

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMPLANTE DE TUBO DE SILICONE COM E SEM COLÁGENO
NA REGENERAÇÃO DE NERVOS DE EQÜINOS

Nádia Delistoianov
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMPLANTE DE TUBO DE SILICONE COM E SEM COLÁGENO
NA REGENERAÇÃO DE NERVOS DE EQÜINOS

Nádia Delistoianov

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NÁDIA DELISTOIANOV – nascida em 07 de abril de 1977 em Colina – SP. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade de Marília – Unimar, Câmpus de Marília, em dezembro de 1999. Ingressou no curso de Mestrado, em março de 2002 pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal e em novembro de 2003 obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária. Ingressou no curso de Doutorado, em março de 2004 pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal e em dezembro de 2007 obteve o título de Doutora em Cirurgia Veterinária.

Palco da vida

Você pode ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não se esqueça de que sua vida é a maior empresa do mundo. E você pode evitar que ela vá a falência. Há muitas pessoas que precisam, admiram e torcem por você. Gostaria que você sempre se lembrasse de que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções. Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros....

Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história....

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um de nós. É ter maturidade para falar “eu errei”. É ter ousadia para dizer “me perdoe”. É ter sensibilidade para expressar “eu preciso de você”. É ter capacidade de dizer “eu te amo”. É ter humildade da receptividade....

Desejo que a vida se torne um canteiro de oportunidades para você ser feliz.... E, quando você errar o caminho recomece. Pois assim você descobrirá que ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância; usar as perdas para refinar a paciência; usar as falhas para lapidar o prazer; usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.....

Jamais desista de si mesmo. Jamais desista das pessoas que você ama. Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um espetáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário....

Pedras no caminho? Aprendo com todas, um dia vou construir um castelo....

Fernando Pessoa

A Deus pelas oportunidades concedidas a minha vida pessoal e profissional.

Aos meus pais João Delistoianov e Maria Antonieta Coletto Delistoianov pelo apoio, amor, dedicação e torcida por mais uma importante vitória da minha vida.

Às minhas irmãs Fernanda e Cristiane que tanto amo e torcem por mim.

Aos meus sobrinhos Julia e João Lucas pela alegria trazida desde os seus nascimentos.

À minha madrinha Tereza e padrinho José Mário pelo apoio.

Ao meu namorado Orlando Candeloro Neto por fazer parte da minha vida.

Ao meu avô Germano (in memoriam), o qual não conheci, mas que herdei a adoração por cavalos.

Ao meu avô Pedro e avós Maria (in memória) pela admiração.

Aos amigos Fabiana Di Simoni, Fernanda Martins, Marina Aleixo Geraldo Martins, Flávia Borsari, Aracele Alves, Marici Apparício Ferreira, Janaina Ferreira Guimarães, Alda Lúcia Ferreira da Silva, Fabiana Leoní, Thaís Girio, Mirela Jabur, Leonardo Pagnano, Afonso Carregarí Martins Filho, Saul Borsari Neto e Paulo Tosi pela amizade e companheirismo nos momentos de alegria e tristeza.

À Louise Martins Portella, Daniele Macedo, Roberta Ferro de Godoy e Patrícia Paiva Miguez, que não fazem mais parte do meu dia a dia, mas que moram no meu coração.

À Marília Candeloro e Geraldo Candeloro pela amizade, apoio e dedicação.

OFEREÇO.....

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, pela amizade, ensinamentos e oportunidade em mais uma etapa da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Delphim da Graça Macoris, pela amizade e atenção durante os anos de convivência e colaboração para a realização deste trabalho.

Às Prof^{as}. Márcia Machado, pelo apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos amigos pós-graduandos Rodrigo Norberto Pereira, Paula Alessandra Di Filippo, Renata Sampaio Gebara Dória, Paulo Canola e Aracele Alves, que contribuíram para a realização da parte experimental deste trabalho.

Aos residentes e funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgia e aos funcionários da Farmácia e Esterilização da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela colaboração durante a realização da parte experimental deste trabalho.

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

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

Ao Evandro e José Lima, pelo preparo e acompanhamento dos animais do experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, por ter me concedido à chance de realizar o Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À Fapesp, pelo auxílio à pesquisa (Proc. 04/06004-9).

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Preparo dos animais.....	18
3.3. Procedimento anestésico.....	18
3.4. Procedimento cirúrgico.....	19
3.5. Conduta pós-operatória.....	22
3.6. Exame físico do aparelho locomotor e teste de sensibilidade cutânea.....	22
3.7. Avaliação macroscópica e eletrofisiológica.....	23
3.8. Biópsias dos nervos e confecção das lâminas.....	24
3.9. Análise histologia.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Procedimento cirúrgico.....	25
4.2. Avaliação do estado clínico geral dos animais e exame físico do aparelho locomotor.....	25
4.3. Avaliação da recuperação sensitiva dos nervos ulnares e dos ramos cutâneos laterais dos 17° nervos torácicos.....	26
4.4. Avaliação macroscópica.....	28
4.5. Avaliação da recuperação motora dos nervos ulnares e dos ramos cutâneos laterais dos 17° nervos torácicos.....	31
4.6. Avaliação histológica.....	33
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Grupo I.....	GI
Grupo II.....	GII
Nervo ulnar.....	n.u
Nervos ulnares.....	nn.u
Ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico.....	n.t
Ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos.....	nn.t
Tricrômio de Masson.....	TM
Tubo de silicone com colágeno.....	TSC
Tubo de silicone sem colágeno.....	TS

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto macroscópico do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico (seta) durante o procedimento cirúrgico. Observar a exposição do nervo para secção e neurorrafia.....	20
Figura 2. Aspecto macroscópico da fixação parcial e secção completa dos cotos nervosos proximal (P) e distal (D) do nervo ulnar de eqüino antes da implantação no tubo de silicone.....	21
Figura 3. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia. Observar os cotos nervosos proximal (P) e distal (D) fixados no tubo de silicone com solução de colágeno.....	21
Figura 4. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de eqüino durante a realização da biópsia. Observar tecido conjuntivo parcialmente removido ao redor do tubo (seta). Tempo de evolução de 13 semanas.....	28
Figura 5. Aspecto macroscópico do nervo ulnar (1) de eqüino exposto para a retirada do tubo de silicone (2). Tempo de evolução de 26 semanas.....	29
Figura 6. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de eqüino após a retirada do tubo de silicone. Observar formato cilíndrico do cabo de regeneração (seta) formado entre os cotos proximal, à esquerda, e distal à direita. Tempo de evolução de 13 semanas.....	30
Figura 7. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de eqüino após a retirada do tubo de silicone. Observar formato cilíndrico do cabo de regeneração (seta) formado entre os cotos proximal, à direita, e distal à esquerda. Tempo de evolução de 26 semanas.....	30
Figura 8. Aspecto macroscópico do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico (seta) de eqüino no momento das estimulações elétricas dos segmentos nervosos. Tempo de evolução de 13 semanas.....	32
Figura 9. Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielínicas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.....	34

Figura 10.	Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielínicas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.....	34
Figura 11.	Aspecto microscópico do segmento proximal do ramo cutâneo lateral do 17° nervo torácico de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielínicas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.....	35
Figura 12.	Aspecto microscópico do segmento proximal do ramo cutâneo lateral do 17° nervo torácico de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielínicas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.....	35
Figura 13.	Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar forma afunilada do nervo na transição do limite com o tubo de silicone (1), fascículos em orientação paralela (2), epineuro (3) e perineuro (4) característicos. Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 4x.....	36
Figura 14.	Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fibras nervosas mielínicas em trajeto longitudinal (1). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.....	37
Figura 15.	Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fibras nervosas mielínicas em trajeto longitudinal (1). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.....	37
Figura 16.	Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículos com fibras nervosas mielínicas em trajeto longitudinal (1) e degeneração walleriana (2). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.....	38

- Figura 17. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de equino submetido à neurografia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x. 39
- Figura 18. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de equino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar grande quantidade de fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x..... 39
- Figura 19. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de equino submetido à neurografia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x. 40
- Figura 20. Aspecto microscópico de segmento distal do nervo ulnar de equino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar grande quantidade de fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x..... 40
- Figura 21. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de equino submetido à neurografia com tubo de silicone sem colágeno. Observar epineuro desenvolvido (1) em relação ao cabo de regeneração (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 4x..... 42
- Figura 22. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de equino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar limite (1) entre epineuro espesso (2) e fibras nervosas em regeneração (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 20x..... 42
- Figura 23. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico de equino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículos (1) delimitados por tecido conjuntivo (2) e com presença de fibras nervosas (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 20x... 43

Figura 24.	Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurografia com tubo de silicone sem colágeno. Observar a disposição das fibras nervosas mielínicas regeneradas em pequenos fascículos (1). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.....	43
Figura 25.	Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar a disposição das fibras nervosas mielínicas regeneradas em pequenos fascículos (1). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.....	44
Figura 26.	Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurografia com tubo de silicone sem colágeno. Observar a disposição das fibras nervosas mielínicas em orientação longitudinal paralela (1). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.....	45
Figura 27.	Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar a grande quantidade de fibras nervosas mielínicas em orientação longitudinal paralela (1). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.....	45
Figura 28.	Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurografia com tubo de silicone com colágeno. Observar infiltrado inflamatório difuso (1), próximo ao local de contato do feixe nervoso com o tubo de silicone (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 20x.....	46

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Reações positivas ao teste de pinçamento de pele em eqüinos submetidos a neurorrafia experimental com tubo de silicone sem colágeno (TS) ou tubo de silicone com colágeno (TSC). GI – período de observação de 13 semanas e GII, 26 semanas....	27
Tabela 2.	Respostas positivas a eletroneuroestimulação ao final do período experimental em eqüinos submetidos à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno (TS) ou tubo de silicone com colágeno (TSC). GI – período de observação de 13 semanas e GII, 26 semanas.....	32
Tabela 3.	Avaliação microscópica de nervos de eqüinos submetidos à neurorrafia experimental. Presença de fibras nervosas no cabo de regeneração interligando o coto proximal ao distal em eqüinos submetidos à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno (TS) ou tubo de silicone com colágeno (TSC). GI – período de observação de 13 semanas e GII, 26 semanas.....	41

IMPLANTE DE TUBO DE SILICONE COM E SEM COLÁGENO NA REGENERAÇÃO DE NERVOS DE EQUÍNOS

RESUMO – A reparação de nervos em seres humanos, em cães e em diversos animais de laboratório é bastante utilizada e tem indicações clínicas e experimentais. Em eqüinos, relata-se formação de neuromas e excessiva proliferação de tecido conjuntivo. O presente estudo teve o objetivo de acrescentar informações sobre o processo de regeneração de nervos periféricos em eqüinos por meio de implante de tubo de silicone preenchido ou não com colágeno. Para tanto foram utilizados oito eqüinos, alocados em dois grupos: GI – 13 semanas e GII – 26 semanas de observação. Foi realizada a fixação parcial dos nervos ulnares (nn.u) e dos ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos (nn.t) ao tubo de silicone, bilateralmente, seguido de secção completa e reparação, realizada em cada animal, alternando-se tubos de silicone vazios (TS), em um dos antímeros, e preenchidos com solução de colágeno (TSC), nos nervos contralaterais, deixando-se espaço de 5mm entre os cotos. Avaliaram-se os animais semanalmente pelo teste de sensibilidade cutânea da região inervada pelos respectivos nervos e exame físico do aparelho locomotor até o final do período de observação. Não foram observadas alterações no exame físico do aparelho locomotor e as primeiras reações positivas ao teste de sensibilidade cutânea nos nn.u e nos nn.t reparados com TS e TSC, foram observadas a partir da 9ª semana, em ambos os grupos. Ao final do período de observação, verificou-se, macroscopicamente, que os nervos encontravam-se envolvidos por tecido conjuntivo e o interior da câmara preenchido por tecido de coloração esbranquiçada, de forma cilíndrica, interligando os cotos proximal e distal. Microscopicamente, constatou-se a presença de axônios mielinizados interligando os cotos, células de Schwann e processo de remielinização do coto distal, principalmente nos nervos com TSC. Concluiu-se que o implante de tubo de silicone conduz a regeneração de nervos sem formação de neuromas, com reduzida proliferação conjuntiva e que a adição de colágeno promove aumento de fibras mielinizadas, possibilitando o modelo eqüino para reparação de nn.u e de nn.t.

Palavras-chave: regeneração de nervos, implante, tubo de silicone, colágeno, eqüino.

IMPLANT OF SILICONE TUBE WITH OR WITHOUT COLLAGEN IN NERVE REGENERATION OF HORSES

ABSTRACT – Nerve repair in humans, dogs and laboratory animals is widely utilized on clinical and experimental purposes. Neuroma and excessive conjunctive proliferation are reported in horses. The aim of the present study was to add information about the regeneration process utilizing implant of silicone tubes with or without collagen in nerve regeneration. Eight horses were allocated in two groups: GI – 13 weeks and GII – 26 weeks of observation. A complete section of the ulnar nerves (unn.) and of the lateral cutaneous branch of 17° thoracic nerves (tnn.), bilaterally, was followed by repair with silicone tubes filled (STF) or not with collagen (ST), with a 5mm gap between stumps. Alternates STF and ST were utilized in each animal. Clinical evaluation was made weekly, by cutaneous sensitivity testing of the region innervated by the operated nerves and physical examination of the thoracic limbs. No alterations were found in the locomotor apparatus. The first positive reactions to the cutaneous test occurred at the 9° week post surgical. At the end of the observation period it was verified, grossly, that the nerves were involved by conjunctive tissue and the lumen of the tube was filled by whitish tissue, in a cylindrical shape. The ends nerves were interconnected. Microscopically, myelinated axons and Schwann cells were present in the gap between the stumps. The distal nerve showed remyelination process. In the nerves with STF the process was more conspicuous. It was concluded that the implant of silicone tubes results in regeneration of nerves without formation of neuromas or excessive conjunctive proliferation. It was concluded also that the addition of collagen promotes an increase in the number of myelinated fibres and that there are possibilities to use the horse as a biological model for unn. and tnn. regeneration.

Key words: nerve regeneration, implant, silicone tube, collagen, horse.

1. INTRODUÇÃO

A reparação cirúrgica dos nervos periféricos constitui-se em casuística clínica comum e continua sendo um grande desafio para os cirurgiões e pesquisadores principalmente quanto aos resultados funcionais obtidos nessas reparações (GAMA et al., 2000; CHEN et al., 2006b; LI et al., 2006). O cirurgião que se propõe a tratar de lesões traumáticas dos nervos periféricos deve estar familiarizado tanto com as características anatômicas, macro e microscópicas, destes nervos e das estruturas que o envolvem, quanto com a fisiopatologia da lesão nervosa (COLLI, 2000).

Nos últimos anos, a reconstrução de nervos vem sendo realizada utilizando-se auto-enxertos. Entretanto, esta técnica apresenta dificuldades. Desta forma, pesquisas têm se concentrado na utilização de canais artificiais para a orientação do tecido em regeneração (ITOH et al., 1999; CHEN et al., 2000; CHEN et al., 2006a; CHEN et al., 2006b).

Investigações do nervo periférico seccionado e inserido em tubos têm sido realizadas experimental ou clinicamente, e analisadas por imunoistoquímica, histologia, eletrofisiologia ou neurologicamente, para evidenciar a regeneração ou as etapas referentes ao processo regenerativo (YANNAS; HILL, 2004).

Além disso, várias substâncias que promovam estímulo do crescimento axonal, tais como: fator de crescimento nervoso - NGF (SANTOS et al., 1999; XU et al., 2003); colágeno, laminina, ou fibronectina em gel (CHEN et al., 2000); fator de crescimento fibroblástico básico (IKEGUCHI et al., 2006); células do estroma da medula óssea (CHOI et al., 2005; CHEN et al., 2006b; CHEN et al., 2007a) entre outras, têm sido introduzidas no lúmen dos tubos, entre os cotos nervosos.

O colágeno, utilizado por vários autores entre os cotos nervosos, puro ou em associação com outras substâncias, atua como substrato para a migração e adesão de células de Schwann, para o crescimento regenerativo dos axônios e é amplamente utilizado em diversos modelos experimentais com bons resultados (SATO et al., 1986; DA-SILVA, 1993; LABRADOR et al., 1998; VERDU et al., 2002; MURAKAMI et al., 2003; PHILLIPS et al., 2005; CHENG et al., 2006; LEE et al., 2006).

O propósito da técnica de reparação nervosa é restabelecer a continuidade do tronco nervoso, para alcançar a recuperação funcional e reinervação dos órgãos finais (LIVINGSTONE; LUNDBORG, 1988; YANNAS; HILL, 2004).

O presente estudo teve o objetivo de acrescentar informações sobre o processo de regeneração de nervos periféricos em eqüinos por meio de implante de tubo de silicone preenchido ou não com colágeno. Para tanto, foram eleitos os nervos ulnares (nn.u) e os ramos cutâneos laterais dos 17° nervos torácicos (nn.t) para o emprego da técnica, presumivelmente por não haver déficit motor ou outras limitações ao animal em decorrência de suas secções. Ao mesmo tempo, verificaram-se efeitos clínicos, resposta ao teste de sensibilidade cutânea, resposta à eletroneuroestimulação, análise histológica e também avaliação dos nervos de eqüino como modelo experimental para o estudo da regeneração nervosa periférica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os nervos periféricos têm a capacidade de regenerar e restabelecer suas funções seguintes às lesões ou doenças. Entretanto, a regeneração é incompleta e a função raramente retorna ao estágio de pré-injúria (LEWIN-KOWALIK et al., 2006; VORIA et al., 2006). Vários modelos experimentais têm sido utilizados na tentativa de encontrar maneiras para melhorar a regeneração de nervos periféricos lesados e também para entender o mecanismo celular envolvido no crescimento axonal durante a regeneração (VORIA 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-alvos que, desempenham papéis importantes na regeneração de axônios. A caracterização do microambiente tem possibilitado antever uma abordagem mais farmacológica e menos mecanicista no reparo de nervos traumatizados (DA-SILVA, 1993).

Os avanços nas técnicas e no instrumental cirúrgico, trouxeram progressos que mudaram consideravelmente o prognóstico das lesões dos nervos periféricos nas últimas décadas (GAMA et al., 2000).

As lesões de nervos periféricos 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 periféricos raramente coloquem a vida em risco, as consequências podem ser graves se não forem tratadas adequadamente (CONTESINI et al., 1992).

Após o trauma em um nervo, originam-se dois segmentos ou cotos: um contendo axônios unidos aos corpos celulares dos neurônios e metabolicamente viáveis, chamado de coto proximal, e outro distal, apresentando fibras separadas de seus

corpos celulares de origem. As fibras nervosas do coto 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 coto distal entram em processo de degeneração e desaparecem, juntamente com suas bainhas de mielina, poucos dias após o trauma (DA-SILVA, 1993).

Quando um nervo é seccionado, ocorre degeneração walleriana do coto distal, enquanto no coto proximal a degeneração não é tão extensa, sendo chamada de degeneração traumática ou retrógrada. A degeneração walleriana progride em direção ao órgão efector ou sinapse. A degeneração retrógrada pode ser definida como o processo que progride a partir do ponto proximal a lesão, através do corpo celular contra o fluxo do axoplasma. A extensão da degeneração retrógrada é relativamente menor e depende do tipo de dano ao nervo (CONTESINI et al., 1992).

Após a compressão ou secção nervosa, todas as fibras distais à lesão, mielinizadas ou não, 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 (ARIAS et al., 1997).

As injúrias aos nervos periféricos, muitas vezes resultam em perda da função sensitiva e motora, freqüentemente seguidas por dor crônica (LIU et al., 2005). A reparação cirúrgica dos nervos periféricos constitui-se em casuística clínica comum e continua sendo um grande desafio para os cirurgiões e pesquisadores quanto aos resultados funcionais obtidos com a mesma (GAMA et al., 2000; BELLAMKONDA, 2006; CHEN et al., 2006b; LI et al., 2006).

Nos últimos anos, a reconstrução de nervos vem sendo realizada utilizando-se auto-enxertos. Entretanto, esta técnica apresenta dificuldades tais como: longo tempo cirúrgico, perda da função do nervo doado, disponibilidade limitada de nervos e a combinação inadequada do diâmetro e da organização fascicular entre o nervo lesado e o enxerto. Sendo assim, para evitar os danos provenientes da cirurgia, pesquisas têm se concentrado na utilização de canais artificiais ou de tubos para a orientação nervosa (ITOH et al., 1999; CHEN et al., 2006a; CHANG; HSU, 2006; CHEN et al., 2006b).

Os canais ou tubos proporcionam orientação aos axônios em regeneração, previnem o escape axonal para os tecidos circunjacentes e impedem a formação de neuromas; isolam o microambiente e possibilitam o acúmulo de fatores tróficos e de crescimento; reduzem a invasão de tecido conjuntivo entre os cotos; direcionam a vascularização longitudinal aos vasos intraneurais; promovem orientação longitudinal do tecido cicatricial e da bainha epineural; aumentam a precisão de aproximação dos cotos e reduzem a tensão sobre a linha de sutura (FIELDS et al., 1989; DANIELSSON et al., 1996; HANSSON; POVLSEN, 1997; LABRADOR et al., 1998; CHEN et al., 2000; CHANG; HSU 2006; CHEN et al., 2006a; HOU et al., 2006).

A técnica de tubulização para a reparação nervosa periférica, que consiste em posicionar os cotos de um nervo seccionado dentro de um tubo, permite também analisar a ação de substâncias exógenas estimuladoras da regeneração entre as extremidades de um nervo seccionado (GAMA et al., 2000).

O material ideal a ser empregado na técnica de tubulização deve apresentar características, tais como: ser inerte (biocompatível); ser translúcido, com paredes finas e flexíveis; inibir fibrose, edema, neuroma, isquemia e adesão; beneficiar os processos que contribuem para a regeneração como a vascularização e fatores que promovem o crescimento axonal (FIELDS et al., 1989).

Uma variedade de materiais tem sido desenvolvidos para o uso da técnica de tubulização: os de origem biológica - como artérias e veias, ou os sintéticos, como os copolímeros (LIVINGSTONE; LUNDBORG, 1988; CHEN et al., 2000; CHANG; HSU, 2006). Desses materiais, o tubo de silicone vem sendo usado clínica e experimentalmente por não causar modificação física no tecido, ser quimicamente

inerte, não ser carcinogênico, não causar reação alérgica ou de corpos estranhos e ter capacidade de resistência às forças mecânicas (KAFEJIAN et al., 1997). Este material tem como vantagem ser transparente, suficientemente rígido e de fácil manipulação cirúrgica (LIVINGSTONE; LUNDBORG, 1988; CHEN et al., 2000; DAHLIN et al., 2001).

Sendo assim, DANIELSSON et al. (1996) analisaram o crescimento axonal após injúria bilateral de nervos isquiáticos de ratos, utilizando tubos de silicone impermeáveis e permeáveis. A regeneração ocorreu nos dois casos, sendo mais pronunciada nos nervos com tubos impermeáveis, quando comparado aos tubos permeáveis e grupo controle. Ainda, DANIELSSON et al. (2001) utilizaram nesta mesma espécie, tubos de silicone (não absorvível) e tubos de ácido poliglicólico (absorvível) no nervo isquiático para estudo da regeneração do quarto ao 21º dia após a tubulização. Por meio de teste de reflexo sensorial e imunoistoquímica, concluíram que o crescimento do axônio sensorial foi maior quando utilizou-se tubo de silicone comparado ao de ácido poliglicólico.

Desde que DUCKER & HAYES (1968) utilizaram uma borracha comercialmente denominada "silastic", hoje conhecida como silicone, na reparação dos nervos radial e peroneal de cães e no nervo ulnar de chimpanzés, sabe-se da importância relevante que deve ser dada ao material utilizado na técnica de tubulização. Fatores como a espessura da parede do tubo; relação da área de secção transversa do tubo em relação à do nervo; comprimento e posicionamento do tubo, devem ser observados no momento da aplicação.

O mecanismo de reparação local das injúrias dos nervos periféricos é complexo. A tentativa de regeneração das fibras ocorre dentro do ambiente do tronco nervoso repleto de mediadores inflamatórios, tróficos, alteração microvascular e proliferação de elementos celulares. No estágio inicial, o desenvolvimento da inflamação após esmagamento ou secção, é importante para ajudar e promover a regeneração nervosa (CHANG; HSU, 2006).

Após a implantação, o tubo é preenchido, em 24 horas, por um fluido translúcido de cor amarelada (WILLIAMS et al., 1983; LONGO et al., 1984; WILLIAMS; VARON, 1985). Este fluido contém fatores neurotróficos (secretado por ambos os cotos) que

garantem a sobrevivência e o crescimento dos neurônios, e fatores que promovem a neurite (LUNDBORG et al., 1982b; LONGO et al., 1984; CHEN; LIU, 1994). Tais fatores são importantes para o desenvolvimento e regeneração do nervo, especificamente na promoção da adesão celular, diferenciação, proliferação, migração e crescimento axonal (CHEN et al., 2000).

Foi demonstrado que fatores neurotróficos, incluindo o fator de crescimento nervoso, produzido pelas células de Schwann do segmento distal, apresentam uma função importante na promoção da regeneração dos nervos periféricos (CHEN; LIU, 1994). Entretanto, concluiu-se que o coto nervoso distal exerce influência neurotrófica, que é essencial para a regeneração dos nervos periféricos seccionados (AEBISCHER et al., 1988).

A regeneração no processo de tubulização depende da formação inicial da matriz de fibrina interligando os cotos nervosos. A matriz de fibrina proporciona uma superfície para o crescimento de fibroblastos, células endoteliais e de Schwann que migram dos cotos nervosos proximais e distais. A fibrina é lisada em poucos dias por mecanismos endógenos e é substituída por fibrilas de colágeno orientadas longitudinalmente. Os axônios em regeneração crescem do coto nervoso proximal e são guiados pelas células de Schwann que invadiram o cabo conectivo intratubular e pelos fatores neurotróficos acumulados no fluido tubular. Os componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina, localizados na membrana basal e endoneuro do nervo periférico, são pressupostos fatores tróficos que guiam o prolongamento dos cones de crescimento *in vitro* e *in vivo* (LABRADOR et al., 1998; CEBALLOS et al., 1999). As moléculas da matriz extracelular são decisivas para a regeneração neural devido à sua interação com os neurônios e células da glia, exercendo função de colaboração quanto ao aparecimento da neurite, crescimento axonal e remielinização (RUMMLER; GUPTA, 2004).

A formação da matriz de fibrina inicial é importante para o sucesso da regeneração nervosa periférica através do espaço deixado entre os cotos, e a composição da matriz pode influenciar no tamanho e na extensão da subsequente regeneração (WILLIAMS et al., 1993). A formação da matriz também é dependente do

diâmetro interno da câmara. Em tubos de maiores diâmetros, a vascularização, a migração de células de Schwann e a progressão axonal são drasticamente retardadas, provavelmente devido à redução na concentração de fatores neurotróficos no seu interior (BUTI et al., 1996).

O crescimento e o direcionamento axonal, durante o processo de regeneração dos nervos periféricos, dependem basicamente das células da glia (LI et al., 2006). As células de Schwann, uma célula glial e de suporte do sistema nervoso periférico de mamíferos, são consideradas as principais células funcionais e estruturais, e desempenham uma função importante no processo de regeneração, exercendo efeito de direcionamento e neurotrófico sobre o crescimento axonal (SCHMALENBERG; UHRICH, 2005; CHEN et al., 2006b; LI et al., 2006). Quando a proliferação das células de Schwann não ocorre, o crescimento axonal é retardado e a formação de mielina é prejudicada. Na ausência das células de Schwann, os axônios não podem regenerar a uma distância significativa ao longo do interior da lâmina basal vazia (LE BEAU et al., 1988).

A reparação nervosa é a combinação do processo de crescimento axonal e de remielinização pelas células de Schwann. Após a injúria, as células de Schwann proliferantes migram junto com os axônios neoformados. A migração das células de Schwann depende da matriz extracelular (AKASSOGLU et al., 2003).

A vasculatura exerce papel importante no processo regenerativo por proporcionar nutrientes, oxigênio e outros fatores do sangue, necessários para a neurite e população celular que suporta a regeneração. A angiogênese, consiste na proliferação de capilares e formação de veias, e é componente importante da resposta regenerativa, especialmente naqueles casos onde o nervo foi seccionado e deve regenerar através do espaço deixado entre os cotos, dentro do tubo (PODHAJSKY; MYERS, 1994).

Apesar do ritmo de crescimento axonal e do retorno da função motora serem lentos, a regeneração ocorre em ritmo definido em algumas espécies. Parâmetros podem ser estabelecidos em relação à época do trauma ou da sutura, para se ter prognóstico do processo de reinervação (COLLI, 2000).

Segundo LE BEAU et al. (1988), a seqüência de eventos celulares durante a regeneração do nervo isquiático de ratos em tubos de silicone com espaço de 10mm entre os cotos, por um período de 28 dias, ocorreu da seguinte maneira: 1) zero - sete dias: migração de células para dentro do tubo, proveniente do nervo seccionado e proliferação das células de Schwann do coto distal; 2) sete - 14 dias: crescimento vascular, proliferação axonal e das células de Schwann do coto proximal em direção ao coto distal; 3) 14 - 21 dias: começo da mielinização na região regenerada do coto proximal; 4) 21 - 28 dias: espaço entre os cotos preenchido por axônios regenerados e remielinizados.

De acordo com CONTESINI et al. (1992), a regeneração dos nervos periféricos de cães demora de duas a quatro semanas até que os axônios possam crescer, alcançar e penetrar através da lesão ou linha de sutura. Depois que as fibras nervosas alcançam o coto distal, o processo cresce à velocidade determinada de 1,5mm por dia, existindo demora de uma semana a meses para alcançar o ponto terminal.

Por outro lado, COLLI (2000) relatou que em seres humanos há um intervalo de tempo antes dos axônios em regeneração alcançarem o coto distal ao local da lesão ou sutura. Este intervalo pode ser de duas semanas com axonotmese ou estender-se a quatro semanas após sutura. Uma vez no coto distal, os axônios em regeneração crescem a um ritmo de 1mm por dia. Há um intervalo final de semanas ou meses entre a chegada das fibras nervosas aos seus alvos e a maturação dos axônios. Um número adequado de axônios, com calibre e mielinização suficientes, é necessário para o retorno da função motora e sensitiva. Além disso, para os axônios em regeneração serem efetivos, estes devem chegar próximo ao seu local de destino.

O espaço deixado entre os cotos, dentro do tubo, tem mostrado ser o fator que mais influencia no processo regenerativo após a tubulização (LABRADOR et al., 1998). LUNDBORG et al. (1982a) concluíram que os axônios em regeneração do nervo isquiático de ratos foram capazes de regenerar no espaço deixado entre os cotos, caso esse afastamento fosse de 10mm ou menos, mas tal regeneração não ocorreu quando o espaço deixado foi de 15mm. Diferentemente, ASHUR et al. (1987) mensuraram o grau de regeneração do nervo isquiático de ratos por método eletrofisiológico, utilizando

vários procedimentos reparativos e obtiveram melhores resultados utilizando tubos de silicone com espaço de 5mm entre os cotos.

LAGO & NAVARRO (2006), por sua vez, fizeram esmagamento ou secção do nervo isquiático de ratos e repararam por meio de sutura direta, tubos de silicone ou de colágeno. Após 60 dias, a regeneração do nervo foi avaliada por testes funcionais, eletrofisiológicos, morfológicos e imunoistoquímica (marcação do axônio motor pela acetiltransferase - ChAT). A reparação com tubos e sutura direta resultaram em níveis similares de reinervação muscular. O número de fibras regeneradas mielinizadas e de fibras + ChAT foram similares aos valores controle após o esmagamento, mas aumentou após secção e reparação.

Na espécie canina, CONTESINI et al. (1992) realizaram excisão do segmento do ramo lateral do nervo radial superficial e repararam com tubos de silicone deixando um espaço de 10mm entre os cotos. Em cada animal foi feita biópsia do segmento nervoso lesado em tempos diferentes, sendo observada macro e microscopicamente a capacidade de regeneração do tecido nervoso periférico. STOPIGLIA (1992) avaliou a regeneração nervosa periférica por meio de reparação cirúrgica de falhas do nervo ulnar, com o emprego de auto-enxerto a fresco e tubo de silicone, deixando um espaço de 1cm entre os cotos. Os animais foram avaliados na 13ª e 26ª semanas após as cirurgias e apresentaram resultados favoráveis quanto a recuperação da função sensitiva e motora. Histologicamente, os nervos ulnares apresentaram evidente regeneração de fibras nervosas mielínicas, independente do tipo de sutura realizada e época de avaliação.

Em eqüinos, DELISTOIANOV et al. (2006) repararam o nervo digital palmar por meio de sutura epineural ou com tubo de silicone, sem deixar espaço entre os cotos. No exame histológico das biópsias coletadas aos 30, 60 e 180 dias após as cirurgias, foi observada a presença de neuromas; proliferação de tecido conjuntivo no local de reparação da sutura epineural, adentrando pelas extremidades e entre os cotos quando reparado com tubo de silicone; infiltrado de células inflamatórias; degeneração dos cotos distais e ausência de regeneração nervosa.

Em seres humanos, os cirurgiões têm empregado freqüentemente a técnica de tubulização na tentativa de restabelecer a recuperação funcional após injúria do tronco nervoso (YANNAS; HILL, 2004).

LUNDBORG et al. (1994) trataram o nervo mediano seccionado do pulso de duas mulheres utilizando tubos de silicone, deixando um espaço de 3 a 5mm entre os cotos. Durante três anos, foi realizada avaliação sensitiva e determinação da força de contração muscular. Em ambos os casos houve uma excelente recuperação motora e um rápido crescimento das fibras sensitivas, resultando numa sensibilidade funcional da mão quase normal. Em outro estudo, LUNDBORG et. al. (1997) repararam o nervo ulnar e mediano de seres humanos utilizando tubos de silicone com espaço de 3 a 4mm entre os cotos ou por meio de sutura epineural. Não houve diferenças quanto à recuperação da função sensitiva e motora entre as técnicas, com exceção da percepção do tato, o qual mostrou uma significativa diferença no terceiro mês de exame em favor da técnica de tubulização.

Com o objetivo de testar uma alternativa às microcirurgias reparadoras convencionais, DAHLIN et al. (2001) utilizaram tubos de silicone com espaço de 3 a 5mm entre os cotos no local de injúria do nervo mediano e ulnar de 16 seres humanos. Sete destes pacientes passaram por re-exploração entre o 12º e 44º mês após implantação devido a um desconforto causado pelo tubo. Foi observada nestes pacientes, uma estrutura formando uma ponte entre os cotos e uma fina cápsula ao redor do tubo de silicone que, conforme observado microscopicamente constituiu-se de tecido conjuntivo.

Para o axônio em crescimento atingir o coto distal, este deve passar pelo local de injúria, no qual, inúmeros fatores podem dificultar ou impedir a sua passagem. Estes fatores incluem: leucócitos, eritrócitos, macrófagos e fibroblastos (WEHLING et al., 1992). O tubo de silicone facilita a regeneração pela concentração de fatores neurotróficos e proporciona um canal para o crescimento orientado dos nervos. Por analogia, o tubo serve como um perineuro rígido e translúcido (PODHAJSKY; MYERS, 1994).

Nos últimos anos, uma variedade de substâncias interpostas entre os cotos dos nervos periféricos seccionados vêm sendo utilizadas, buscando modificar o microambiente interno, para acelerar a regeneração nervosa (GAMA et al., 2000; LIU et al., 2004; CHENG et al., 2006; LEE et al., 2006). Estas substâncias vêm sendo empregadas para estudo do crescimento axonal e tempo requerido para que os axônios do coto proximal atinjam o coto distal (CHEN et al., 2007b)

As substâncias utilizadas por vários autores, entre os cotos nervosos, para estimular o crescimento axonal incluem: fator de crescimento nervoso – NGF (DA-SILVA; LANGONE, 1989; DERBY et al., 1993; SANTOS et al., 1999; XU et al., 2003); colágeno em gel (SATO et al., 1986; CEBALLOS et al., 1999; LEE et al., 2006); laminina em gel e colágeno em gel (MADISON et al., 1988; LABRADOR et al., 1998; VERDU et al., 2002); colágeno e monogangliosídeos - GM1 (LAINETTI; DA-SILVA, 1993); esponja de colágeno com ou sem laminina (OHBAYASHI et al., 1996); poros específicos de copolímero de colágeno (CHAMBERLAIN et al., 1998); matriz de colágeno-glicosaminoglicanas (CHAMBERLAIN et al., 2000); gel contendo colágeno, laminina e fibronectina (CHEN et al., 2000); neuroquinas (GAMA et al., 2000); fibras colágenas e fibras de copolímeros de poli-L-lactato (ITOH et al., 2001); células progenitoras neuronais embebidas em gel de colágeno (MURAKAMI et al., 2003); genipin fixado em gelatina (LIU et al., 2004); gel de colágeno mais células de Schwann (PHILLIPS et al., 2005); fator de crescimento fibroblástico básico (IKEGUCHI et al., 2006); astragalosídeo embebido em gel de colágeno (CHENG et al., 2006); hormônio da tireóide (VORIA et al., 2006); fator neurotrófico derivado da célula glial (LI et al., 2006); células do estroma da medula óssea (CHOI et al., 2005; CHEN et al., 2006b; CHEN et al., 2007a), *Pueraria lobata* (CHEN et al., 2007b), entre outras.

Para o nervo regenerar em longos espaços entre os cotos, fatores que promovem a neurite e fatores neurotróficos, os quais podem promover a regeneração nervosa precoce, têm sido utilizados entre os cotos nervosos dentro dos tubos. Os fatores mais comuns que promovem a neurite incluem o colágeno, laminina e fibronectina e o mais estudado fator neurotrófico é o fator de crescimento nervoso (CHEN et al., 2000).

Os componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina, localizados na membrana basal e endoneuro do nervo periférico, são pressupostos fatores tróficos que guiam o prolongamento dos cones de crescimento *in vitro* e *in vivo* (LABRADOR et al., 1998; CEBALLOS et al., 1999). O colágeno, utilizado por vários autores entre os cotos nervosos como substância estimulante do crescimento axonal, forma uma malha tridimensional no interior do tubo, atuando como substrato para a migração celular e para o crescimento regenerativo dos axônios. Podem ser adicionadas ao colágeno substâncias potencialmente benéficas no processo de regeneração axonal (DA-SILVA, 1993).

Tratando-se do nervo isquiático, diversos estudos foram realizados em ratos com o intuito de se avaliar a eficiência do colágeno associado ou não a outras substâncias que promovam estímulo do crescimento axonal. SATOU et al. (1986) examinaram por microscopia de luz e eletrônica, os efeitos da matriz de gel de colágeno sobre o processo regenerativo após secção e reparação do nervo utilizando tubos de silicone. Observou-se maior crescimento axonal em direção ao coto distal no tubo com gel de colágeno em comparação ao grupo controle.

MADISON et al. (1988) implantaram tubos de silicone preenchidos com gel de laminina ou gel de colágeno e tubos vazios. Os autores constataram pelas análises histológicas de microscopia de luz e eletrônica que todos os tubos com aditivos apresentaram axônios em regeneração nos cabos neoformados.

Por outro lado, LAINETTI & DA-SILVA (1993) demonstraram pela análise morfométrica do total de axônios mielinizados que o colágeno em combinação com monogangliosídeos (GM1) utilizado entre os cotos do nervo seccionado e reparado com tubos de polietileno, aumentou significativamente a regeneração axonal periférica.

OHBAYASHI et al. (1996) avaliaram por microscopia de luz e por imunoistoquímica a regeneração do referido nervo após secção e reparação com tubos de silicone com esponja de colágeno (com ou sem laminina) ou tubos vazios. O grupo tratado apresentou tecido regenerado em todo comprimento da esponja de colágeno três semanas após secção e reparação. Observações a longo prazo demonstraram

cabo de regeneração com neurofilamentos e fibras mielinizadas em todos os nervos que continham a esponja de colágeno.

WELLS et al. (1997) testaram três matrizes - colágeno, laminina com matriz extracelular (Biomatriz) e metilcelulose 2% em gel, puras ou em combinação, com fatores de crescimento derivado de plaqueta ou de insulina. Na quarta e oitava semanas após injúria, o grupo que continha colágeno ou metilcelulose sem fator de crescimento apresentou maior número de axônios mielinizados comparado ao grupo Biomatriz.

Ainda, CHAMBERLAIN et al. (1998) utilizaram tubos de colágeno degradáveis ou não e tubos de silicone preenchidos ou não com copolímero de colágeno no nervo e avaliaram por meio de histograma do diâmetro axonal e imunoistoquímica o processo regenerativo. Os autores descreveram que a regeneração foi melhor utilizando tubos com copolímero de colágeno comparado aos vazios.

LABRADOR et al. (1998) utilizaram solução salina, gel de colágeno ou gel de laminina entre os cotos do nervo isquiático de camundongos. A regeneração foi precoce utilizando gel de colágeno diluído (1,28mg/ml) do que concentrado (1,92 e 2,56mg/ml) e solução salina em 4mm entre os cotos. O gel de laminina e de colágeno diluídos proporcionaram altos níveis de recuperação funcional e regeneração axonal em um espaço de 6mm entre os cotos, quando comparados à solução salina.

Com o objetivo de estudar a regeneração axonal, recuperação motora e sensitiva do nervo CHAMBERLAIN et al. (2000) implantaram tubos de silicone e de colágeno vazios ou preenchidos com uma matriz de colágeno-glicosaminoglicanas, auto-enxertos ou nervos intactos como grupo controle. O grupo com tubo de colágeno preenchido com matriz apresentou maior número de axônios mielinizados de grandes diâmetros em relação aos outros grupos. Os testes funcionais revelaram a existência de recuperação motora e sensitiva após regeneração nervosa por meio de todos os tubos utilizados.

Diferentemente, CHEN et al. (2000) adicionaram um gel extracelular contendo colágeno, laminina e fibronectina após secção e reparação dos nervos utilizando tubos de silicone. Estudo morfométrico revelou que a média da área de secção transversa dos nervos regenerados e o número de axônios mielinizados no grupo com a mistura

em gel foi maior em 28%, comparado aos tubos vazios. Os resultados demonstraram que a mistura em gel de colágeno, laminina e fibronectina podem oferecer um meio adequado para o crescimento axonal.

Para a indução da regeneração nervosa, ITOH et al. (2001) empregaram diferentes materiais preenchidos ou não com fibras colágenas (fibras) ou fibras de copolímeros de poli-L-lactato (CPLA). Tubos de silicone (vazio, com fibras e com CPLA), bainha de colágeno (vazio, com fibras e com CPLA) ou membrana atelocolágeno bioabsorvível (vazio, com fibras e com CPLA) foram utilizados no estudo. Os resultados demonstraram que os tubos preenchidos com fibras colágenas foram eficientes em proporcionar regeneração do tecido nervoso.

VERDU et al. (2002) utilizaram tubos de silicone preenchidos com gel de colágeno ou gel de laminina entre os cotos do nervo isquiático de camundongos. O gel foi polimerizado antes da implantação em posição horizontal, vertical ou induzido magneticamente ao alinhamento longitudinal das fibrilas. A reinervação começou precocemente e alcançou altos níveis com gel de colágeno alinhado do que com gel na forma horizontal. O alinhamento do gel de colágeno ou laminina dentro do tubo de silicone aumentou o êxito e a qualidade da regeneração.

MURAKAMI et al. (2003) testaram células progenitoras neuronais embebidas em gel de colágeno entre os cotos nervosos empregando tubos de silicone. Foi observado um aumento do número e diâmetro das fibras mielinizadas em relação ao grupo controle. Da mesma forma, PHILLIPS et al. (2005) obtiveram bons resultados ao adicionarem células de Schwann ao gel de colágeno alinhado entre os cotos nervosos.

Por fim, CHENG et al. (2006) empregaram diferentes concentrações de astragalosídeos em gel de colágeno entre os cotos do nervo seccionado e reparado com tubos de silicone. O astragalosídeo na concentração de 50 μ M juntamente com o colágeno apresentaram grande número de axônios mielinizados e um maior potencial de ação evocado comparado aos outros grupos.

Ademais, um estudo recente sobre reparação do nervo peroneal em coelhos, empregou o cultivo de células do estroma da medula óssea (grupo BMTs) embebidas em gel de colágeno entre os cotos nervosos após secção e reparação por meio de

enxerto de veia. O número e diâmetro das fibras mielinizadas do grupo BMTS associado ao colágeno foi significativamente maior do que o grupo controle (CHOI et al., 2005).

Todas estas substâncias utilizadas na forma líquida preenchendo os tubos, podem perder a eficácia em um curto período devido à sua difusão no espaço entre os cotos e a parede do tubo. Para superar esta desvantagem, tais substâncias têm sido utilizadas na forma de gel, podendo se manter no lúmen do tubo, por sua viscosidade (CHEN et al., 2000).

As alterações clínicas decorrentes de lesões dos nervos periféricos são os déficits da movimentação, da sensibilidade e alterações autonômicas, originárias de interrupção funcional ou anatômica dos prolongamentos celulares neles contidos. O diagnóstico das lesões agudas dos nervos periféricos, na maioria dos casos, é feito sem grandes dificuldades, através do exame neurológico pois, as alterações clínicas de cada nervo lesado, são características de acordo com a área específica de inervação (COLLI, 2000).

ARIAS et al. (1997) constataram que a biópsia de nervo, quando utilizada conjuntamente com o exame neurológico e eletroneuroestimulação, fornece resultados importantes sobre a condição do nervo. Investigações têm correlacionado mensurações eletrofisiológicas com estrutura axonal entre os cotos dentro dos tubos (CHAMBERLAIN et al., 2000).

Os três testes mais importantes para a avaliação eletrofisiológica dos nervos são o teste de estimulação dos troncos nervosos, a eletroneurografia (potencial evocado do nervo) e a eletromiografia. Os dois primeiros são capazes de detectar o processo de degeneração axonal numa fase precoce, enquanto que o último é útil quando a degeneração já ocorreu (COLLI, 2000).

De modo geral, testes eletrodiagnósticos são úteis no estudo de distúrbios envolvendo a unidade motora - corpo celular, axônio, junção neuromuscular e fibras musculares. Três a quatro dias após as lesões no nervo, tem início a degeneração axonal. Somente oito a 21 dias após a lesão é que se inicia o aparecimento das alterações eletromiográficas e de velocidade de condução nervosa. Se este prazo não

for respeitado, estes exames terão valores limitados na avaliação das lesões. Para evitar que ocorra resposta devido ao estímulo de nervos adjacentes intactos, o nervo a ser examinado deve ser separado do tecido ao redor. A ausência de resposta ocorre imediatamente após o trauma nos pontos proximais à lesão. Se o estímulo não deflagra resposta motora, há forte evidência de lesão completa ou ausência de regeneração. A presença de alguns axônios em regeneração pode permitir resposta positiva. Nos casos de denervação, pode ocorrer contração muscular lenta, considerada reação de degeneração (ARIAS; STOPIGLIA, 1997).

A regeneração do nervo periférico após lesão depende da sua reestruturação e que, o maior número possível de axônios em regeneração, a partir do segmento proximal, encontre facilmente as bandas de Bungner formadas pelas células de Schwann e seja orientado por estas até as placas motoras (MACKINNON; NOVAK, 1999).

O propósito da técnica de reparação nervosa é restabelecer a continuidade do tronco nervoso, para alcançar a recuperação funcional e reinervação dos órgãos finais (LIVINGSTONE; LUNDBORG, 1988; YANNAS; HILL, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados oito eqüinos adultos, de sete a nove anos de idade, com peso entre 300 e 450kg, machos e fêmeas, sem raça definida e clinicamente hígidos. Os animais foram mantidos em baias individuais com alimentação à base de feno, ração, capim verde e água *ad libitum* durante o tempo de observação. O nervo ulnar (n.u), e o ramo cutâneo lateral do 17° nervo torácico (n.t), em um dos antímeros do animal, foram submetidos à reparação com tubo de silicone (TS), e os nervos contralaterais, à reparação com tubo de silicone preenchido com solução de colágeno (TSC). Os animais foram divididos em dois grupos - GI e GII com quatro animais em cada grupo, segundo o tempo de observação e colheita das biópsias. Este tempo para o grupo I (GI) foi de 13 semanas e para o grupo II (GII), 26 semanas.

3.2. Preparo dos animais

A conduta pré-cirúrgica envolveu tricotomia da região caudolateral e caudomedial do antebraço e região do flanco. Os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico de 12 horas, antes do procedimento cirúrgico. Foram utilizadas baias e o centro cirúrgico de grandes animais do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV-UNESP, para realização do experimento.

3.3. Procedimento anestésico

A tranquilização dos animais foi realizada por meio de medicação pré-anestésica aplicando-se cloridrato de xilazina 10%¹ (0,5mg/kg/IV). Decorridos 10 minutos, administrou-se éter gliceril guaiacol a 10%² (100mg/kg/IV) em soro glicosado 5%, sob

¹ Sedazine – Fort Dodge – Saúde Animal Ltda. – São Paulo/SP

² Éter Gliceril Guaiacol – Henryfarma – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – São Paulo/SP

pressão até o decúbito. A indução anestésica foi realizada com cetamina 10%³ (1mg/kg/IV) e os animais foram entubados e mantidos sob anestesia geral inalatória com halotano⁴, sob ventilação espontânea, em circuito semifechado.

3.4. Procedimento cirúrgico

Os animais foram acomodados em mesa cirúrgica e posicionados em decúbito dorsal. Foi realizada a anti-sepsia dos campos cirúrgicos com polivinil pirrolidona iodo tópico a 1%⁵ e álcool iodado. O acesso ao n.u incluiu: incisão linear da pele no terço médio do osso rádio em posição caudolateral, divulsão romba do tecido subcutâneo, incisão da fáscia anti-braquial e exposição do nervo. Já no n.t, a abordagem foi realizada por meio de uma incisão linear de pele na região média do flanco, seguida pela divulsão romba do tecido subcutâneo e exposição do nervo (Figura 1). Após o acesso ao n.u e ao n.t, em um dos antímeros do animal, foi realizada a secção e reparação dos nervos utilizando-se tubos de silicone. Primeiramente, foi passado um fio de náilon 6-0⁶ agulhado pela parede do tubo a 5mm de uma das extremidades, seguindo-se pelo lúmen até o meio externo. Em seguida, o fio foi passado pelo epineuro do nervo, retornando pelo interior do lúmen do tubo e exteriorizado através da parede a 2mm lateralmente ao ponto inicial de entrada. Após realizar-se este procedimento nas duas extremidades do tubo de silicone, tendo sido ancorados os cotos proximal e distal, foi realizada a secção completa dos referidos nervos, como modelo experimental de um trauma (Figura 2). Em seguida os cotos foram tracionados pelos fios, sendo introduzidos no tubo de silicone. Ato contínuo, realizou-se a fixação dos fios de náilon por nós cirúrgicos simples (FIELDS et al., 1989). Como o tubo apresentava comprimento total de 20mm, obteve-se, ao final do procedimento, um espaço de 5mm entre as extremidades dos cotos (grupo TS). Nos nervos contralaterais, foram realizados os mesmos procedimentos acrescentando-se, no entanto, solução de

³ Cetamina – Agender União – União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu/SP

⁴ Halothano – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. – Itapira/SP

⁵ Polivinil Pirrolidona Iodo 1% - Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda. – São José do Rio Preto/SP

⁶ Mononylon 6-0 – Johnson & Johnson (Ethicon) – Produtos Profissionais Ltda. – São José dos Campos/SP

colágeno⁷, em concentração de 3,0mg/ml injetada com seringa e agulha, diretamente no espaço de 5mm, preenchendo-o totalmente (grupo TSC) (Figura 3). Alternaram-se nos nn.u e nos nn.t de cada animal, igualmente, tubos de silicone vazios (TS), em um dos antímeros, e preenchidos com solução de colágeno (TSC), nos contralaterais. A seguir, realizou-se sutura de reaproximação do tecido subcutâneo com fio de poliglactina 1-0⁸ e sutura de pele com pontos simples separados com fio inabsorvível⁹ sintético. Os diâmetros internos dos tubos de silicone empregados foram ligeiramente maiores que os dos nn.u e nnt. – entre 1,5 e 2,5mm.



Figura 1. Aspecto macroscópico do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico (seta) durante o procedimento cirúrgico. Observar a exposição do nervo para secção e neurorrafia.

⁷ Vitrogen – Collagen in Solution – Nutacon Ltda. – Nederland/European

⁸ Vycril 1-0 – Johnson & Johnson (Ethicon) – Produtos Profissionais Ltda. – São José dos Campos/SP

⁹ Supramid 1 – Hauptner GmbH & Co KG

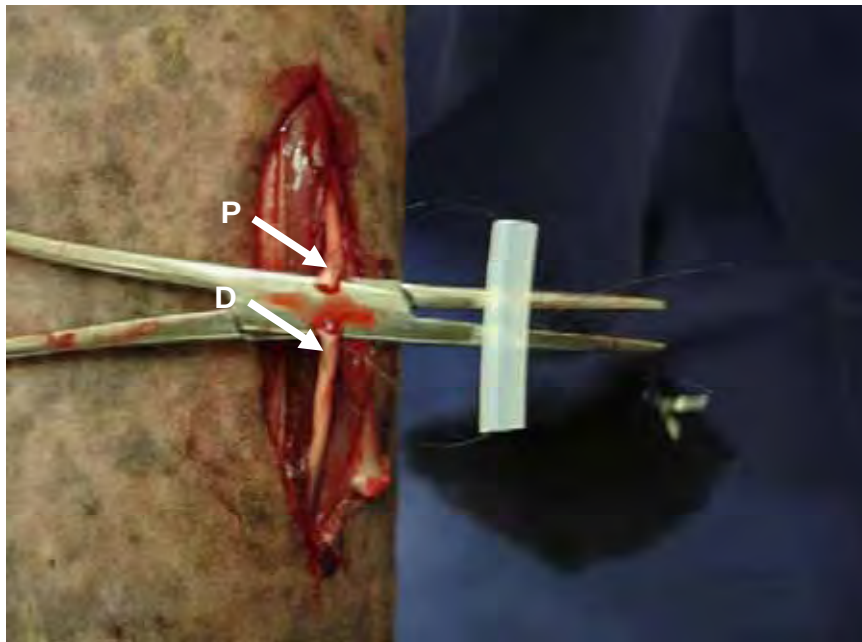


Figura 2. Aspecto macroscópico da fixação parcial e secção completa dos cotos nervosos proximal (P) e distal (D) do nervo ulnar de equino antes da implantação no tubo de silicone.



Figura 3. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de equino submetido à neurorrafia. Observar os cotos nervosos proximal (P) e distal (D) fixados no tubo de silicone com solução de colágeno.

Para a realização das reparações dos respectivos nervos, utilizaram-se instrumentos cirúrgicos empregados nas microcirurgias oftálmicas, tais como: porta agulha Barraquer¹⁰, pinças de colibri Castroviejo¹¹ retas e lupa de pala¹² com aumento de 2,5x.

3.5. Conduta pós-operatória

Durante o período pós-operatório, foram realizados curativos sobre as feridas cirúrgicas com polivinil pirrolidona iodo 1% e bandagens esparadrapadas nos antebraços. Os animais permaneceram em baias e receberam antibioticoterapia sistêmica com penicilina benzatina¹³ (30.000UI/kg/IM) a cada 48 horas, totalizando três aplicações e fenilbutazona¹⁴ (4,4mg/kg/IV) a cada 24 horas, totalizando quatro aplicações. Os curativos foram realizados diariamente, até a remoção das bandagens e da sutura de pele, com sete e 10 dias, respectivamente.

3.6. Exame físico do aparelho locomotor e teste de sensibilidade cutânea

Os animais dos GI e GII foram submetidos semanalmente, a partir da primeira semana pós-operatória, durante todo o período de observação, ao exame físico do aparelho locomotor - avaliação de claudicação e aspectos neurológicos gerais, onde observou-se ao trote e ao passo algum grau de fraqueza, espasticidade, dismetria ou ataxia. Ademais, foram realizados semanalmente, teste de sensibilidade cutânea utilizando pinça anatômica (SPEIRS, 1999). O teste foi realizado pelo pinçamento de pele da região inervada pelos nervos ulnares (nn.u) e pelos ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos (nn.t), que, segundo GHOSHAL (1986) compreende as regiões caudolateral e caudomedial do antebraço e a região do flanco, respectivamente.

¹⁰ Porta Agulha Barraquer – J. Petrovich – Instrumentos Cirúrgicos – São Paulo/SP

¹¹ Pinça de Colibri Castroviejo – J. Petrovich – Instrumentos Cirúrgicos – São Paulo/SP

¹² Lupa com Armação em Metal com Pala – Intex – Ref. ELTLP 28x32

¹³ Pentabiótico Veterinário Reforçado – Fort Dodge – Saúde Animal Ltda. – Campinas/SP

¹⁴ Equipalazone – Marcolab Laboratórios Ltda. – Duque de Caxias/RJ

Contrações musculares após repetidos pinçamentos de pele foram interpretados como reação positiva.

3.7. Avaliação macroscópica e eletrofisiológica

Os animais foram novamente submetidos à anestesia geral inalatória, na 13ª semana no GI e 26ª semana no GII. Os nn.u e os nn.t reparados com TS e TSC, foram expostos nos locais das intervenções cirúrgicas, avaliados macroscopicamente e os tubos de silicone retirados, após cuidadosa incisão longitudinal da sua parede, realizada com lâmina de bisturi, para posterior avaliação da recuperação motora e colheita das biópsias.

Macroscopicamente, os nn.u e os nn.t, foram avaliadas quanto à presença de tecido conjuntivo fibroso peri-neural e ao redor do tubo, aderências entre as estruturas do feixe vâsculo-nervoso e formação do cabo de regeneração entre os cotos proximal e distal.

A seguir, realizou-se com eletroestimulador¹⁵, estímulos elétricos nos segmentos nervosos proximais, distais e cabos de regeneração formados entre os cotos dos nn.u e dos nn.t, semelhante ao descrito por STOPIGLIA (1992) com o objetivo de avaliar a recuperação motora. Os nervos foram estimulados por meio de um par de agulhas finas estéreis colocadas diretamente sobre cada segmento. Utilizou-se onda bipolar regular com frequência fixa de 10Hz e voltagem de 0,5. Foram utilizadas tiras de luvas de borracha estéreis embaixo dos nn.u e dos nn.t no momento das estimulações elétricas para isolá-los dos tecidos adjacentes. Contrações de feixes musculares seguidas aos estímulos elétricos no segmento nervoso distal foram interpretadas como respostas positivas.

Segundo GHOSHAL (1986), o n.u emite ramos para os músculos flexor ulnar do carpo, flexor superficial dos dedos e flexor profundo dos dedos, no entanto o n.t, supre os músculos abdominais, o músculo cutâneo do tronco e a pele. Após a

¹⁵ Eletroestimulador – modelo AP585 – Biotherapy – São Carlos/SP

eletroneuroestimulação, foram realizadas as biópsias nos segmentos proximais, distais e cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t.

3.8. Biópsias dos nervos e confecção das lâminas

Após a colheita dos segmentos proximais, distais e cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t, de aproximadamente 7cm, estes foram fixados em formalina a 10%, tamponada com fosfatos, pH 7.4, por 18 horas. Fragmentos foram incluídos em parafina, seguindo-se obtenção de cortes transversais ou longitudinais de 5µm de espessura, que foram corados pelo método da Hematoxilina e Eosina ou Tricrômio de Masson (TM). Outros fragmentos das mesmas amostras foram incluídos em histo-resina à base de metacrilato e obtidos cortes transversais de 2µm, estes foram corados pelo Azul de Toluidina.

3.9. Análise histológica

A avaliação histológica foi realizada em microscópio óptico binocular com objetivas de 4, 10, 20, 40 e 100x. A fotodocumentação foi realizada em fotomicroscópio com câmera digital. Avaliou-se nos segmentos proximais, distais e cabos de regeneração, dos nn.u e dos nn.t dos GI e GII, a presença ou ausência de feixe nervoso envolto pelo epineuro, fascículos envoltos pelo perineuro, axônios mielinizados, proliferação de células de Schwann, proliferação axonal do coto proximal ao distal, remielinização do coto distal, degeneração walleriana, neuromas e infiltrados de células inflamatórias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Procedimento cirúrgico

Os animais dos GI e GII submetidos aos procedimentos cirúrgicos experimentais propostos, não apresentaram complicações nos períodos trans e pós-operatórios. A anestesia empregada, bem como as vias utilizadas para acessar os nervos, permitiu a realização, sem dificuldades, de todas as manobras necessárias para a aplicação dos TS e TSC, entre os cotos dos nn.u e dos nn.t.

A secção do nervo foi realizada após a passagem do fio de sutura pelo tubo e pelo epineuro dos nn.u e nn.t para se minimizar a possibilidade de traumas. Como é reconhecido amplamente, traumas nos nervos são indesejáveis e comprometem o processo regenerativo (GIBSON; DANILOFF, 1989).

A utilização de um espaço de 5mm entre os cotos proximais e distais dos nn.u e dos nn.t neste estudo, também utilizado por DAHLIN et al. (2001) em seres humanos e por CHEN et al. (2006b) em ratos, no momento da reparação, mostrou-se adequado uma vez que ocorreu regeneração axonal. Em outras espécies, estudos têm utilizado várias distâncias. No rato, espécie em que a regeneração é muito rápida, ou seja, ocorre em quatro semanas, utiliza-se 5mm (ASHUR et al., 1987; CHEN et al., 2000b), 10mm (CHEN et al., 2000; CHEN et al., 2000a) ou até mesmo 15mm (IKEGUCHI et al., 2006; CHEN et al., 2007a). Nesta espécie, não há tempo para haver degeneração do coto distal devido à rápida proliferação axonal. No equino, nem mesmo a aposição do nervo digital palmar dentro do tubo de silicone colaborou com o processo regenerativo (DELISTOIANOV et al., 2006).

4.2. Avaliação do estado clínico geral dos animais e exame físico do aparelho locomotor

Após a retirada das bandagens dos antebraços dos animais dos GI e GII, bem como dos pontos de sutura de pele, com sete e 10 dias, respectivamente, observou-se cicatrização das feridas cirúrgicas dos nn.u e dos nn.t por primeira intenção, não

constatando-se, em todo o período de observação, complicações como infecções, fístulas e eliminação do tubo de silicone, exceto um animal do GI, apresentou fístula no local da ferida cirúrgica do nn.u reparado com TSC. Não foi observada a eliminação do tubo de silicone durante o tratamento da ferida.

A imobilização dos membros, difícil para a espécie eqüina e apontada pelo trabalho de DELISTOIANOV et al. (2006) como uma das causas de insucesso, foi minimizada neste estudo pela escolha de nervos de regiões de menor movimentação, ou seja, os nn.u e os nn.t.

Durante o período de observação os animais dos GI e GII, submetidos à reparação de falhas dos nn.u e nn.t, evoluíram, do ponto de vista clínico geral, de maneira satisfatória, não apresentando restrições e dificuldades quanto à alimentação e comportamento.

Nenhuma alteração foi registrada ao serem realizados os exames físicos do aparelho locomotor – tanto na avaliação de claudicação quanto nos aspectos neurológicos gerais, durante todo o período de observação, tanto nos eqüinos do GI quanto nos do GII. Os animais não apresentaram perturbações funcionais que acarretassem em alterações na locomoção, haja vista que os eqüinos apresentaram-se com andamento normal ao passo e ao trote de modo retilíneo ou em círculos à direita ou à esquerda ao trote. Não foi observado nenhum grau de fraqueza, espasticidade, dismetria ou ataxia em nenhum dos oito eqüinos utilizados neste experimento.

Esses resultados confirmam que não houve déficit motor ou outras limitações em decorrência da secção dos nn.u e até mesmo dos nn.t.

4.3. Avaliação da recuperação sensitiva dos nervos ulnares e dos ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos

Na primeira semana pós-operatória, não foram observadas respostas aos testes de sensibilidade cutânea realizados pelo pinçamento de pele das regiões inervadas pelos nn.u e nn.t. As primeiras reações positivas ao teste de sensibilidade cutânea nos respectivos nervos, foram observadas a partir da 9ª semana após procedimento cirúrgico, independente da reparação com TS ou TSC.

A avaliação pelo teste de sensibilidade cutânea foi importante na confirmação da recuperação sensitiva. Na 9ª semana já se observaram respostas aos estímulos de pinçamento de pele na região inervada pelos nn.u e nn.t. Esse tempo está de acordo com o que ocorreu com cães (STOPIGLIA, 1992).

Os animais dos GI e GII, acompanhados por períodos de 13 ou 26 semanas, ao final do período experimental, apresentaram respostas positivas aos estímulos mecânicos nos nn.u e nn.t reparados com TS ou TSC, conforme Tabela 1. As respostas positivas ao teste de sensibilidade cutânea na região inervada pelos nn.u e nn.t, foram representadas respectivamente pela retirada do membro do solo e por tremores cutâneos na região do flanco. Não foram encontradas diferenças quando comparados o grau de resposta evocada aos estímulos mecânicos provocados na região inervada pelos nn.u e nn.t reparados com TS ou TSC.

Tabela 1. Reações positivas ao teste de pinçamento de pele em equinos submetidos à neurografia experimental com tubo de silicone sem colágeno (TS) ou tubo de silicone com colágeno (TSC). GI – período de observação de 13 semanas e GII, 26 semanas.

Grupos	9ª Semana		10ª Semana		13ª Semana		26ª Semana	
	nn.u*	nn.t	nn.u	nn.t	nn.u	nn.t	nn.u	nn.t
GI – TS	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	-----	-----
GI – TSC	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	-----	-----
GII – TS	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
GII – TSC	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

* nn.u – nervos ulnares; nn.t - ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos.

4.4. Avaliação macroscópica

Na região peri-neural aos TS e TSC observou-se formação de tecido conjuntivo fibroso acompanhado de rica rede de vasos neoformados, levando ao sangramento imediato e em grande quantidade após incisão de pele sobre a região dos implantes.

Sobre o tubo de silicone foi observada formação de tecido conjuntivo, semelhante ao observado por CHEN et al. (2000) em ratos, DAHLIN et al. (2001) em seres humanos e por DELISTOIANOV et al. (2006) em eqüinos. Este tecido foi incidido para que se pudesse ter acesso e visibilidade do tubo (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de eqüino durante a realização da biópsia. Observar tecido conjuntivo parcialmente removido ao redor do tubo (seta). Tempo de evolução de 13 semanas.

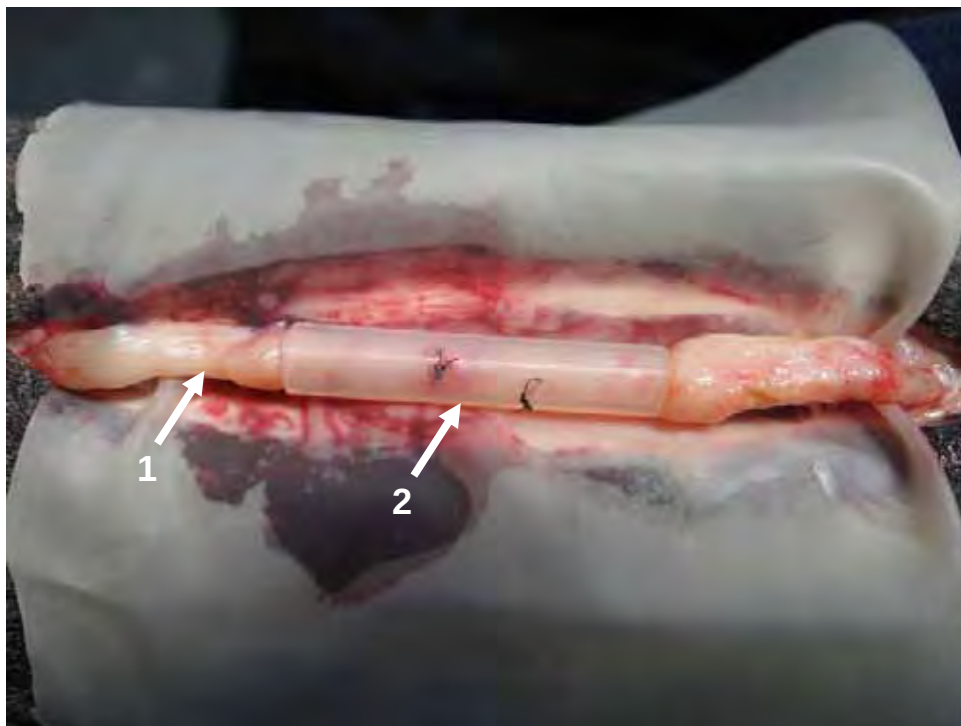


Figura 5. Aspecto macroscópico do nervo ulnar (1) de eqüino exposto para a retirada do tubo de silicone (2). Tempo de evolução de 26 semanas.

Após a retirada do tubo de silicone, observou-se estrutura esbranquiçada cilíndrica, com a mesma coloração do nervo, interligando os cotos proximais e distais dos nn.u (Figuras 6 e 7) e dos nn.t. Esta estrutura, ou seja, o cabo de regeneração, ocupou a porção central do tubo de silicone ao final do período experimental nos GI e GII, independente do uso de TS ou TSC.

O cabo de regeneração formado entre os cotos proximal e distal apresentou características semelhantes às encontradas por STOPIGLIA (1992) em cães, LUNDBORG et al. (1997) em seres humanos e por CHEN et al (2000) e IKEGUCHI et al. (2006) em ratos.

Não foram encontradas dificuldades no momento da retirada do tubo de silicone devido a não aderência dos segmentos proximais, distais e cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t reparados com TS ou TSC.

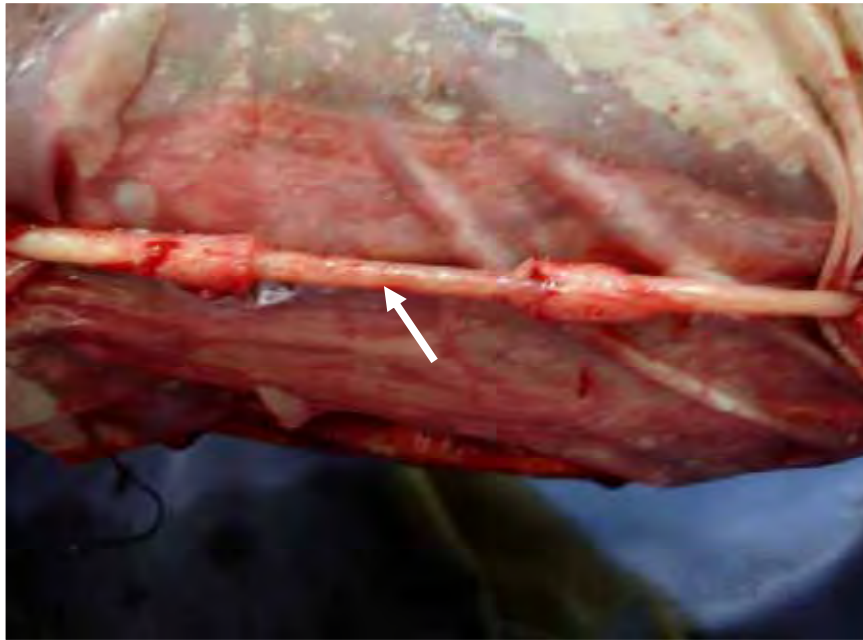


Figura 6. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de equino após a retirada do tubo de silicone. Observar formato cilíndrico do cabo de regeneração (seta) formado entre os cotos proximal, à esquerda, e distal à direita. Tempo de evolução de 13 semanas.

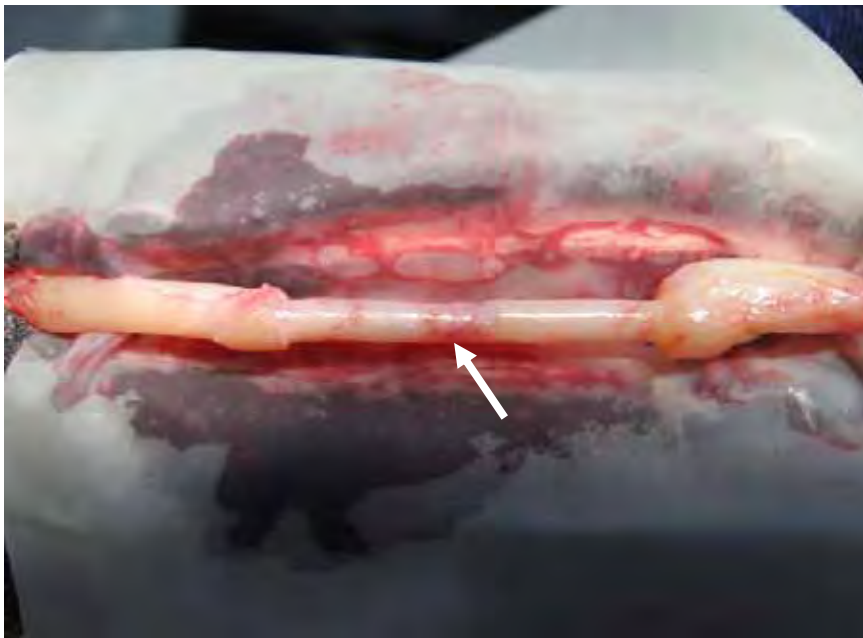


Figura 7. Aspecto macroscópico do nervo ulnar de equino após a retirada do tubo de silicone. Observar formato cilíndrico do cabo de regeneração (seta) formado entre os cotos proximal, à direita, e distal à esquerda. Tempo de evolução de 26 semanas.

Os segmentos proximais e distais dos nn.u e dos nn.t apresentaram características de nervo normal. Não foram observados nos segmentos proximais evidências de formação de neuromas, diferente, portanto, dos achados de DELISTOIANOV et al. (2006) onde prevaleceu o crescimento axonal desorganizado e proliferação de tecido conjuntivo.

Foi verificada ausência de tubo de silicone no n.u reparado com TSC do animal do GI que apresentou fistulação no período pós-operatório. Constatou-se também em um n.t reparado com TSC do GII, deiscência da sutura dos cotos com o tubo de silicone. Esses nervos não foram testados ou colhidos.

Nos outros animais, os tubos de silicone mantiveram-se em posição, unindo os segmentos nervosos proximais e distais pelos cabos de regeneração neoformados. Não foram encontradas diferenças nos cabos de regeneração entre os segmentos proximais e distais dos nn.u e dos nn.t reparados com TS ou TSC.

4.5. Avaliação da recuperação motora dos nervos ulnares e dos ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos

Após a avaliação macroscópica da região peri-neural aos TS e TSC, e secção longitudinal dos tubos para acesso aos cabos de regeneração, avaliou-se a recuperação motora por eletroneuroestimulação. Estímulos elétricos foram diretamente aplicados sobre os segmentos proximais, distais e cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t (Figura 8). As respostas observadas durante a avaliação motora estão sumarizadas na Tabela 2.

As respostas positivas aos estímulos elétricos aplicados diretamente no segmento distal do n.u, dos animais dos GI e GII reparados com TS ou TSC, permitiram observar pequenas contrações do músculo flexor ulnar do carpo, como também, contrações do músculo oblíquo externo do abdome após estímulos no n.t.

Não foram encontradas diferenças quando comparados o grau de resposta muscular evocada aos estímulos elétricos aplicados nos segmentos dos nn.u e dos nn.t reparados com TS ou TSC.



Figura 8. Aspecto macroscópico do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico (seta) de equino no momento das estimulações elétricas dos segmentos nervosos. Tempo de evolução de 13 semanas.

Tabela 2. Respostas positivas a eletroneuroestimulação ao final do período experimental em equinos submetidos à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno (TS) ou tubo de silicone com colágeno (TSC). GI – período de observação de 13 semanas e GII, 26 semanas.

Grupo experimental	Nervos	
	nn.u*	nn.t*
GI – TS	0/4	0/4
GI – TSC	1/3	0/4
GII – TS	3/4	3/4
GII – TSC	3/4	1/3

* nn.u – nervos ulnares; nn.t - ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos.

A eletroneuroestimulação mostrou resultados de difícil interpretação, quando correlacionados aos resultados observados no teste de sensibilidade cutânea e análise histológica. Na literatura não se encontram trabalhos sobre esse procedimento em eqüinos, mas sim para outras espécies, com mensuração do potencial de ação evocado e da velocidade de condução do nervo (LABRADOR et al., 1998; MURAKAMI et al., 2003; IKEGUCHI et al., 2006; CHEN et al. 2007a). Portanto, a utilização de metodologia adaptada, pode não ter sido a mais indicada. Este é um assunto que merece mais estudos.

4.6. Análise histológica

As observações macro e microscópica demonstraram que o tubo de silicone proporcionou uma orientação aos axônios em regeneração, impediu a invasão de tecido conjuntivo entre os cotos e a formação de neuromas, corroborando com os resultados de FIELDS et al. (1989), LABRADOR et al. (1998) e DAHLIN et al. (2001) em outras espécies.

Observou-se nos segmentos proximais, distais e cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t, dos animais dos GI e GII, ao final do período experimental, os seguintes resultados:

Os segmentos nervosos proximais dos nn.u e dos nn.t, reparados com TS e TSC, dos animais dos GI e GII, 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. 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 (Figuras 9, 10, 11 e 12) de forma semelhante ao observado em cães por STOPIGLIA (1992). A mielina ficou muito bem evidenciada na cor vermelha pelo TM.

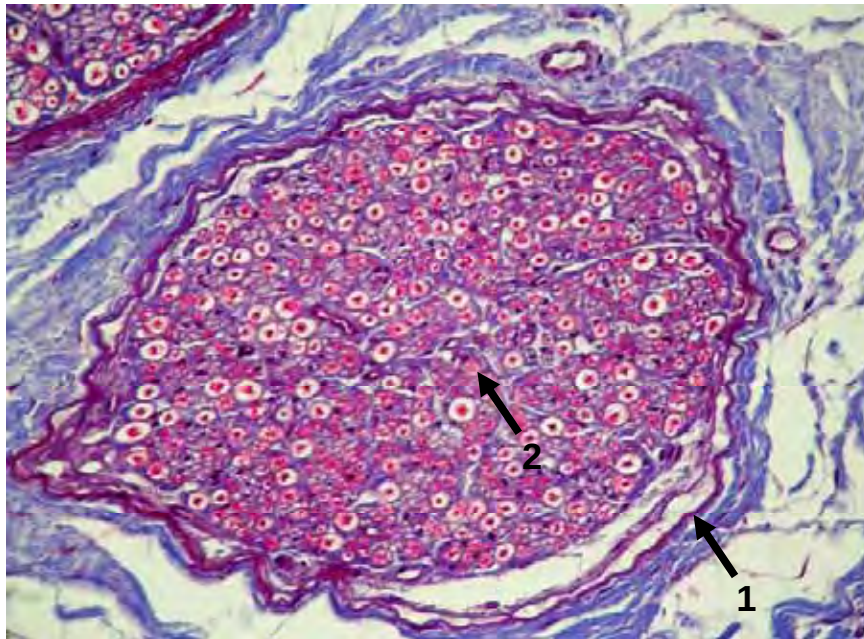


Figura 9. Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielinizadas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

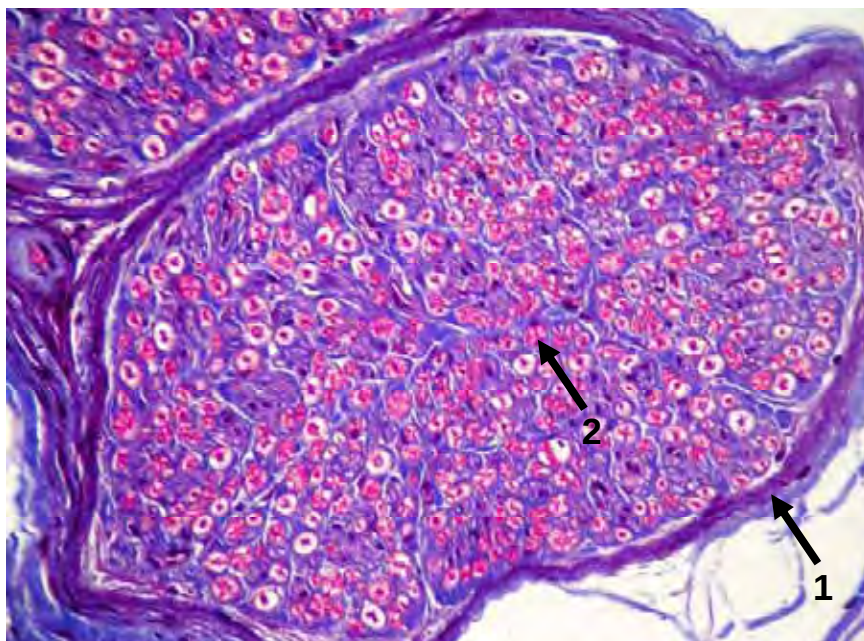


Figura 10. Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielinizadas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

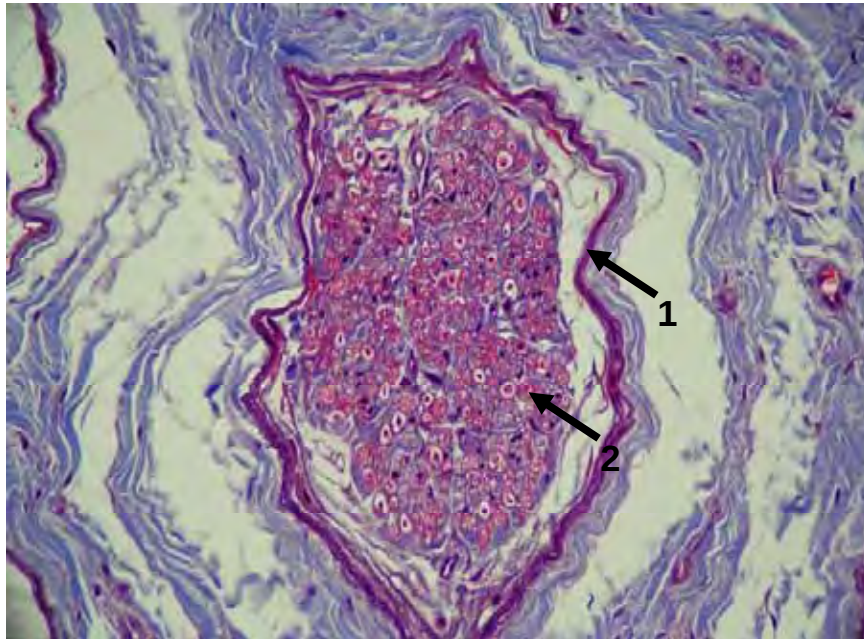


Figura 11. Aspecto microscópico do segmento proximal do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielínicas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

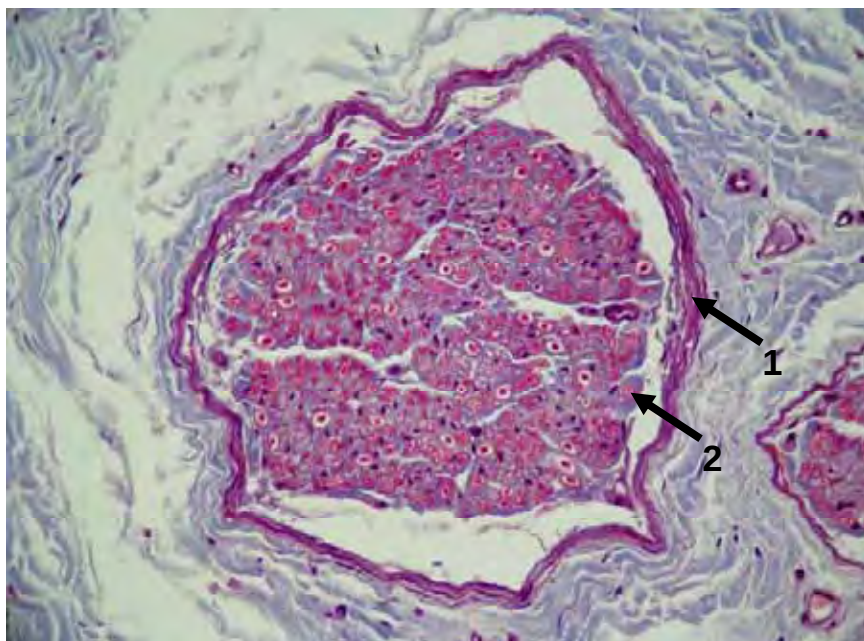


Figura 12. Aspecto microscópico do segmento proximal do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículo envolto pelo perineuro (1) e fibras nervosas mielínicas com morfologia próxima do normal (2). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

Nos cortes longitudinais dos segmentos nervosos proximais dos nn.u (Figura 13) e dos nn.t, reparados com TS e TSC, dos animais dos GI e GII, foram observados epineuro e perineuro característicos como nos cortes transversais e fibras nervosas mielinizadas em trajeto longitudinal (Figuras 14 e 15). Notou-se ainda, células de Schwann marcando o trajeto dos axônios, e fibroblastos do endoneuro espalhados entre as células de Schwann, muito mais numerosas.

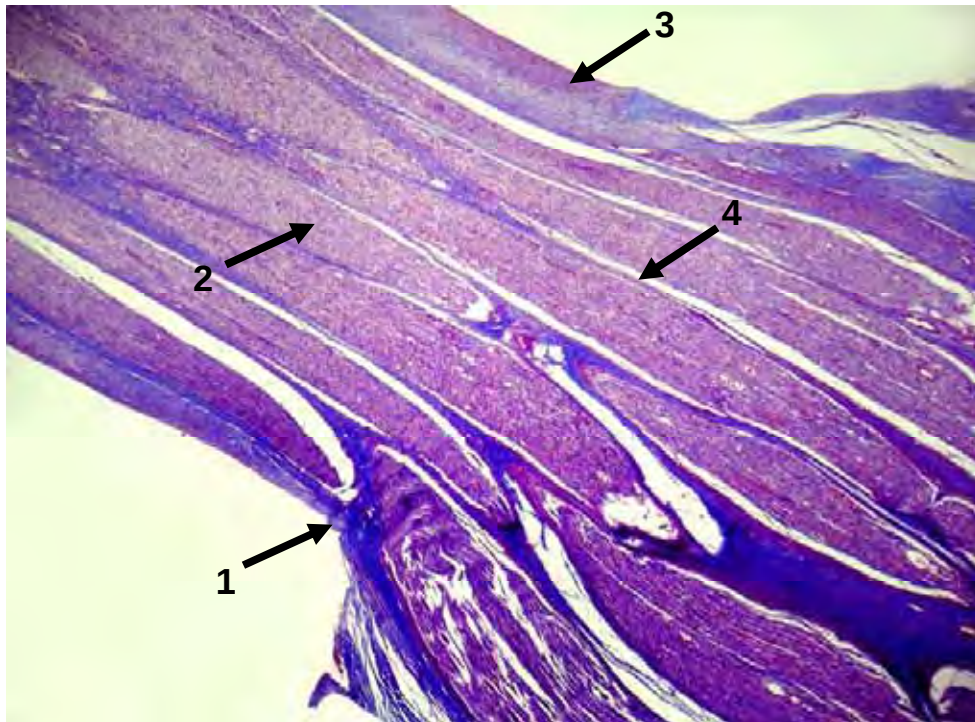


Figura 13. Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar forma afunilada do nervo na transição do limite com o tubo de silicone (1), fascículos em orientação paralela (2) epineuro (3) e perineuro (4) característicos. Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 4x.

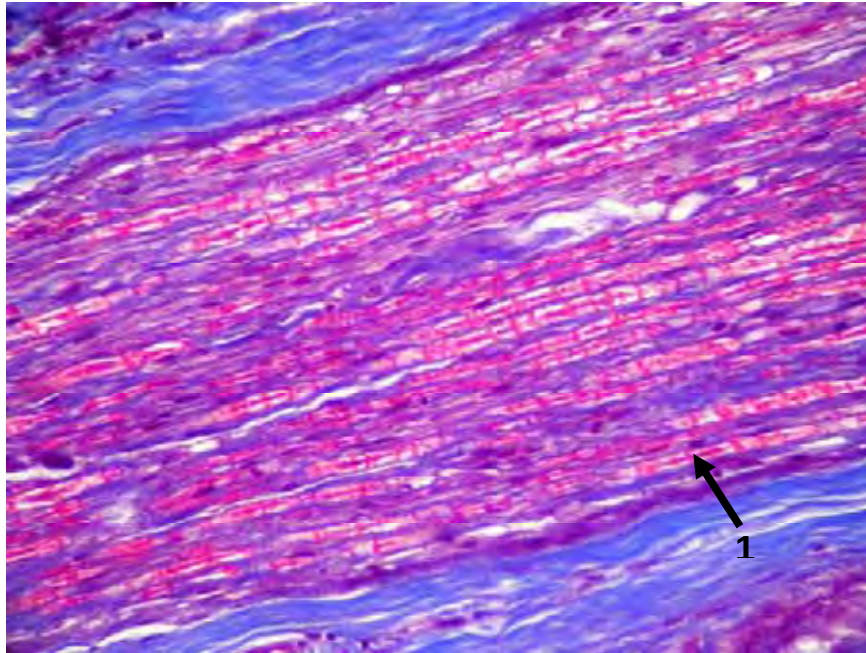


Figura 14. Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fibras nervosas mielínicas em trajeto longitudinal (1). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

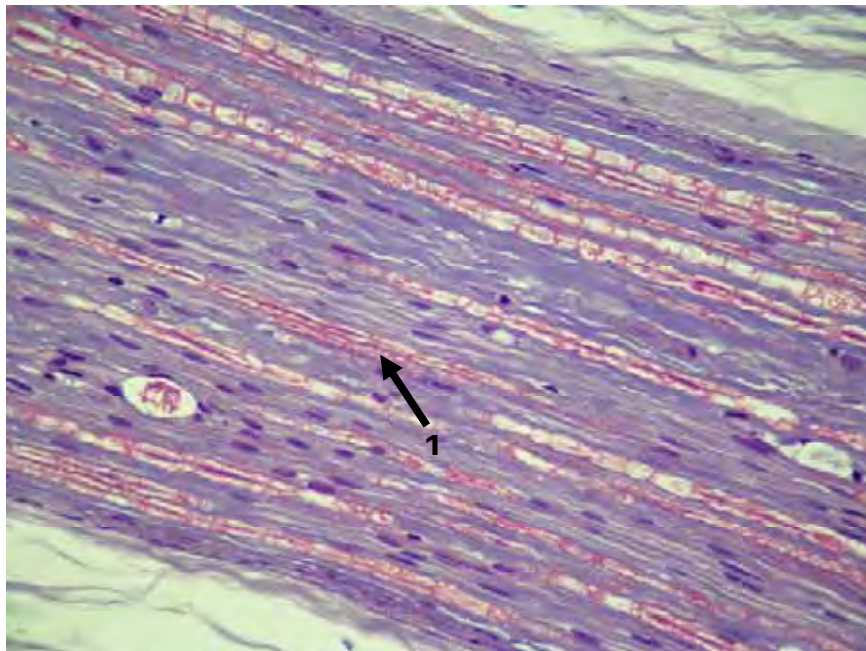


Figura 15. Aspecto microscópico do segmento proximal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fibras nervosas mielínicas em trajeto longitudinal (1). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

Os segmentos distais dos nn.u e dos nn.t, reparados com TS e TSC, dos animais dos GI e GII, apresentaram epineuro e perineuro característicos, clara redução da mielina, degeneração walleriana, tumefação axonal, redução do diâmetro dos fascículos e células de Schwann dispersas.

No entanto, os segmentos distais dos nn.u e dos nn.t reparados com TSC nos dois grupos, em cortes longitudinais (Figura 16) e transversais (Figuras 18 e 20) apresentaram visivelmente maior quantidade de axônios mielinizados e em processo de remielinização quando comparados aos nervos reparados com TS (Figuras 17 e 19). As fibras nervosas dos segmentos distais, em cortes transversais, apresentaram-se pouco visíveis, mais finas (característica de fibras em regeneração), quando comparadas às dos segmentos proximais, de forma semelhante ao observado em cães por STOPIGLIA (1992).

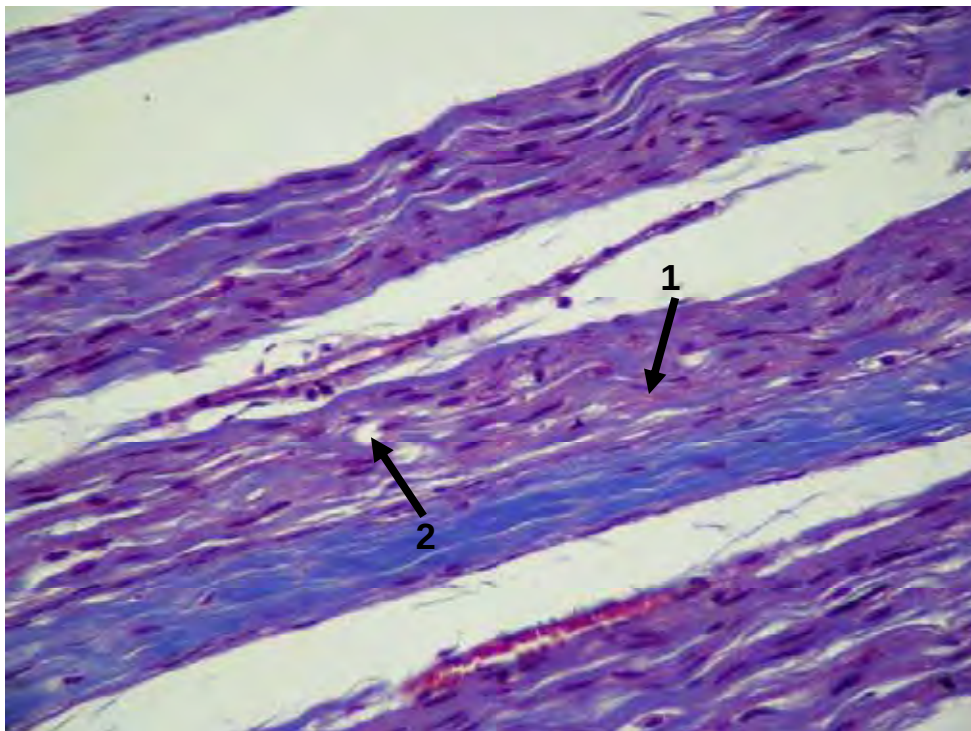


Figura 16. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículos com fibras nervosas mielínicas em trajeto longitudinal (1) e degeneração walleriana (2). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

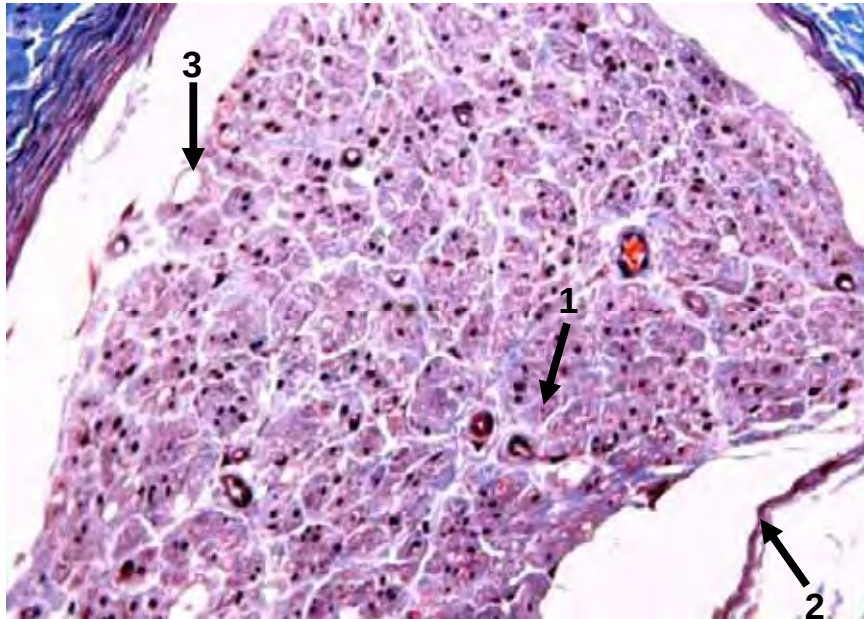


Figura 17. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

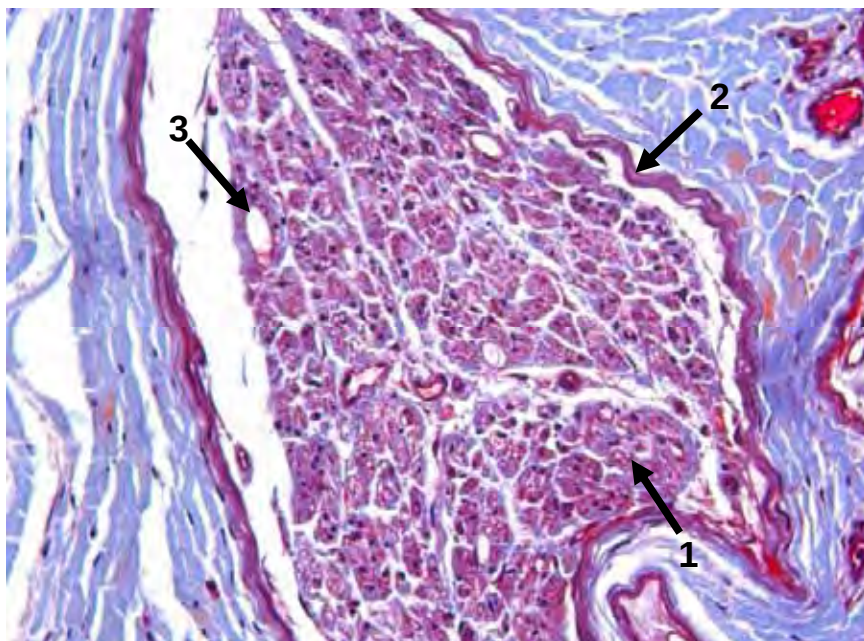


Figura 18. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar grande quantidade de fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

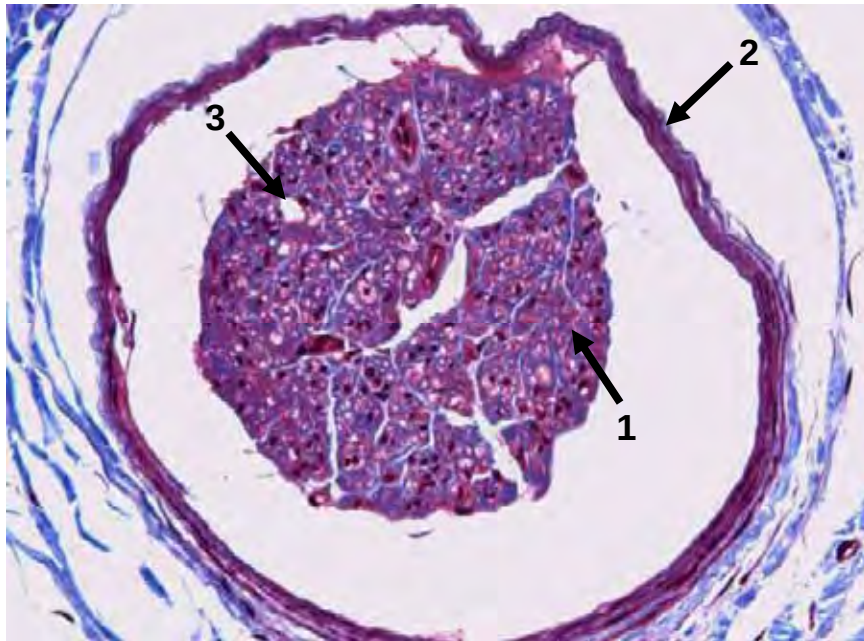


Figura 19. Aspecto microscópico do segmento distal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

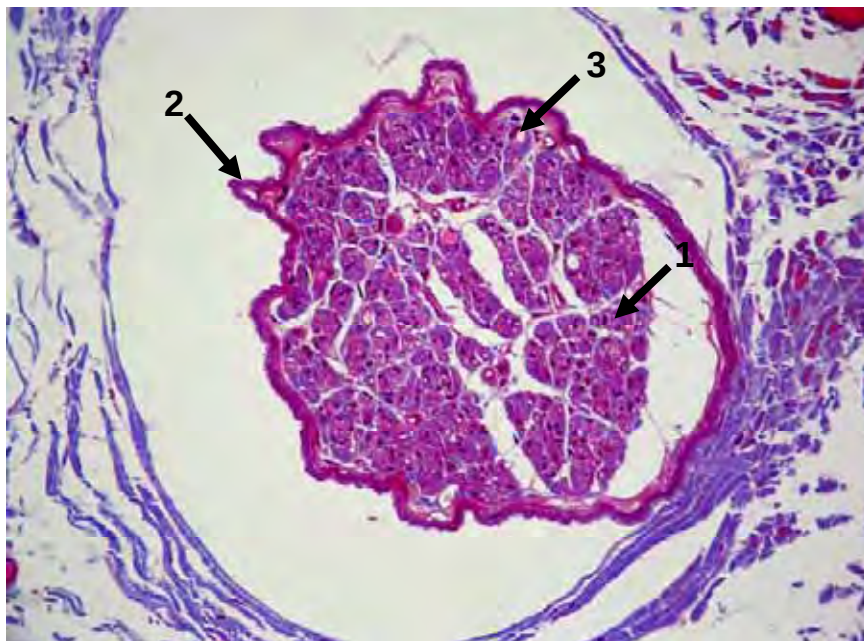


Figura 20. Aspecto microscópico de segmento distal do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar grande quantidade de fibras nervosas em processo de remielinização (1), perineuro característico (2) e degeneração walleriana (3). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

Os cabos de regeneração (Tabela 3) dos nn.u e dos nn.t reparados com TS e TSC, dos animais do GI, apresentaram em cortes transversais, epineuro espesso em relação ao diâmetro do cabo de regeneração (Figuras 21 e 22), pequenos fascículos delimitados por tecido conjuntivo em quantidade variável com presença de fibras nervosas mielinizadas e células de Schwann dispersas (Figuras 23, 24 e 25). As fibras nervosas, quando visíveis, apresentaram-se mais finas (característica de fibras em regeneração), quando comparadas as do segmento proximal do mesmo nervo.

Observou-se pela análise histológica do cabo de regeneração que o período requerido para regeneração em eqüinos é superior ao de outras espécies, no entanto, com 13 semanas já se encontrou cabos de regeneração com algumas fibras mielinizadas ou em processo de remielinização.

Tabela 3. Avaliação microscópica de nervos de eqüinos submetidos à neurorrafia experimental. Presença de fibras nervosas no cabo de regeneração interligando o coto proximal ao distal em eqüinos submetidos à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno (TS) ou tubo de silicone com colágeno (TSC). GI – período de observação de 13 semanas e GII, 26 semanas.

Grupo experimental	Nervos	
	nn.u*	nn.t*
GI – TS	4/4	3/4
GI – TSC	3/3	2/4
GII – TS	4/4	3/4
GII – TSC	4/4	3/3

* nn.u – nervos ulnares; nn.t - ramos cutâneos laterais dos 17º nervos torácicos.

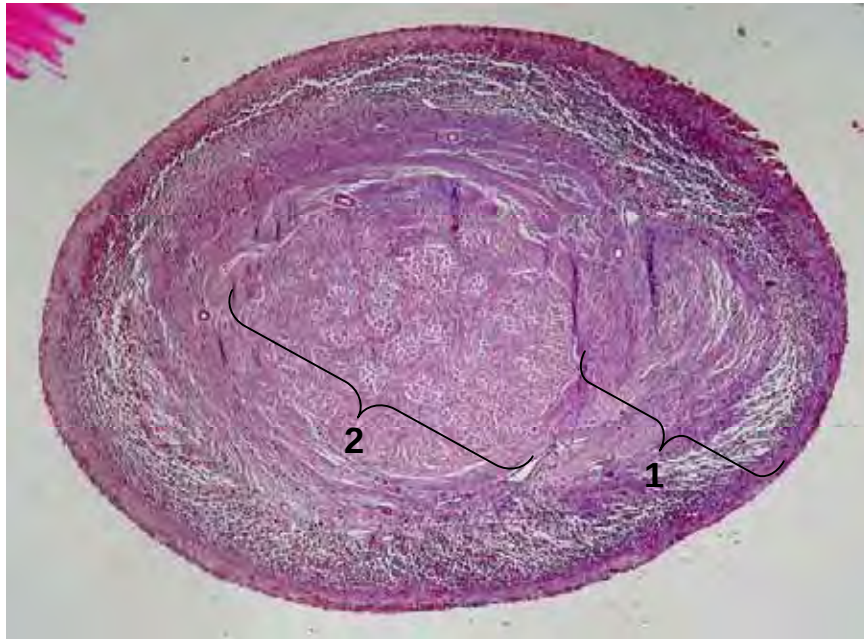


Figura 21. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de equino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar epineuro desenvolvido (1) em relação ao cabo de regeneração (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 4x.

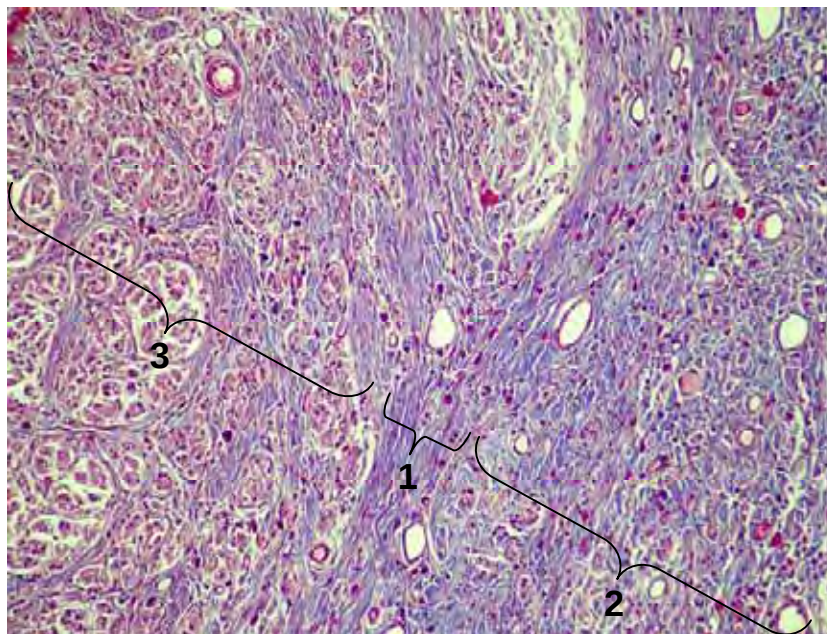


Figura 22. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de equino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar limite (1) entre epineuro espesso (2) e fibras nervosas em regeneração (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 20x.

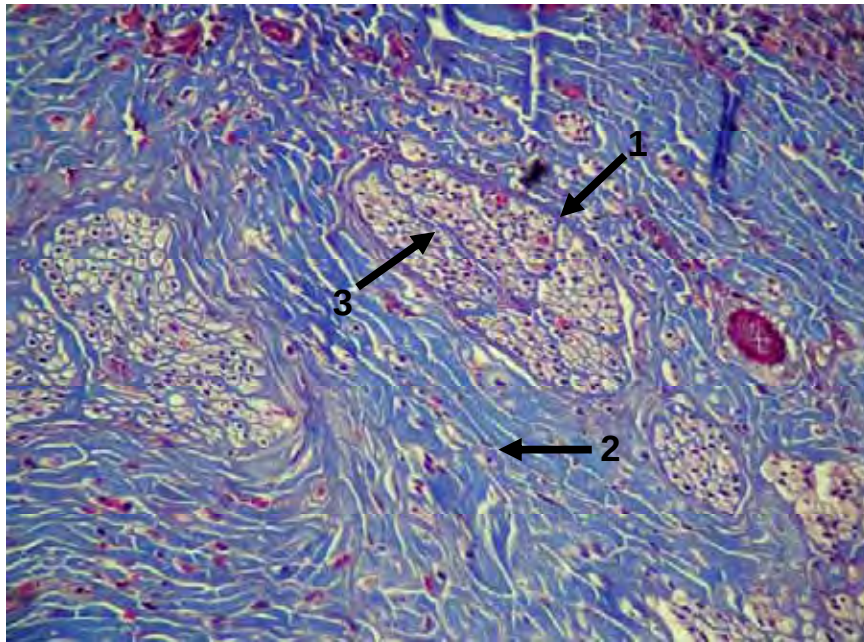


Figura 23. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do ramo cutâneo lateral do 17º nervo torácico de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar fascículos (1) delimitados por tecido conjuntivo (2) e com presença de fibras nervosas (3). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 20x.

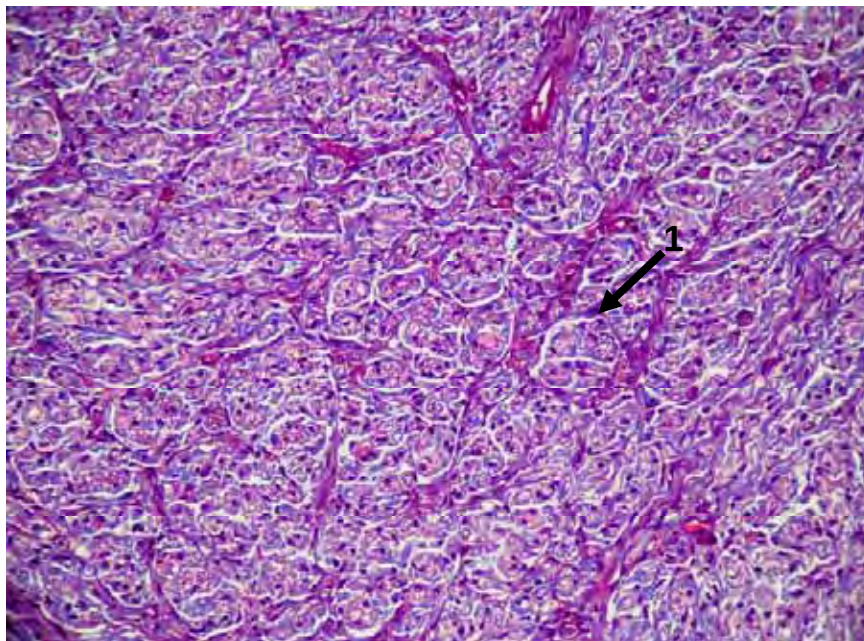


Figura 24. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar a disposição das fibras nervosas mielinizadas regeneradas em pequenos fascículos (1). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

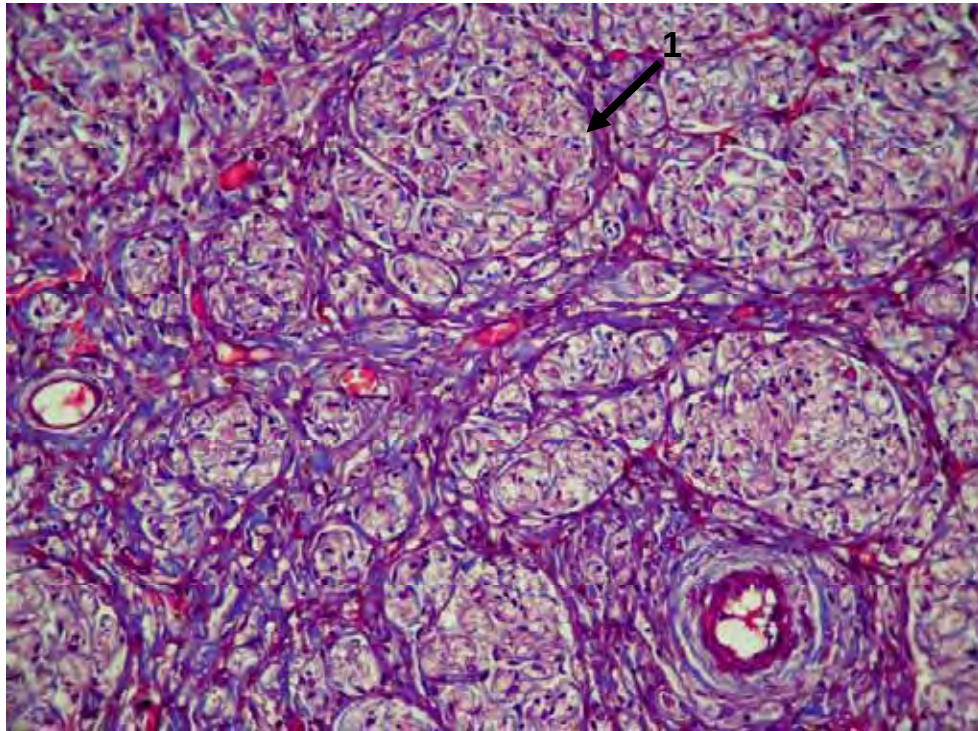


Figura 25. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar a disposição das fibras nervosas mielinizadas regeneradas em pequenos fascículos (1). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 40x.

Nos cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t, reparados com TS e TSC, dos animais do GII, em cortes longitudinais, havia notável proliferação de fibras nervosas, em fascículos, e de células de Schwann do segmento proximal ao distal com orientação longitudinal paralela. Os cabos de regeneração reparados com TS (Figura 26) apresentaram menor quantidade de fibras mielinizadas comparadas aos cabos reparados com TSC (Figura 27).

A utilização de colágeno entre os cotos dos nn.u e dos nn.t, como substância estimulante do crescimento axonal, favoreceu o processo de regeneração, de forma semelhante ao observado por SATOU et al. (1986), DA-SILVA (1993), LABRADOR et al. (1998), VERDU et al. (2002); MURAKAMI et al. (2003), PHILLIPS et al. (2005), CHENG et al. (2006) e LEE et al. (2006).

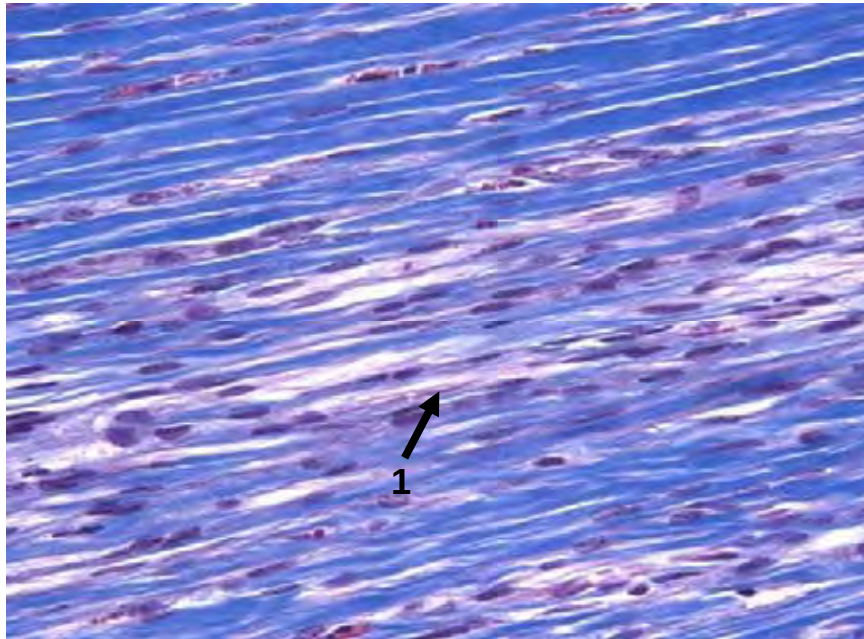


Figura 26. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone sem colágeno. Observar a disposição das fibras nervosas mielínicas em orientação longitudinal paralela (1). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

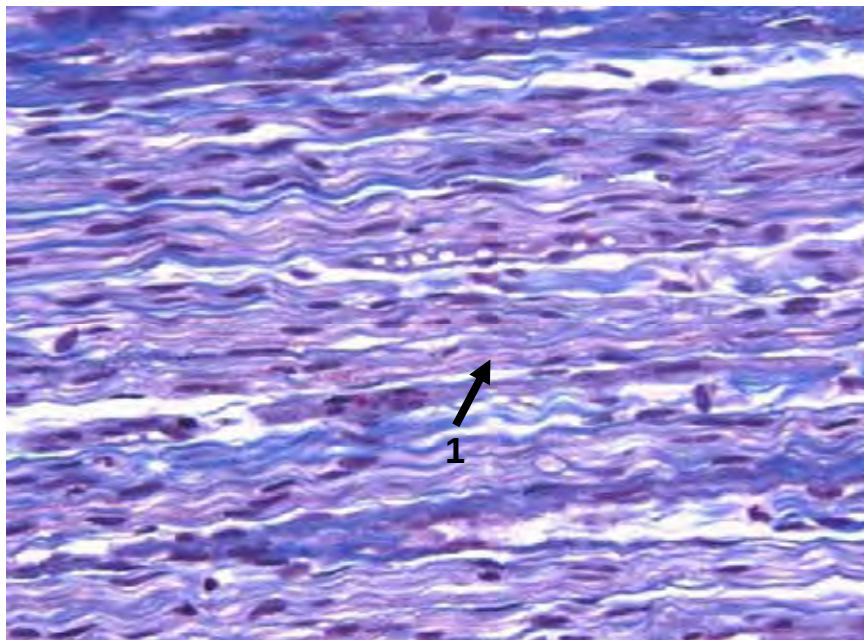


Figura 27. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar a grande quantidade de fibras nervosas mielínicas em orientação longitudinal paralela (1). Tempo de evolução de 26 semanas. TM, obj. 40x.

Os segmentos proximais, distais e cabos de regeneração dos nn.u e dos nn.t, reparados com TS e TSC, dos animais dos GI e GII, em cortes longitudinais e transversais, apresentaram infiltrado inflamatório difuso de células mononucleares e eosinófilos, de moderado a acentuado, próximo ao local de contato do feixe nervoso com o tubo de silicone (Figura 28). Não foi observado infiltrado inflamatório nos segmentos proximais e distais, fora das áreas próximas ao tubo.

A presença de infiltrado inflamatório junto aos cotos e cabo de regeneração foi discreta e não comprometeu o processo de regeneração.

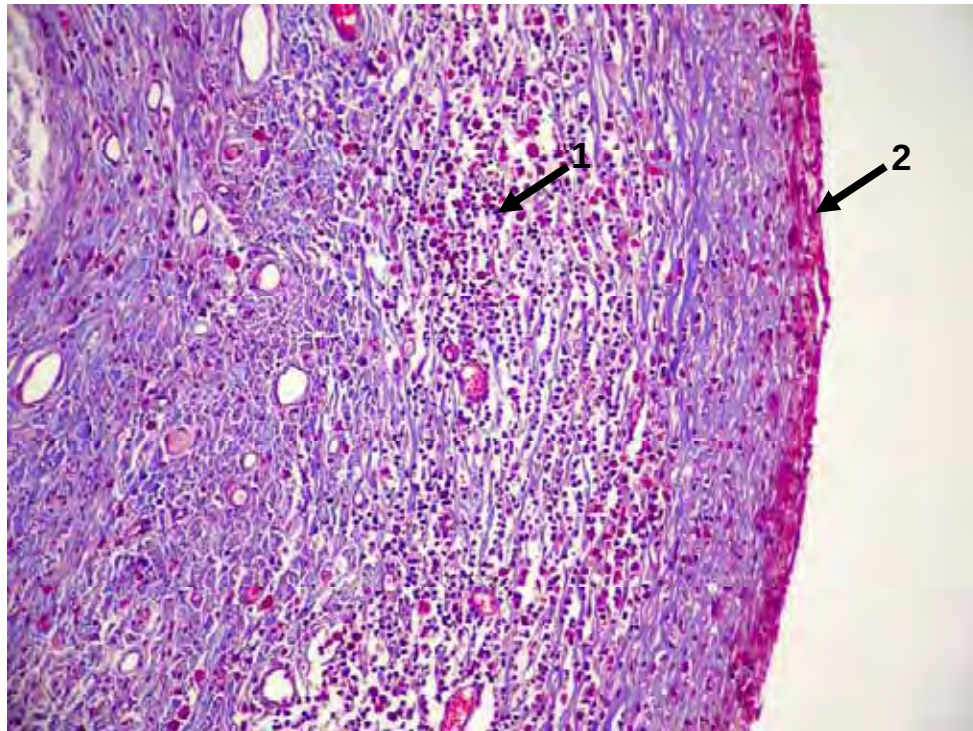


Figura 28. Aspecto microscópico do cabo de regeneração do nervo ulnar de eqüino submetido à neurorrafia com tubo de silicone com colágeno. Observar infiltrado inflamatório difuso (1), próximo ao local de contato do feixe nervoso com o tubo de silicone (2). Tempo de evolução de 13 semanas. TM, obj. 20x.

As avaliações, no seu conjunto, demonstraram que o processo de regeneração experimental de eqüinos pode ocorrer de forma satisfatória, com restauração morfológica e funcional dos nervos. Estudos futuros, visando aperfeiçoamento da técnica cirúrgica, e a procura por substâncias que promovam estímulo do crescimento axonal em eqüinos são aconselháveis.

5. CONCLUSÕES

Mediante a análise dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que:

1) A reparação com tubos de silicone nos nn.u e nos nn.t, possibilitou a regeneração nervosa periférica em eqüinos, sem formação de neuromas e com reduzida proliferação conjuntiva.

2) O uso de colágeno favoreceu o processo de regeneração axonal.

3) Os nn.u e nn.t de eqüinos mostraram-se viáveis como modelo experimental para o estudo da regeneração nervosa periférica.

6. REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, P.; GUENARD, V.; WINN, S.R.; VALENTINI, R.F.; GALLETTI, P.M. Blind-ended semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of a distal nerve stump. **Brain Research**, v. 454, n. 1-2, p. 179-187, 1988.
- AKASSOGLU, K.; AKPINAR, P.; MURRAY, S.; STRICKLAND, S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. **Neuroscience Letters**, v. 338, n. 3, p. 185-188, 2003.
- 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.
- ARIAS, M.V.B.; STOPIGLIA, A.J. Avulsão do plexo braquial em cães – 3. Eletroestimulação dos nervos radial, mediano, ulnar e musculocutâneo. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 87-91, 1997.
- ASHUR, H.; VILNER, Y.; FINSTERBUSH, A.; ROUSSO, M.; WEINBERG, H.; DEVOR, M. Extent of fiber regeneration after peripheral nerve repair: silicone splint vs. suture, gap repair vs. graft. **Experimental Neurology**, v. 97, n. 2, p. 365-374, 1987.
- BELLAMKONDA, R.V. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3515-3518, 2006.
- BUTI, M.; VERDÚ, E.; LABRADOR, R.O.; VILCHES, J.J.; FORÉS, J.; NAVARRO, X. Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. **Experimental Neurology**, v. 137, n. 1, p. 26-33, 1996.
- CEBALLOS, D.; NAVARRO, X.; DUBEY, N.; WENDELSCHAFER-CRABB, G.; KENNEDY, W.R.; TRANQUILLO, R.T. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v. 158, n. 2, p. 290-300, 1999.

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, n. 15, p. 1393-1403, 1998.

CHAMBERLAIN, L.J.; YANNAS, I.V.; HSU, H.P.; STRICHARTZ, G.R.; SPECTOR, M. Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-GAG matrix in a ten-millimeter gap. **Journal of Neuroscience Research**, v. 60, p. 666-677, 2000.

CHANG, C.J.; HSU, S.H. The effect of high outflow permeability in asymmetric poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 27, p. 1035-1042, 2006.

CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; CHEN, S.Y.; WU, C.W.; WANG, C.C.; WANG, W.Y.; HUANG, Y.S.; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. **Experimental Neurology**, v. 204, n. 1, p. 443-453, 2007a.

CHEN, H.H.; LIU, H.M. The use of collagen polymer tube and fibrin clot in peripheral nerve repair. **Proceedings of the National Science Council Republic of China**, v. 18, n. 2, p. 58-63, 1994.

CHEN, H.T.; YAO, C.H.; CHAO, P.D.L.; HOU, Y.C.; CHIANG, H.M.; HSIEH, C.C.; KE, C.J.; CHEN, Y.S. Effect of serum metabolites of *Pueraria lobata* in rats on peripheral nerve regeneration: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 2007b. DOI 10. 1002/jbm.b.30868. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/114265115/ABSTRACT?CRETY=1&SRE...>>. Acesso em : 20 ago. 2007.

CHEN, M.H.; CHEN, P.R.; CHEN, M.H.; HSIEH, S.T.; HUANG, J.S.; LIN, F.H. An *in vivo* study of tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinking gelatin conduits in peripheral nerve repair. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2006a.

CHEN, X.; WANG, X.D.; CHEN, G.; LIN, W.W.; YAO, J. Study of in vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into Schwann cell-like cells. **Microsurgery**, v. 26, n. 2, p. 111-115, 2006b.

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.

CHENG, C.Y.; YAO, C.H.; LIU, B.S.; LIU, C.J.; CHEN, G.W. The role of astragaloside in regeneration of the peripheral nerve system. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 76, n. 3, p. 463-469, 2006.

CHOI, B.H.; ZHU, S.J.; KIM, B.Y.; HUH, J.Y.; LEE, S.H.; JUNG, J.H. Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. **Internacional Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 5, p. 537-542, 2005.

COLLI, B.O. **Aspectos gerais das lesões traumáticas agudas dos nervos periféricos**. Ribeirão Preto: Hospital das Clínicas da Unidade SP, 2000. p. 147-164 (Tópicos de Neurocirurgia para Graduação).

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.

DAHLIN, L.B.; ANAGNOSTAKI, L.; LUNDBORG, G. Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves. **Scandinavians Journal Reconstructive Surgery**, v. 35, n. 1, p. 29-34, 2001.

DANIELSSON, P.A.; ADOLFSSON, L.; DAHLIN, L.B. Different effect on axonal outgrowth application of non-absorbable or absorbable tubes around a nerve repair. **Scandinavians Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 35, n. 4, p. 347-353, 2001.

DANIELSSON, P.; DAHLIN, L.; POVLSEN, B. Tubulization increases axonal outgrowth of rat sciatic nerve after injury. **Experimental Neurology**, v. 139, n. 2, p. 238-243, 1996.

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

DA-SILVA, C.F.; LANGONE, F. Addition of nerve growth factor to the interior of a tubular prosthesis increases sensory neuron regeneration *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 6, p. 691-694, 1989.

DELISTOIANOV, N.; MACORIS, D.G.; GODOY, R.F.; ALESSI, A.C. Comparação entre duas técnicas de neurorrafia do digital palmar em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 44-51, 2006.

DERBY, A.; ENGLEMAN, V.W.; FRIERDICH, G.E.; NEISES, G.; RAPP, S.R.; ROUFA, D.G. Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve. **Experimental Neurology**, v. 119, n. 2, p. 176-191, 1993.

DUCKER, T.B.; HAYES, G.J. Experimental improvements in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. **Journal of Neurosurgery**, v. 28, n. 6, p. 582-587, 1968.

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.

GAMA, S.A.M.; MATTAR JUNIOR, R.; SILVA, C.F.; LAINETTI, R.D. Estudo experimental comparativo da ação das neuroquinas cardiotrofina-1 e oncostatina-m na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 55-69, 2000.

GHOSHAL, N.G. Nervos espinhais. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 620-641.

GIBSON, K.L.; DANILOFF, J.K. Peripheral nerve repair. **Continuing Education Article**, v. 11, n. 8, p. 938-944, 1989.

HANSSON, T.; POVLSEN, B. Functional regeneration of C-fibres inside a silicone tube after sciatic neurotomy in rats. **Scandinavians Journal Reconstructive Surgery**, v. 31, n. 1, p. 7-11, 1997.

HOU, S.Y.; ZHANG, H.Y.; QUAN, D.P.; LIU, X.L.; ZHU, J.K. Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 101-110, 2006.

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⁺-ion-implanted silicon chamber. **Brain Research**, v. 1090, n. 1, p. 51-57, 2006.

ITOH, S.; TAKAKUDA, K.; ICHINOSE, S.; KIKUCHI, M.; SCHINOMIYA, K. A study of induction of nerve regeneration using bioabsorbable tubes. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 2, p. 115-123, 2001.

ITOH, S.; TAKAKUDA, K.; SAMEJIMA, H.; OHTA, T.; SHINOMIYA, K.; ICHINOSE, S. Synthetic collagen fibers coated with a synthetic peptide containing the YIGS sequence of laminin to promote peripheral nerve regeneration *in vivo*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, p. 129-134, 1999.

KAFEJIAN, A.P.; HADDAD-FILHO, D.; GUIDUGLI-NETO, J.; GOLDENBERG, S. Estudo comparativo das reações teciduais a implantação de silicone e politetrafluoroetileno no dorso de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 131-135, 1997.

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.

LAGO, N.; NAVARRO, X. Correlation between target reinnervation and distribution of motor axons in the injured rat sciatic nerve. **Journal Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 227-240, 2006.

LAINETTI, R.D.; DA-SILVA, C.F. Local addition of monosialoganglioside GM1 stimulates peripheral axon regeneration *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 8, p. 841-845, 1993.

LE BEAU, J.M.; LaCORBIERE, M.; POWELL, H.C.; ELLISMAN, M.H.; SCHUBERT, D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. **Brain Research**, v. 459, n. 1, p. 93-104, 1988.

LEE, D.Y.; CHOI, B.H.; PARK, J.H.; ZHU, S.J.; KIM, B.Y.; HUH, J.Y.; LEE, S.H.; JUNG, J.H.; KIM, S.H. Nerve regeneration with the use of a poly(l-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 1, p. 50-56, 2006.

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.

LI, Q.; PING, P.; JIANG, H.; LIU, K. Nerve conduit filled with GDNF gene-modified Schwann cells enhances regeneration of the peripheral nerve. **Microsurgery**, v. 26, n. 2, p. 116-121, 2006.

LIU, B.S.; YAO, C.H.; HSU, S.H. A novel use of genipin-fixed gelatin as extracellular matrix for peripheral nerve regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 19, n. 1, p. 21-34, 2004.

LIU, S.; LI, H.; YANG, J.O.; PENG, H.; WU, K.; LIU, Y.; YANG, J. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes filled with pyrroloquinoline quinine. **Microsurgery**, v. 25, p. 329-337, 2005.

LIVINGSTONE, C.; LUNGBORG, G. **Nerve injury and repair**. New York: Melbourne, 1988. p. 196-197.

LONGO, F.M.; HAYMAN, E.G.; DAVIS, G.E.; RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. **Brain Research**, v. 309, n. 1, p. 105-117, 1984.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. **Experimental Neurology**, v. 76, n. 2, p. 361-375, 1982a.

LUNDBORG, G.; LONGO, F.M.; VARON, S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. **Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 157-161, 1982b.

LUNDBORG, G.; ROSÉN, B.; ABRAHAMSON, S.O.; DAHLIN, L.; DANIELSON, N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. **Journal of Hand Surgery**, v. 19, n. 3, p. 273-276, 1994.

LUNDBORG, G.; ROSEN, B.; DAHLIN, L.; DANIELSEN, N.; HOLMBERG, J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study. **The Journal of Hand Surgery**, v. 22, n. 1, p. 99-106, 1997.

MACKINNON, S.E.; NOVAK, C.B. Nerve transfers. New options reconstruction following nerve injury. **Hand Clinical**, v. 15, n. 4, p. 643-666, 1999.

MADISON, R.D.; DA-SILVA, C.F.; DIKKES, P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. **Brain Research**, v. 447, n. 2, p. 325-334, 1988.

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

OHBAYASHI, K.; INOUE, H.K.; AWAYA, A.; KOBAYASHI, S.; KOHGA, H.; NAKAMURA, M.; OHYE, C. Peripheral nerve regeneration in a silicone tube: effect of collagen sponge prosthesis, laminin, and pyrimidine compound administration. **Neurology Medicine Chir**, v. 36, n. 7, p. 428-433, 1996.

PHILLIPS, J.B.; BUNTING, S.C.; HALL, S.M.; BROWN, R.A. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. **Tissue Engineer**, v. 11, n. 9-10, p. 1611-1617, 2005.

PODHAJSKY, R.J.; MYERS, R.R. The vascular response to nerve transection: neovascularization in the silicone nerve regeneration chamber. **Brain Research**, v. 662, n. 1-2, p. 88-94, 1994.

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

SANTOS, X.; RODRIGO, J.; HONTANILLA, B.; BILBAO, G. Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. **Microsurgery**, v. 19, n. 6, p. 275-280, 1999.

SATOU, T.; NISHIDA, S.; HIRUMA, S.; TANJI, K.; TAKAHASHI, M.; FUJITA, S.; MIZUHARA, Y.; AKAI, F.; HASHIMOTO, S. A morphological study on the effects of collagen gel matrix on regeneration of severed rat sciatic nerve in silicone tubes. **Acta Pathology Japonica**, v. 36, n. 2, p. 199-208, 1986.

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

SPEIRS, V.C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 90-91.

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

VERDU, E.; LABRADOR, R.O.; RODRIGUEZ, F.J.; CEBALLOS, D.; FORES, J.; NAVARRO, X. Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes. **Restoration Neurology Neuroscience**, v. 20, n. 5, p.169-179, 2002.

VORIA, I.; HAUSER, J.; AXIS, A.; SCHENKER, M.; BICHET, S.; KUNTZER, T.; GRENNINGLOH, G.; BARAKAT-WALTER, I. Improved sciatic nerve regeneration by local thyroid hormone treatment in adult rat is accompanied by increased expression of SCG10. **Experimental Neurology**, v. 197, n. 1, p. 258-267, 2006.

WEHLING, P.; PAK, M.; CLEVELAND, S.; NIEPER, R. The influence of bacterial collagenase on regeneration of severed rat sciatic nerves. **Acta Neurochirurgic**, v. 119, n. 1-4, p. 121-127, 1992.

WELLS, M.R.; KRAUS, K.; BATTER, D.K.; BLUNT, D.G.; WEREMOWITZ, J.; LYNCH, S.E.; ANTONIADES, H.N.; HANSSON, H.A. Gel matriz vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatriz, collagen, and methylcellulose. **Experimental Neurology**, v. 146, n. 2, p. 395-402, 1997.

WILLIAMS, L.R.; AZZAM, N.A.; ZALEWSKI, A.A.; AZZAM, R.N. Regenerating axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. **Experimental Neurology**, v. 120, p. 49-59, 1993.

WILLIAMS, L.R.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; LUNDBORG, G.; VARON, S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay, **The Journal of Comparative Neurology**, v. 218, n. 4, p. 460-470, 1983.

WILLIAMS, L.R.; VARON, S. Modification of fibrin matrix formation in situ enhances nerve regeneration in silicone chambers. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 231, n. 2, p. 209-220, 1985.

XU, X.; YEE, W.C.; HWANG, P.Y.K.; YU, H.; WAN, A.C.A.; GAO, S.; BOON, K.L.; MAO, H.Q.; LEONG, K.W.; WANG, S. Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly (phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2405-2412, 2003.

YANNAS, I.V.; HILL, B.J. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1593-1600, 2004.