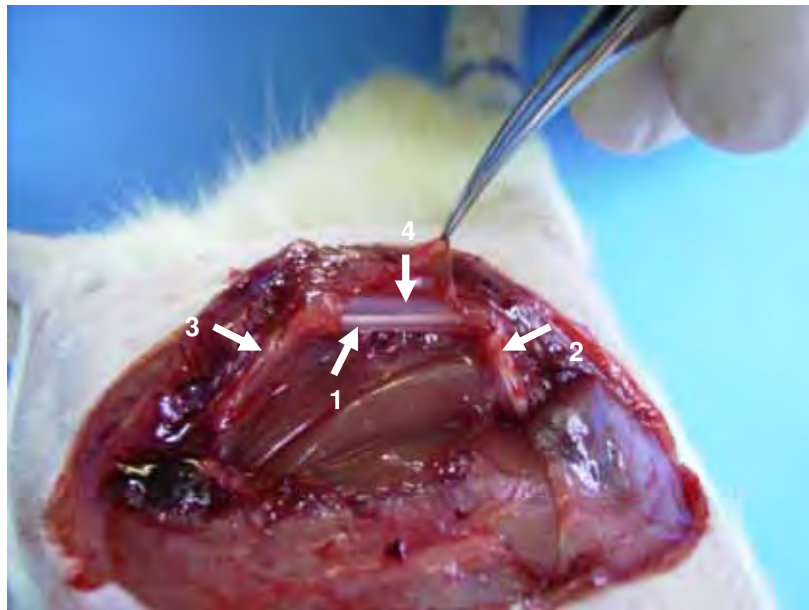


Figura 6. Aspecto macroscópico do cabo de regeneração formado (1) entre os segmentos proximal (2) e distal (3) do nervo isquiático dentro do tubo de silicone (4) em um rato Wistar do grupo A (controle) na décima semana de pós-operatório.

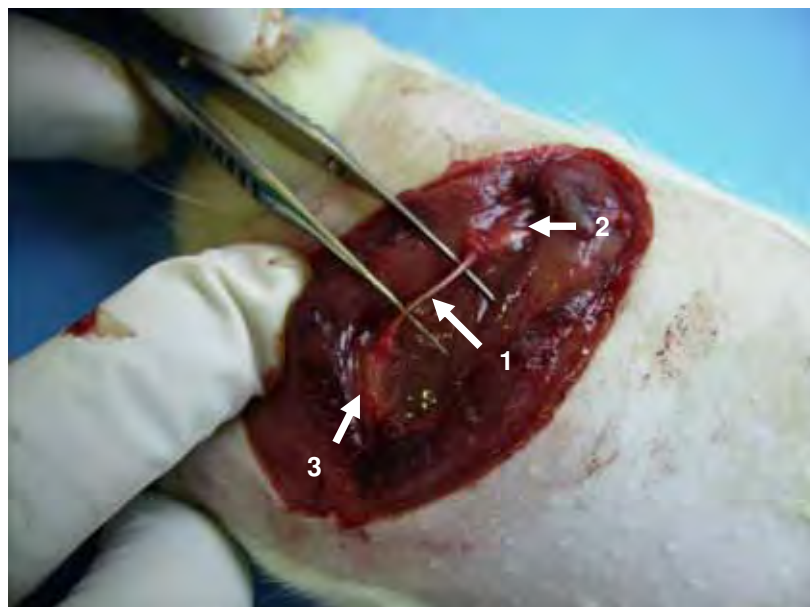


Figura 7. Aspecto macroscópico do cabo de regeneração (1) formado entre os segmentos proximal (2) e distal (3) depois de removido o tubo de silicone em um rato Wistar do grupo A (controle).

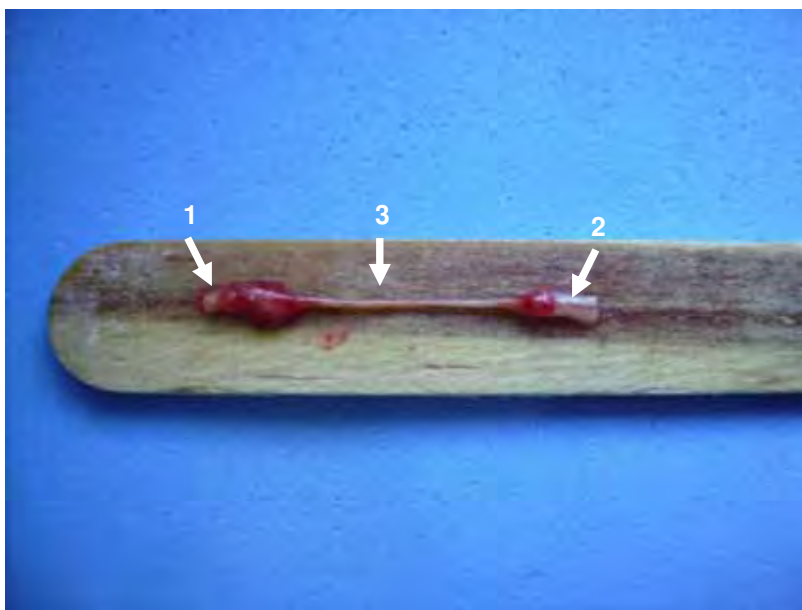


Figura 8. Aspecto macroscópico da biópsia do nervo isquiático de rato com cabo de regeneração colhida na décima semana de pós-operatório. Notar a diferença de diâmetro entre os segmentos nervosos proximal (1) e distal (2) e cabo de regeneração (3) de um rato Wistar do grupo B (Catuama 100mg).

### 5.3 Avaliação eletrofisiológica

Os resultados da avaliação da resposta de contração muscular à eletroestimulação (tabela 4) foram positivos em todos os animais que apresentaram cabo de regeneração exceto em um animal do grupo A (controle) que apresentou cabo de regeneração não responsivo à estimulação elétrica. A resposta à estimulação elétrica não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

A presença de resposta positiva em todos os animais que formaram cabo de regeneração exceto um, demonstra que na décima semana de pós-operatório o cabo de regeneração formado entre os segmentos nervosos já apresentava capacidade de transmitir o estímulo elétrico levando a contração muscular.

Tabela 4. Porcentagem de animais que tiveram resposta positiva ao eletro-estímulo (EE) em relação aos animais que formaram cabo de regeneração. A: grupo controle, B: grupo Catuama 100mg, C: grupo Catuama 200mg, D: grupo Catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

Tratamento	EE positivo	Total animais que formaram CR	% de animais com EE positivo
A	7	8	87,50%
B	10	10	100,00%
C	6	6	100,00%
D	8	8	100,00%
E	9	9	100,00%

Não houve diferença entre os valores pelo teste Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ). A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

#### 5.4 Análise histológica

Foram avaliadas as áreas dos cabos de regeneração como demonstrado na Figura 9. Não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais em relação à área do cabo de regeneração.

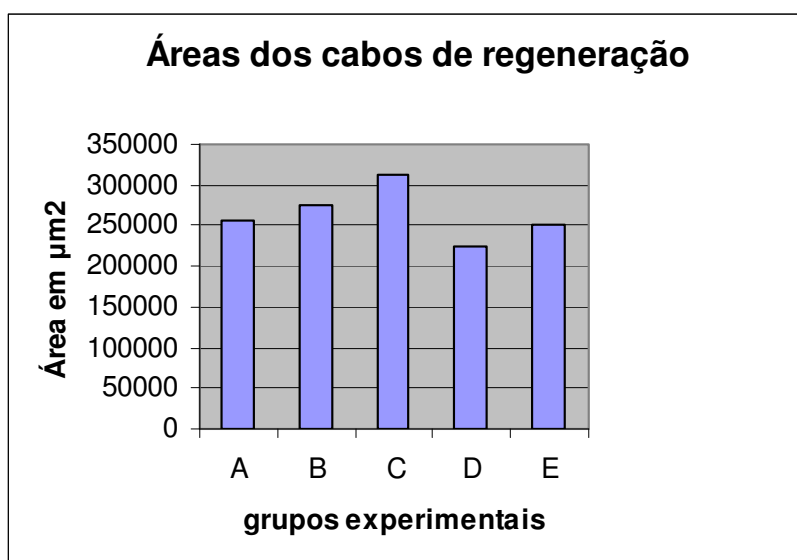


Figura 9. Área em  $\mu\text{m}^2$  dos cabos de regeneração formados entre cotos nervosos proximal e distal nos grupos experimentais. A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.



A análise histológica dos cabos de regeneração notou-se a presença de grande quantidade de axônios, axônios mielinizados e em processo de mielinização. Presença de grande quantidade de vasos sanguíneos (Figuras 10 e 11).

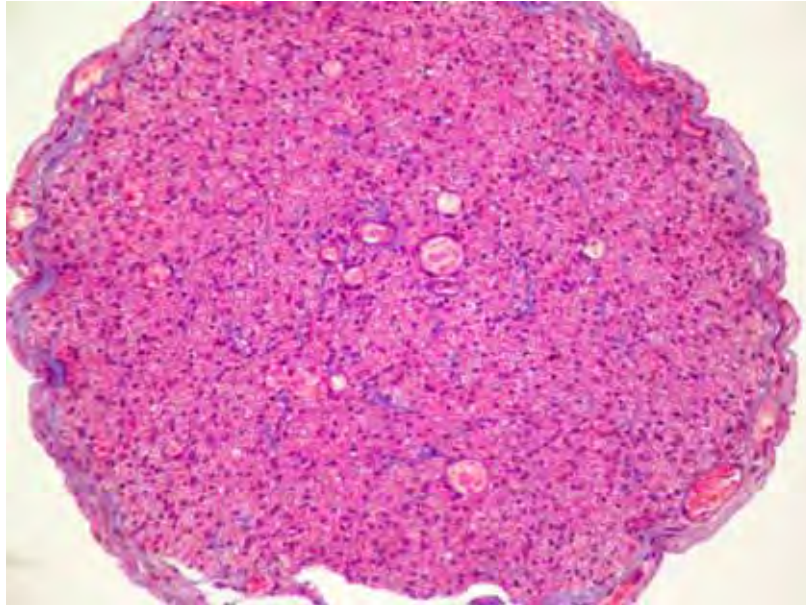


Figura 10. Aspecto microscópico de corte transversal do cabo de regeneração formado entre os segmentos nervosos proximal e distal de nervo isquiático de rato Wistar do grupo B (Catuama 100mg). Presença de grande número de axônios. Tricrômico de Masson, obj. 40x

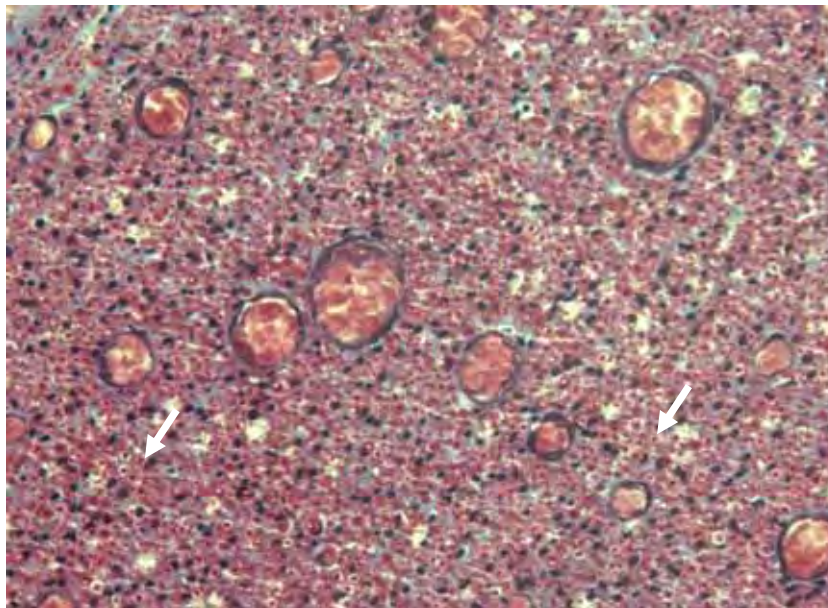


Figura 11. Aspecto microscópico do cabo de regeneração formado entre os segmentos nervosos proximal e distal de nervo isquiático de rato Wistar do grupo D (Catuama 400mg). Presença de vasos sanguíneos e axônios em grande quantidade (setas). Tricrômico de Masson, obj. 40x.

Os cabos de regeneração foram avaliados quanto à proliferação axonal pela contagem do número de axônios mielinizados por área em  $\mu\text{m}^2$ . Os resultados estão apresentados na tabela 5 e indicam não haver diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais. A presença de axônios mielinizados (figuras 12 e 13) é um indício histológico de reparação nervosa periférica e está de acordo com os achados da avaliação funcional e avaliação eletrofisiológica demonstrando que os cabos formados já apresentavam capacidade de transmitir o estímulo elétrico, causar contração muscular e melhorar a qualidade da passada.

Foi observada também a presença de hemossiderina (figura 15) nos cabos de regeneração. Este pigmento é derivado do metabolismo de ferro indicativo de hemorragia pós-secção nervosa.

Tabela 5. Número de axônios por área em  $\mu\text{m}^2$  (NA), presença de cabo de regeneração (CR), eletroestimulação positiva (EE) e área do cabo de regeneração (ACR) e coeficiente de variação (CV).

Parâmetro	Grupo					CV(%)
	A	B	C	D	E	
NA <sup>1</sup>	0,0546	0,0523	0,0553	0,0598	0,0629	18,59
CR (%)*	80	100	60	89,9	90	-
EE (%)*	70	100	60	89,9	90	-
ACR <sup>1</sup> ( $\mu\text{m}^2$ )	256558	274068	313860	223276	252259	3,75

<sup>1</sup>Não houve diferença significativa pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

\* Valores referentes à percentagem de presença de CR ou EE.

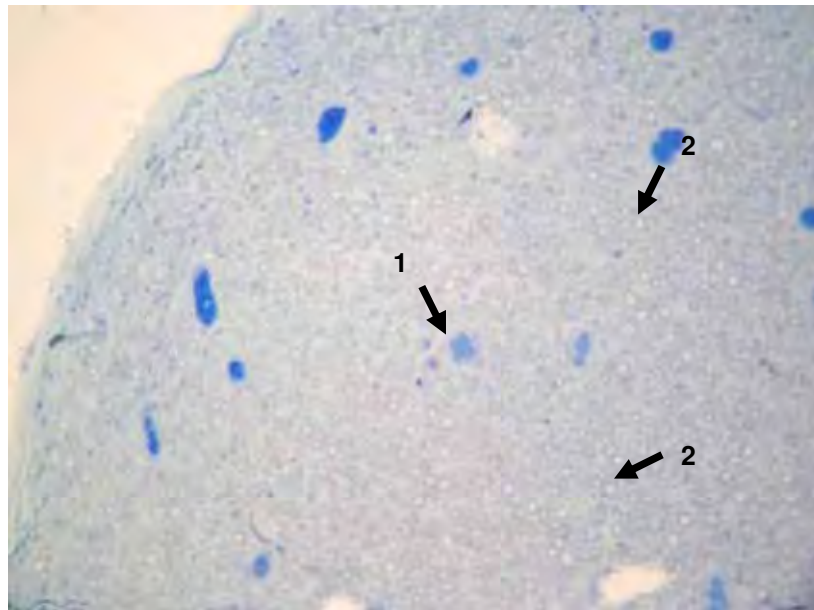


Figura 12. Aspecto microscópico do cabo de regeneração de nervo isquiático de rato Wistar do grupo A (controle). Presença de vasos sanguíneos (1) e axônios mielinizados em grande quantidade (2). Azul de Toluidina, obj. 40x.

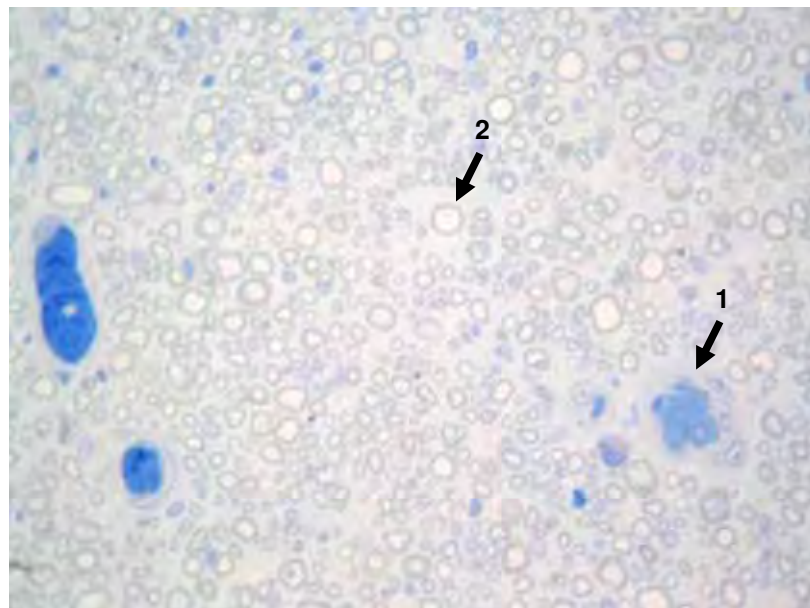


Figura 13. Aspecto microscópico do cabo de regeneração de rato Wistar do grupo A (controle). Presença de vasos sanguíneos (1) e axônios mielinizados (2) em grande quantidade e com diâmetros diferentes. Azul de Toluidina, obj. 100x.



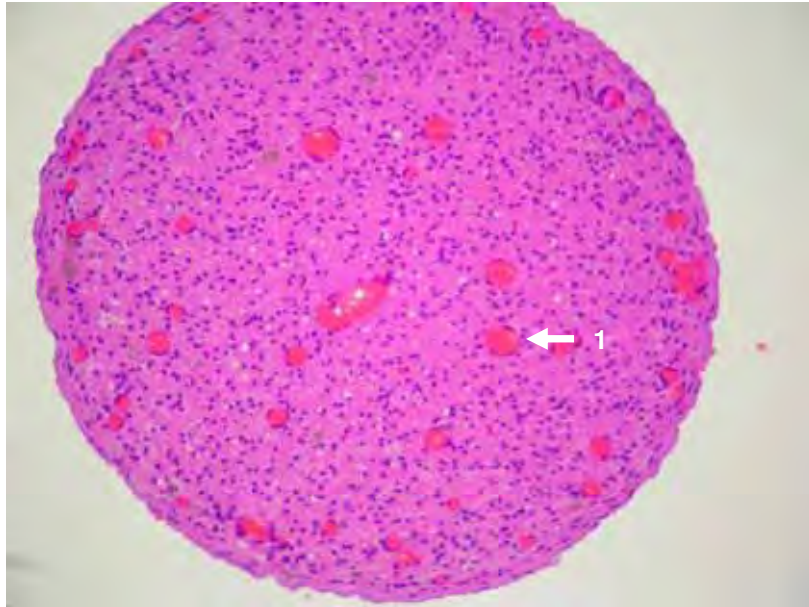


Figura 14. Aspecto microscópico do cabo de regeneração de rato Wistar do grupo E (bilobalide). Presença de vasos sanguíneos (1) e axônios mielinizados em grande quantidade e com diâmetros diferentes. Hematoxilina-eosina, obj. 40x.

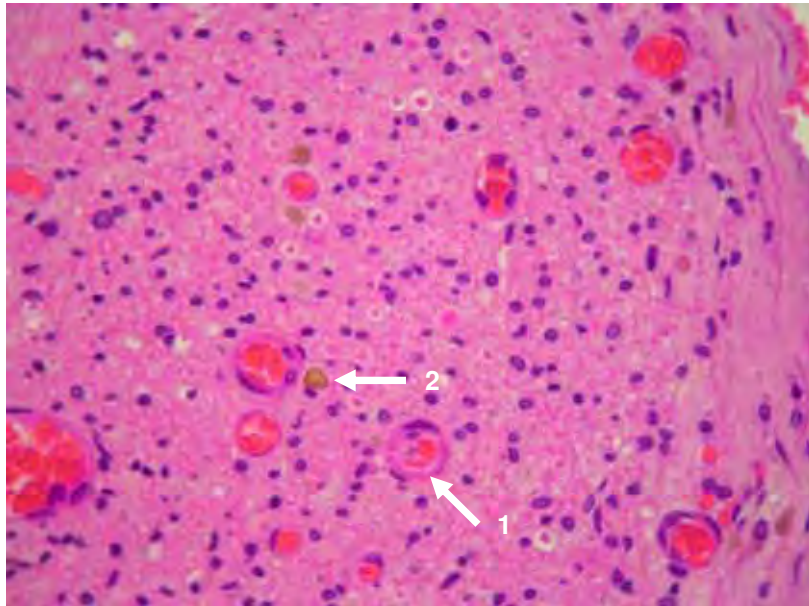


Figura 15. Aspecto microscópico do cabo de regeneração de rato Wistar do grupo E (bilobalide). Presença de vasos sanguíneos (1) e axônios mielinizados em grande quantidade e com diâmetros diferentes. Presença de hemossiderina (2). Hematoxilina e Eosina, obj. 100x.

Os segmentos nervosos distais foram avaliados em relação ao grau de degeneração nervosa (GDSD), em uma escala de I a IV, sendo I degeneração nervosa discreta; II degeneração nervosa leve; III degeneração nervosa moderada; IV degeneração nervosa severa, como observado nas figuras 16, 17 e 18. A diferença é nítida entre os animais que apresentaram cabo de regeneração (figura 18) e os animais onde não houve a formação do cabo (figuras 16 e 17). Os grupos experimentais não demonstraram diferença ( $P>0,05$ ) com relação a esta análise (figura 19).

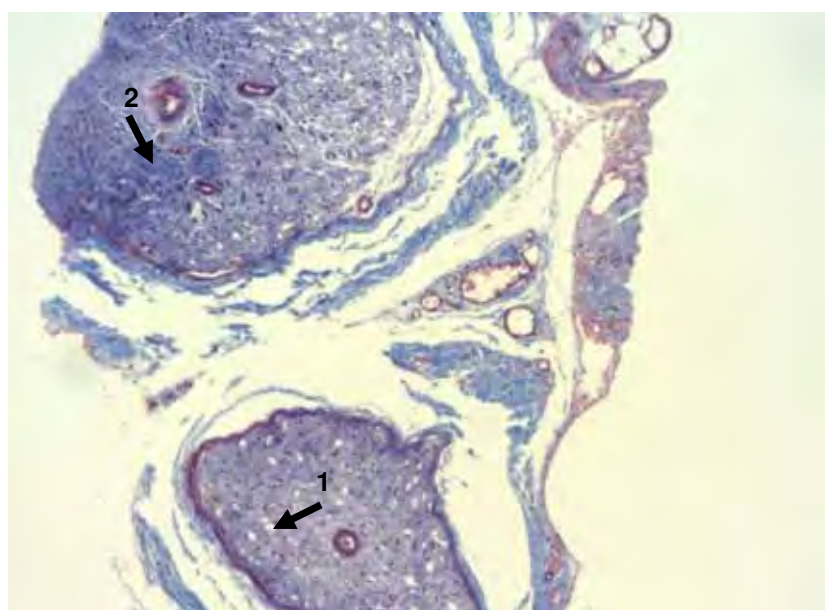


Figura 16. Aspecto microscópico de corte transversal do seguimento distal do nervo isquiático de um rato Wistar do grupo C (Catuama 200mg) que não apresentou formação de cabo de regeneração à décima semana de pós-operatório. Observar severa degeneração walleriana (grau IV) com presença de vacúolos (1), ausência de axônios mielinizados e áreas de fibrose (2). Tricômico de Masson, obj. 10x.

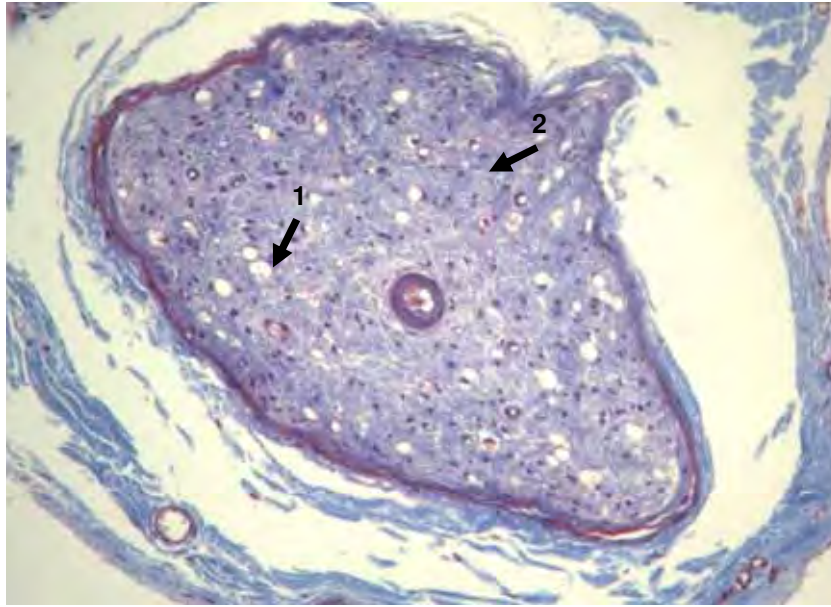


Figura 17. Aspecto microscópico do seguimento distal do nervo isquiático de um rato do grupo C (Catuama 200mg) que não apresentou formação de cabo de regeneração à décima semana de pós-operatório. Observar degeneração walleriana severa (grau IV) com presença de vacúolos (1), ausência de axônios mielinizados e áreas de fibrose (2). Tricrômico de Masson, obj. 20x.

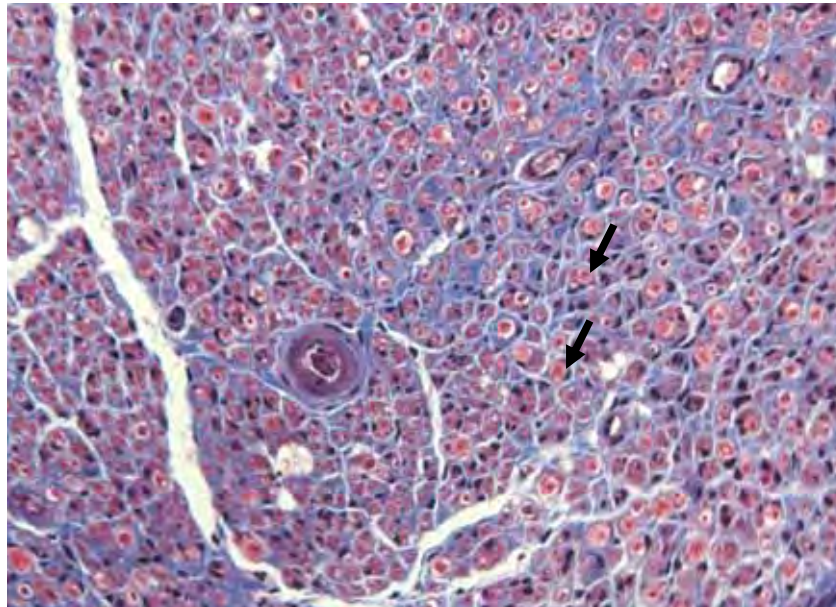


Figura 18. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo isquiático de um rato do grupo D (Catuama 400mg) que apresentou formação de cabo de regeneração à décima semana de pós-operatório. Presença axônios mielinizados (setas) e discreta degeneração walleriana (grau I). Tricrômico de Masson, obj. 40x.

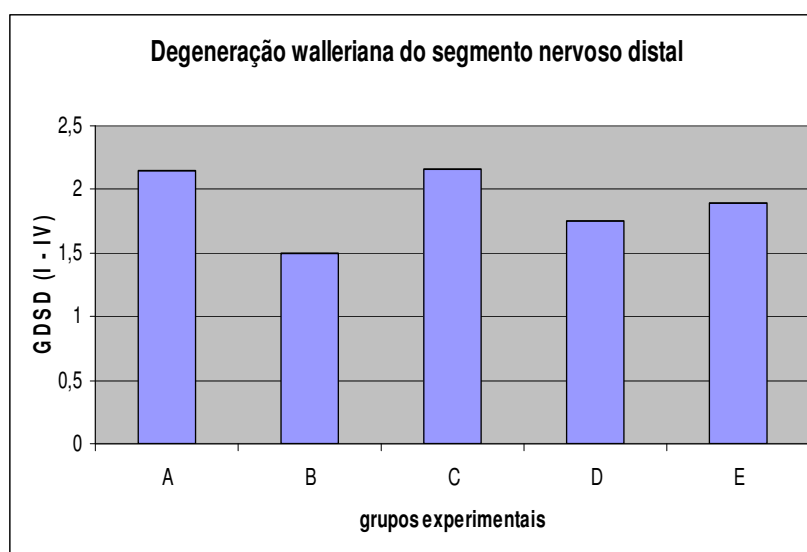


Figura 19. Representação gráfica do grau de degeneração walleriana do segmento distal (GDSD), escala de I a IV, dos grupos experimentais. A: grupo controle, B: grupo Catuama 100mg, C: grupo Catuama 200mg, D: grupo Catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

Os segmentos nervosos proximais apresentaram à microscopia óptica de luz, em corte transversal, aspecto típico de um nervo periférico, constituído por vários fascículos, cada um com muitas fibras nervosas (figuras 20 e 21). O epineuro do feixe nervoso e o perineuro de cada fascículo apresentaram-se característicos. Observou-se ainda, fibras nervosas em espessuras diferentes, com revestimento mielínico e morfologia muito próxima do normal (figura 20). A mielina ficou muito bem evidenciada na cor vermelha pelo TM.

O único animal que formou cabo de regeneração entre os segmentos nervosos e teve resposta negativa ao estímulo elétrico, apresentou grande quantidade de tecido conjuntivo e poucos axônios mielinizados no cabo de regeneração. Apresentou ainda, grau IV de degeneração do segmento distal, compatível com o grau de degeneração dos ratos Wistar que não formaram cabo de regeneração entre os segmentos nervosos.



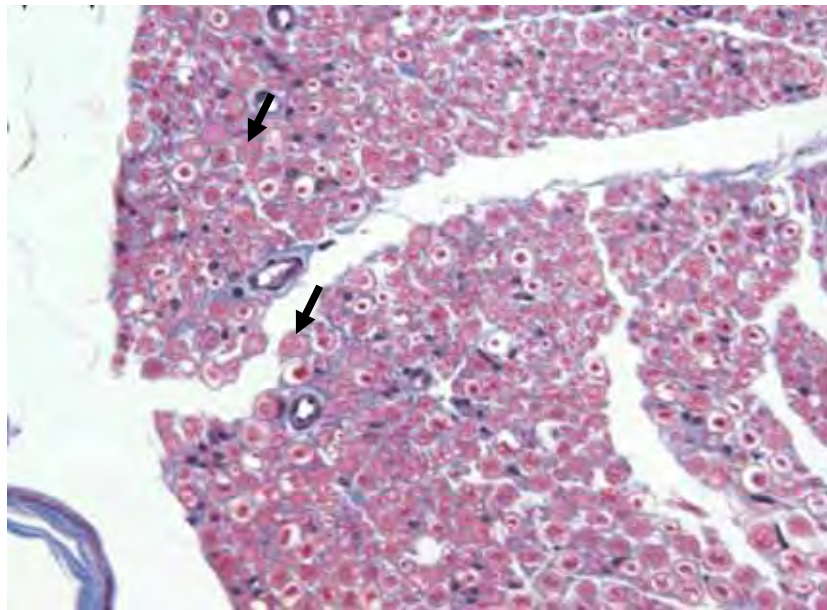


Figura 20. Aspecto microscópico de corte transversal do segmento proximal do nervo isquiático direito. Presença de fibras nervosas mielínicas (setas) com diferentes diâmetros. Tricrômico de Masson, obj. 40 x.

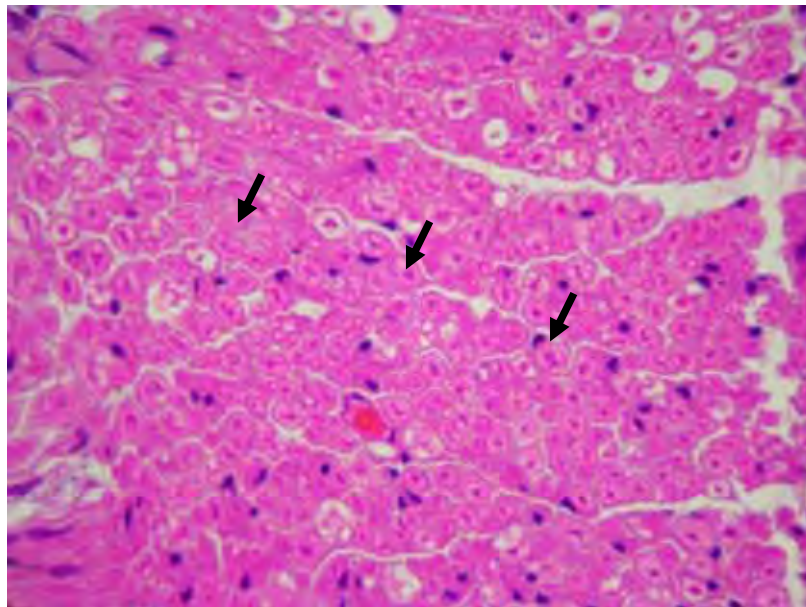


Figura 21. Aspecto microscópico de corte transversal do segmento proximal do nervo isquiático direito de rato do grupo E que apresentou formação de cabo de regeneração à décima semana de pós-operatório. Presença de fibras nervosas mielínicas (setas) com diferentes diâmetros. Hematoxilina e Eosina, obj. 100 x.



O grau de atrofia do músculo gastrocnêmio, que está diretamente relacionado ao processo de denervação do músculo pelo nervo isquiático foi avaliado numa escala de I a III, sendo I atrofia muscular leve; grau II atrofia muscular moderada e grau III atrofia muscular severa (Figura 22). Na figura 23 podemos observar as fibras musculares do músculo gastrocnêmio do antímero esquerdo, não operado. As fibras musculares apresentam-se bem delimitadas mantendo sua morfologia normal. Na figura 24 do antímero direito (operado) do mesmo animal, apresenta atrofia muscular visível com perda da arquitetura das fibras musculares e núcleos aglomerados. Os resultados encontrados não demonstram diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais.

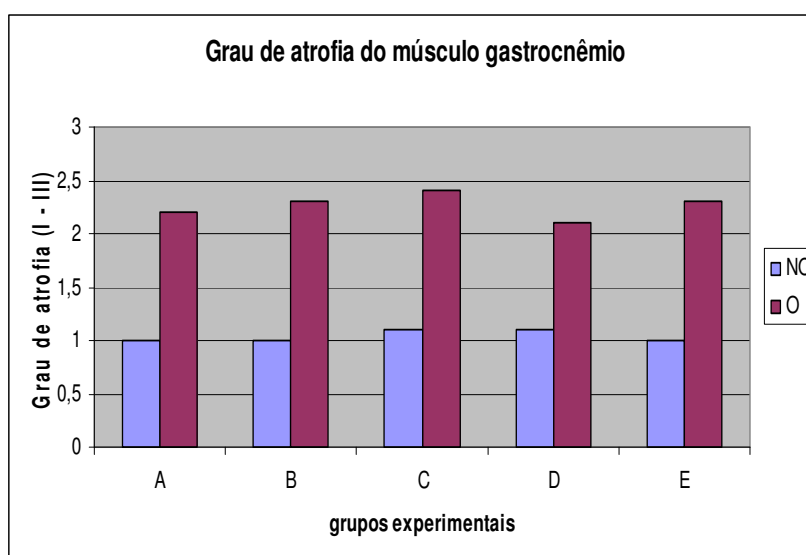


Figura 22. Representação gráfica do grau de atrofia (escala de I a III) do músculo gastrocnêmio de rato Wistar para os antímeros não operados (NO) e operados (O). A: grupo controle, B: grupo catuama 100mg, C: grupo catuama 200mg, D: grupo catuama 400mg e E: grupo bilobalide.

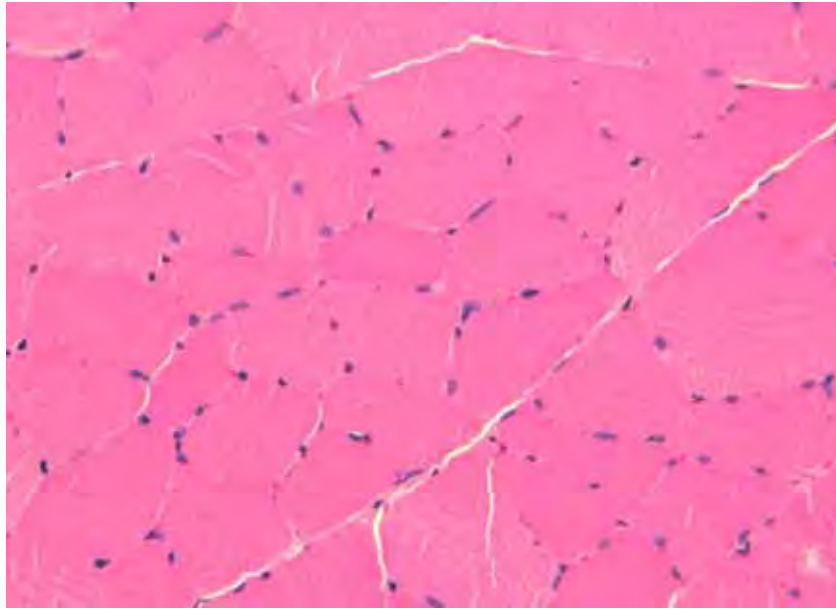


Figura 23. Aspecto microscópico de corte transversal do músculo gastrocnêmio do membro não operado de rato Wistar do grupo D (catuama 400mg) na décima semana de pós-operatório. Observar as fibras musculares bem delimitadas. Hematoxilina e Eosina, obj. 40x.

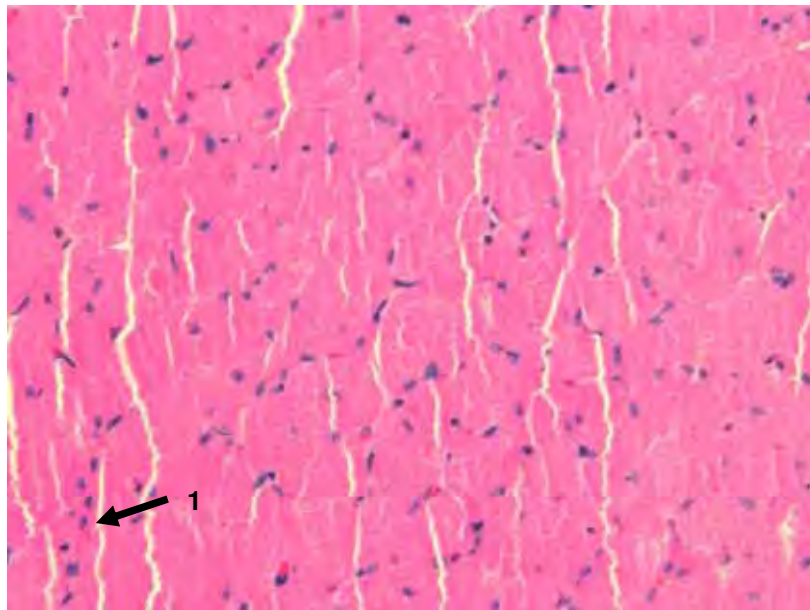


Figura 24. Aspecto microscópico de corte transversal do músculo gastrocnêmio do membro operado de rato Wistar do grupo D (catuama 400mg) na décima semana de pós-operatório. Presença de atrofia muscular grau III, com diminuição das fibras musculares e agrupamento de núcleos (1). Hematoxilina e Eosina, obj. 40x.

## 6. DISCUSSÃO

A regeneração nervosa periférica é um assunto amplamente estudado por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo. A recuperação funcional de um nervo lesado continua sendo um desafio na clínica das diferentes espécies. A reparação cirúrgica dos segmentos nervosos por suturas ou enxertos foram as primeiras formas encontradas para tentar promover a recuperação de um segmento nervoso lesado. Com o desenvolvimento destas técnicas foi possível comprovar que os nervos espinhais diferentemente do sistema nervoso central tinham capacidade de regeneração com retorno funcional.

Todavia o desenvolvimento de técnicas utilizadas para a aposição dos segmentos nervosos ou orientação axonal ainda eram insuficientes para obtenção de sucesso em diferentes condições clínicas. Isso levou ao estudo dos fatores envolvidos no processo de regeneração axonal e em formas de interferir de forma positiva no desenvolvimento da reparação, facilitando e acelerando esse processo.

A hipótese avaliada foi a potencial ação neuro-protetora da catuama no SNP e sua interferência no processo de regeneração nervosa periférica.

Para estudar a ação da catuama na reparação nervosa periférica escolhemos um modelo de lesão do nervo isquiático seguida de reparação com tubo de silicone. O tubo de silicone é amplamente utilizado por diversos autores (DIAZ-FLORES et al., 1995; CHEN et al., 2000; CHEN et al., 2001a; CHEN et al., 2001b; CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2005; DELISTOIANOV et al., 2008) por apresentar vantagens como ser inerte, translúcido e de fácil aquisição e apresentou-se muito adequado ao desenvolvimento deste trabalho.

CHEN et al. (2004) demonstraram o efeito positivo do bilobalide, extraído da folha do *G. biloba*, promovendo a reparação do nervo isquiático de ratos seccionados e suturados em tubos de silicone preenchidos por colágeno.

O modelo experimental escolhido e o número de animais selecionados apresentaram-se adequados para a avaliação da regeneração nervosa periférica. A espécie escolhida tem sido utilizada amplamente no estudo da reparação de injúrias nervosas (AKASSOGLU et al. 2003; BROWN et al. 1991; BAIN et al., 1989; DE MEDINACELI et al., 1982) por apresentar, entre outras características, manejo fácil e um intervalo relativamente pequeno para reparação nervosa periférica quando

comparado a outras espécies como o cão (STOPIGLIA, 1992) e o eqüino (DELISTOIANOV et al., 2008).

A técnica de implante de tubo de silicone, assim como as técnicas que exigem manipulação cirúrgica de nervos, tem como limitação o desenvolvimento de habilidades específicas do cirurgião. O treinamento em microcirurgia demandou tempo e precedeu o início dos procedimentos cirúrgicos nos grupos experimentais. No início tentou-se utilizar uma lupa com aumento de 4x, semelhante ao utilizado em cães por STOPIGLIA (1992). Entretanto, o aumento era insuficiente para a confecção adequada da sutura perineural ao tubo de silicone. Passou-se a utilizar microscópio cirúrgico com aumento de 16x. A mudança do aumento facilitou a manipulação dos segmentos nervosos permitindo a confecção de uma sutura de melhor qualidade e causando menor dano aos segmentos nervosos.

A escolha da via intramuscular como via de administração dos anestésicos, que foi realizada no membro não operado, levou alguns animais à claudicação no pós-operatório. Estes animais tiveram que ser excluídos da avaliação funcional. O que indica que a via intramuscular não foi adequada para animais que serão submetidos ao teste de marcha. A via intra-peritoneal é uma alternativa viável para estes casos.

Os grupos experimentais foram divididos para comparar o desempenho de três diferentes doses de catuama com a dose de bilobalide que obteve melhor resultado no experimento de CHEN et al. (2004). A divisão dos grupos experimentais foi satisfatória e permitiu adequada comparação entre os grupos.

Os achados encontrados na avaliação pelo teste da função do nervo isquiático foram compatíveis com os encontrados por MONTE-RASO et al. (2008). Nas primeiras semanas de avaliação as pegadas analisadas tinham qualidade ruim, entretanto nas avaliações seguintes a análise das pegadas foi realizada com mais facilidade. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo examinador, que não conhecia a origem dos grupos.

Os achados do teste de função do isquiático também foram semelhantes aos achados histológicos, histomorfométricos e eletrofisiológicos. Indicando sua viabilidade de execução e fidedignidade de resultados compatível com os achados de MONTE-RASO et al. (2008).

A avaliação eletrofisiológica foi satisfatória para a avaliação. Apesar de ser apenas qualitativa dando como resultado apenas positivo e negativo e não quantitativa, com mensuração do potencial evocado, eletroneuromiografia como utilizado por outros autores (LABRADOR et al., 1998; MURAKAMI et al., 2003; IKEGUCHI et al., 2006). Todos os animais que apresentaram formação de cabo de regeneração, exceto um, apresentaram reação positiva ao estímulo elétrico. Isso indica que às dez semanas de pós-operatórios os cabos de regeneração formados, exceto um, apresentavam retorno da capacidade de condução do potencial de ação suficiente para gerar contração muscular.

A análise das biopsias nervosas demonstrou que o período de 10 semanas foi suficiente para formação de um cabo de regeneração com presença de grande quantidade de axônios mielinizados e em processo de mielinização. Estes achados são compatíveis com o retorno da capacidade de transmissão do estímulo elétrico e contração muscular e com a melhora da qualidade da passada no teste de função do isquiático, observado em todos os grupos experimentais.

O grupo bilobalide apresentou uma porcentagem de formação de cabo de regeneração de 88,89% com um intervalo entre os segmentos de 10mm não apresentando diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle que obteve 80% de formação. CHEN et al. (2004) obtiveram 50% de formação de cabo de regeneração quando utilizando a mesma dose de 200 $\mu$ g mas com um intervalo entre os cotos de 15mm num período de oito semanas. No referido experimento a porcentagem de formação do cabo de regeneração do grupo controle foi de apenas 10%. O tamanho do intervalo entre os segmentos nervosos e o tempo de observação pós-operatória pode ter sido responsável pela divergência entre os resultados encontrados nos dois experimentos. Talvez o efeito benéfico do bilobalide tenha ficado evidente no modelo de CHEN et al. (2004) por haver um intervalo maior entre segmentos nervosos.

O efeito benéfico do bilobalide pôde ser demonstrado por CHEN *et al.* 2004 em condições de maior adversidade à regeneração. Assim, a hipótese da catuama e seus componentes ter ação sobre o processo de regeneração nervosa periférica assim como tem ação no sistema nervoso central (CAMPOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005), talvez possa ser demonstrada por modelos experimentais que aumentem o desafio à reparação nervosa periférica por meio de intervalos mais longos entre os segmentos nervosos.

A catuama e o bilobalide podem ter apresentado algum efeito nas fases iniciais da reparação nervosa durante as primeiras semanas de pós-operatório. Todavia este possível efeito só foi analisado pela avaliação funcional, que apresenta baixa confiabilidade como demonstrado por MONTE-RASO et al. (2008) justamente nas primeiras semanas após a cirurgia. Uma proposta para a avaliação deste possível efeito seria aumentar os grupos experimentais fazendo a análise histológica e histomorfométricas destes novos grupos durante as primeiras semanas de pós-operatório.

## **7. CONCLUSÕES**

O modelo experimental escolhido é adequado para o estudo da regeneração nervosa periférica.

A catuama, em diferentes doses, e o bilobalide não demonstraram efeito sobre a regeneração nervosa periférica nas condições experimentais.

## 8. REFERÊNCIAS

ABREU, A.A.N.; WEI, T.H.; ZUMIOTTI, A.V. Avaliação dos gangliosídios na regeneração nervosa em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n. 1/2, p. 39-44, 2002.

AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo Biloba extract for Alzhewimer's disease. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, supl. 1, p. 8-14, 2003.

AKASSOGLU, K.; AKPINAR, P.; MURRAY, S.; STRICKLAND, S. Fibrin is a regulation of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. **Neuroscience Letters**, v. 338, p. 185-188, 2003.

ALTMAN, R.D.; MARCUSSEN, K.C. Effects of a ginger extract on knee pain patients with osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 11, p. 2531-2538, 2001.

ARIAS, M.V.B.; BRACARENSE, A.P.F.L.; STOPIGLIA, A.J. Avulsão do plexo braquial em cães – 2. Biópsia fascicular e histologia dos nervos radial, mediano, ulnar e musculocutâneo. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 81-85, 1997.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, R.T. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, p.129-136, 1989.

BARBOSA, N.R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuama extracts suggests antiinflammatory properties. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 11, p. 942-944, 2004.

BELKAS, J.S.; SHOICHET, M.S.; MIDHA, R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. **Neurological Research**, v. 26, n. 2, p. 151-160, 2004.



BINI, T.B.; GAO, S.; XU, X.; WANG, S.; RAMAKRISHNA, S.; G, K.W. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 68A, n. 2, p. 286-295, 2004.

BROWN, C.J.; EVANE, P.J.; MACKINNON, S.E.; BAIN, J.R.; MAKINO, A.P.; HUNTER, D.A.; HARE, G. Inter- and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. **Microsurgery**, v.12, p.76-79, 1991.

BRUNO, C.; CUPPINI, R.; SARTINI, S.; CECCHINI, T.; AMBROGINI, P.; BOMBARDELLI, E. Regeneration of motor nerves in bilobalide-treated rats. **Planta Medica**, v. 59, n. 4, p. 302-307, 1993.

BYDLOWSKI, S.P.; D'AMICO, E.A.; CHAMONE, D.A. An aqueous extract of guarana (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 4, p. 421-424, 1991.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.; SANTOS, F.A., RAO, V.S. Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; BORTOLANZA, L.B.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 757-764, 2004.

CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 1, p. 1-9, 2005.

CHAMBERLAIN, L.J.; YANNAS, I.V.; ARRIZABALAGA, A.; HSU, H.P.; NORREGAARD, T.V.; SPECTOR, M. Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: Myofibroblasts and the cellular response. **Biomaterials**, v. 19, p. 1393-1403, 1998a.

CHAMBERLAIN, L.J.; YANNAS, I.V.; HSU, H.P.; STRICHARTZ, G.; SPECTOR, M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. **Experimental Neurology**, v. 154, n. 2, p. 315-329, 1998b.

CHAMBERLAIN, L.J.; YANNAS, I.V.; HSU, H.P.; SPECTOR, M. Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: the role of myofibroblasts. **Journal of Comparative Neurology**, v. 417, n. 4, p. 415-430, 2000.

CHANDRASEKARAN, K.; MEHRABIAN, Z.; SPINNEWYN, B.; CHINOPOULOS, C.; DRIEU, K.; FISKUM, G. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in global brain ischemia and excitotoxicity-induced neuronal death. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, suppl. 1, p. S89-94, 2003.

CHEN, Y.S.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CHEN, T.H.; CHENG, W.C.; HU, C.L.; YAO, C.H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, v. 21, n. 15, p. 1541-1547, 2000.

CHEN, Y.S.; YAO, C.H.; CHEN, T.H.; LIN, J.G.; HSIEH, C.L.; LIN, C.C.; LAO, C.J.; TSAI, C.C. Effect of acupuncture stimulation on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 377-385, 2001a.

CHEN, Y.S.; CHENG, W.C.; YAO, C.H.; HSIEH, C.L.; LIN, J.G.; LAI, T.Y.; LIN, C.C.; TSAI, C.C. Effects of buyang huanwu decoction on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 423-432, 2001b.

CHEN, Y.S.; WU, C.H.; YAO,C.H.; CHEN, C.T. Ginsenoside Rb1 enhances peripheral nerve regeneration across wide gaps in silicone rubber chambers. **International Journal of Artificial Organs**, v. 25, n. 11, p. 1103-1108, 2002.

CHEN, Y.S.; LIU, CJ; CHENG, C.Y.; YAO,C.H. Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 25, p. 509-514, 2004.

CHEN, Y.S.; HSU, S.F., CHUI, C.W.; LIN, J.G.; CHEN, C.T.; YAO, C.H. Effects of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2005.

CHOI, B.H.; ZHU, S.J.; KIM, B.Y.; HUH, J.Y.; LEE, S.H.; JUNG, J.H. Transplantation of culture bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 34, p. 537-542, 2005.

CHUI, D.T. The development of autogenous venous nerve conduit as a clinical entity. **P&S Medical Review**, v. 3, n. 1, 1995.

CONTESINI, E.A.; WITZ, M.I.; PIPPI, N.L.; GRAÇA, D.L. Avaliação clínico-morfológica da regeneração nervosa periférica mediante alinhamento por tubo de silicone em caninos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 1, p. 65-71, 1992.

DA-SILVA, C.F. Tubos sintéticos para a regeneração de nervos. **Ciência Hoje**, v. 16, n. 4, p. 85-86, 1993.

DA SILVA, A.L.; PIATO, A.L.S.; BARDINI, S.; NETTO, C.A.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 199-203, 2004.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, p. 634-643, 1982.

DEFEUDIS, F.V. Bilobalide and neuroprotection. **Pharmacology Research**, v. 46, n. 6, p. 565-568, 2002.

DELISTOIANOV, N.; PEREIRA, R.N.; DI FILIPPO, P.A.; DÓRIA, R.G.S.; ALESSI, A.C. Implante de tubo de silicone com e sem colágeno na regeneração de nervos de eqüinos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. (prelo) 2008.

DEZAWA, M.; TAKAHASHI, I.; ESAKI, M.; TAKANO, M.; SAWADA, H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 1771-1776, 2001.

DIAZ-FLORES, L.; GUTIERREZ, R.; VARELA, H.; EVORA, P.; VALLADARES, F., RODRIGUES, M.; RANCEL, N.; ALVAREZ-ARGUELLES, H. Contribution of the proximal and distal nerve stumps to peripheral nerve regeneration in silicone chambers. **Histology and Histopathology**, v. 10, n.4, p. 937-946, 1995.

DUCKER, T.B.; HAYNES, G.J. Experimental improvements in the use silastic cuff for peripheral nerve repair. **Journal of Neurosurgery**, v.28, p. 582-587, 1968.

ESPINOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223-229, 1997.

FIELDS, R.D.; LE BEAU, J.M.; LONGO, F.M.; ELLISMAN, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progress in Neurobiology**, v. 33, n. 2, p. 87-134, 1989.

FINE, E.G.; DECOSTERD, I.; PAPALOIZOS, M.; ZURN, A.D.; AEBISCHER, P. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 589-601, 2002.

GALLA, T.J.; VEDECNIK, S.V.; HALBGEWACHS, J.; STEINMANN, S.; FRIEDRICH, C.; STARK, G.B. Fibrin/Schwann cell matrix in poly-epsilon-caprolactone conduits enhance guided nerve regeneration. **International Journal of Artificial Organs**, v. 27, n. 2, p. 127-136, 2004.

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, n. 4, p. 236-250, 2003.

GUTMANN, E.; GUTMANN, L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesion. **Journal of Neurology and Psychiatry**, v. 5, p. 117-129, 1942.

HAINES, D.E. Degeneration and regeneration of nerve tissue. In: JENKINS, T.W. **Functional mammalian neuroanatomy**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1972 cap. 8, p. 118-128.

HARLEY, B.A.; SPILKER, M.H.; WU, J.W.; ASANO, K.; HSU, H.P.; SPECTOR, M.; YANNAS, I.V. Optimal degradation rate for collagen chambers used for regeneration of peripheral nerve over long gaps. **Cells Tissues Organs**, v. 176, n. 1-3, p. 153-165, 2004.

HSU, S.H.; CHANG J.C.; TANG, C.M.; LIN, F.T. In vitro and in vivo effects of *Ginkgo biloba* extract Egb 761 on seeded Schwann cells within poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 19, n. 2, p. 163-182, 2004.

IKEGUCHI, R.; KAKINOKI, R.; MATSUMOTO, T.; YAMAKAWA, T.; NAKAYAMA, K.; MORIMOTO, Y.; TSUJI, H.; ISHIKAWA, J.; NAKAMURA, T. Basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in C<sup>-</sup>ion-implanted silicon chamber. **Brain Research**, v. 1090, n. 1, p. 51-57, 2006.

KALBERMATTEN, D.F.; KINGHAM, P.J.; MAHAY, D.; MANTOVANI, C.; PETTERSSON, J.; RAFFOUL, W.; BALCIN, H.; PIERER, G.; TERENCEHI, G. Fibrin matrix for suspension of regenerative cells in an artificial nerve conduit. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, xx (article in press), 1 - 7, 2008.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with **Panax ginseng**. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 401-411, 2004.

KIM, B.S.; YOO, J.J.; ATALA, A. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 68A, n. 2, p. 201-209, 2004.

LABRADOR, R.O.; BUTI, M.; NAVARRO, X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. **Experimental Neurology**, v. 149, n. 1, p. 243-252, 1998.

LEWIN-KOWALIC, J.; MARCOL, W.; KOTULSKA, K.; MANDERA, M.; KLIMCZAK, A. Prevention and management of painful neuroma. **Neurology Medicine Chir**, v. 46, n. 2, p. 62-68, 2006.

MASUDA, Y.; KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; NAKATANI, N. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. **Biofactors**, v. 21, n. 1-4, p. 293-296, 2004.

MONTE-RASO, V.V.; BARBIERI, C.H.; MAZER, N.; YAMASITA, A.C. Is the sciatic functional index reliable and reproducible. **Journal of Neuroscience Methods**, v.170, p. 255-261, 2008.

MOSAHEBI, A.; FULLER, P.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v. 173, n. 2, p. 213-223, 2002.

MLIGILICHE, N.L.; ENDO, K.; OKAMOTO, K.; FUJIMOTO, E.; IDE, C. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n. 5, p. 591-600, 2002.

MLIGILICHE, N.L.; TABATA, Y.; KITADA, M.; ENDOH, K.; FUJIMOTO, E.; IDE, C. Poly lactic acid-caprolactone copolymer tube with a denatured skeletal muscle segment inside as a guide for peripheral nerve regeneration: a morphological and electrophysiological evaluation of the regenerated nerves. **Anatomical Science International**, v. 78, n. 3, p.156-161, 2003.

MURAKAMI, T.; FUGIMOTO, Y.; YASUNAGA, Y.; ISHIDA, O.; TANAKA, N.; IKUTA, Y.; OCHI, M.; Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. **Brain Research**, v. 974, n. 1-2, p. 17-24, 2003.

OH, S.H.; KIM, J.H.; SONG, K.S.Ç JEON, B.H.; YOON, J.H.; SEO, T.B.; NAMGUNG, U.; LEE, I.W.; LEE, J.H. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, xx (article in press), 1-7, 2007.

OHTA, M.; SUZUKI, Y.; CHOU, H.; ISHIKAWA, N.; SUZUKI, S.; TANIHARA, M.; MIZUSHIMA, Y.; DEZAWA, M.; IDE, C. Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71A, n. 4, p. 661-668, 2004.

OLIVEIRA, C.H.; MORAES, M.E., MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.; ABID, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of na herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 1, p. 54-57, 2005.

OZAY, R.; BEKAR, A.; KOCAELI, H.; KARL, N.; FILIZ, G.; ULUS, H. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. **Surgical Neurology**, v. 68, p. 615– 622, 2007.

PENNA, S.C.; MEDEIROS, M.V.; AIMBIRE, F.S.; FARIA-NETO, H.C.; SERTIE, J.A.; LOPES-MARTINS, R.A. Anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on rat paw and skin edema. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 381-385, 2003.

PONTIERI, V.; NETO, A.S.; CAMARGO, A.F.F.; KOIKE, M.K.; VELASCO, I.T. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. **Journal of Electrocardiology**, v. 40, p. 534.e1–534.e8, 2007.

RISITANO, G.; CAVALLARO, G.; MERRINO, T.; COPPOLINO, S.; RUGGERI, F. Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein grafts in emergency hand reconstruction. **Chirurgie de la Main**, v. 21, n. 3, p.194-197, 2002.

RUMMLER, L.S.; GUPTA, R. Peripheral nerve repair: a review. **Current Opinion in Orthopaedics**, v. 15, p. 215-219, 2004.

SCHMALENBERG, K.E.; UHRICH; K.E. Micropatterned polymer substrate control alignment of proliferating cells to direct neuronal regeneration. **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1423-1430, 2005.

SHEN, C.L.; HONG, K.J.; KIM, S.W. Effects of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on decreasing the production of inflammatory Effects of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) on decreasing the production of inflammatory mediators in sow osteoarthrotic cartilage explants. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 323-328, 2003.



SIERPINSK, P.; GARRETT, J.; MAB, J.; APEL, P.; KLORIG, D.; SMITH, T.; KOMAN, L.A.; ATALA, A; DYKE, M.V. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. **Biomaterials**, v. 29, p. 118–128, 2008.

SIQUEIRA, I.R.; FOCHESTATTO, C.; DA SILVA, A.L.; NUNES, D.S.; BATTASTINI, A.M.; NETTO, C.A.; ELISABETSKY, E. *Ptychopetalum olacoides*, a tradicional Amazonian “nerve tonic”, possesses anticholinesterase activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 645-650, 2003.

SIQUEIRA, Y.R.; CIMAROSTI, H.; FOCHESTATTO, C.; NUNES, D.S.; SALBEGO, C.; ELISABETSKY, E; NETTO, C.A. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Betham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sciences*, v. 75, p. 1897-1906, 2004.

STOPIGLIA, A.J. **Estudo experimental comparativo da regeneração nervosa com o emprego de uto-enxerto a fresco e de tubo de silicone na reparação cirúrgica de falhas do nervo ulnar de cão (*Canis familiaris*)**. 1992. 116 f. Tese (Livre Docência em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

SWAIM, S.F. Peripheral nerves. In: ARCHIBALD, J. **Canine Surgery**. Santa Bárbara: American Veterinary Publications, 1974. cap. 21, p. 899-908.

THOMPSON, D.M.; BUETTNER, H.M. Oriented Schwann cells monolayers for directed neurite outgrowth. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 8, p. 1120-1130, 2004.

THOMSON, M.; AL-QATTAN, K.K.; AL-SAWAN, S.M.; ALNAQEEB, M.A.; KHAN, I.; ALI, M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 6, p. 475-478, 2002.

VAZ, Z.R.; MATA, L.V.; CALIXTO, J.B. Analgesic effect of herbal medicine Ctuama in thermal and chemical models of nociception in mice. **Phytotherapy Research**, v. 11. n. 2, p. 101-106, 1997.

YUAN, Y.; ZHANG, P.; YANG, Y.; WANG, X.; GU, X. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p.4273-4278, 2004.

ZHANG, J.; LINEAWEAVER, W.C.; OSWALD, T.; CHEN, Z.; ZHANG, F. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 20, n . 4, p. 323-327, 2004.