Maria Inês Meira Dolfini

Efeitos do FK-506 na regeneração de nervos após Neurorrafia Látero-terminal. Estudo em ratos.

Tese de Doutorado

Botucatu

2014

Maria Inês Meira-Dolfini

Efeitos do FK-506 na regeneração de nervos após Neurorrafia Látero-terminal. Estudo em ratos.

[Effects of FK-506 on nerve regeneration after side-to-end Neurorrhaphy. Study in rats.]

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientandor: Prof. Adj. Fausto Viterbo

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Meira-Dolfini, Maria Inês.
Efeitos do FK-506 na regeneração de nervo após neurorrafia látero-terminal. Estudo em ratos. = Effects of FK-506 on nerve regeneration after side-to-end Neurorrhaphy Study in rats / Maria Inês Meira-Dolfini. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Fausto Viterbo
Capes: 40102149

Músculos – Regeneração. 2. Nervos periféricos. 3. Nervos – Cirurgia.

Palavras-chave: FK-506; Neurorrafia látero-terminal; Regeneração nervosa.

Maria Inês Meira Dolfini

Efeitos do FK-506 na regeneração de nervos após Neurorrafia Látero-terminal. Estudo em ratos.

[Effects of FK-506 on nerve regeneration after side-to-end Neurorrhaphy. Study in rats.]

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Comissão Examinadora

Presidente e orientador: **Prof. Dr. fausto Vi**terbo

Examinador: **Prof. Dr. Alexandre L. R. Oliveira**

Examinador: **Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira**

Examinador: **Prof. Dr. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus**

Examinador: **Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior**

Botucatu, SP _____ de _____ de _____.

Botucatu

2014

Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, trote.
Quando não conseguir trotar, caminhe.
Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha"

Madre Teresa de Calcutá

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO:

À DEUS,

"Ao Sr. da minha história, que além de conceder-me o dom mais precioso que uma mulher pode desejar: o de ser Esposa e Mãe, ainda me permitiu o dom de estudar um pouco o seu invento mais valioso: a vida."

Ao meu Esposo e Filhos:

Silmar,

Mariana, Pedro, André e Clara

"Obrigada por me darem o presente mais valioso desta Terra: o "tempo", o qual deveria ter sido destinado integralmente a vocês, mas que por amor, vocês me permitiram utilizar parte dele para realização deste trabalho. Saiba que foi sempre pensando em vocês, que eu fiz o melhor que eu podia..."

Aos meus pais:

José Felício Meira

Ana Inês Coracine Meira

"Que com paciência e orações participaram das minhas idas e vindas nesta estrada...."

"Pai.... o que eu não daria para tê-lo aqui... nenhum elogio conseguirá ser tão doce quanto seria o seu...."

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Fausto Viterbo,

Nem todos tem a sorte de ser aceita por um orientador com as suas características: competência, inteligência, conhecimento e reconhecimento da sociedade. Portanto, por ter me aceito e por tudo que se dignou a me ensinar, o meu mais profundo agradecimento, reconhecimento e respeito.

Aos que sempre estiveram do meu lado:

Joaquim e Ana

William e Denise

Renato e Camila

Henrique

ainda não sei como agradecer tanto...

Por isso continuo pedindo a Deus que o faça por mim."

de maneira muito especial :

Ednelson Henrique Bianchi

" .. que durante todo o tempo do meu trabalho prático esteve ao meu lado, me auxiliando. Muito Obrigado..."

e com todo o carinho do mundo:

Cleide D. T.T Neves,

Cristiane Neves Alessi Pissulin,

Janete Caprioli Carrocini,

Roselaine Palhares Alves,

Magno C. Viera, Antonio F. Ferrari, Felipes V.Rodrigues, Willys Tristão e Nader Wafae (in memória)

Com vocês eu sempre aprendo algo, todos os dias.

Resumo

A neurorrafia látero-terminal sem lesão do nervo doador representou grande avanço na área de microcirurgia de nervos periféricos. O coto distal do nervo receptor é suturado na face lateral do nervo doador, sem prejudicá-lo. Desde 1994, o FK-506, uma droga imunossupressora, tem sido utilizado para impedir a rejeição do aloenxerto nos transplantes de órgãos e apresentou, em alguns estudos, como ação secundária, efeitos positivos sobre a regeneração nervosa periférica. O objetivo desse trabalho foi estudar se a administração de FK-506 traria benefícios na regeneração do nervo após neurorrafia látero-terminal. Foram utilizados 80 ratos Wistar, divididos em 4 grupos experimentais. Cada rato teve seu nervo fibular esquerdo seccionado e a extremidade distal suturada término-lateralmente ao nervo tibial. Os animais do grupo I, II e III foram submetidos à administração de FK-506 com dose de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/kg/dia, respectivamente, durante dois meses, enquanto os animas do grupo Controle (GC) não receberam nenhuma droga. Após dois meses da cirurgia, os ratos foram submetidos ao teste da marcha, estudo eletrofisiológico e análise das fibras musculares e nervosas. O grupo II (GII) apresentou o músculo tibial cranial (MTC) com menor massa ($p < 0,05$) e maior amplitude ($p = 0,019$). Os resultados do número total de fibras nervosas foram maiores para GII ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos para os índices funcionais. Com base em nosso modelo experimental, pudemos concluir que a administração de FK-506 na dose de 0,5 mg/Kg/dia diminuiu o ganho de massa corporal e massa do músculo tibial cranial e aumentou a regeneração das fibras nervosas, embora não tenha conseguido alterar a resposta funcional.

Palavras-chave: neurorrafia látero-terminal, regeneração nervosa, FK-506.

Abstract

The latero-terminal neurorrhaphy without injury to the donor nerve, represented great advances in microsurgery of peripheral nerves. The receptor nerve distal stump was sutured on the lateral side of the donor nerve, without harming it. Since 1994, FK-506, an immunosupressive drug, has been used to prevent allograft rejection in organ transplants and presented, in some studies, as a secondary action, positive effects on peripheral nerve regeneration. The aim of this work was to investigate whether the administration of FK-506 would benefit nerve regeneration after a latero-terminal neurorrhaphy. We used 80 Wistar rats, divided into four experimental groups. Each rat had its left fibular nerve sectioned and the distal stump sutured to the lateral of the tibial nerve. The animals of group I, II and III were subjected to the administration of FK-506 in an amount of 1.0, 0.5 to 0.25mg/K/day, respectively, for two months, while the aminals of the control group received no drug. Two months after surgery the rats were submitted to the walking test, eletrophysiological study and analysis of muscle and nerve fibers**.** The group II **(**GII) showed cranial tibial muscle (MTC) with lower mass ($p < 0.05$) and higher amplitude ($p = 0.019$). The results by the total number of nerve fibers was higher for GII ($p < 0.001$) . There was no significant difference between groups for functional indices. Based on our experimental model, we could conclude that the administration of 0.5 mg/Kg/dia of FK-506 decreased body mass gain and mass of MTC and increased regeneration of nerve fibers, although not able to change the functional response.

Keywords: side-to-end neurorraphy, nerve Regeneration, FK-506.

Lista de Abreviações

AIAE - Abertura intermediária dos artelhos da pata experimental
AIAN - Abertura intermediária dos artelhos da pata contralateral
APE - Abertura do passo experimental
APN - Abertura do passo contralateral
ATAE - Abertura total dos artelhos da pata experimental
ATAN - Abertura total dos artelhos da pata contralateral
BDNF - Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo
CMAP - Potencial de ação muscular composto
CNTF - Fator Ciliar Neurotrófico
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPE - Comprimento total da pata experimental
CPN - Comprimento total da pata contralateral
FDA - Food and Drug Administration – US
Fig. - Figura
FKBP - Imunofilina (fk-bining protein isoenzime)
G - Gramas
GC - Grupo controle – não recebeu nenhuma dose da droga
GI - Grupo I – (1,0 mg/Kg/dia)
GII - Grupo II – (0,5 mg/Kg/dia)
GIII - Grupo III – (0,25 mg/Kg/dia)
HE - Hematoxilina e eosina
IFF Bain - Índice Funcional do n. Fibular segundo Bain
IFI De Medinaceli - Índice Funcional do n. Isquiático segundo De Medinaceli
IFI Bain - Índice Funcional do n. Isquiático segundo Bain
i.p. - Intraperitoneal
M. - Músculo
MCL - Membro contralateral (membro direito sem NLT)
ME - Membro experimental (membro esquerdo com NLT)
Mg/Kg - Micrograma/Kilograma
MLCL - Músculo do lado contralateral
MLE - Músculo do lado experimental
MO - Microscópio Óptico
Ms - Milissegundos

MTC - Músculo tibial cranial

mV - Milivolt

N. - Nervo

N1 - Segmento distal do n. fibular comum esquerdo

N2 - Segmento proximal do n. fibular comum esquerdo

N3 - Área da NLT

N4 - Segmento do nervo fibular comum direito

NEF - Fator de Crescimento Neurotrófico

NGF - Fator de crescimento neuronal

Ng/ml - Nanograma/mililitro

NLT - Neurorrafia látero-terminal

NN. - Nervos

NTL - Neurorrafia término-lateral

NTT - Neurorrafia término-terminal

P - Nível de significância

PPS - Pitch Pattern Sequence – padrão de frequência

PVPI - Polivinilperrolidona-iodo

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

Tab. - Tabela

TAM - Teste de avaliação da marcha

TI - Distância entre o 2º e o 4º artelhos

TS - Distância entre o 1º e o 5º artelhos

µm - Micrômetro

µg/l - Microgramas por litro

µs - Microssegundos

Lista de Ilustrações

Figura 1A -	Fixação do coto proximal à musculatura adjacente.....	52
Figura 1B -	Fixação do coto distal do n. fibular comum ao n. tibial.....	52
Figura 2AB -	Técnicos preparando os ratos para o corredor da marcha.....	53
Figura 2CD -	Fitas com as marcas das patas dos ratos.....	53
Figura 3A -	Impressão nítida da pata.....	56
Figura 3B -	Impressão não nítida da pata.....	56
Figura 4A -	Eletromiógrafo – Shappire II 4ME.....	57
Figura 4B -	Posicionamento dos eletrodos.....	57
Figura 5A -	Imagem do n. isquiático e seus ramos.....	58
Figura 5B -	Esquema do n. isquiático e seus ramos.....	58
Figura 6 -	Secção transversal do MTC.....	58
Figura 7 -	Escolha de cinco fibras musculares por imagem.....	59
Figura 8 -	Escolha de cinco fibras nervosas por imagem.....	61
Figura 9 -	Gráfico das médias das massas iniciais e finais dos animais.....	65
Figura 10 -	Gráfico das médias do MTC (MLCL e MLE).....	66
Figura 11 -	Gráfico das médias dos índices funcionais.....	67
Figura 12 -	Médias obtidas no estudo eletrofisiológico (latência / amplitude).....	68
Figura 13A -	Corte histológico do MTC (MLCL – GC).....	69
Figura 13B -	Corte histológico do MTC (MLCL – GI).....	69
Figura 13C -	Corte histológico do MTC (MLCL – GII).....	69
Figura 13D -	Corte histológico do MTC (MLCL – GIII).....	69
Figura 13E -	Corte histológico do MTC (MLE – GC).....	69
Figura 13F -	Corte histológico do MTC (MLE – GI).....	69
Figura 13G -	Corte histológico do MTC (MLE – GII).....	69
Figura 13H -	Corte histológico do MTC (MLE – GIII).....	69
Figura 14 -	Gráfico da área, diâmetro máximo e mínimo dos MLEs.....	70
Figura 15 -	Gráfico da área, diâmetro máximo e mínimo dos MLCLs.....	71
Figura 16 -	Gráfico das médias do total de fibras musculares por campo.....	73
Figura 17A -	Corte histológico do N4 (GC).....	74
Figura 17B -	Corte histológico do N4 (GI).....	74
Figura 17C -	Corte histológico do N4 (GII).....	74
Figura 17D -	Corte histológico do N4 (GIII).....	74
Figura 17E -	Corte histológico do N1(GC).....	74

Figura 17F - Corte histológico do N1 (GI)..... 74
Figura 17G - Corte histológico do N1 (GII)..... 74
Figura 17H - Corte histológico do N1 (GIII)..... 74
Figura 18 - Gráfico da área, diâmetro máximo e mínimo do N1..... 75
Figura 19 - Gráfico da área, diâmetro máximo e mínimo do N4..... 76
Figura 20 - Gráfico das médias do total de fibras nervosas por campo..... 77
Figura 21 - Segmento proximl do n. fibular comum esquerdo (N2)..... 78

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Médias e desvios padrões das massas individuais iniciais e finais dos animais..... 64
Tabela 2 - Médias e desvios padrões das massas do MTC para o MLCLe para o MLE..... 66
Tabela 3 - Médias e desvios padrões dos índices funcionais..... 67
Tabela 4 - Médias e desvios padrões obtidos no estudo eletrofisiológico..... 68
Tabela 5 - Médias e desvios padrões da área, diâmetro máximo e mínimo das fibras musculares dos MLEs..... 70
Tabela 6 - Médias e desvios padrões da área, diâmetro máximo e mínimo das fibras musculares dos MLCLs..... 71
Tabela 7 - Médias e desvios padrões do total de fibras musculares por campo..... 72
Tabela 8 - Médias e desvios padrões da área, diâmetro máximo e mínimo das fibras nervosas dos segmentos N1..... 75
Tabela 9 - Médias e desvios padrões da área, diâmetro máximo e mínimo das fibras nervosas dos segmentos N4..... 76
Tabela 10 - Médias e desvios padrões do total de fibras nervosas por campo..... 77

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Abreviações

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

1. Introdução..... 26

2. Revisão de literatura 28

2.1 Nervo..... 29

2.2 Lesão, degeneração e regeneração nervosa..... 30

2.2.1 Lesão..... 30

2.2.2 Degeneração e regeneração nervosa..... 31

2.3 Neurorrafia látero-terminal..... 34

2.4 FK-506..... 41

2.4.1 Estrutura química do FK-506..... 42

2.4.2 Indicação e mecanismo de ação..... 42

2.4.3 Apresentação e dosagem..... 43

2.4.4 Absorção, concentração sérica e metabolização..... 43

2.4.5 Efeitos colaterais..... 44

2.4.6 Influência na regeneração axonial..... 44

3. Objetivo..... 48

4. Método..... 50

4.1 Animais..... 51

4.2 Procedimentos cirúrgicos..... 51

4.3 Testes utilizados..... 53

4.3.1 Teste de avaliação da marcha..... 53

4.3.2 Estudo eletrofisiológico..... 56

4.4 Sacrifício e coletas de peças histológicas..... 57

4.4.1 Aferição da massa corporal e do MTC..... 58

4.4.2 Processamento histológico das fibras musculares..... 59

4.4.3 Processamento histológico dos segmentos nervosos..... 60

4.5 Análise estatística..... 62

5. Resultados..... 63

5.1 Massa corporal..... 64

5.2 Massa do MTC..... 65
5.3 Teste de avaliação da marcha..... 66
5.4 Teste eletrofisiológico..... 67
5.5 Estudo histológico das fibras musculares..... 69
5.6 Estudo histológico dos segmentos nervosos..... 73
6. Discussão..... 79
6.1 Teste de avaliação da marcha..... 89
6.2 Teste eletrofisiológico..... 91
6.3 Massa corporal e massa do MTC..... 92
6.4 Análise histológica do MTC..... 93
6.5 Análise histológica dos segmentos nervosos..... 93
6.6 Atuação do FK-506..... 94
6.7 Considerações..... 99
7. Conclusão..... 100
8. Referências Bibliográficas..... 102
9. Anexos..... 132
9.1 Painel..... 133
9.2 Certificado..... 134
9.3 Tabelas..... 135
9.4 Análise Estatística..... 141

de que adiantaria ganhar o mundo,
se perdesse a minha alma ...

(Mt 16,26)

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Há muito os cientistas vem procurando soluções para os traumatismos graves por transecção em nervos periféricos, na busca de reparação funcional, já que a ocorrência desse tipo de lesão é rotineira na prática clínica e sua recuperação pode necessitar de intervenção cirúrgica. No século II, Galeno (131-201 d.C.) já discorria sobre a potencialidade da regeneração neural (*apud* Geuna et al., 2006) e, situada entre os anos 1210 e 1277, encontra-se a descrição da primeira cirurgia em nervos periféricos, realizada por William de Saliceto, na Bolonha (*apud* Viterbo, 2003), tendo sido Gabrieli Ferrara, em 1596 (*apud* Artico et al., 1996), no entanto, o primeiro a descrever detalhadamente a técnica de sutura em nervos. Logo no início dos estudos em nervos periféricos foram publicadas as suturas término-terminais, bem como os enxertos de nervos sadios quando havia perda de tecido nervoso. Em 1851, já se sabia que o nervo, uma vez seccionado, sofreria degeneração no seu coto distal conforme a publicação intitulada *Experiments on the section of the glossopharingeal and hipoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers*, de Waller. Sunderland (1968) descreveu a anatomia interna do nervo e a sutura fascicular microcirúrgica utilizando informações e observações feitas em acidentados durante a II Guerra Mundial, quando neurorrafias e enxertos foram muito realizados.

se todos os escritos e livros se perdessem ou se queimassem
e só restasse o "Sermão da Montanha" não haveríamos
Perdido absolutamente nada...

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nervo

Nosso Sistema Nervoso (SN) está preparado para nos conectar, perceber e responder ao meio ambiente externo e interno. Anatomicamente, o SN está dividido em SNC (parte protegida por estojos ósseos: esqueleto cefálico e coluna vertebral) e SNP (distribuído por todo o tecido mole do corpo).

Dentre as estruturas que fazem parte do SNP encontram-se os nervos, conjuntos de fibras nervosas, que conectam as mais diversas partes do corpo ao SNC. Cada fibra nervosa periférica é constituída de axônio e uma bainha de neurilema. E de acordo com a disposição desta bainha de neurilema pode-se distinguir duas classes de fibras periféricas: fibras mielinizadas, onde as células de Schwann (neurolemócitos) envolvem apenas um axônio, individualmente, formando bainha de mielina; e as amielínicas, onde as células de Schwann envolvem grupos de axônios e não produzem mielina.

Essas fibras nervosas, juntas, formam cordões esbranquiçados, razoavelmente fortes por estarem unidas por tecido conjuntivo, dispostos da seguinte forma: cada fibra é envolvida por um tecido conjuntivo muito delicado denominado endoneuro; envolvendo várias fibras com suas bainhas de neurilema mais o endoneuro aparece a segunda camada de tecido conjuntivo, denominada de perineuro, que funciona como uma barreira frente a substâncias estranhas, formando fascículos de fibras nervosas. A quantidade de fibras por fascículos é extremamente variável. Vários feixes são envolvidos pela terceira camada conjuntiva, o epineuro, constituindo o conjunto denominado de nervo.

Esses revestimentos conjuntivos permitem microambiente próprio para a passagem de vasos sanguíneos e linfáticos, além da presença de uma população de células constituídas de fibroblastos (mais organizados no perineuro) e, ocasionalmente, macrófagos e mastócitos.

Podemos utilizar diversos parâmetros para classificar os nervos, dentre eles, a direção do estímulo que o percorre: sensitivo (aferente – conduzem informações dos receptores sensoriais ao SNC) e motores (eferentes – conduzem informações do SNC aos órgãos periféricos, como glândulas e músculos) ou ainda mistos, quando apresentam os dois componentes.

2.2 Lesão, degeneração e regeneração nervosa

2.2.1 Lesão

Os nervos estão sujeitos às mais diversas alterações patológicas. Várias classificações foram feitas na tentativa de facilitar a compreensão das disfunções causadas por essas lesões, das quais duas ficaram mais conhecidas: a de Seddon (1943) e a de Sunderland (1968).

Sunderland delineou cinco níveis de lesão do nervo - de grau I a V - que podem ser correlacionados aos três níveis de acometimento dos nervos apresentados por Seddon: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese.

Na **neuropraxia**, ou Grau I, há um bloqueio de condução (provocado por trauma ou isquemia local do nervo), sendo uma lesão a nível bioquímico (provavelmente na bainha de mielina) e não estrutural (Ferreira, 1999). A recuperação se dá sem ocorrer o processo de degeneração Walleriana, de forma rápida (alguns dias ou semanas), espontânea e completa (Batista & Araújo, 2010).

Na **axoniotmese**, ou Grau II, o bloqueio de condução ocorre devido à perda de continuidade do axônio (normalmente provocada por esmagamento, tração excessiva ou trauma fechado do nervo), embora o tecido conjuntivo envolvente se mantenha preservado. Nessa situação ocorre a degeneração Walleriana dos axônios comprometidos no segmento distal à lesão. Axônios degenerados misturam-se a células macrofágicas e, simultaneamente, há proliferação abundante de células de Schwann (Henriques, 2004). A regeneração axonial permite recuperação funcional do nervo entre dois e seis meses (a regeneração ocorre em torno de um mm ao dia), o que é possível pelo fato de as bainhas conjuntivas manterem-se intactas (Roque, 2008).

A **neurotmese** (forma mais grave de lesão nervosa), considerada por Seddon como a que leva à ruptura total dos nervos (causada por projéteis de arma de fogo, armas brancas, mordidas de animais ou fraturas com deslocamentos), foi classificada por Sunderland em três graus distintos: III, IV e V. O grau III apresenta ruptura axonial e da bainha mais interna, o endoneuro; o grau IV apresenta perda de axônios com rompimento do endoneuro e perineuro, mas com manutenção do epineuro; e o grau V representa realmente a ruptura total, com completa solução de continuidade, já que além do axônio, todas a bainhas conjuntivas

(endoneuro, perineuro e epineuro) se romperam também. Neste caso, a atuação cirúrgica é inevitável para que se tente uma recuperação funcional.

2.2.2 Degeneração / Regeneração

O modelo animal permite, por observação, compreender muito da regeneração axonial. Após uma lesão (neurotmese), é possível observar, em vários momentos distintos, o início de diversas alterações estruturais.

Em seguida a uma ruptura, os corpos de neurônios correspondentes (tanto na área anterior da medula quanto no gânglio da raiz dorsal) apresentam aumento da atividade metabólica, que se dá em torno de seis horas pós-injúria, podendo permanecer do 4º ao 20º dia (Burnett & Zager, 2004), e que se caracteriza pelo aumento no tamanho e deslocamento do núcleo para a periferia, o qual se torna eosinófilo e sofre dispersão dos grânulos de Nissl, refletindo a prioridade em produzir neurotransmissores que estimulem o crescimento e a reparação axonial, como lipídeos, RNA mensageiro, tubulinas e fatores de crescimento, entre outros. Segue-se uma fase de supervivência e regeneração, levando em consideração a intensidade da agressão traumática (quanto maior a intensidade, mais intensa a reação retrógrada), a proximidade da lesão com o corpo do neurônio (quanto mais próximo, mais provável a morte celular), a idade do paciente (quanto mais jovem, melhor a resposta regenerativa) e a manipulação cirúrgica adequada. Outras consequências da lesão são a ruptura da barreira hematonervosa e a exposição a proteínas que atuam sobre os antígenos, podendo levar a uma reação autoimune e desencadear um ciclo de degeneração.

O axônio seccionado responde ao trauma, distintamente, nos dois cotos resultantes: proximal e distal. No coto proximal, já na primeira hora aparecem modificações devido à resposta inflamatória, que afeta aproximadamente a extensão de 1 cm (Henriques, 2004), onde os restos de axônios e mielina vão sendo degradados, estendendo-se por um ou dois nódulos de Ranvier, caso a lesão esteja muito próxima do corpo celular pode haver apoptose (Lee & Wolf, 2000; Burnett & Zager, 2004). Observa-se, ainda, uma diminuição do diâmetro da bainha de mielina (da linha de incisão até o corpo celular), que pode ou não se recuperar mais tardiamente, embora persista uma perda de +/- 20%, segundo Henriques (2004). Se a degradação chegar ao corpo celular, o coto proximal também pode entrar no mecanismo dito "degeneração Walleriana" e é fagocitado. Ainda, esse coto se comporta como um sítio de intensa atividade, pois as células de Schwann multiplicam-se e migram formando as bainhas

de Bungner (Batista & Araújo, 2010). No coto distal, como consequência da separação do centro trófico, a maioria dos axônios são reduzidos a detritos amorfos em 24 horas, ocorrendo o processo que tem seu início em um período de 48 a 96 horas pós-lesão, denominado "degeneração Walleriana" (Verdú et al., 2000). Há desorganização dos neurotúbulos e neurofilamentos, simultaneamente com a degeneração e a fragmentação da bainha de mielina, em 48 horas. A mielina fragmentada é transformada em gordura neutra, favorecendo a ação dos macrófagos hematógenos que, junto com os fragmentos de axônios, são eliminados. As células de Schwann tornam-se metabolicamente muito ativas, aumentam em número e ganham função fagocitária, devido às citocinas que são sintetizadas e secretadas pelos macrófagos. Também secretam fatores neurotróficos, as neurotrofinas (como por exemplo, o fator de crescimento neuronal - NEF e o fator neurotrófico derivado do encéfalo - BDNF), que entre outras funções, estimulam o crescimento axonial, pois se dispersam ao redor do axônio, em grande quantidade e, segundo Ide (1996), promovem a sobrevivência neuronal, estimulando o crescimento. Embora haja a fragmentação dos axônios e posterior fagocitose, as membranas conjuntivas são preservadas. Normalmente, após três semanas, encerra-se o mecanismo que leva à degeneração Walleriana.

Após uma intervenção cirúrgica de aproximação dos cotos, a sequência de regeneração pode ser observada em cinco diferentes regiões: corpo celular, extremidade proximal (área de injúria até o corpo celular), área de injúria (propriamente dita), extremidade distal (área de injúria até o órgão-alvo) e órgão-alvo (Burnett & Zager, 2004).

No corpo celular, o núcleo volta à sua posição central e os grânulos de Nissl se reorganizam. Há uma troca momentânea na função celular: a prioridade passa de transmissão sináptica para reparação celular. Para isso, o metabolismo celular é reprogramado a ponto de se tornar capaz de produzir uma larga quantidade de proteínas necessárias para a regeneração e o crescimento. As células de Schwann, no coto proximal, proliferam, alinham-se longitudinalmente e se organizam em colunas, as Bandas de Büngner, forrando os tubos endoneurais, orientando o novo crescimento axonial que ocorre mediado por fatores quimiotáteis (Stoll & Muller, 1999; Belkas et al., 2004; Campbell, 2008), favorecido pela criação desse microambiente adequado. De cada axônio partem de dois a três novos brotos. Distalmente a esses brotamentos nervosos há um cone de crescimento ou bulbo, cuja atividade determina a direção do crescimento nervoso (Lundborg, 2000; Henriques, 2004), com inúmeras projeções digitiformes que exploram esse microambiente e que apresentam a capacidade de estimular o alongamento axonial (através de fatores neurotróficos, fatores

promotores de neuritos, precursores de matriz e fatores metabólicos), além de produzir proteínas que determinam limpeza do caminho até o órgão-alvo, dissolvendo a antiga matriz de mielina (Lee & Wolf, 2000).

Regeneração axonial, porém, não é sinônimo de recuperação funcional. Para isso, é necessário também um processo de maturação. Mudanças morfológicas de maturação do axônio (restauração da dimensão e da velocidade de condução) prosseguem além da regeneração axonial, em velocidade bem menor, e se prolongam por aproximadamente um ano ou, dependendo do local da lesão, por até 5-6 anos (Hall, 2001), e a recuperação somente ocorrerá se houver restabelecimento da conexão com o órgão-alvo (Rovak et al., 2000). Segundo Verdú et al. (2000), Waldram (2003) e Henriques (2004), mesmo após longos períodos (pós-reparação), tanto a dimensão quanto a velocidade de condução permanecem abaixo dos valores normais.

A orientação do avanço da extremidade depende das características do segmento distal. Na ausência de uma estrutura guia, os axônios regenerados tornam-se tortuosos, e formam-se os neuromas, brotos axoniais imaturos que não levam à reconexão músculo-nervosa (Favero et al., 2007).

A média de crescimento do axônio é ainda muito discutida pelos autores: 0,5-3 mm/dia (Cardoso, 1992); 3-4 mm/dia e 2-3 mm/dia após esmagamento e ruptura, respectivamente (Stoll & Muller, 1999); apenas 1 mm/dia (Grant et al., 1999; Hall, 2001; Fernandez et al., 2007; Batista & Araújo, 2010). E é necessário também levar em consideração os principais fatores influentes na regeneração: o *gap* nervoso, a formação de neuromas, a extensão da lesão, a distância entre o corpo do neurônio e a extremidade a ser reparada, a idade do paciente e a técnica empregada para a reparação nervosa (Dourado et al., 2003).

Aparentemente, o neurônio periférico humano mantém a capacidade de iniciar a regeneração por pelo menos até 12 meses depois da lesão (Burnett & Zager, 2004). Mas como consequência da perda de estímulos, o músculo, que é órgão-alvo do nervo motor, sofre progressiva atrofia já nas primeiras semanas, chegando à perda de 80 % de suas fibras em um período de quatro meses. Portanto, é geralmente aceito que, se não houve alcance do nervo até a placa motora em um período máximo de 12 meses, fica muito reduzida a chance de reparo funcional. Já os órgãos-alvos dos nervos sensoriais - corpúsculo de Ruffini, corpúsculos de Meissner e células de Merkerl - mantêm-se viáveis por um tempo bem maior, favorecendo a reparação sensorial (Siqueira, 2007).

A regeneração do nervo periférico lesado, com uma completa reabilitação funcional, sensitiva e motora, continua sendo um desafio para os pesquisadores, quer pela falta de um entendimento completo dos fatores biológicos e moleculares envolvidos na regeneração neural, quer por deficiência da técnica operatória utilizada (Viterbo, 1992a). Na tentativa de diminuir as sequelas das lesões traumáticas dos nervos periféricos, como a perda de sensibilidade e motricidade (e suas consequências), além dos desajustes no córtex cerebral e uma desorganização no mapa cortical (Rosén et al., 2003; Siqueira, 2007), diversas técnicas foram desenvolvidas: 1- neurorrafia término-terminal (NTT) com sutura epineural (Millesi, 1984; Kline, 1990) e com sutura fascicular (Lundborg, 1987), sutura essa, que pode ser realizada com fios de diversos tipos (nylon, pdf) ou ainda através de adesivos biológicos, como a cola de fibrina (Viterbo et al., 1993; Nunes & Silva, 2008); 2- técnicas de tubulização com diversos materiais: polietileno (Gibson & Daniloff, 1989), silicone (Delistoinov et al., 2006), tubos de pericárdio bovino (Virmond & Pereira, 2000), tubo fibrocolagenoso envolto em fáscia (Watanabe et al., 2001), tubulização preenchida com fatores de crescimento ou fatores neurotróficos (Costa et al., 2006; 2009), com tecido adiposo (Moraes, 2009; Rosa Junior, 2010), túbulos biodegradáveis ou não (Ijkema-Paasen et al., 2004), veias invertidas ou não (Barcelos et al., 2003; Roque, 2008), tubulização venosa com m. esquelético (Battiston et al., 2000; Geuna et al., 2000); enxertos de nervos autólogos (Sunderland, 1991; Kotulska et al., 2006), enxertos heterólogos (Heath & Rutkwski, 1998); 3- implantes biossintéticos (Tansey et al., 2011). Todas essas técnicas necessitam ambos os cotos, proximal e distal, disponíveis. Muitas vezes o coto proximal não é viável, nesses casos sacrifica-se um nervo adjacente, que é seccionado, tendo o seu coto proximal utilizado como doador de fibras nervosas. Essa lesão determina sequelas ao nervo doador. Para evitar essa situação Viterbo et al.(1992a) introduziram a técnica da Neurorrafia látero-terminal (NLT), sem lesão do nervo doador.

2.3 Neurorrafia látero-terminal (NLT)

Uma opção terapêutica surgiu com a NLT, representando um grande avanço na área de microcirurgia de nervos periféricos. Essa técnica parte do princípio que os axônios do nervo doador emergem pela parede lateral e adentram o nervo receptor (brotamentos laterais), restabelecendo a transmissão dos estímulos elétricos (Viterbo et al, 1992b; Viterbo & Faleiros, 2002; Lundborg, 2000; Lykissas, 2011), Essa técnica é especialmente indicada

quando o segmento proximal do nervo não está disponível (Yamauchi et al., 2001; Zhang & Fisher, 2002; Matsuda et al., 2005; Samal et al., 2006), situação essa frequentemente encontrada em patologias como paralisia facial e lesões do plexo braquial. Outra situação em que essa neurorrafia vem sendo utilizada é quando o intervalo entre o coto proximal e o coto distal é acentuadamente grande, necessitando longo enxerto de nervo. Nessa situação a NLT é a alternativa, pois o coto distal pode ser suturado na lateral de algum nervo próximo ao mesmo. Evitando-se enxertos longos de nervo obtém-se recuperação mais rápida, diminuindo sequelas especialmente motoras. Outra vantagem da neurorrafia seria superar a diferença de calibre entre os nervos a serem coaptados (Brown, 1972; Rodrigues & Perez, 2009) e não alterar a função do nervo doador (Luo et al., 1997; Ögun et al., 2003; Sato, 2005; Lykissas, 2011).

Na literatura, há controvérsias quanto à denominação desta técnica. Se utilizado como parâmetro a direção dos axônios, de doador para o receptor, teremos uma neurorrafia látero (porção lateral do nervo doador) – terminal (porção terminal do nervo receptor), ou ainda, uma neurorrafia término (porção terminal do nervo doador) – lateral (porção lateral do nervo receptor). Embora, o termo Neurorrafia término-lateral (NTL), tenha sido utilizado de forma genérica para ambas as situações, Dellon et al. (2010) chamaram a atenção para a necessidade de usar-se nomenclatura que defina exatamente o modo com que foi feita a neurorrafia.

As primeiras descrições a respeito da utilização da NLT de que se tem notícia são de 1873 e 1895, quando Létiévant e Ballance (*apud* Ballance et al., 1903), respectivamente, dela fizeram uso em situações de espasmos faciais. Através de incisão na lateral do nervo acessório foi suturado o segmento distal do nervo facial seccionado. Houve retorno dos movimentos faciais, porém de forma associada aos movimentos do ombro, o que não trouxe resultados satisfatórios. Em 1899, Kennedy et al. (*apud* Al-Qattan, 2001; Zhang & Fisher, 2002) e em 1903, Ballance et al., com a mesma abordagem, trataram patologias semelhantes, porém com incisão maior no nervo doador, feita por Kennedy et al., deixando praticamente apenas o epineuro do lado oposto à NLT intacto. Obtiveram movimentos facias, porém associados aos movimentos do ombro, o que representou resultado inadequado. Em 1901, Barrago e Ciarella (*apud* Viterbo, 1992a) encontraram resultados semelhantes em cães. Essa técnica, preconizada desde Sherren (1906), ressaltava a importância de secção (longitudinal ou transversal) no nervo doador, praticamente abrindo-o, fazendo com que parte do nervo ficasse comprometido, determinando seqüelas às áreas por ele inervadas e, conseqüentemente, prejuízos ao paciente, levando Babcock (1927) a recomendar o abandono dessa NLT.

Os maus resultados daquela época eram agravados pela ausência de microscópio cirúrgico, só introduzido a partir de 1964, e de materiais cirúrgicos inadequados para lesões de tão pequenas dimensões (Lykissas, 2011).

Após grande intervalo na literatura, Krivolutskaia et al. (1989) publicaram uma NLT suturando o segmento distal do ramo mandibular (ramo do n. trigêmeo) à lateral do ramo bucal (ramo do n. facial), mas fazendo escarificações com agulhas na lateral do nervo doador. May & Drucker (1993) propuseram a sutura do coto distal do nervo facial à lateral do nervo hipoglosso após incisão parcial neste último, determinando sequelas menores do que as obtidas com NLT do facial ao hipoglosso. Mesmo assim esta proposta determinou sequelas na movimentação da língua.

Em 1992 Viterbo et al. introduziram novo conceito de ligação em nervos periféricos, ou seja a NLT ou NTL, sem lesão no nervo doador, inclusive em nervos delgados, sem retirada de janela epineural. Em nervos mais espessos, como nos nervos do plexo braquial, Viterbo et al. recomendam confecção da janela epineural. Os autores observaram que as três camadas de tecido conjuntivo eram absorvidas permitindo que os axônios sofressem brotamentos laterais (*sprouting*) e penetrassem nos tubos endoneurais do nervo receptor. Essa contribuição foi muito importante, pois a partir daí qualquer nervo passa a ser doador em potencial.

Diversos autores confirmaram os achados de Viterbo (1992a/b) e Viterbo et al. (1992) (Lundborg et al. (1994a/b), Ross et al. (1995), Noah et al. (1997). Lundborg et al (1994a/b) ratificaram histologicamente a presença de axônios no segmento nervoso fixado, após 35 dias; e após 90 dias, através da estimulação do nervo tibial, observaram movimentos do m. gastrocnêmio e do m. tibial anterior, sugerindo que fatores provenientes do coto nervoso fixado induziriam os brotamentos laterais de axônios intactos.

Outros autores, entretanto, não obtiveram os mesmos resultados de Viterbo et al. (1992a/b). Bertelli et al. (1996) realizou estudo experimental e observou os animais após três e seis meses da cirurgia, sendo a união dos nervos realizada com cola de fibrina. Estes autores não obtiveram resultados funcionais e não realizaram estudos histológicos. Al-Qattan e Al-Tunyan (1998) realizaram NLT com suturas epineurais e sacrificaram os animais após 50 dias, não encontrando regeneração axonial.

Em 1995 e em 1998, Viterbo et al. estudaram a NLT com e sem janela de epineuro, encontrando os mesmos resultados. Com modelo experimental semelhante, Matsuda et al.

(1995), Battat et al. (1996), Cao et al. (1997), Dourado et al. (2003) e Lykissas (2011), encontraram resultados semelhantes, ou seja, com ou sem fenestrações no epineuro. Em 1998, Tham & Morrison encontraram evidências de axônios mielinizados no nervo receptor, sem nenhuma evidência de dano para o nervo doador e apresentaram resultados com 60% de recuperação na força de contração após três meses da realização da NLT com janela epineural. Giovanolli et al. (2000) utilizando a técnica da NLT sem janela epineural, enfatiza que além de não haver prejuízo para o nervo doador, seus músculos nervo-dependentes também não apresentam prejuízo funcional.

Cao et al. (1997), Zhao et al. (1997) e Rosseto et al. (2001) não encontraram igualmente diferença significativa na capacidade de regeneração neural após a NLT, com ou sem janela de epineuro. Zhang et al., em 2000, realizando observação em um período de 8 a 12 meses de pós-operatório e, em 2001, um período de dois a três meses de pós-operatório, encontraram respostas funcionais semelhantes para NLT com ou sem janela epineural, embora o perfil histológico das fibras axoniais das NLT com janela epineural fossem melhores. Em 2001, Yamauchi et al., usando a ação da acetiltransferase, encontraram recuperação funcional após NLT sem janela epineural, observando três meses de pós-operatório e, em 2007, Noditi et al., após uma observação de até dois anos de pós-operatório, constataram que a presença do epineuro não só não interfere na reconstituição axonial, como também não impede a passagem do estímulo elétrico.

Haninec et al. (2012) concluíram que a sutura epineural não invade o conteúdo neural, é simples, de fácil execução, não necessitando de grandes amplificações, e observaram, em 13 pacientes, após utilizar a NLT em nervos axilares em paralisia do plexo braquial, reinervação e reconstituição funcional entre sete e doze meses, através de métodos eletrofisiológicos e funcionais.

Kalliainen et al. (1999), Haastert et al. (2010) e Frutan et al. (2011), compararam as duas técnicas: NLT com NTT utilizando modelo experimental semelhante, sendo o nervo fibular comum utilizado para a NTT e, para a NLT, o nervo tibial funcionou como doador após ter o coto distal do nervo fibular comum suturado a sua parede lateral. Kalliainen et al. demonstraram que não havia diferença significativa em recuperação de força, após seis meses de cirurgia, Haastert et al., não encontraram diferenças no estudo eletrofisiológico, após oito semanas, embora tenham encontrado uma quantidade maior de axônios mielinizados na distal de uma NTT e Frutan et al. não encontraram diferenças na análise funcional (IFI De Medinaceli - Índice funcional do n. isquiático segundo De Medinaceli), após 16 semanas.

Mennen (1998a) utilizou a NLT em estudo em primatas (babuínos) com resultados satisfatórios, confirmado histologicamente com os brotamentos laterais e recuperação funcional através de testes eletrofisiológicos e empregou também a técnica em humanos (1998b e 2003). Em 1998 utilizou a técnica em 22 pacientes e utilizando testes de condução elétrica, demonstrou que, além de respostas clínicas satisfatórias, havia recuperação motora e sensorial. Em 2003, Mennen conseguiu bons resultados utilizando a técnica em 56 pacientes, nas mais diversas injúrias, desde avulsão do plexo braquial até lesões dos nervos digitais, encontrando os melhores resultados na reinervação do m. bíceps (motor) e na reinervação da pele da palma da mão (sensitiva). Amr & Moharram (2005) também relatam sucessos em 11 pacientes tratados com paralisia do plexo braquial com a NLT e enxertos através de NLT . Haninec et al. (2012) utilizaram em pacientes, com bons resultados, na reinervação do nervo axilar.

Em 2005, Bontioti et al. e em 2006, Ozbek & Kurt conseguiram bons resultados utilizando apenas um nervo doador para dois nervos receptores lesionados (nn.radial e/ou mediano e/ou ulnar suturados ao n. musculocutâneo e nn. sural e fibular comum suturados ao n. tibial, respectivamente), e algumas associações começaram a aparecer, como por exemplo, o uso da NLT associado ao *laser* de baixa potência (Gigo-Benato et al., 2004) e a eletroestimulação (Maciel, 2011).Tanto a associação com o *laser* quanto a eletroestimulação mostraram favorecer a velocidade da reparação, sendo eficientes na recuperação funcional do músculo e do nervo.

Relatos de sucesso em reconstruções de nervos sensitivos passaram a ser frequentes: Viterbo (1993), Lundborg et al. (1994b), Tarasidis et al. (1998), Kanje et al. (2000), Frey & Giovanoli (2003), Ögun et al. (2003), Yüksel et al. (2004), Voche & Quattara (2005), Kovacic et al. (2007) e Noditi et al. (2007). Frey & Giovanoli (2003) relataram dois casos, o n. digital ulnar do polegar suturado à lateral do n. mediano e outro, o n. digital ulnar do dedo anelar suturado à lateral do n. radial do mesmo dedo. A sensibilidade foi recuperada em ambos pacientes, sem alterações na sensibilidade da área do nervo doador quando comparado ao correspondente contralateral, acreditando ser esse o modelo ideal para o estudo em regeneração sensorial. Yüksel et al. (2004) obtiveram bons resultados em dois casos extremos que não teriam nenhuma chance de reparo direto, suturando n.ulnar à lateral do n. mediano e em outro caso, suturou os nn. mediano e radial ao n. ulnar.

Em 1998, Tarasidis et al. e, em 1999, Matsumoto et al. sugerem que apenas os axônios sensitivos é que teriam brotamento lateral após a NLT. Pannucci et al., em 2007, e Dvali &

Myckatyn, em 2008, após uma revisão de literatura, acrescentaram que, embora os axônios motores também respondam com brotamentos laterais, somente os sensitivos é que responderiam sem nenhuma lesão deliberada no nervo doador. Em contrapartida, Lundborg et al., Sawamura & Abe e Tham & Morrison, em 1994b, 1997 e 1998, respectivamente, descreveram ótimos resultados para os brotamentos laterais em axônios motores, enquanto Samal et al. (2006) e Dubový et al. (2011) relataram resultados com capacidade similar, tanto para axônios motores quanto para os sensitivos.

Autores como Lutz et al. (2000), Terzis & Papakonstantinou (2000) levantaram a importância de se trabalhar com nervos com alta contagem axonial, após observarem que o n. mediano apresentava diferença de reinervação se suturado na parede do n. ulnar ou do n. radial, apresentando melhores resultados quando suturado ao n. ulnar.

Com esse volume de trabalhos confirmando os achados de Viterbo (1992a), deu-se início a uma discussão sobre qual seria o mecanismo de regeneração nervosa após a NLT. A teoria mais aceita, apontada por Viterbo em 1992ab, é a capacidade do nervo em emitir brotamentos laterais, o que também foi enfatizado por diversos outros autores (Liu et al, 1999; Zhang et al., 1999; 2000; Kanje et al., 2000; Giovanoli et al., 2000; Yamauchi et al., 2001; Hayashi et al., 2004; Zhu et al., 2005; Bontioti et al., 2005; Flores, 2006; Pondaag & Gilbert, 2008; Zhu et al., 2008; Beris & Lykissas, 2009; Cheng et al., 2011; Dubový et al., 2011). O mecanismo pelo qual ocorre o brotamento lateral ainda não está bem esclarecido. Para alguns autores (Zhu et al., 2005 e 2008; Beris & Lykissas, 2009; Lykissas, 2011) o brotamento lateral seria obtido a partir de estímulos proporcionados pelas neurotrofinas (fatores de crescimento tipo-insulina I e II, fatores de crescimento nervosos, fatores de crescimento de fibroblastos, fator ciliar neurotrófico (CNTF), assim como fatores associados ao contato físico no ponto anastomótico) provenientes da região do nódulo de Ranvier do nervo doador, mais próximo ao local da fixação dos nervos; ou, ainda, seria o resultado de uma combinação desses sinais ou fatores, que além de promoverem o brotamento lateral também são capazes de promover o crescimento axonial (Fortes et al., 1999; Caplan et al., 1999; Bajrovic et al., 2002). As células de Schwann passariam para o epineuro do nervo receptor, preparando a passagem dos axônios intactos provenientes do brotamento lateral, brotamentos esses que apresentam múltiplos filopedia, os quais aderem à lâmina basal da célula de Schwann, utilizando-a como guia (Lundborg, 2000; Campbell, 2008; Geuna et al., 2009; Batista & Araújo, 2010). Zhu et al. (2005) desenvolveram a *micro-tease technique*, uma técnica que demonstra o brotamento lateral de fibras do nervo doador, inúmeras pequenas fibras na região

mais próxima do primeiro nódulo de Ranvier, a partir do local da NLT. As neurotrofinas liberadas pelas células de Schwann usariam como meio de transporte o epineuro e seriam transferidas, por difusão, ao perineuro e endoneuro (Noah et al., 1997; Al-Qattan & Al-Thunyan, 1998; Liu et al., 1999). Ainda, a presença da célula de Schwann, contendo laminina e fribonectina, favorece o avanço da regeneração axonial, pois estimula tanto a região do nódulo de Ranvier do nervo doador quanto o coto distal do nervo receptor (Tarasidis et al., 1997), em que a distância dessa regeneração é limitada mais pela extensão dos processos das células de Schwann do que propriamente pelo crescimento axonial (Flores et al., 2000; Betini, 2010), já que o axônio para de crescer se, ao invés de encontrar as colunas formadas pelas células de Schwann, adentrar em tecido conectivo.

Uma variação da técnica descrita por Viterbo et al. (1994b) e, posteriormente, confirmada por outros autores como Lykissas et al., 2007 e Lykissas, 2011, mostra que tanto o coto proximal quanto o distal poderiam ser suturados na lateral do nervo doador. A vantagem teórica seria que os brotamentos axoniais do coto proximal cresceriam pelo nervo doador e aumentariam o número de fibras nervosas no coto distal, receptor. Jung et al. (2009) acrescentaram que o coto proximal, que em outra técnica seria inviável e inútil, nesta contribuiria para estimular o aparecimento de mais um sítio de brotamento lateral. Distintos nervos coaptados a um único nervo doador, também foi experimentado (Ozbek & Kurt, 2006). Outra variação da técnica, também bastante recente, é o embraçamento, por meio da qual o nervo receptor abraça o nervo doador e é preso a ele mediante um único ponto, sendo especialmente indicado para áreas cirúrgicas mais profundas (Viterbo et al., 2012).

Recentemente, novas indicações para a NLT foram introduzidas, como para a reinervação em paralisia de m. orbicular dos olhos (Sundine et al; 2003); recuperação em paralisia de pregas vocais (Liu et al., 2005), recuperação sensitiva em paraplégicos (Viterbo & Ripari, 2008), prevenção e/ou solução para os neuromas dolorosos (Ayan et al., 2007; Viterbo & Ripari, 2008; Aszmann et al, 2010; Batista & Araújo, 2010), e utilização em nervos autonômicos (Dong et al., 2012; Gao et al., 2012).

As pesquisas prosseguiram buscando melhores resultados funcionais após secção de nervo periférico com a NLT, para isso, além das variações na técnica original e a diversidade de indicações, também foram sendo associadas diferentes substâncias, dentre as quais citamos: 1 - adesivos biológicos, ao invés de suturas, como cola de fibrina (Viterbo et al., 1993; Nunes & Silva, 2008); 2 - fatores de crescimento ou fatores neurotróficos (Flores et al.,

2000; Johnson et al., 2008); 3 - agentes farmacológicos (Atikins et al., 2007; Casha et al, 2008), entre esses, os imunossupressores vem sendo estudados.

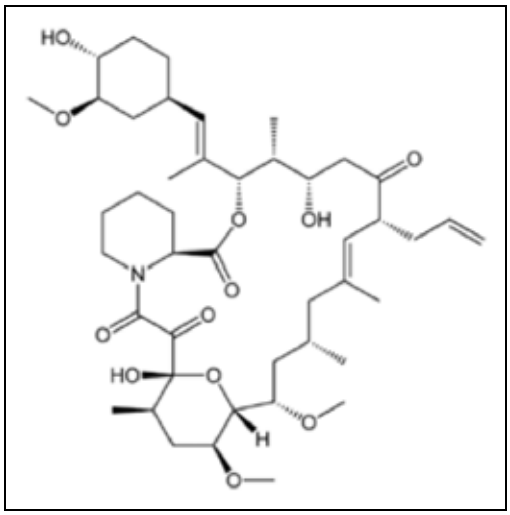
2.4 FK-506

Tacrolimus, também conhecido como FK-506 ou Fujimicin ($C_{44}H_{69}O_{12}$), é um antibiótico macrolídeo com ação imunossupressora, produzido pelo *Streptomyces tsukubaensis*, descoberto em 1984, por Goto et al, no solo da cidade de Tsukuba, na região norte do Japão. A droga recebeu, inicialmente, o nome completo de FK900506, e foi relatada pela primeira vez no 11º Congresso Internacional da Sociedade de Transplante, realizado em Helsinki, em 1986, já apresentada como FK-506. No ano seguinte, foi demonstrado como opção terapêutica quando apareceu na literatura o primeiro relato experimental, *in vitro* e em animais. Entre 1987 e 1988 foi desenvolvido o primeiro uso de ELISA para quantificá-lo. Em 1989, foram feitos os primeiros ensaios clínicos, em Pittsburgh, e em 1991, durante o 1º Congresso Internacional sobre FK-506, realizado também nessa cidade, foram apresentadas informações relativas a mecanismo de ação, eficiência clínica, toxidade e metabolismo (Wallemacq & Reding, 1993).

Em 1992 essa droga passou a ser designado também com o nome de Tacrolimus, resultante da união do nome da bactéria que o produz e sua ação - Tsukubaensis Macrolide Immunossupressant (Kino et al., 1987a,b).

Aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration - US)*, em 1994, para uso em transplantes (fígado, rim, coração, intestinos, pâncreas, pulmão, pele, córnea, medula óssea e demais órgãos) (Selzner et al., 2001), o mesmo vem sendo comercializado pela empresa Asteltas Pharma Inc., com os nomes comerciais Prograf®, Advagraf®, Protopic® e Tacrolimus®, e pela empresa Janssen-Cilag Pty Ltd, com o nome de Prograf-XL®.

2.4.1. Estrutura química do FK-506



Tacrolimus é um pó branco que, dissolvido em acitonitrila e mantido em baixa temperatura, toma a forma de prismas cristalinos. O Tacrolimus puro, em forma de prismas, resulta da recristalização. É insolúvel em água (hidrófobo) e solúvel em metanol, etanol, acetona e etil acetato.

2.4.2. Indicação e mecanismo de ação

Sua primeira e principal indicação é como droga imunossupressora, com a função de impedir a rejeição do aloenxerto no transplante de órgãos (Starzl et al., 1989; Garcia et al., 2004; Prada, 2004).

O FK-506, com base no sítio de ação imunorregulatório, é classificado como inibidor de transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T, pois se difunde prontamente para o citoplasma da célula T (Armstrong & Oellerich, 2001). O FK-506 atua na via de sinalização de cálcio, inibindo a atividade da calcineurina (proteína fosfatase 2B - ativada por cálcio) somente após se ligar a uma diferente imunofilina, a *fk-bining protein isoenzyme* 120 (FKBP-12 / fosfatase 2B), interferindo nessa via de transdução no sinal de imunoativação das células T (Thomson et al., 1995; Scott et al., 2003). As imunofilinas ligadoras do FK-506 (FKBPs) se associam a receptores de glicocorticoides ou de progesterona, por meio da ação de proteínas de fase aguda da inflamação (*heat shock proteins*). A ligação do FK-506 aos receptores de glicocorticóides protege-o contra a degradação ou inativação, promovendo a sua translocação

para o núcleo e potencializando a sua ligação no DNA, inibindo a transcrição de diversas citocinas inflamatórias e mimetizando o efeito dos corticóides (Thomson et al., 1995). Também inibe a ativação das células B, através de sua ação sobre as células T e sobre o bloqueio da transcrição do gene TNF-a por um anticorpo Ig (Fagiuoli et al., 1992; Estévez, 2004).

Tem uma atividade similar à da Ciclosporina, embora com estrutura química diferente. Estudos indicam que o FK-506 tem maior potência imunossupressora, mesmo em menor volume. *In vitro*, o Tacrolimus é de 10 a 100 vezes mais potente (Kino & Goto, 1993; Jain & Fung, 1996; Scott et al., 2003; Garcia et al., 2004), enquanto seus efeitos colaterais, como a nefrotoxicidade, são menores (Wang et al., 1997).

2.4.3. Apresentação e dosagem

Os nomes comerciais utilizados são Prograf® e Advagraf®, comprimidos de 0,5 mg, 1,0, 3,0 e 5,0 mg, sendo o Advagraf® de liberação prolongada. São também apresentados na forma líquida, em ampolas de 1,0 e 5,0 mg/ml, e numa formulação tópica, o Protopic®, de 0,1% e 0,03%. O Prograf-XL®, da Janssen-Cilag, é apresentado em forma de *blisters*, com dosagem de 0,5 mg, 1,0 e 5,0 mg, com liberação gradual (Peters et al., 1993; Australian Public, 2010).

A dose inicial é de 0,075 – 0,3 mg/kg/dia para adultos e 0,15 – 0,3 mg/kg/dia para crianças.

2.4.4. Absorção, concentração sérica e metabolização

A absorção dessa droga é rápida, porém pobre e incompleta no trato gastrointestinal, determinando biodisponibilidade que varia entre 4 % a 89 %, sendo em média de 20 % a 25 %, e não é influenciada pela bile, o que lhe confere uma vantagem particular em transplante hepático. Sua concentração sérica máxima é alcançada entre 30 e 60 minutos ou, na administração oral, após 1-2 horas; depois, circula ligada a proteínas plasmáticas, linfócitos e hemácias e sofre extensa metabolização via fígado e, em menor grau, na mucosa intestinal, resultando em mais de 15 metabólitos. A meia-vida de eliminação média é de dez horas, sendo sua depuração maior em crianças, e reduzida na presença de severa disfunção hepática (Spencer et al., 1997).

O FK-506 pode ser quantificado em níveis sanguíneos, em soro, no sangue total ou no plasma, embora segundo Ventakamanan et al., (1991), seja difícil desenvolver uma técnica específica e sensível, devido à sua baixa absorção e concentração no plasma e no sangue. No sangue total, é encontrado em uma concentração de 10 a 30 vezes maior que no plasma, porque é sequestrado pelos eritrócitos (Moreira, 2008). A concentração sanguínea total deve permanecer entre 10 µg/l e 15 µg/l, em um período curto, e entre 5 µg/l e 10 µg/l, após períodos mais longos. Distribui-se na maioria dos tecidos e atravessa a placenta (1/3 da concentração encontrada no plasma materno), sendo que os níveis observados no leite materno são similares aos encontrados no plasma e, segundo Scott et al. (2003), mesmo em pacientes com neurotoxicidade referente à droga, não aparece no fluído cerebroespinal.

2.4.5. Efeitos colaterais

Uma das principais desvantagens do FK-506 é o efeito diabetogênico (Scott et al., 2003), cuja incidência é dose-dependente, e diminui quando seu nível sérico encontra-se abaixo de 10 ng/ml. Pode apresentar condições neurotóxicas como tremores, cefaleias, parestesia, agitação, ansiedade, labilidade emocional, confusão mental, depressão ou euforia, distúrbios de cognição, pesadelos, sonolência, vertigens e enxaquecas.

Em ratos, uma dose única de 100 mg/kg foi relatada como letal; em doses repetidas, mostrou efeitos tóxicos em alguns órgãos, como por exemplo, no rim (1,5 a 3,2 mg/kg/dia por 13 semanas), no pâncreas (diabetogênese) e no sistema nervoso, onde doses superiores a 5 mg/kg/dia levaram a efeitos tóxicos mínimos sobre os nervos periféricos, enquanto doses acima de 3,2 mg/kg afetaram o SNC (Estévez, 2004).

Não foram evidenciados sinais carcinogênicos em estudos de mais de um ano, em ratos e babuínos, nem potencial embriotóxico (Estévez, 2004), embora uma complicação comum tenha sido o nascimento prematuro com baixo peso corporal (Ramos *et al*., 2008).

2.4.6. Influência na regeneração axonial

Outras indicações têm sido relatadas na literatura, como cicatrização de feridas (Francaville et al., 1989), regeneração de células hepáticas em humanos, estimulação de crescimento de cabelos em mamíferos (Yamamoto et al., 1994); ação neuroprotetora (Castilho

et al., 2000) e, mais recentemente, em colites ulcerativas, dermatite atópica severa (Castro, 2006) e vitiligo infantil (Reyes-Perez & Medeiros-Domingues, 2006).

Dois relatos, em 1994, demonstraram a possibilidade de o FK-506 estar influenciando a capacidade de regeneração neural *in vitro* (Lyons et al.) e *in vivo* (Gold et al.). Outros autores, como Gold et al. (1995), Wang et al. (1997), Fansa et al. (1999) e Doolabh & Mackinnon (1999), descreveram experimentos em que o FK-506 demonstrou acelerar a recuperação funcional através de aumento no crescimento neural ou acelerando o amadurecimento dos brotos neurais. Steiner et al. (1997) descreveram crescimento axonial também em fibras dopaminérgicas e serotonérgicas.

Em 1998, Madsen et al. relataram que o FK-506 pode melhorar resultados funcionais em injúrias do SNC, em humanos. Muitos estudos vêm sugerindo papel neuroprotetor no SNC (Butcher et al., 1997; Guo et al., 2001; Benetoli & Milani, 2002) e neurorregenerador no SNP (Lyons et al., 1994; Gold et al., 1995; Wang et al., 1997; Yeh et al., 2007).

A teoria do mecanismo de ação aceita, que tenta explicar a atuação do FK-506 sobre a regeneração neural, é a de que, além da ação inibidora da atividade da calcineurina, o FK-506 se ligaria à imunofilina FKBP-12, aumentando a fosforilação do *gap-43* (proteína associada de crescimento), ativando-a (Gold & Villafranca, 2003; Hayashi et al., 2005). O *gap-43* tem papel relevante no processo de alongamento axonial (Lyons et al., 1994). O FKBP-12 (peso molecular 12kd) é uma proteína que, mediada pelo FK-506 (complexo FK506-FKBP-12), tem a capacidade de inibir a proliferação de célula T, sendo encontrada, também em neurônios ao lado da calcineurina. Portanto, o aumento da regeneração axonial poderia advir do aumento da fosforização ativada por esse complexo, via *Gap-43*, pela sua capacidade de inibir a atividade da calcineurina (Gold et al., 1995; Gold & Villafranca, 2003). A partir daí, as hipóteses levantadas para a aceleração da regeneração axonial pressupõem que a administração por diferentes períodos levaria ao aumento do número de fibras mielinizadas (Wang et al., 1997; Doolabh & MacKinnon, 1999), ou axônios mais extensos (Wang et al., 1997) e fibras mais longas (Doolabh & Mackinnon, 1999), situações essas possíveis por existir um menor número de destruição dos brotos regenerativos e um aumento no processo de mielinização.

Mas em estudos também de Wang et al. (1997), em que se comparava a ação do FK-506 e da Ciclosporina A sobre a regeneração neural, observou-se que há uma grande separação entre a propriedade imunossupressora e a capacidade de favorecer a regeneração nervosa, pois a Ciclosporina, que apresenta o mesmo mecanismo de ação, não tem nenhuma influência sobre a regeneração nervosa, resultado também observado por Gold & Villafranca

(2003) e Cheng et al. (2011). Esta afirmação é contraposta pelo trabalho de Bain et al. (1992), que traz resultados considerados excelentes com o uso da Ciclosporina A.

Outras hipóteses foram levantadas (Snyder & Sabatini, 1995; Wang et al., 1997),como a atuação direta do FKBP-12 ativando o TGF-β1, que é conhecido por estimular a síntese do NGF (fator de crescimento neuronal) em células gliais, e neste caso conseguiria ter atuação direta no crescimento axonial, mas ainda sem respaldo científico.

Yang et al. (2003) estudaram os efeitos de doses diferentes de FK-506 na regeneração periférica nervosa para determinar se a neurorregeneração poderia ser realçada sem a toxidade da imunossupressão sistêmica. As análises histomorfométricas demonstraram melhorias estatisticamente significativas na neurorregeneração, verificadas nos 30º e 35º dias do pós-operatório, com doses de 0,5 a 1,0 mg/kg/dia. Este estudo demonstrou que a neurorregeneração esteve realçada em doses baixas de FK-506, doses menores até do que as necessárias para a ação como imunossupressor.

Sobbol et al. (2003) e Brenner et al. (2004; 2005) estudaram o efeito do FK-506 na neurorregeneração, administrado dias após a cirurgia, para observar se reteria suas propriedades neurorregenerativas quando o início da terapia fosse retardado em direção ao reparo cirúrgico. Mostraram que os efeitos benéficos do FK-506 na neurorregeneração não estão restritos à administração imediata, mas que embora aconteçam, esses efeitos diminuem, significativamente, quando o FK-506 é administrado três dias após a lesão do nervo. A grande contribuição desses autores é a informação de que a administração dessa droga deve ser iniciada no dia da cirurgia.

Hayashi et al. (2005) compararam a atuação do FK-506 e da Ciclosporina em diferentes situações, como a sobrevivência de fibroblastos enxertados, neuroproteção e a influência sobre o crescimento axonial.

Em 2008, Yildirim et al. relataram melhoras na reparação axonial do n. obturatório. Em 2012, Yan et al. comprovaram que o FK-506 acelera a regeneração tanto em nervos seccionados quanto em enxertos nervosos.

Os ratos foram, na grande maioria, o modelo animal para estes estudos, mas, em 2004, Diaz et al. usando coelhos, demonstraram superioridade na regeneração após o uso de FK-506 tópico (comparado a grupos controles), através do preenchimento de túbulos para reparação de nervo craniano seccionado (n. facial). E em 2006, Hontanilla et al. utilizaram como modelo

de estudo também o n. facial, mas agora em macacos. Macacos também foram utilizados como modelo de estudo da atuação do FK506 em aloenxertos (Auba et al., 2006).

O FK-506 já foi utilizado em aloenxerto de nervos periféricos em humanos, mas somente a sua capacidade imunossupressora foi analisada, não tendo sido avaliada, porém, a capacidade de influir sobre a regeneração axonial (Mackinnon et al., 2001).

Embora se encontre uma vasta literatura sobre o uso do FK-506, somente uma publicação estudou o efeito neurorregenerativo na NLT (Chen et al., 2009). O estudo foi realizado em 30 ratos "Sprague-Dawley", dividido em três grupos. O grupo A (10 ratos) foi tratado com NTT, o grupo B (10 ratos) com NLT recebendo 1,0 mg/kg/dia de solução salina e o grupo C, tratados com NLT recebendo 1,0 mg/Kg/dia de FK-506, durante quatro semanas. A partir da 2º semana de pós operatório, sendo repetido a cada duas semanas (4ª. 6ª, 8ª e 12ª), foram realizados estudos funcionais utilizando-se do IFI De Medinaceli. Na 12ª semana foi realizado o estudo histológico. Em ambos os estudos, funcional e histológico, o grupo que recebeu a droga mostrou diferenças estatísticas com relação ao grupo controle, o que levou os autores a indicarem o uso da NLT associada a FK-506 em casos selecionados de lesões de nervos periféricos, na clínica médica.

Portanto, temos que levar em consideração que as lesões de nervos periféricos são muito prevalentes, estando presentes em 5 % das feridas abertas em extremidades, devido a esportes e acidentes automobilísticos (Ijkema-Paassen et al., 2004; Campbell, 2008). Também são responsáveis por 80-90 % das lesões do plexo braquial (Carvalho & Samii, 2003). Após o reparo dessas lesões, na maioria das vezes, se faz necessário tempo prolongado de afastamento do trabalho, mudança de função e, às vezes, aposentadoria (Portincasa et al., 2007; Jaquet et al., 2001). Anualmente a cada trinta mil pessoas, uma apresenta quadro de paralisia facial (principalmente devido ao vírus herpes). As cirurgias de ressecções de tumores e trações durante nascimentos também podem, frequentemente, acarretar lesões nos nervos periféricos (Nehme et al., 2002). Em todas essas situações a NLT é técnica cirúrgica a ser considerada em qualquer parte do corpo (Pardini Jr et al., 2005).

Embora as pesquisas tenham avançado muito, a completa reparação da função neural ainda não é obtida (Höke, 2006; Casha et al, 2008). Além de expor a vida do paciente, essas lesões interferem na qualidade da mesma e ainda acarretam custos socioeconômicos (Evans, 2000; Ruis et al., 2005).

Tentando obter melhores resultados na NLT decidimos estudá-la associando-a com uso do FK-506.

O que eu posso fazer para ajudar na paz mundial?
Vá para casa e ame a sua família!

(resposta dada por Madre Tereza de Calcutá)

3. Objetivo

3. Objetivo

Estudar se a administração de FK-506 traria benefícios na regeneração de nervo periférico após neurorrafia látero-terminal.

... eu preparo os cavalos para a batalha,
mas quem me dá a Vitória não é nem meu zelo
e nem a Força dos cavalos,
e sim, a misericórdia De Deus...

4. Método

4. Método

Toda a parte experimental desse trabalho foi realizada no Laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia (cirurgia, manutenção dos animais durante o período de experimentos e teste de avaliação da marcha (Walking Track Analysis) e no Laboratório de Pesquisa em Nervos Periféricos e Reinervação do Departamento de Urologia (teste eletrofisiológico, sacrifício dos animais, coleta das peças histológicas, confecção e leitura das lâminas histológicas), ambos pertencentes ao Centro de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu.

4.1 Animais

Foram utilizados oitenta ratos (*Rattus norvegicus)*, da linhagem Wistar, machos, com massa inicial, em média, de 210 g (2 meses), provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista / UNESP – Campus de Botucatu.

Todos os procedimentos cirúrgicos, executados pelo pesquisador para os quatro grupos estudados, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu, pelo Protocolo nº549 (anexo 9.1). Estando os procedimentos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos constituídos de 20 animais, sendo Grupo Controle (GC - não recebeu nenhuma droga) e Grupos I (GI), II (GII) e III (GIII) que receberam 1,0 mg/Kg/dia, 0,5 mg/Kg/dia e 0,25 mg/Kg/dia, respectivamente, durante dois meses, via subcutânea, diariamente e tendo seu início logo após a cirurgia.

4.2 Procedimentos cirúrgicos

Inicialmente os animais tiveram suas massas aferidas e, em seguida, anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 30 mg/Kg, intra-peritonealmente (i.p.). Realizou-se a tricotomia e assepsia com PVPI (polivinilperrolidona-iodo).

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e realizou-se a incisão de 2 a 3 cm na região dorsal da coxa esquerda, longitudinalmente ao maior eixo do membro, comprometendo pele e tecido subcutâneo. A musculatura foi divulsionada e os nervos isquiático, tibial e fibular comum dissecados. O nervo fibular comum foi seccionado e a sua extremidade proximal encurvada para trás, aproximadamente em um ângulo de 100º, e implantada no interior da musculatura abdutora (Fig.1A). A extremidade distal do nervo fibular comum, foi suturada término-lateralmente ao nervo tibial (NLT), sem remoção do epineuro, através de dois pontos com fio nylon monofilamentar 10-0 com agulha cilíndrica e circular (Fig.1B). A NLT foi realizada com auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcelos com aumento de 16x. A incisão foi suturada por planos, muscular e cutâneo, com fio nylon 5-0 preto, utilizando-se pontos simples. No lado direito nenhum procedimento foi realizado.

Após a cirurgia, os animais foram abrigados em caixas apropriadas contendo cinco animais cada, alimentados (ração e água *ad libitum)* durante todo o estudo sob condições ambientais, respeitando 12 horas de luz por dia e temperatura controlada (25ºC ± 2ºC), sem limitação de movimento, por dois meses, no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu.

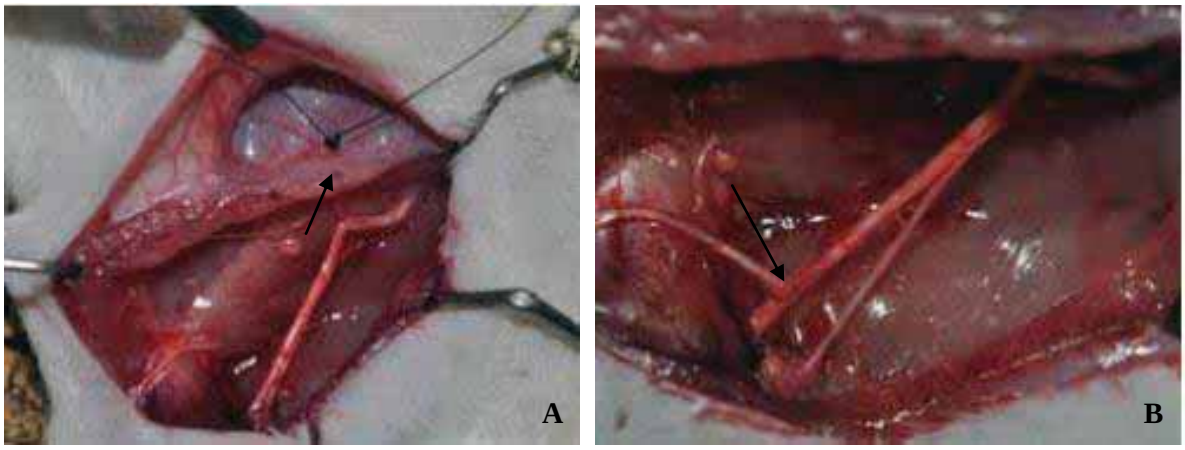


Fig.1- **(A)** Coto proximal do n. fibular comum sepultado e fixado à musculatura adjacente.
(B) Coto distal do n. fibular comum fixado (2 pontos) na lateral do n. tibial**.**

4.3 Testes utilizados

4.3.1 Teste de Avaliação da Marcha (TAM)

No laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, os animais foram previamente treinados e condicionados a andar em corredor de 78 cm x 9 cm coberto por uma tira de papel branco de tamanho adequado, após terem as patas posteriores pintadas com tinta nanquim preta para marcar as pegadas no papel branco (Fig. 2A, 2B, 2C e 2D).

Fig.2 - (AB) Técnicos passando a tinta nas patas traseiras do rato e conduzindo o mesmo no corredor da marcha.

(CD) Fitas com as marcas das patas dos ratos.

As medidas obtidas a partir das pegadas referentes ao MCL (Membro Contralateral, normal) e ME (Membro Experimental), deixadas nas folhas de papéis br**a**ncas, foram descritas a seguir:

APN - Abertura do passo contralateral (normal).
Distância entre a pata MCL e a pata ME.
("to other foot" – distância de uma pata a outra)
N - Normal

APE - Abertura do passo experimental.
Distância entre a pata ME e a pata MCL
("to other foot" – distância de uma pata a outra)
E - Experimental

CPN - Comprimento da pata contralateral (normal).
Tamanho total da pata contralateral.
("print leght" – distância do calcanhar aos artelhos)
N - Normal

CPE - Comprimento da pata experimental.
Tamanho total da pata experimental
("print leght" – distância do calcanhar aos artelhos)
E - Experimental

ATAN - Abertura total dos artelhos da pata contralateral (normal).
(" total spread" - distância entre o 1º e o 5º artelhos)
N - Normal

ATAE - Abertura total dos artelhos da pata experimental
(" total spread" - distância entre o 1º e o 5º artelhos)
E - Experimental

AIAN - Abertura entre os artelhos intermediários da pata
Contralateral (normal).
("intermedies toes" - distância entre o 2º e 4º artelhos)
N - Normal

AIAE - Abertura entre os artelhos intermediários da pata experimetal
("intermedies toes" - distância entre o 2º e 4º artelhos)
E - Experimental

Faz-se necessário lembrar que, valores quanto mais próximos a -100 (menos cem) indicam perdas funcionais, e valores próximos a 0 (zero) indicam animais sem alterações funcionais (0% - normalidade e 100% - déficit total de função / Monte-Raso, 2006).

As medidas obtidas foram utilizadas para o cálculo do Índice Funcional do Nervo Isquiático descrito por De Medinaceli et al. (1982) (IFI De Medinaceli), para o índice modificado por Bain et al. (1989) (IFI Bain) e também para o índice específico para a lesão do nervo Fibular (IFF Bain).

$$\text{IFI De Medinaceli} = \left[\frac{APE - APN}{APN} + \frac{CPN - CPE}{CPE} + \frac{ATAE - ATAN}{ATAN} + \frac{AIAE - AIAN}{AIAN} \right] \times \frac{220}{4}$$

$$\text{IFI (Bain)} = 38.3 \left[\frac{CPE - CPN}{CPN} \right] + 109.5 \left[\frac{ATAE - ATAN}{ATAN} \right] + 13.3 \left[\frac{AIAE - AIAN}{AIAN} \right] - 8.8$$

$$\text{IFF (Bain)} = 174{,}9 \times \left[\frac{APE - APN}{APE + 80{,}3} \right] + \left[\frac{CPE - CPN}{CPN - 13{,}4} \right]$$

Em situações em que o animal não apresentou uma caminhada normal, faltando as impressões nítidas necessárias para obtenção das medidas (Fig. 3AB), no lado experimental, foram atribuídos valores arbitrários, segundo orientação de De Medinaceli et al. (1982):

APE - 1/3 da distância entre as duas pegadas normais.

APN - 2/3 da mesma distância.

CPE - 80 mm.

ATAE - 6 mm.

AIAE - 6 mm.

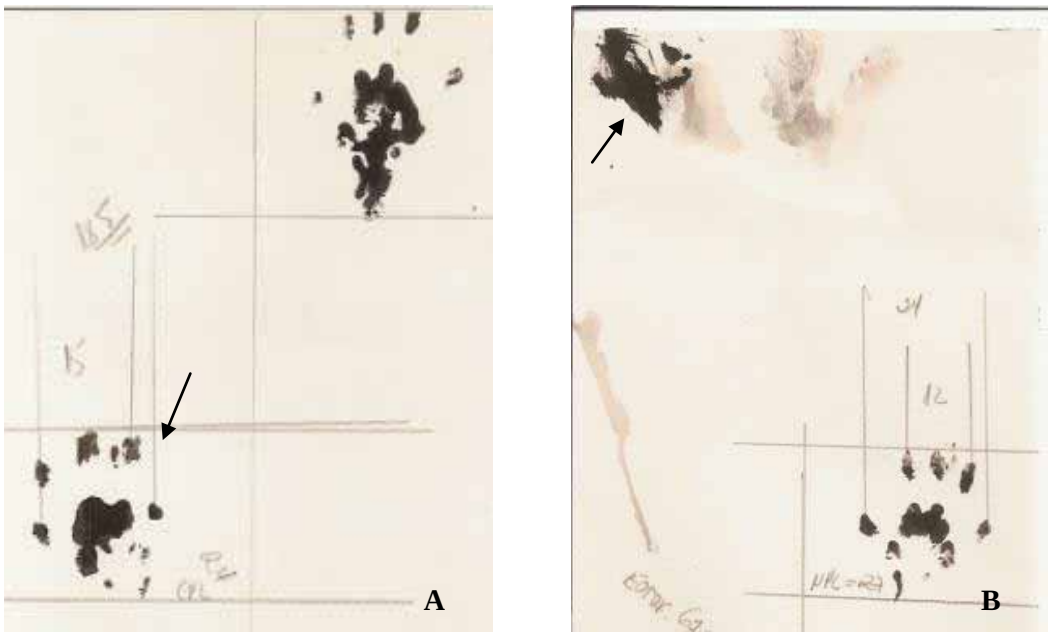


Fig. 3 – (A) Seta – Impressão nítida da pata, permitindo medidas.
(B) Seta – Impressão não nítida, valores arbitrários são atribuídos.

4.3.2 Estudo eletrofisiológico

Em todos os animais, o teste eletrofisiológico do músculo tibial cranial (MTC) e a condução do nervo fibular comum foi realizado imediatamente antes do sacrifício, em temperatura ambiente mantida em torno de 25ºC. Foi utilizado eletromiógrafo da marca Shappire II 4ME (Fig. 4A), no Laboratório de Pesquisa em Nervos Periféricos e Reinervação do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina – UNESP / Campus de Botucatu.

Após a anestesia (critérios iguais aos utilizados para a cirurgia), os animais foram imobilizados em decúbito ventral, realizadas a tricotomia e ampla incisão no membro posterior esquerdo (ME) permitindo acesso aos nervos isquiático, tibial, fibular comum, área de NLT e o músculo tibial cranial. O nervo tibial e o sural foram seccionados distalmente, aproximadamente 1 cm abaixo da NLT, evitando assim a passagem de correntes elétricas espúrias.

Para o registro do potencial de ação, um eletrodo (eletrodo de referência, vermelho) foi introduzido no tendão do MTC e, um eletrodo (eletrodo ativo, preto) foi introduzido no ventre do músculo tibial cranial do rato. Ainda um terceiro eletrodo (eletrodo dispersivo, cinza) foi introduzido em um músculo distante da região do teste. Os eletrodos, ativo e de referência, sempre distavam 1 cm um do outro (Fig. 4B). O eletrodo de estimulação bipolar,

que deflagra o estímulo elétrico, foi posicionado diretamente sobre o nervo isquiático, proximal à NLT, permitindo a propagação dos impulsos elétricos através dele. A intensidade do estímulo foi de 5,1 volts, a frequência fixada em 1 pps e a duração em 100 µs, dados mantidos para todos os animais.

Foram registrados a amplitude (mV) e a latência (ms) do potencial de ação muscular composto (CMAP), em seis conjuntos de medidas para cada animal, sendo escolhido apenas um conjunto, observando a medida que apresentava a maior amplitude registrada.

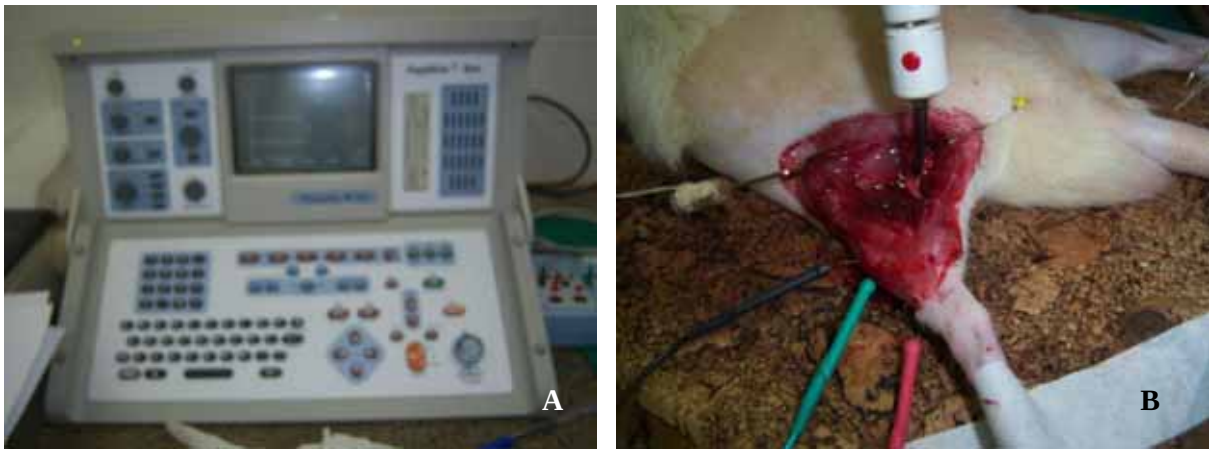


Fig. 4 – (A) Eletromiógrafo Shappire II 4ME.
(B) Posicionamento dos eletrodos (estimulação bipolar proximalmente à NLT e os eletrodos de captação em agulha localizados no MTC).

4.4 Sacrifício e coleta de peças histológicas

Os animais tiveram sua massa aferida momentos antes do estudo eletrofisiológico e para análise histológica foram retirados os MTCs (direito e esquerdo), o coto distal (N1) e proximal (N2) do nervo fibular comum, área de NLT - segmento do n. tibial e coto distal do n. fibular comum que participavam da NLT (N3) e o n. fibular comum (N4) do MCL. Os animais foram sacrificados, imediatamente, com uma dose letal de pentobarbital sódico administrado i.p. (Fig. 5A e 5B)

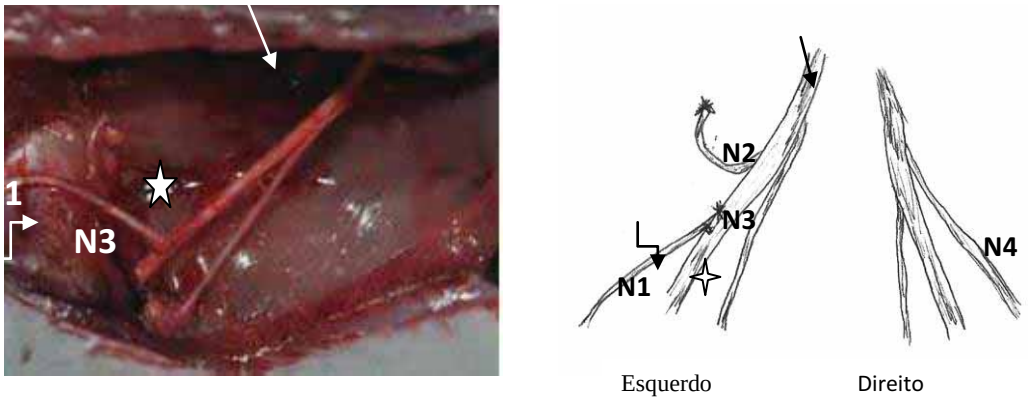


Fig. 5 - (A) N1 – Segmento distal do n. fibular comum esquerdo – (ME).
N3 – Região da NLT – (ME).
(B) N2 - Segmento proximal do n.fibular comum esquerdo - (ME).
N4 - Segmento do n. fibular comum direito – para controle - (MCL).
N.Ciático N. Fibular comum N. tibial

4.4.1 Aferição da massa corporal e do MTC

A massa corporal e o MTC foram aferidos. O MTC direito (MLCL - músculo do lado contralateral) e o MTC esquerdo (MLE – músculo do lado experimental) foram pesados sem o tendão.

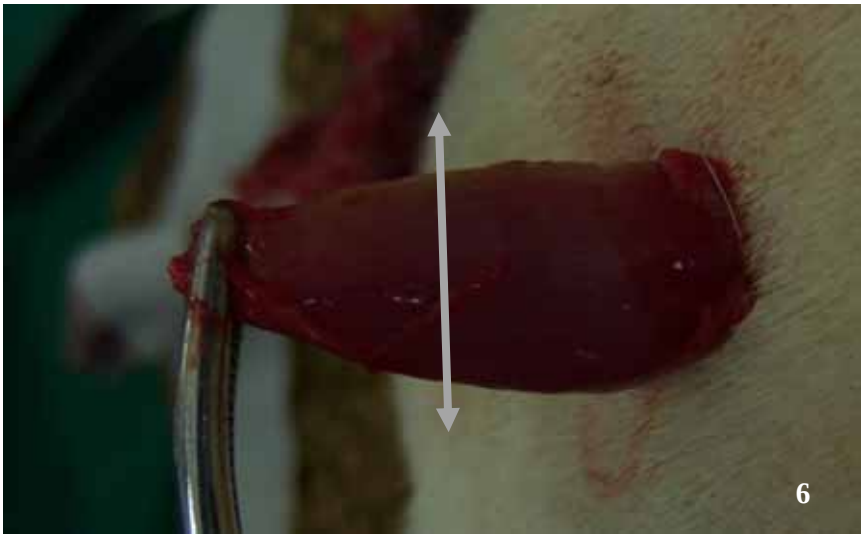


Fig.6 - Retirada do MTC.
Secção transversal do MTC comprometendo toda a sua espessura.

4.4.2 Processamento histológico das fibras musculares (Análise morfológica e morfométrica)

Os músculos tibiais craniais de todos os ratos foram removidos, fixados e mantidos em nitrogênio líquido (-196 ºC) até o momento do processamento histológico. Os músculos foram submetidos a secções transversais, com espessura de 5 µ, na porção central do músculo, comprometendo toda a sua espessura (Fig. 6), utilizando o Criostato Leica CM 1850. Foram realizadas, em média, cinco cortes de um mesmo músculo, permitindo a análise de um corte com menos artefatos histológicos. As lâminas foram identificadas com o número de registro do laboratório, para que o pesquisador não soubesse, no momento da análise, a que grupo o animal pertencia. A numeração real foi revelada apenas no momento da análise estatística. Foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) e os cortes histológicos foram analisados no microscópio LEICA-DMLB, com lente objetiva de 20x e aumento total de 200x. As imagens foram digitalizadas usando o software Sigma Pro Image, versão 5.0, da Jardel Scientific Corporation.

Digitalização das imagens das lâminas histológicas do MTC.

Para escolha dos cortes com menos artefatos, as lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio óptico (MO) em menor aumento (50x). Para análise das fibras musculares foi utilizado aumento de 200x. As imagens estudadas foram salvas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1 GB DDR, HD 80 GB, após serem capturadas por uma câmara digital Leica DFC 280.

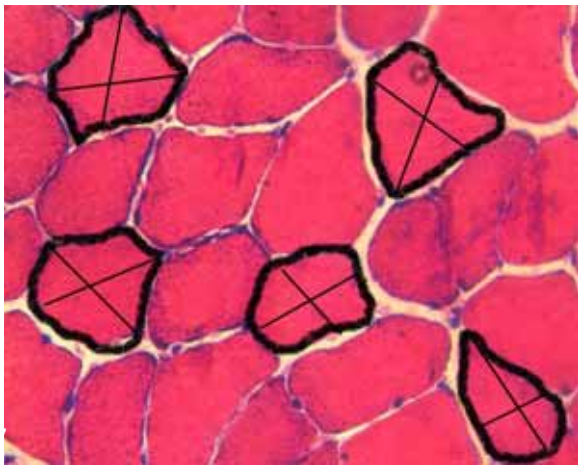


Fig.7 – Escolha de 5 fibras musculares por imagem.

Foram analisadas 50 fibras musculares, para cada membro (ME e MCL), de cada animal, usando o software Sigma Pro Image, versão 5.0, da Jardel Scientific Corporation. Para cada lâmina histológica foram digitalizadas dez imagens (dez campos distintos), e em cada um dos campos foram medidas cinco fibras musculares, totalizando 50 fibras para cada lâmina estudada. Para cada campo foram medidas fibras que apareciam por inteiro, localizadas na porção mais externa de cada quadrante e uma fibra central. Isso totalizou 2000 fibras por grupo estudado, sendo 1.000 para o MLE e 1.000 para o MLCL.

Morfometria das fibras musculares

Para a morfometria das fibras musculares (8.000), digitalizadas e salvas, foram utilizadas as seguintes medidas: área, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e número total de fibras musculares por campo tomadas de maneira semiautomática. As medidas foram organizadas em tabelas e calculadas as médias e desvios padrões.

4.4.3 Processamento histológico dos segmentos nervosos

Os segmentos de nervo coletados, coto distal (N1) e proximal (N2) do nervo fibular comum esquerdo, local da neurorrafia (N3) e nervo fibular comum direito (N4) foram fixados em solução de Karnovisk (período superior a 24 horas), passaram por lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por três vezes, com duração de 5 minutos cada vez e posteriormente sofreram pré-coloração com tetróxido de ósmio a 1 % por 2 horas, refrigerados a 4 ºC até o momento dos procedimentos rotineiros do processamento histológico até a coloração.

Após nova lavagem com tampão fosfato, foi realizada desidratação por uma bateria de concentrações crescentes de acetona (50 %, 70 %, 90 % e 100 %). A inclusão em resina Araldite® foi realizada em duas etapas: em solução de resina e acetona (1:1), permanecendo por 24 horas em dessecador; e em resina, após dez minutos em dessecador, permanecendo em estufa a 37 ºC por 1 hora. O emblocamento foi realizado posicionando-se o segmento de nervo em resina Araldite® e mantido em estufa a 60 ºC por 48 horas para polimerização.

Os blocos foram preparados para o corte histológico através da eliminação de excesso de resina ao redor do segmento do nervo (trimados) com auxílio de uma lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6x e lâmina Gillette®.

Em cortes transversais, foram analisados os seguintes segmentos: segmento distal do nervo fibular comum esquerdo (N1) e segmento do nervo fibular comum direito (N4). Cortes semi-finos (0,5 µm) foram feitos em micrótomo Leica MZ6. Após o corte, a lâmina foi aquecida sobre uma chapa a 45 ºC para secagem e pré-aderência do corte à lâmina do vidro. Para a coloração foi utilizado azul de toluidina 1 % durante cinco minutos, manualmente.

Os seguintes segmentos: coto proximal do nervo fibular comum esquerdo (N2) e região da NLT (N3) foram analisados em cortes longitudinais. Após os mesmos procedimentos descritos acima até a realização dos cortes semi-finos, as lâminas foram submetidas à coloração de prata de Bielschowsky.

Digitalização das imagens das lâminas histológicas dos segmentos nervosos.

Ao MO, em aumento de 100x, foi feito a escolha do corte histológico com menos artefatos, e em aumento de 400x realizou-se a análise das fibras nervosas.

As imagens foram salvas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1GB DDR, HD 80 GB, previamente capturadas por uma câmera digital Leica DFC 280. As medidas foram feitas utilizando-se software Sigma Pro Image Analysis, versão 5 da Jande Scientific Corporation, de modo semiautomático. Foram salvas duas imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico.

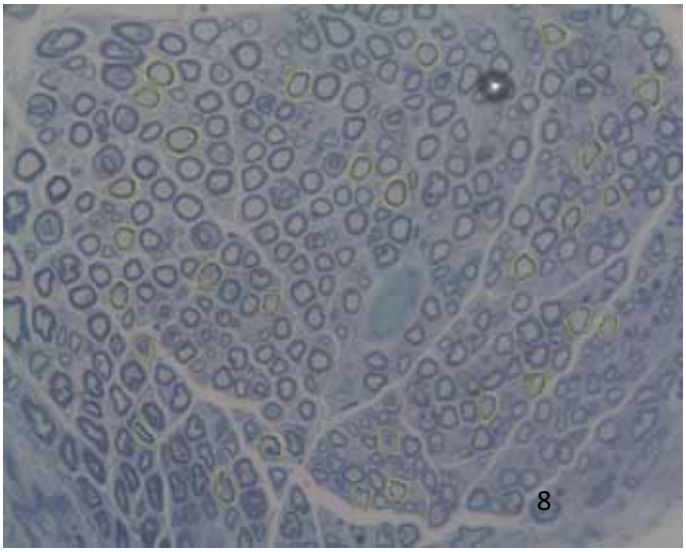


Fig.8 – Escolha de cinco fibras nervosas por imagem.

Medidas dos segmentos nervosos

Os segmentos N1 e N4 (cortes transversais) foram submetidos à mensuração das seguintes medidas: área, diâmetro máximo, mínimo e número total das fibras nervosas por campo. As medidas foram feitas de modo semiautomático utilizando-se software Sigma pro Image Analysis, versão 5 da Jandel Scientific Corporation.

Análise de brotamento axonial lateral

Os segmentos N2 e N3 (cortes longitudinais) foram submetidos à análise das condições das fibras nervosas e do brotamento axonial lateral (crescimento dos axônios do nervo doador para dentro do nervo receptor), respectivamente.

O estudo das fibras nervosas, digitalizadas e salvas, foram organizados em tabelas e feitas às médias e desvios padrões.

4.5 Análise estatística

Para comparação dos grupos, entre si, foram aplicados testes de normalidade, para posterior aplicação de testes paramétricos ou não-paramétricos. Em uma segunda fase, o teste não paramétrico escolhido foi o de Kruskal-Walls (ANOVA) para amostras independentes e o Teste de Friedman seguido do teste T-Student e teste Tukey para amostras dependentes (Silva & Azevedo, 2009).

Em toda a análise foi utilizado o nível de significância $p < 0,05$ (ou 5 % de significância).

... o amor de Deus é a única Ciência
que não conseguimos e nem Precisamos entender,
basta apenas experimentar...

5. Resultados

5. RESULTADOS

Durante as oito semanas de estudo, com exceção de dois animais que foram a óbito antes do sacrifício (ratos 11 e 19 – GC), os animais se mantiveram saudáveis, sem infecções ou úlceras neurodistróficas plantares.

5.1 Massa corporal

As médias e desvios padrões das massas iniciais dos animais foram de 200 g (± 0,51) para o GC, de 210 g (± 0,02) para o GI, de 200 g (± 0,01) para GII e de 207 g (± 0,02) para o GIII. O Teste de Friedman, para amostras independentes seguidos de teste T, mostrou não haver diferença na massa inicial entre os grupos ($p < 0,001$), porém, ao final, houve aumento significativo de massa, em todos os animais. O GC apresentou aumento de massa de 155 %, o GI de 122 %, o GII de 80 % e o GIII de 131 %. Para verificar quais grupos diferiam, foi aplicado o método de comparações múltiplas, que mostrou haver diferenças significativas entre as médias das massas iniciais e as massas finais em todos os grupos, sendo o GC com o maior ganho de massa, diferindo do GIII e GI, que não deferiram entre si, e esses foram maiores que o GII, o qual apresentou o menor ganho de massa, diferindo de todos os grupos ($p < 0,001$). Com relação à massa final, as médias e os desvios padrões foram de 510 g (± 0,06) para o GC, de 468 g (± 0,06) para o GI, de 360 g (± 0,01) para o GII e de 478 g (± 0,06) para o GIII. O Teste de Friedman, para amostras independentes seguidos de teste T, mostrou que o GC foi maior diferindo do GIII e GI, que não deferiram entre si, e esses foram maiores que o GII (360 g ± 0,01), o qual apresentou a menor massa, diferindo de todos os grupos ($p < 0,001$) (Tab. 1 – Fig. 9).

TABELA 1 - Massa Individual Inicial (g) x Massa Individual Final dos animais (g) Média e Desvio padrão

Grupos	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)
GC	200 (± 0,51)	510 (± 0,06)
GI	210 (± 0,02)	468 (± 0,06)
GII	200 (± 0,01)	360 (± 0,01)
GIII	207 (± 0,02)	478 (± 0,06)

Teste Friedman para amostras independentes seguidos de Teste T ($p < 0,001$).
Massa inicial: GC = GI = GII = GIII / Massa final: GC > GIII = GI > GII.

Massa inicial e final (g) dos animais

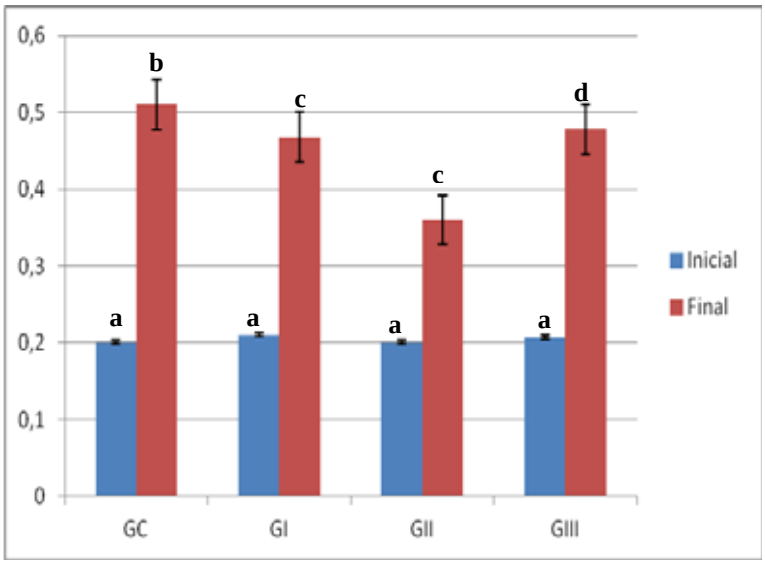


Fig. 9 – Teste Friedman para amostras independentes seguidos de Teste T ($p < 0,001$)
Massa inicial: GC = GI = GII = GIII / Massa: final: GC > GIII = GI > GII.
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,001$).

As massas individuais dos animais aferidas no início e ao final do experimento estão na tabela A dos Anexos.

5.2 Massa do MTC

As médias e desvios padrões das massas dos MTCs dos MLEs foram de 0,608 g (± 0,16) para o GC, de 0,640 g (± 0,17) para o GI, de 0,391 g (± 0,05) para o GII e de 0,574 g (± 0,16) para o GIII. As médias e desvios padrões das massas dos MTCs dos MLCLs foram de 0,927 g (± 0,09) para o GC, de 0,934 g (± 0,23) para o grupo GI, de 0,712 g (± 0,01) para o GII e de 0,905 g (± 0,14) para o GIII. Se compararmos a perda da massa muscular entre o MLCL e o MLE, de um mesmo grupo, encontramos uma perda para o GC de 0,062 %, para o GI de 0,063 %, para o GII de 0,106 % e de 0,069 % para o GIII. O Teste F seguido do Teste T student mostrou, tanto para o MLCL como para o MLE, que o GC, GI e GIII não diferiram entre si, e esses foram maiores que o GII, o qual apresentou a menor massa, diferindo de todos os grupos ($p < 0,001$) (Tab. 2 – Fig. 10).

TABELA 2 - Massa (g) do MTC para o MLCL x Massa (g) do MTC para o MLE Média e Desvio padrão

Grupos	MLCL	MLE
GC	0,927 (± 0,09)	0,608 (± 0,16)
GI	0,934 (± 0,23)	0,640 (± 0,17)
GII	0,712 (± 0,01)	0,391 (± 0,05)
GIII	0,905 (± 0,14)	0,574 (± 0.16)

Teste F seguido do Teste T student (p < 0,001).
GII < GC = GI = GIII – Tanto para o MLCL quanto para o MLE.

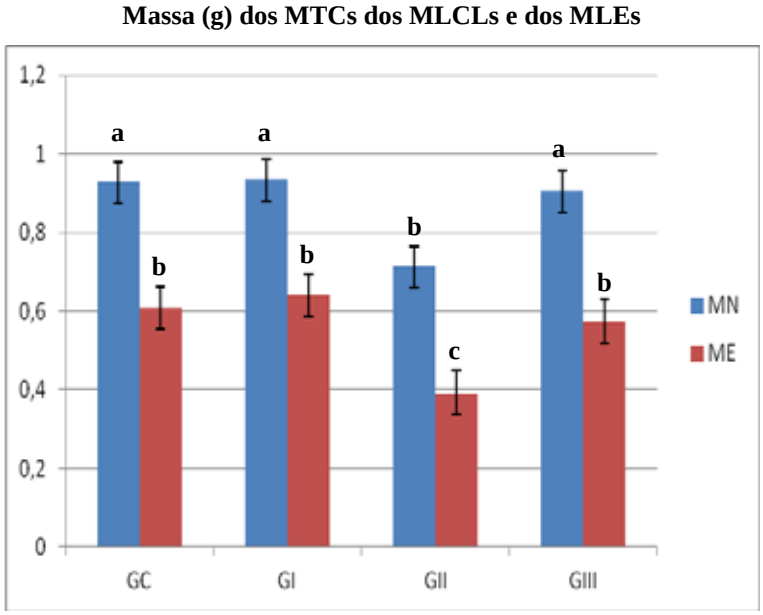


Fig. 10 – Teste F seguido do Teste T student (p < 0,001). GII < GC = GI = GIII – Tanto para o MLCL quanto para o MLE
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p < 0,001).

As massas dos MTCs individuais aferidas para os MLCLs e para os MLEs estão na tabela B dos Anexos.

5.3 Teste de Avaliação da Marcha (TAM)

As médias e desvios padrões do TAM segundo os índices IFI De Medinaceli, IFI Bain e IFF Bain foram, respectivamente de 27 % (± 0,076), 84 % (± 0,226) e 80 % (± 0,259) para o GC, de 19 % (± 0,124), 66 % (± 0,312) e 63 % (± 0,250) para o GI, de 18 % (± 0,124), 61 % (± 0,333) e 62 % (± 0,371) para o GII e de 24 % (± 0,100), 82 % (± 0,170) e 67 % (± 0,39) para o GIII. O Teste de Kruskal-Wallis mostrou não haver diferença significativa entre os

grupos para os três índices (p = 0,102 para o IFI De Medinaceli, p = 0,144 para o IFI Bain e p = 0,313 para o IFF Bain) (Tab. 3 – Fig. 11).

TABELA 3 - Média e Desvio Padrão dos Índices funcionais

Grupo	IFI De Medinaceli	IFI Bain	IFF Bain
GC	27 % (± 0,076)	84 % (± 0,226)	80 % (± 0,259)
GI	19 % (± 0,124)	66 % (± 0,312)	63 % (± 0,250)
GII	18 % (± 0,124)	61 % (± 0,333)	62 % (± 0,371)
GIII	24 % (± 0,100)	82 % (± 0,170)	67 % (± 0,390)

Teste de Kruskal-Wallis GC = GI = GII = GIII.
(IFI De Medinaceli - p = 0,102; IFI Bain – p = 0,144; IFF Bain – p = 0,313).

Média dos Índices funcionais em % (IFI De Medinaceli, IFI Bain, IFF Bain)

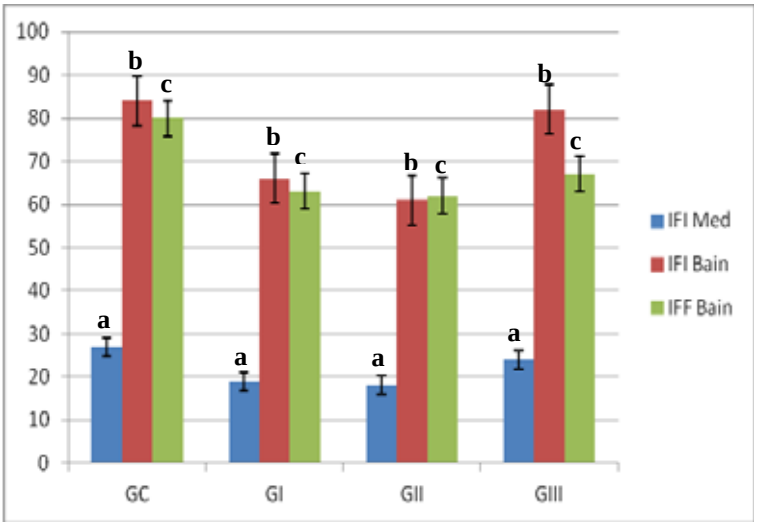


Fig. 11 - Teste de Kruskal-Wallis - GC = GI = GII = GIII. (IFI De Medinaceli - p = 0,102; IFI Bain – p = 0,144; IFF Bain – p = 0,313).
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Os resultados dos índices para cada animal estão na tabela C dos Anexos.

5.4 Teste eletrofisiológico

As médias e desvios padrões dos resultados da latência foram de 2,28 ms (± 1,07) para o GC, de 4,04 ms (± 6,94) para o GI, de 3,37 ms (± 0,51) para o GII e de 4,89 ms (± 6,69) para o III. O Teste de Kruskal-Wallis mostrou não haver diferença entre os grupos (p =

0,209). Para a amplitude, as médias e desvios padrões foram de 7,42 mV (± 4,62) para o GC, de 7,73 mV (± 5,63) para o GI, de 10,02 mV (± 6,49) para o GII e de 9,05 mV (± 5,29) para o GIII. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que houve diferenças estatísticas entre os GC e o GII, sendo a maior média apresentada pelo GII que diferiu do GC, mas não diferiu do GI e GIII (p = 0,019) (Tab. 4 – fig. 12).

TABELA 4 - Médias e Desvios Padrões dos resultados obtidos no estudo eletrofisiológico

Grupo	Latência (ms)	Amplitude (mV)
GC	2,78 (± 1,07)	7,42 (± 4,62)
GI	4,04 (± 6,94)	7,73 (± 5,63)
GII	3,37 (± 0,51)	10,02 (± 6,49)
GIII	4,89 (± 6,69)	9,05 (± 5,29)

Teste de Kruskal-Wallis Anova - GII > GC = GI = GIII.
(latência (ms) -p = 0,209; amplitude (mV) - (p = 0,019).

Médias obtidas no estudo eletrofisiológico

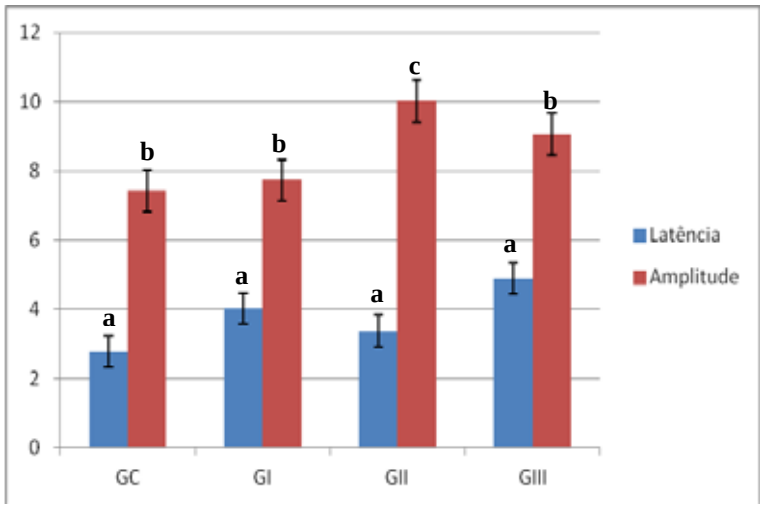


Figura 12 - Teste de Kruskal-Wallis - GII > GC = GI = GIII. latência (ms) -p = 0,209; amplitude (mV) - p = 0,019.
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Os resultados da latência e amplitude para cada animal estão na tabela D dos Anexos.

5.5 Estudo histológico das fibras musculares

Morfologia

Em todos os grupos estudados, as fibras dos MLCLs, apresentaram características morfológicas típicas de uma fibra muscular estriada esquelética. O contorno celular era preferencialmente poligonal, com tamanhos equivalentes entre si, núcleos periféricos e agrupadas em fascículos, delimitadas por tecido conjuntivo relativamente frouxo (Figs. 13 A, B, C, D).

Nos MLEs, as fibras apresentaram-se com discreto polimorfismo, algumas vezes com diminuição da sua área, mas não havia aumento de espessura do compartimento conjuntivo (endomísio e perimísio), em todos os grupos estudados (Figs. 13 E, F, G, H).

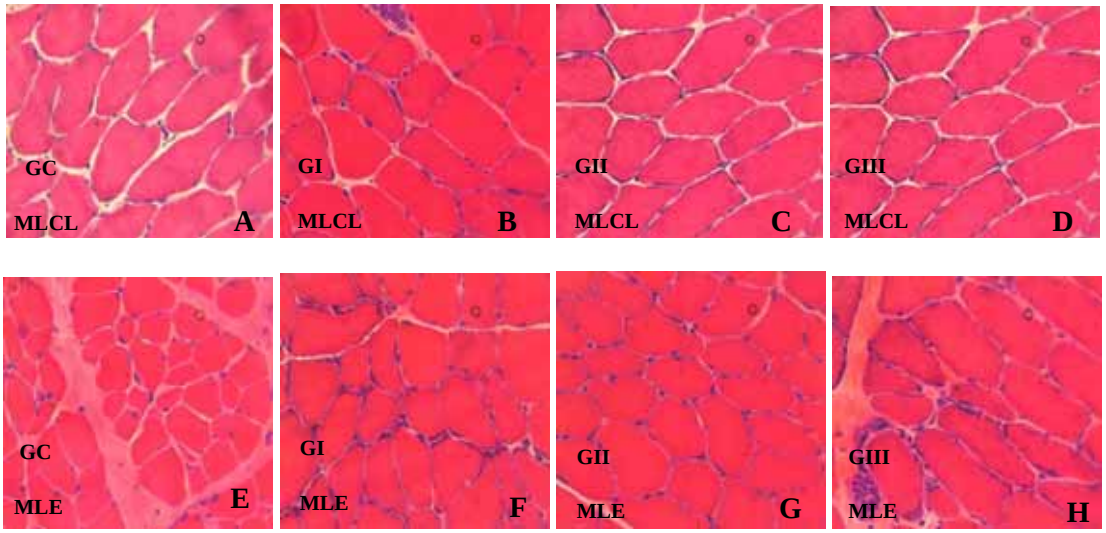


Fig. 13 **(A, B, C, D)** – Fibras musculares dos MLCLs.
(E, F, G, H) – Fibras musculares dos MLEs.
Cortes corados pela técnica HE – 200X (MO).

Morfometria

As médias e desvios padrões do parâmetro área para os MLEs foram de 999,34 μm^2 (± 124,10) para o GC, de 1020,60 μm^2 (± 436,21) para o GI, de 1059,34 μm^2 (± 127,60) para o GII, e de 1080,74 μm^2 (± 411,07) para o GIII. O Teste de Kruskal-Wallis, para amostras independentes seguidos de teste T, mostrou que todos os grupos diferiram entre si, sendo o GIII que apresentou a maior área, seguido pelo GII, GI e a menor área apresentada pelo GC (p

> 0,01). Para o parâmetro diâmetro máximo, as médias e desvios padrões foram de 398,83 µm (± 45,32) para o GC, de 424,89 µm (± 148,57) para o GI, de 444,79 µm (± 158,06) para o GII e de 390,81 µm (± 45,32) para o GIII. Segundo o teste F seguido do teste T e teste de Tukey, o GII apresentou o maior diâmetro que diferiu estatisticamente do GC, enquanto os outros grupos não diferiram entre si ($p < 0,05$). Para o parâmetro diâmetro mínimo, as médias e desvios padrões foram de 218,65 µm (± 16,93) para o GC, de 220,26 µm (± 79,92) para o GI, de 221,50 µm (± 16,93) para o GII e de 220,28 µm (± 69,73) para o GIII. Segundo o teste Kruskal-Wallis não existiram diferenças significativas entre as médias dos grupos ($p > 0,01$) (Tab. 5 – Fig. 14).

TABELA 5 - Área, Diâmetro máximo e Diâmetro mínimo dos MLEs, Média e Desvio Padrão

Grupo	Área (µm$^{2)}$	Diâmetro máximo (µm)	Diâmetro mínimo (µm)
GC	999,34 (± 124,10)	398,83 (± 45,32)	218,65 (± 16,93)
GI	1020,60 (± 436,21)	424,89 (± 148,57)	220,26 (± 79,92)
GII	1059,34 (± 127,60)	444,79 (± 158,06)	221,50 (± 16,93)
GIII	1080,74 (± 411,07)	390,81 (± 45,32)	220,28 (± 69,73)

Área - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GIII > GII > GI > GC ($p > 0,01$).
Diâm Max. - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GII > GC = GI = GIII ($p < 0,05$).
Diâm. Mín - Teste de Kruskal-Wallis – GC = GI = GII = GIII ($p > 0,01$)

Morfometria das fibras musculares dos MLEs

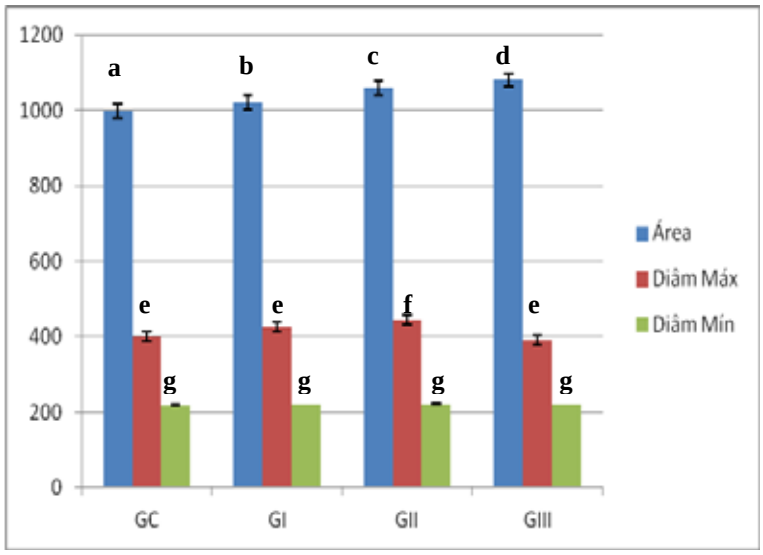


Fig. 14 Área (µm$^{2)}$ - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GIII > GII > GI > GC ($p > 0,01$).
Diâm Max. (µm) - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GII > GC = GI = GIII ($p < 0,05$)
Diâm. Mín. (µm) - Teste de Kruskal-Wallis – GC = GI = GII = GIII ($p > 0,01$)
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

As médias e desvios padrões do parâmetro área para os MLCLs foram de 1174,25 µm^2 (± 58,02) para o GC, de 1366,87 µm^2 (± 261,36) para o GI, de 1352,75 µm^2 (± 100,02) para o GII, e de 1282,37 µm^2 (± 660,92) para o GIII. Para o parâmetro diâmetro máximo, as médias e desvios padrões foram de 438,60 µm (± 22,78) para o GC, de 568,15 µm (± 37,24) para o GI, de 528,60 µm (± 20,78) para o GII e de 486,54 µm (± 188,55) para o GIII. Para o parâmetro diâmetro mínimo, as médias e desvios padrões foram de 268,31 µm (± 14,30) para o GC, de 325,12 µm (± 36,50) para o GI, de 368,31 µm (± 34,30) para o GII e de 274,45 µm (± 85,37) para o GIII. Segundo o teste Kruskal-Wallis não existiram diferenças significativas entre as médias dos grupos para os três parâmetros estudados (p > 0,01) (Tab. 6– Fig. 15).

TABELA 6 - Área, Diâmetro máximo e Diâmetro mínimo dos MLCLs, Média e Desvio Padrão

Grupo	Área (µm$^{2)}$	Diâmetro máximo (µm)	Diâmetro mínimo (µm)
GC	1174,25 (± 58,02)	438,60 (± 22,78)	268,31 (± 14,30)
GI	1366,87 (± 261,36)	568,15 (± 37,24)	325,12 (± 36,50)
GII	1352,75 (± 100,02)	428,60 (± 20,78)	368,31 (± 34,30)
GIII	1282,37 (± 660,92)	486,54 (± 188,55)	274,45 (± 85,37)

Área, Diâm.Máx. e Diâm Mín. - Teste de Kruskal-Wallis – GC = GI = GII = GIII (p > 0,01)

Morfometria das fibras musculares dos MLCLs

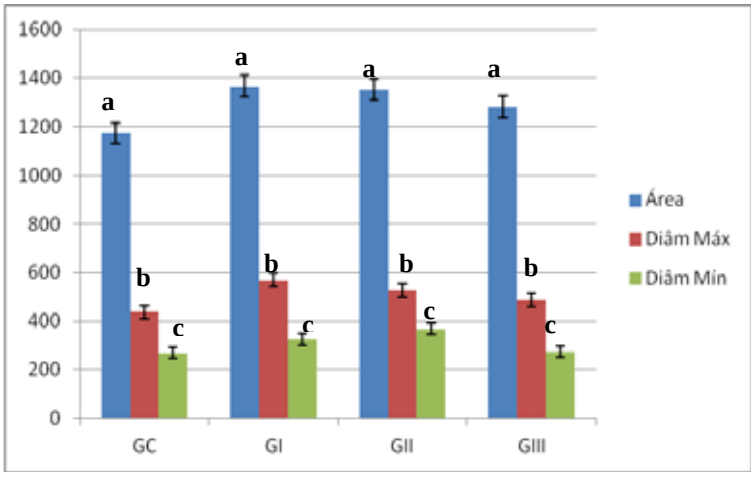


Fig. 15 Área (µm$^{2)}$, Diâm. Máx. (µm) e Diâm Mín (µm). Teste de Kruskal-Wallis – GC = GI = GII = GIII (p > 0,01)
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

As médias e desvios padrões do número total de fibras musculares por campo nos MLCLs e nos MLEs, respectivamente, foram de 22,92 (± 2,05) e 60,81 (± 8,15) para o GC, de 21,92 (± 1,95) e 61,00 (± 7,78) para o GI, de 22,07 (± 2,23) e 48,60 (± 7,98) para GII e de 25,67 (± 2,15) e 64,50 (± 8,03) para o GIII. O Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes mostrou não haver diferença na quantidade de fibras entre os grupos dos MLCL ($p < 0,001$). Para os MLEs, segundo o Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguidos do Teste T, o GII apresentou o menor número de fibras por campo diferindo estatisticamente dos GC, GI e GIII, que não diferiram entre si ($p < 0,001$). O GI apresentou aumento de 278,28 % de fibras por campo, quando comparado os MLCL com o MLE, o GC apresentou 265,04 % de aumento, o aumento para o GIII foi de 251,26 % e o menor aumento foi apresentado pelo GII, 220,20 %. Para verificar quais grupos diferiram, foi aplicado o método de comparações múltiplas, que mostrou haver diferenças significativas entre as médias apresentadas pelo GII e os GC, GI e GIII, que não diferiram entre si ($p < 0,001$). (Tab. 7 – Fig. 16).

TABELA 7 - Total de fibras musculares por campo, Média e Desvio Padrão

Grupo	MLCL	MLE
GC	22,92 (± 2,05)	60,81 (± 58,02)
GI	21,92 (± 1,95)	61,00 (± 7,78)
GII	22,07 (± 2,23)	48,60 (± 7,98)
GIII	25,67 (± 2,15)	64,50 (± 8,03)

Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguidos de Teste T ($p < 0,001$).
Fibras por campo - MLCL: GC = GI = GII = GIII / MLE: GII < GC = GI = GIII.

Total de fibras musculares por campo

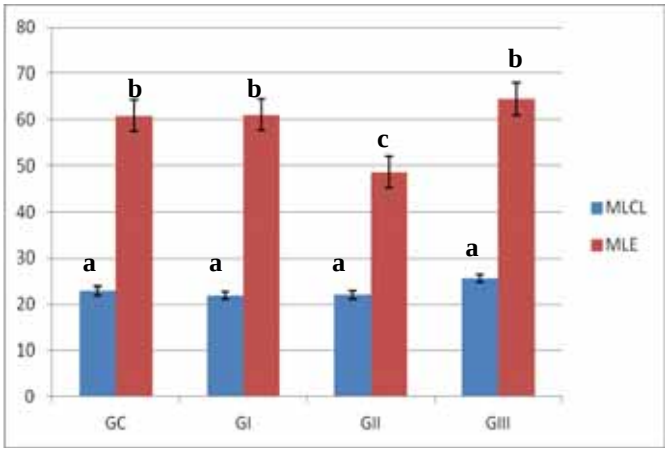


Fig. 16 - Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguidos de Teste T. MLCL: GC = GI = GII = GIII / MLE: GII < GC = GI = GIII ($p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

5.6 Estudo Histológica dos Segmentos Nervosos

Morfologia N1 / N4

As características encontradas com relação à quantidade de fibras, regularidade da bainha de mielina e área das fibras nervosas foram semelhantes em todos os grupos no segmento N4 (Figs. 17 A, B, C, D), assim como, para todos os grupos, se comparados as fibras nervosas do segmento N1 com as do segmento N4, foram evidenciados uma quantidade menor de fibras, com bainha de mielina menos espessas e quantidade maior de tecido conjuntivo interposto (Figs. 17 E, F, G, H).

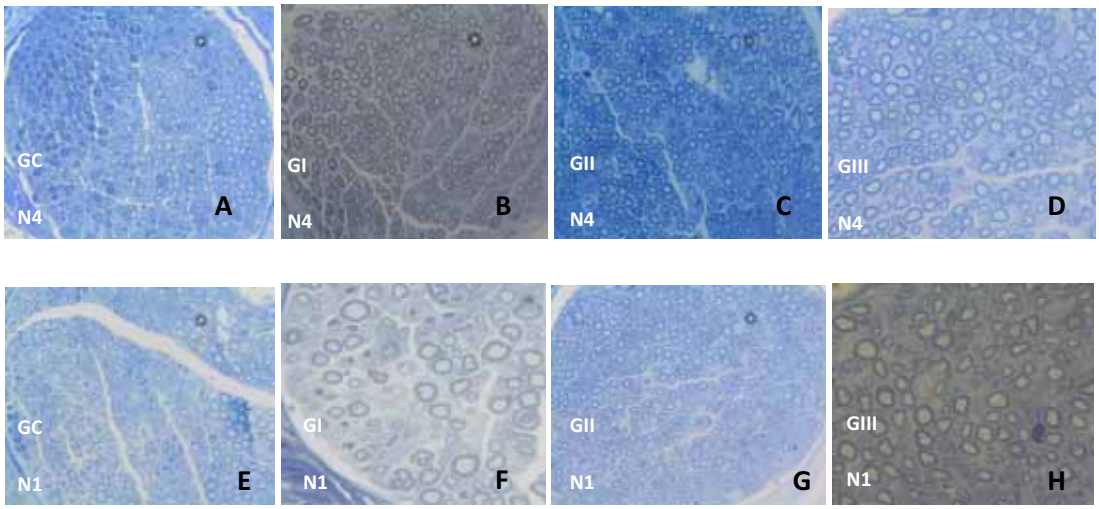


Fig. 17 **(A, B, C, D)** – Nervo fibular comum (N4).
(E, F, G, H) – Nervo fibular comum (N1).
Cortes corados por azul de tuluidina a 0,25 % - 400x (MO).

Morfometria

As médias e desvios padrões do parâmetro área para o segmento N1 foram de 20,75 μm^2 (± 1,99) para o GC, de 20,80 μm^2 (± 2,78) para o GI, de 21,09 μm^2 (± 1,84) para o GII, e de 19,82 μm^2 (± 1,75) para o GIII. O teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguido do teste T mostrou que não existiram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,01$). Para o parâmetro diâmetro máximo, as médias e desvios padrões foram de 10,06 µm (± 1,12) para o GC, de 9,05 µm (± 1,33) para o GI, de 09,08 µm (± 1,02) para o GII e de 08,92 µm (± 1,33) para o GIII. Segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T nenhum grupo diferiu estatisticamente ($p < 0,01$). Para o parâmetro diâmetro mínimo, as médias e desvios padrões foram de 5,80 µm (± 0,12) para o GC, de 7,02 µm (± 0,11) para o GI, de 6,07 µm (± 0,42) para o GII e de 5,01 µm (± 0,11) para o GIII. Segundo o teste Kruskal-Wallis seguido do teste T não existem diferenças significativas entre as médias dos grupos ($p > 0,01$) (Tab. 8 – Fig. 18).

TABELA 8 - Área, Diâmetro máximo e Diâmetro mínimo do N1, Média e Desvio Padrão

Grupo	Área (µm$^{2)}$	Diâmetro máximo (µm)	Diâmetro mínimo (µm)
GC	20,75 (± 2,54)	10,06 (± 1,12)	5,82 (± 0,12)
GI	20,80 (± 1,24)	9,05 (± 0,11)	7,02 (± 1,33)
GII	21,09 (± 2,04)	9,08 (± 0,42)	6,07 (± 1,02)
GIII	19,82 (± 1,24)	9,72 (± 0,32)	5,01 (± 1,33)

Área - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GC = GI = GII = GIII (p > 0,01).
Diâm Max. - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GC = GI = GII = GIII (p < 0,01)
Diâm. Mín. - Teste deKruskal-Wallis seguido do teste T - GC = GI = GII = GIII (p > 0,01)

Área, Diâmetro máximo e Diâmetro mínimo do N1

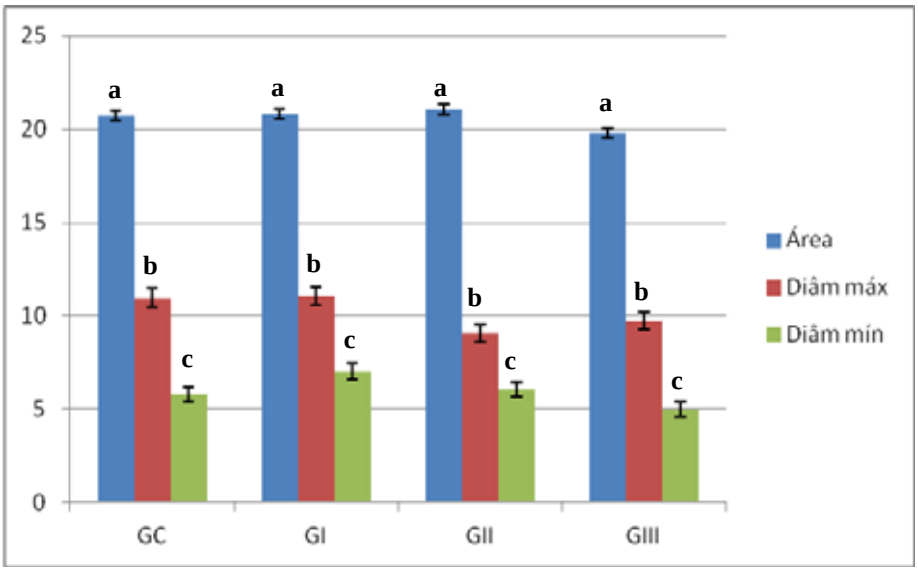


Fig. 18 - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GC = GI = GII = GIII
Área (µm^2) - p > 0,01); Diâmetro Max. (µm) - p < 0,01); Diâmetro Mín. (µm) - p > 0,01.
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

As médias e desvios padrões do parâmetro área para o N4 foram de 27,35 µm^2 (± 2,54) para o GC, de 26,01 µm^2 (± 1,24) para o GI, de 26,05 µm^2 (± 2,04) para o GII, e de 26,01 µm^2 (± 1,24) para o GIII. O teste de Kruskal-Wallis, para amostras independentes seguido do teste T, mostrou que não existiram diferenças significativas entre os grupos (p > 0,01). Para o parâmetro diâmetro máximo, as médias e desvios padrões foram de 11,06 µm (± 1,12) para o GC, de 12,67 µm (± 0,11) para o GI, de 10,96 µm (± 0,42) para o GII e de 10,67 µm (± 0,11) para o GIII. Segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T nenhum grupo diferiu estatisticamente (p < 0,01). Para o parâmetro diâmetro mínimo, as médias e desvios padrões foram de 7,82 µm (± 0,12) para o GC, de 9,92 µm (± 1,33) para o GI, de 7,52 µm (± 1,02) para o GII e de 6,92 µm (± 1,33) para o GIII. Segundo o teste Kruskal-Wallis seguido

do teste T não existiram diferenças significativas entre as médias dos grupos (p > 0,01) (Tab. 9 – Fig. 19).

TABELA 9 - Área, Diâmetro máximo e Diâmetro mínimo do N4, Média e Desvio Padrão

Grupo	Área (µm$^{2)}$	Diâmetro máximo (µm)	Diâmetro mínimo (µm)
GC	27,35 (± 2,54)	11,06 (± 1,12)	8,82 (± 0,12)
GI	26,01 (± 1,24)	12,67 (± 0,11)	9,92 (± 1,33)
GII	26,05 (± 2,04)	10,96 (± 0,42)	7,52 (± 1,02)
GIII	26,01 (± 1,24)	10,67 (± 0,11)	7,92 (± 1,33)

Área - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GC = GI = GII = GIII (p > 0,01).
Diâm Max. - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GC = GI = GII = GIII (p < 0,01)
Diâm. Mín. - Teste deKruskal-Wallis seguido do teste T - GC = GI = GII = GIII (p > 0,01)

Área, Diâmetro máximo e Diâmetro mínimo do N4

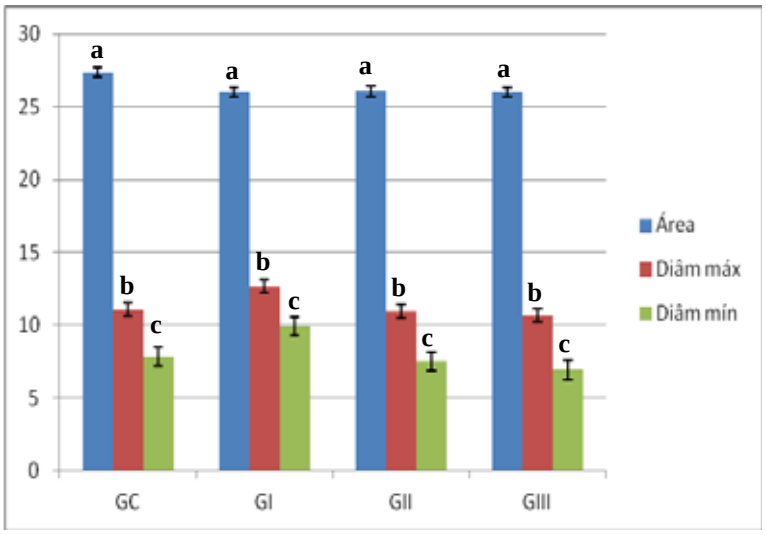


Fig. 19 - Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste T – GC = GI = GII = GIII.
Área (µm^2) - p > 0,01; Diâmetro máx. (µm) - p < 0,01; Diâmetro Mín. (µm) - p > 0,01.
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

As médias e desvios padrões do número total de fibras nervosas por campo no segmento N1 e no segmento N4, respectivamente, foram de 401,08 (± 98,5) e 905,01 (± 58,1) para o GC, de 387,03 (± 85,7) e 865,12 (± 19,95) para o GI, de 511,60 (± 91,6) e 899,06 (± 28,23) para GII e de 398,50 (± 75,3) e 955,21 (± 30,05) para o GIII. O Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes mostrou não haver diferença na quantidade de fibras entre os grupos do N4 (p < 0,001). Para o N1, segundo o Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguidos do Teste T, o GII apresentou o maior número de fibras por campo diferindo estatisticamente dos GC, GI e GIII, que não diferiram entre si (p < 0,001). O

GIII apresentou perda de 58,29 % de fibras nervosas por campo, quando comparado os grupos do segmento N4 com o segmento N1, o GC apresentou perda de 55,69 %, a perda para o GI foi de 55,27 % e a menor perda foi apresentado pelo GII, 43,10 %. Para verificar quais grupos diferiam, foi aplicado o método de comparações múltiplas, que mostrou haver diferenças significativas entre as médias apresentadas pelo GII e os GC, GI e GIII, que não diferiram entre si ($p < 0,001$). (Tab. 10 – Fig. 20).

TABELA 10 - Total de fibras nervosas por campo, Média e Desvio Padrão

Grupo	N4	N1
GC	905,01 (± 58,1)	401,08 (± 98,5)
GI	865,12 (± 19,95)	387,03 (± 85,7)
GII	899,06 (± 28,23)	511,60 (± 91,6)
GIII	955,21 (± 30,05)	398,50 (± 75,3)

Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguidos de Teste T ($p < 0,001$).
N4: GC = GI = GII = GIII / N1: GII > GC = GI = GIII.

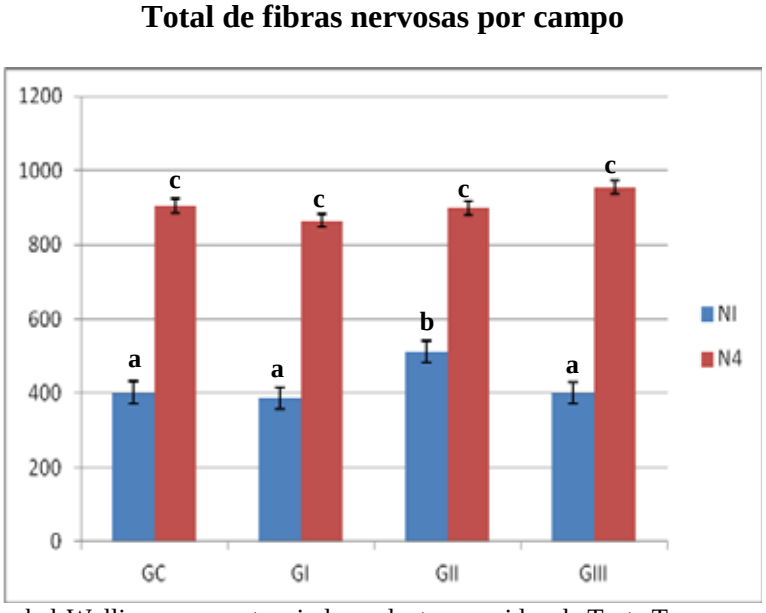


Fig. 20 - Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes seguidos de Teste T.
N4: GC = GI = GII = GIII / N1: GII > GC = GI = GIII ($p < 0,001$).

Segmento N2

Foram observadas fibras nervosas desorganizadas.

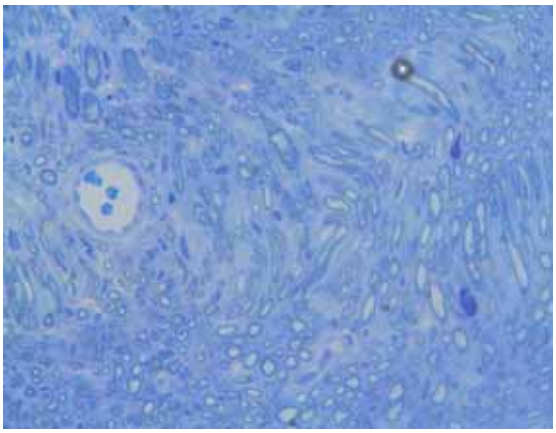


Fig. 21 – Segmento proximal do n. fibular comum esquerdo (N2). Cortes corados por azul de tuluidina a 0,25 % - 400 x (MO).

... quando nada parece ajudar eu vou e
Olho o cortador de pedras martelando
sua rocha, talvez Cem vezes sem
que nenhuma rachadura apareça.
Então, Na centésima primeira martelada
a pedra se abre Em duas e,
eu sei que não foi aquela última que Conseguiu,
mas todas aquelas que vieram antes...

Jacoob Riis

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Apesar da evolução nas técnicas de reparação de nervos periféricos e melhora na recuperação funcional após a secção de um nervo periférico, a obtenção de bons resultados em grande quantidade de pacientes é ainda grande desafio cirúrgico.

O objetivo principal das pesquisas que seguem a linha de reparação de lesões nervosas é proporcionar ao indivíduo a melhor recuperação funcional possível, sensitiva e/ou motora. E o que se deseja com uma técnica de reparação microcirúrgica para a regeneração nervosa é o realinhamento dos cabos nervosos, permitindo a passagem do estímulo elétrico, com o mínimo de traumatismo cirúrgico (Dourado, 2002). Para se falar, então, em reparação cirúrgica dos nervos periféricos, temos que levar em consideração o domínio da neuroanatomia dos nervos periféricos, o uso de material de microcirurgia apropriado, o uso do microscópio cirúrgico e a indicação da técnica adequada (Henriques, 2004).

Não podemos esquecer que a regeneração axonial é um processo altamente delicado, com objetivo de direcionar os brotamentos axoniais na direção correta. E embora haja um aperfeiçoamento sucessivo dos materiais cirúrgicos (fio de sutura, microagulhas, microscópio operatório) e avanços nas técnicas propostas, a qualidade da recuperação funcional ainda deixa a desejar, pois a resposta do organismo a lesão, na maioria das vezes, é um tecido cicatricial que diminui a qualidade da recuperação funcional (De Medinaceli et al., 1982; De Medinaceli, 1994; Sato, 2005).

A técnica da NLT foi escolhida para o nosso trabalho pelos mesmos motivos que tem gerado certo fascínio e curiosidade na comunidade científica, já que ela permite a coaptação dos nervos sem interposição de material, quer biológico ou não; e, ainda, não requer perda ou déficit motor/sensitivo como sequela para a área doadora, como no caso de enxerto de nervo, além de tornar qualquer nervo como potencial nervo doador, sem prejudicá-lo (Viterbo et al., 1994a; Luo et al., 1997; Tham & Morrisson, 1998; Giovanoli et al., 2000; Cederna et al., 2001; Yamauchi et al., 2001; Zhang & Fisher, 2002; Ögun et al., 2003; Sato, 2005; Ross et al., 2005; Samal et al., 2006; Matsuda et al., 2008; Beris & Lykissas, 2009; Viterbo et al., 2009; Lykissas, 2011). Segundo Secer et al. (2009), a NLT é frequentemente utilizada em lesões de plexo braquial, as quais, por serem extremamente prevalentes, representam a maior incidência de lesões nervosas em geral (n. mediano – 32,3%; ulnar – 24,1%; radial – 12,1 %;

somando aproximadamente 70% das lesões), o que por si só já justificaria a quantidade de trabalhos que tratam dessa técnica.

Há muito a se pesquisar sobre o fenômeno do brotamento lateral em NLT (Liu et al., 1999; Matsumoto et al, 1999; Lutz et al., 2000; Zhu et al., 2005; Akeda et al., 2006; Samii et al., 2006), enfatizando questões como a origem dos neurônios regenerados e o mecanismo molecular do brotamento lateral. Acredita-se, porém, que o neurotropismo que o segmento nervoso distal degenerado produz é forte o bastante para induzir o brotamento lateral de um axônio em um nervo não lesado, a partir do nó de Ranvier mais próximo do local de coaptação dos nervos ou da própria área de coaptação dos dois nervos (Liu et al., 1999; Giovanoli et al., 2000; Yamauchi et al., 2001; Xiong et al., 2003; Hayashi et al., 2004; El-Sherben et al., 2004; Zhu et al., 2005; Flores., 2006; Pondaag & Gilbert., 2008; Beris & Lykissas., 2009; Cheng et al., 2011; Dubový et al., 2011). De acordo com o estudo de Tarasidis et al. (1997), Al-Qattan & Al-Thunyan (1998), Lutz et al. (2000), Verdú et al. (2000) e Betini (2010), as células de Schwann, tanto do coto distal do nervo lesado, quanto do corpo do nervo sadio (provenientes do nódulo de Ranvier mais próximo da coaptação) funcionam como fatores neurotróficos para a regeneração axonial e promoveriam o crescimento axonial. Matsuda et al. (1997) demonstraram que a invasão de células de Schwann, do segmento distal do epineuro do nervo receptor para o nervo doador, foi o passo crucial para o início do brotamento lateral do nervo intacto. Bontioti et al. (2005) e Liao et al. (2009) demonstraram, através de marcadores retrógrados, que brotamentos laterais foram os responsáveis pelo mecanismo por meio do qual ocorreu a regeneração. Segundo Xiong et al. (2003), em condições fisiológicas não são encontrados brotamentos axoniais laterais entre o n. fibular comum e o n. tibial intactos e nem mesmo em situações onde há tentativas de realinhamento dos cabos nervosos, como em uma NTT. Faijko et al. (2004) levantam a possibilidade de que a sinalização entre os neurônios lesados e intactos no gânglio da raiz dorsal também seria importante mecanismo indutor de brotamento lateral. McCallister et al. (1999), em experimento semelhante ao nosso, suturaram o coto distal do n. fibular comum à lateral do n. tibial e, ao estimular o n. isquiático, observaram a extensão da pata com contração do m. tibial cranial, podendo assim afirmar que houve a reinervação do músculo alvo. Mas por estimularem distalmente à NLT, não podiam informar sobre a origem dos axônios regenerados, diferente do nosso trabalho, no qual estimulamos proximalmente à NLT, diretamente sobre o n. isquiático, podendo afirmar, portanto, que o estímulo passou pela NLT, levando o MTC a responder com um potencial de ação, mostrando haver reinervação.

Acreditamos, portanto, que as células de Schwann atuaram no epineuro do nervo receptor, preparando um micro-ambiente favorável para a passagem e crescimento dos axônios que tiveram sua origem nos brotamentos laterais, sendo os responsáveis por esse estímulo (Fortes et al., 1999; Bajrovic et al., 2002; Hayashi et al., 2004; Lykissas 2011).

Outra variável da NLT diz respeito à necessidade ou não de se fazer uma lesão no nervo doador. Na literatura consultada, encontramos autores mais antigos (Platt & Bristow, 1924; Polock & Davis, 1933; Gatta, 1938; Braun, 1966; Hakstian, 1968) e outros mais atuais (Grabb et al.,1970; Hakstian, 1973; Noah et al., 1997), que acreditam ser essencial ao menos uma incisão no nervo doador, o que promoveria uma neurorrafia muito próxima à término-terminal. Para Bertelli et al. (1996), a principal condição para a regeneração do nervo é a axotomia dos neurônios. Autores como Liu *et al*. (1999), Zhang et al. (2000, 2001), Bontioti et al. (2005, 2006), Brenner et al.(2007), Lykissas et al. (2007), Pondaag & Gilbert (2008), acreditam que a axotomia parcial, uma fenestração ou a própria sutura na bainha epineural do nervo doador, é um pré-requisito básico a fim de que ocorra o estímulo para iniciar o mecanismo biológico que leva ao aparecimento dos brotos laterais no nervo sadio. De alguma forma, esses diversos autores buscam aumentar a superfície de contato entre os axônios do nervo doador e do nervo receptor, o que determina união término-terminal dos túbulos endoneurais, comprometendo boa parte do nervo doador. Esse método leva sempre a um déficit funcional no resultado final da reconstituição axonial, trazendo prejuízo às estruturas inervadas pelo nervo doador. Mas a partir da apresentação dos resultados de Viterbo et al. em 1992, 1995 e 1998, em que a NLT foi realizada sem lesão alguma no nervo doador e até mesmo, em alguns casos, sem a ressecção do epineuro, autores como Ross et al., 1995; Matsuda et al., 1995; Battat et al., 1996; Cao et al.,1997; Zhao et al., 1997; Matsumoto et al., 1999; Rosseto et al., 2001, Dourado et al., 2003; Matsuda et al., 2005; Akeda et al., 2006; Ayan et al., 2007; Viterbo et al., 2009; Lykissas, 2011 confirmaram seus achados, mostrando que a NLT .pode ser realizada sem nehuma lesão no nervo doador, ampliando suas aplicações. Não utilizamos nenhum tipo de lesão ou ranhuras no nervo doador em nosso experimento.

Abrir uma janela epineural no nervo doador ainda é bastante discutido. Autores como Urbaniak (1982), Tupper et al. (1988), Al-Qattan & Al-Thunyan (1998) e Accioli de Vasconcelos (1999), acreditam que além do epineuro, há também a necessidade da secção de alguns fascículos. Embora eficaz, requer manipulação microcirúrgica precisa, maior tempo cirúrgico e provoca a formação de cicatrizes teciduais devido ao aumento da dissecção e da sutura (Dourado et al., 2003). Yan & Matloud (2002) e Walker et al. (2004) são favoráveis a

confecção da janela epineural e analisaram até mesmo o tamanho que deveria ter a janela epineural, afirmando que com 5 mm se teria maior garantia de brotamento lateral do nervo doador.

Outros autores (Matsuda et al., 1995; Battat et al., 1996; Cao et al., 1997; Zhao et al., 1997; Viterbo et al., 1998; Frutan et al., 2011) obtiveram resultados semelhantes aos de Viterbo (1992a), comparando, no mesmo experimento, os resultados da NLT com e sem janela epineural. Cao et al. (1997), Zao et al. (1997), Viterbo et al. (1998) e Frutan et al. (2011), utilizaram em seus estudos o modelo de nervos fibular e tibial. Cao et al. e Viterbo et al. não encontraram diferenças estatísticas no estudo do índice funcional (IFI De Medinaceli) entre os dois grupos ($p > 0,05$). Cao *et al*. (1997) e Zhao et al. (1997) demonstraram, através de análises histológicas e ultraestruturais, respectivamente, a presença de brotamentos laterais em ambos os grupos. Frutan et al. (2011), ainda no mesmo experimento, compararam também os resultados da NTT, demonstrando que apesar da NLT com janela de epineuro ter apresentado maior contagem de axônios no segmento distal do n. fibular ($p > 0,05$), os resultados do índice funcional (IFI De Medinaceli) não apresentaram diferença para nenhum dos três grupos ($p > 0,05$).

A maioria desses autores observou que as fibras regeneradas têm a capacidade de penetrar e percorrer o endoneuro, perineuro e epineuro (Noah et al., 1997; Zhao et al., 1997; Mennen, 1998ab; Al-Qattan & Al-Thunyan, 1998; Liu et al., 1999; Giovanoli et al., 2000). Em nosso trabalho não foi realizada janela de epineuro por terem sido utilizados nervos delgados, com diâmetros menores que 1,5 mm. Viterbo et al., em1998, compararam a NLT com e sem retirada de janela de epineuro, suturando o coto distal do n. fibular na lateral do n. tibial e viram não haver diferença. Baseados nessa recomendação não retiramos a janela de epineuro.

El-Sherbeni et al. (2004), utilizando dois grupos de 30 ratos, realizou janelas epineurais em um grupo sem fixar a esta região algum segmento nervoso e, no segundo grupo, realizou a janela epineural e fixou posteriormente o segmento nervoso. Observaram que não houve brotamento lateral nos nervos em que foram feitas apenas as janelas epineurais, mas não a NLT subseqüente; nos mesmos experimentos, nos nervos em que foram realizadas as janelas e, na sequência, a técnica tradicional da NLT, os resultados obtidos foram excelentes, baseados no número de axônios e na espessura da bainha de mielina, que se aproximaram muito do grupo controle, sugerindo que a liberação de fatores de crescimento do nervo receptor permite o surgimento de brotamentos laterais. Alguns autores sugerem que a lesão

provocada pelo próprio ponto de sutura já seria suficiente para a liberação de fatores neurotróficos de crescimento (Pannucci et al., 2007; Johnson et al., 2008; Pondaag & Gilbert et al., 2008) influenciando na NLT.

Os resultados de El-Sherbeni et al. (2004) se somam as afirmações de Matsuda et al. (1997) que afirmam que somente a janela de epineuro não permitiria o aparecimento de brotamentos, e sim a invasão das células de Schwann, do segmento distal do nervo receptor para o epineuro do nervo doador funcionando como fator neurotrófico.

Não podemos deixar de levar em consideração as vantagens de se atuar somente no epineuro, sem lesá-lo: técnica simples, de fácil execução e, portanto, requer menos tempo cirúrgico, além de não precisar de grandes ampliações de imagem (Silva Neto, 2003), não invade o conteúdo neural e permite preservar uma camada de tecido conjuntivo existente abaixo do epineuro, rica em vasos sanguíneos, o que é de grande importância para evitar tecido cicatricial. Sabe-se, hoje, que após alguns meses pós NLT, ocorre a absorção das camadas conjuntivas, expondo os neurônios do nervo doador, havendo uma interação entre as células de Schwann dos dois nervos coaptados, podendo assim reforçar a produção de fatores de crescimento, que não só estimulariam o crescimento axonial, como também direcionariam o brotamento para o nervo lesado. Se as camadas são conjuntivas absorvidas e as neurotrofinas vêm do nervo receptor, isso explicaria porque não há necessidade de lesão, ainda que mínima, no nervo doador, conhecimento este que permite a tentativa de novas técnicas (como embraçamento dos nervos), com o objetivo de reduzir, cada vez mais, o tempo cirúrgico e possível trauma ao nervo (Viterbo et al., 2012).

O modelo utilizado para este estudo, *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, foi eleito por ser um animal que além de apresentar degeneração/regeneração nos nervos periféricos muito semelhantes às que ocorrem no homem, oferecem resistência à infecção, é de fácil manejo e tem baixo custo de manutenção. Essas vantagens fazem desse animal um modelo muito utilizado em estudos experimentais sobre regeneração nervosa (Viterbo, 1992a; 1993; Viterbo et al.,1994ab; 1995; Terzis et al., 1997, Kanje et al., 2000; Lundborg, 2000; Schultes et al., 2001; Barcelos et al., 2003; Hayashi et al., 2004; Martins., 2005; Tansey et al., 2011), embora se encontrem na literatura outros modelos animais que, mesmo de maneira mais escassa, também são utilizados, por exemplo, macacos (Grabb et al., 1970; Mennen, 1998a; Schmidhammer et al., 2007), cães (Levinthal et al., 1997), coelhos (Krivolutskaia et al., 1989; Giovanoli et al., 2000; Jaberi et al., 2003) e ovelhas (Kettle et al., 2012).

Foram utilizados ratos machos e jovens. Machos, para evitar as variáveis hormonais, já que Kovacic et al. (2007) mostraram que os hormônios sexuais exercem efeitos neurotróficos em várias regiões do sistema nervoso. Jovens, por apresentarem melhor capacidade regenerativa e serem o tipo de animal utilizados pela maioria dos autores. Ratos mais velhos poderiam apresentar uma diminuição de liberação de fatores neurotróficos (Andrews, 1996), alterando a velocidade da regeneração nervosa (Fawcett, 1992; Vaughan, 1992).

Frente aos achados positivos da NLT, diversos autores (Matsuda et al., 1997; Mennen, 1998b; Kostakoglu, 1999; Accioli de Vasconcelos, 1999; Terzis & Papakonstantinou, 2000; Rovack et al., 2001; Mennen, 2003; Frey & Giovanoli, 2003; Haninec et al., 2004; Yüksel et al., 2004; Amr & Moharram, 2005; Pardini et al., 2005; Samii et al., 2006; Noditi et al., 2007; Landwehrs & Bruser, 2008; Zhang et al., 2012) vêm utilizando a NLT em pacientes, empregando-a clinicamente. Nos trabalhos apresentados em humanos, a quantidade apresentada de pacientes é bastante variada, a partir de 2 pacientes (Yüksel et al., 2004), 8 pacientes (Noditi et al., 2007), 11 pacientes (Amr & Moharram, 2005), 13 pacientes (Frey & Giovanoli, 2003; Haninec et al., 2004), 22 pacientes (Mennen, 1998b), 25 pacientes (Zhang et al., 2012) até 56 pacientes (Mennen, 2003). Todos os autores citados utilizaram a NLT em traumas de membro superior, onde os nervos mais utilizados do plexo braquial foram: n.ulnar – n. mediano (Kostakoglu, 1999; Yüksel et al., 2004; Noditi et al., 2007) e n. digital – n. mediano (Frey & Giovanoli, 2003; Mennen, 2003), embora todos eles utilizem diversas combinações entre os nervos, de acordo com a necessidade: n. digital – n. ulnar, n. digital – n. radial (Frey e Giovanoli, 2003), n. radial – n. mediano (Yüksel et al., 2004). O tempo em que foram avaliados os resultados é ainda mais variado. Respostas positivas puderam ser observadas a partir de três meses, nos n. musculocutâneo – n. radial (Haninec et al., 2004), entre 6 e 24 meses (Amr & Moharram, 2005; Noditi et al., 2007), 36 meses (Zhang et al., 2012) até 43 meses (Kostakoglu, 1999). Os resultados foram avaliados, na grande maioria, por testes clínicos mediante descriminação de dois pontos, para nervos sensitivos, e avaliação motora, para nervos motores (Mennen, 1998b; Kostakoglu, 1999; Frey & Giovanoli, 2003; Mennen, 2003; Yüksel et al., 2004; Noditi et al., 2007) e classificação pela Escala BMRC - The British Medical Research Council (Conselho Britânico de Pesquisa Médica), e exames paraclínicos como Ressonância Magnética, Eletromiografia e avaliação da velocidade da condução nervosa (Kostakoglu, 1999; Zhang et al., 2012).

Todos os autores citados acima afirmam terem conseguido bons resultados, tanto motor quanto sensitivo, onde métodos convencionais não conseguiriam prover resultados semelhantes. Mennen (2003), que apresentou uma casuística de 56 pacientes, afirma que os melhores resultados têm sido na resposta do m. bíceps (motor) e na pele da palma da mão (sensitivo). Noditi et al. (2007) foi o único autor que relatou um insucesso em um quadro em que a NLT foi realizada três meses após o trauma.

O número de animais por grupo na literatura é bastante variável, de 4 a 6 animais. Cao et al. (1997) utilizaram 4 animais; Betini (2010), 5 animais e Cederna et al. (2001) 6 animais. Muitos autores utilizaram grupos com 10 animais (Al-Qattan & Al-Thunyan, 1998; Giovanoli et al., 2000; El-Sherbeni et al., 2004; Bontioti et al., 2005; Frutan et al., 2011) e grupos de até 20 animais (Bertelli et al., 1996; Franco, 2010; Bersaneti et al., 2012), especialmente em estudos sobre a NLT. Optamos por grupos compostos por 20 ratos, número esse já utilizado em outros trabalhos do nosso grupo (Stipp et al., 2007; Maciel, 2011), para dar maior confiabilidade à análise estatística, pois sabemos que a regeneração de nervos determina números bastante variáveis e também podem ocorrer perdas de animais durante experimentos de longa duração. No nosso caso foram a óbito dois ratos, do GC. Esses dados da literatura reforçam a nossa opção por grupos maiores de animais, embora isso represente maiores custos e maior trabalho para a equipe, mas achamos que são válidos. Na literatura referente ao FK-506 encontramos grupos menores, variando de 5 a 10 animais (Gold et al., 1995; Jost et al., 2000; Brenner et al., 2005; Costa et al., 2006; Yildirim et al., 2008; Cheng et al., 2011), com raras exceções como a de Li et al. (2010) que utilizaram 13 animais.

O período de pós-operatório na literatura também é muito variável, a partir de 2 semanas (Cederna et al., 2001), entre 1 e 2 meses (Al-Qattan & Al-Thunyan, 1988; El-Sherbeni et al., 2004; Betini, 2010; Frutan et al., 2011; Dubový et al., 2011; Bersaneti et al., 2012), 3 meses (Al-Qattan, 2000; Betini, 2010, Franco, 2010); 4 meses (Stipp et al., 2007; Frutan et al., 2011); 5 meses (Jung et al., 2009) e 6 meses (Viterbo et al., 1998; Cederna et al., 2001; Bontioti et al., 2005) para NLT em animais (trabalhos experimentais). A NLT em humanos foi avaliada desde 3 meses de pós operatório (Haninec *et al.*, 2004) até acima de 36 meses (Kostakoglu, 1999).

Os períodos de pós operatórios descritos nos trabalhos de observação da ação do FK-506, em animais, são menores, variando a partir de 1 semana (Yildirim et al., 2008), de 2 a 4 semanas (Gold et al.,1995; Jost et al., 2000; Brenner et al., 2005), de 5 a 8 semanas (Costa et al., 2006; Li et al., 2010) e alguns poucos trabalhos que apresentam períodos mais longos

como Cheng et al. (2011) com 120 a 180 dias. O período levado em questão no nosso experimento foi de 60 dias, pois queríamos observar as alterações ocorridas nos nervos em uma fase inicial, já que o nosso trabalho é o segundo no mundo a associar NLT com o FK-506, futuramente ampliaremos este trabalho para observações em diferentes períodos.

O primeiro trabalho com características semelhantes ao nosso, foi descrito por Chen et al. (2009), utilizando 10 ratos por grupo e apresentando análises funcionais iniciais com 2 semanas de pós operatório, repetidas com 4, 6, 8 e 12 semanas e análises histológicas com 12 semanas de pós-operatório. Sabe-se ainda que as respostas funcionais e histomorfométricas ocorrem com prioridade neste período, e que as alterações posteriores são pequenas (Barcelos et al., 2003; Kotulska et al., 2006), o que não justificaria um tempo maior de utilização da droga (FK-506), além de seu alto custo. Muitos trabalhos utilizaram período igual ou menor: Kale et al. (2011) – 5 semanas; Walker et al. (2004) – 6 semanas; El-Sherbeni et al. (2004) – 7 semanas; Karacaoglu et al. (2001), Zhang et al. (2001), Ülkür et al. (2003), Rupp et al. (2007), Haastert et al. (2010) e Frutan et al. (2011), 8 semanas. Todos estes autores obtiveram bons resultados, no período indicado, sem utilização de fármacos. E nos trabalhos que utilizaram o FK-506, com 16 dias de pós operatório (Gold et al., 1994) os nervos tratados já apresentavam diferenças histológicas e funcionais dos nervos não tratados, embora fossem nervos esmagados e não seccionados e, em nervos seccionados e imediatamente reparados, com 3 semanas, embora não houvesse diferença na recuperação funcional, já havia diferenças histológicas (Costa et al., 2006).

Embora existam alguns modelos, como os nn. safeno/isquiático, musculocutâneo/mediano (Zhang & Fisher, 2002), mediano/ulnar, mediano/radial (Kostakoglu, 1999; Yüksel et al., 2004; Bontioti et al., 2005), n. digital/n. mediano, n. digital/n. radial (Frey & Giovanoli, 2003), n. musculocutâneo/n. ulnar (Haninec et al., 2004) nos quais a NLT tem sido avaliada, os nervos fibular comum e tibial foram selecionados para o nosso trabalho por serem de fácil acesso cirúrgico e, mesmo próximos, inervam músculos distintos (m. tibial cranial e m. gastrocnêmio, respectivamente). O nervo fibular comum atuou como receptor porque, sendo o único nervo motor responsável pelo m. tibial cranial, qualquer alteração seria fácil de ser notada pela observação do músculo em questão. Esse modelo foi utilizado pela primeira vez por Viterbo (1992a) e, a partir dai, tem sido repetido em uma sequência de trabalhos (Viterbo et al., 1994abc; 1998; Al-Qattan & Al-Tunyan, 1998; Goheen-Robilland et al., 2002; Ogün et al., 2003; El-Sherbeni et al., 2004; De Sá, 2004; Zhu et al., 2005; Stipp et al., 2007; Noditi et al., 2007; Franco, 2010; Frutan et al., 2011, Lykissas,

2011). Outra vantagem do n. fibular comum é a de ser exclusivamente motor, pois ainda é consenso, entre os autores, que o nervo exclusivamente sensitivo ou motor apresenta uma resposta melhor que um nervo misto (Stoll & Muller, 1999; Campbell, 2008; Liao et al., 2009). Muitos autores têm demonstrado boas respostas, tantos em nervos sensitivos, quanto em nervos motores (Viterbo et al., 1992ab; 1994ab; 1998; Lundborg et al., 1994b; Noah et al., 1997; Tham & Morrison, 1998; Liu et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Sanapanich et al, 2002; Haninec et al., 2012). Mennen (1998a) demonstrou em macacos e humanos (Mennen, 1998b), a reconstituição funcional motora e sensitiva, e Lykissas (2011) tem encontrado respostas biológicas semelhantes, tanto para axônios sensitivos quanto para motores, e estes, acredita o autor, devido à sua alta especificidade com a fibra muscular. Existem evidências que também o órgão-alvo exerceria influência neurotrófica sobre os axônios, fatores estes, liberados por moléculas da lâmina basal das fibras musculares (Mackinnon, 1989; Mackinnon et al., 2001; Mueller, 2008). Isso também seria um fator determinante para o sucesso da recuperação funcional (Ide, 1996).

Para expor o nervo isquiático e seus ramos, foi utilizada a técnica padrão de abordagem dorsal glútea, por ser um procedimento de fácil acesso, com pouco sangramento e pouco deslocamento tecidual, favorecendo o pós-operatório (Koch, 2002).

O fio de sutura utilizado foi o de náilon monofilamentar 10-0 também utilizado por outros autores (Udina et al., 2004; Martins et al., 2005; Costa et al., 2006; Chen et al., 2009; Frutan et al., 2011; Bersaneti et al., 2012), porque apresenta baixa reação tecidual e custo inferior ao 11-0. Optou-se por dois pontos, pois, sendo o n. fibular comum menos espesso que o n. tibial, os dois pontos foram suficientes para manter os nervos em posição adequada e em íntimo contato (Viterbo, 1992a; Caplan et al., 1999, Schultes et al., 2001). Embora na literatura se encontre o uso de 3 pontos (Mackinnon, 1989; Viterbo, 1992a; Lundborg et al., 1994a) e até de 4 pontos (Lundborg et al., 1994b; Goheen-Robilland et al., 2002; Yan & Matloud, 2002; Stipp et al., 2007), não podemos esquecer que as suturas podem provocar formação de fibrose, o que alteraria a vascularização, com a possibilidade de produzir área isquêmica no sítio da lesão. Todo o procedimento cirúrgico foi feito com a utilização do microscópio cirúrgico, pois muitos autores, entre eles Braun (1966), Terzis et al. (1997) e Millesi & Schmidhammer (2008), chamam a atenção para a vantagem do seu uso, pois diminui o trauma durante a manipulação nervosa, permitindo uma melhor recuperação funcional.

6.1 Teste de Avaliação da Marcha

Assim como a análise histológica é necessária, indicando ou não a regeneração axonial, há também a necessidade da análise funcional, já que a regeneração axonial não é sinônima de recuperação funcional e nem sempre ocorre simultaneamente (Frutan et al., 2011).

Um dos testes mais utilizados para essa avaliação é o Teste da Marcha (De Medinaceli et al., 1982), que pela análise do padrão da caminhada do animal, por meio da impressão das suas pegadas, permite a avaliação motora, de maneira econômica, prática e não invasiva (Varejão et al., 2001; Ogün et al., 2003; Monte-Raso, 2006; Moraes, 2009; Betini, 2010; Rosa Junior, 2010). É importante salientar que o teste da marcha revela, indiretamente, o nível de plasticidade cerebral, que para uma recuperação motora funcional é necessária, especialmente na NLT, desenvolvendo novas conexões nos níveis centrais, ou seja, adaptação na estrutura e na função do SNC, frente à lesão periférica, que além de promover a perda funcional, leva a alterações no mapa cortical referente à região alterada. Os animais aprendem a utilizar neurônios que têm uma nova área definida (McAllister et al., 1999; Bontioti et al., 2005).

De Medinaceli et al. (1982) desenvolveram esse método quantitativo de marcha, analisando o desempenho dos membros posteriores de ratos, com base no Índice Funcional do Isquiático (IFI De Medinaceli), expressando como porcentagem a perda da função normal e avaliando a função relacionada ao n. isquiático. Bain et al. (1989) aperfeiçoaram essa técnica, estabelecendo uma expressão individual para o n. tibial (IFI Bain) e para o n. fibular comum (IFF Bain). Em uma completa lesão do n. fibular comum, os animais apresentam uma diminuição do comprimento da pegada. A distância entre o 2º e 4º artelhos (TI) não é muito afetada, devido à função normal dos músculos intrínsecos da pata, porém apresenta pequena diminuição da distância entre o 1º e 5º artelhos (TS). Esses três índices vêm sendo largamente utilizados na literatura (Gold et al., 1994; Jost et al., 2000; Sobol et al., 2003; Brenner et al., 2004; Costa et al., 2006; 2009; Chen et al., 2009; Franco, 2010; Romão, 2011; Sun et al., 2012; Yan et al., 2012).

Utilizamos as três expressões, ou seja, os três índices (IFI De Medinaceli, IFI Bain e IFF Bain). O que observamos foi que, independente da dose da droga utilizada, ou da ausência da droga, não houve diferença significativa entre os resultados dos grupos estudados.

A média do IFI De Medinaceli encontrada para os 4 grupos estudados, GC, GI, GII e GIII, respectivamente, 27 %, 19 %, 18 % e 24 %, se assemelham às encontradas por Frutan et al. (2011) em NLT com janela epineural (26 %) e sem janela epineural (25 %), sem a utilização de fármacos.

Em alguns trabalhos que se utilizaram do FK-506, com nervos seccionados e em períodos de até 49 dias (Doolabh & Mackinnon, 1999) e de 42 dias (Sobol et al, 2003), embora os resultados desse índice tenha apresentado diferença na avaliação funcional entre o grupo controle e o grupo tratado com FK-506, é necessário esclarecer que os resultados foram obtidos no início do experimento, enquanto que no nosso trabalho, nós avaliamos apenas o resultado final, após dois meses. Talvez a análise apenas no final tenha encoberto o aumento da velocidade da reparação no início do experimento. Também temos que levar em consideração que a marcha envolve o mecanismo de plasticidade cerebral e que, talvez para obtermos resultados compatíveis com o reparo axonial, ou seja, para a recuperação funcional ser compatível com a regeneração anatômica, tivéssemos que analisar após seis meses, no mínimo, e até mesmo por períodos ainda mais longos. Ainda é necessário se pensar na hipótese do índice não ter sido sensível o suficiente para demonstrar pequenas diferenças entre os grupos, situação essa também encontrada por Stipp et al. (2007), sendo um motivo a mais para se pensar em analisar em períodos mais longos, com maior tempo para adaptação cerebral.

Autores como Gold et al. (1994), Jost et al. (2000), Brenner et al. (2004), Yan et al. (2012) e Sun et al. (2012), encontraram diferenças significativas, tanto morfológicas quanto funcionais, em grupos tratados com FK-506, mas a lesão e a técnica de reparo utilizadas foram diferentes das utilizados em nosso trabalho. Brenner et al. (1994) e Gold et al. (1994) utilizaram nervos esmagados e Jost et al. (2000), Sun et al. (2012) e Yan et al. (2012) utilizaram nervos seccionados mas imediatamente reparados e o TAM (Teste de Avaliação da Marcha) realizado no período entre 7 e 18 dias. Todos os grupos tratados com FK-506 apresentaram maior contagem de axônios no coto distal ou distalmente à região que sofreu a compressão e melhores resultados no TAM do que os respectivos grupos não tratados, que funcionaram como grupos controles. Lembrando que mesmo em esmagamentos, o n. fibular comum leva em torno de oito semanas para uma recuperação funcional de 100 % (Hare et al., 1992).

Semelhante ao nosso trabalho, em 2009, Chen et al. associaram NLT com FK-506, utilizando a dose de 1 mg/Kg/dia, durante quatro semanas, e fizeram a análise histológica e

funcional após 8 e 12 semanas. Em nosso trabalho administramos o FK-506 por oito semanas e ao término já analisamos. Talvez essa diferença na metodologia justifique, em parte, os resultados diferentes dos dois trabalhos. Chen et al. (2009) encontraram uma melhora nos resultados funcionais, enquanto nós, não. Embora se compararmos os resultados dos índices parcialmente, o IFI Bain do nosso trabalho, com a dose de 0,5 mg/Kg/dia, se apresenta com resultados muito semelhantes aos de Chen et al. Os resultados de Chen et al. para o grupo que recebeu NLT mais solução salina foi de 70,12 (± 4,83) e para o grupo que recebeu FK-506 (1 mg) foi de 63,81(± 7,79), enquanto os nossos resultados para o grupo que só recebeu NLT (GC) foi de 84 (± 0,22), para o que recebeu 1mg (GI) foi de 66 (± 0,31) e para o que recebeu 0,5 mg foi de 61 (± 0,06). Mas quando comparamos os nossos resultados (GI e GII) com o nosso GC, não houve diferença.

6.2 Teste Eletrofisiológico

A Avaliação Eletrofisiológica analisa as condições funcionais por meio de variações na atividade elétrica das unidades motoras, as quais podem ser avaliadas em repouso, durante a contração voluntária e em respostas a estímulos elétricos no nervo motor (Henrique, 2004). O estudo fornece dados sobre a regeneração nervosa e a reinervação muscular. As informações são dadas através da latência, que dá indícios sobre a condução nervosa e a amplitude, mostrando o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico, e consequentemente, o número de axônios excitáveis (Robinson & Snyder-Mackler, 2010). Quando há reinervação, a amplitude é aumentada pelos potenciais das unidades motoras, e no caso da desnervação, os potenciais da unidade motora decrescem. Deve-se levar em consideração que a remielinização das raízes nervosas degeneradas nunca terão a mesma qualidade que tinham antes do traumatismo, o que repercutirá sobre a condução nervosa, que será mais lenta, mesmo depois de uma reparação cirúrgica (Waldran, 2003).

Foram mantidas constantes a frequência, a duração e a intensidade, para que a única variável fosse o grupo experimental. Optamos pela utilização do eletrodo de captação em agulha, pois embora registre apenas uma parte do potencial de ação muscular, sofre menor interferência dos músculos vizinhos (Kimura, 1983).

Em todos os grupos estudados, não houve variação entre as médias de latência. Mas com relação à amplitude, a resposta do GII foi maior que a do GC, estatisticamente, de

maneira significativa. A amplitude observada para o GII foi de 10,02 / ± 6,49 mV, sendo que Yan & Matloud (2002), com experimento de sutura do n. fibular comum à lateral do n. tibial com abertura de janela epineural, suturado na diagonal (janela helicoidal) ou no modelo padrão (ângulo de 90º), observaram uma amplitude de 10,8 / ± 5,3 mV, após 11 meses. Aparentemente, o GII apresentou um resultado muito bom em apenas dois meses. Muito bom também, se comparado aos achados em NLT, que não receberam nenhum fármaco, como os encontrado por Maciel (2011), de 7,8s ± 5,72 mV.

6.3 Massa Corporal e Massa do MTC

Todos os animais apresentaram massa inicial semelhante, sem diferença estatística, pois essa homogeneidade nas amostras é necessária e recomendada por Vieira & Hossne (2001), já que há relação direta entre a massa corporal e a massa muscular. O aumento significativo em todos os grupos, quando comparada a massa corporal inicial com a final, era esperado, já que nos trabalhos envolvendo NLT em ratos, sem utilização de fármacos, esse aumento tem sido uma constante, mostrando que a cirurgia não interfere no desenvolvimento normal dos animais (Stipp et al., 2007; Franco, 2010; Maciel, 2011). No nosso trabalho, nos GC, GI e GIII esse padrão se manteve, mas no GII, em que a dose de FK-506 aplicada foi de 0.5 mg/Kg/dia, os animais apresentaram uma diminuição no ganho de peso (0,391 / ± 0,05g), apresentando uma média abaixo dos outros grupos e estatisticamente diferente do GC. Tudo isto refletido na massa do MTC, em relação à qual os animais também apresentaram o mesmo padrão de aumento, para o GC, GI e GIII, ficando estatisticamente maiores, se comparados ao GII, mostrando que a droga, na dose de 0,5 mg/Kg/dia, de alguma forma, prejudicou esse ganho de massa. Esse resultado nos surpreendeu e não encontramos nenhuma possibilidade para explicá-lo.

Alguns trabalhos na literatura mostram grupos como os de Viterbo et al. (1998) e Maciel (2011), que obtiveram resultados da massa do MTC de 0,470 / ± 0,18g e 0,540 / ± 0,07g, respectivamente, nos animais com NLT sem janela epineural. Portanto, o GII não só difere entre os grupos do nosso trabalho, como também dos apresentados na literatura.

6.4 Análise Histológica do Músculo Tibial Cranial (MTC)

Em nosso experimento, houve variável de todos os grupos estudados quanto à área, sendo a maior encontrada no GIII, o mesmo ocorrendo para o diâmetro máximo. Já para o diâmetro mínimo não houve variação, não confirmando, assim, a diferença encontrada pelos outros dois parâmetros. É importante destacar que a medida do diâmetro mínimo é mais confiável que a medida da área ou diâmetro máximo, pois essa não sofre alteração da inclinação da navalha durante o corte histológico (De Sá, 2004; Romão et al., 2007; Romão, 2011).

O GII, embora tenha sido o grupo que apresentou a menor massa do MTC, foi o que apresentou a menor quantidade de fibras musculares por campo (48,6 / ± 6,73). Os grupos GC, GI e GIII não apresentaram diferença significativa entre eles, quanto ao número total de fibras por campo. Novamente esse resultado nos surpreendeu e não encontramos nenhuma possibilidade para explicá-lo.

6.5 Análise Histológica dos Segmentos Nervosos

No segmento N1, ou seja, no segmento distal do n. fibular comum esquerdo, não houve diferença significativa entre as médias da área, diâmetro máximo e diâmetro mínimo, nos quatro grupos. Foi uma constante a grande quantidade de axônios e a bainha de mielina espessa e bem definida. Mas quando observamos a quantidade de fibras nervosas por campo, o GII (511 / ± 85,7) apresentou diferenças significativas com relação aos outros grupos, se aproximando do N4, ou seja, do segmento do n. fibular comum direito (MCL) - 905 / ± 58,1. Chen et al. (2009) encontraram um aumento no número de fibras nervosas utilizando 1 mg/Kg/dia, enquanto, em nosso trabalho, achamos um aumento maior utilizando 0,5 mg/Kg/dia. Mas diferente de Chen, apesar desse resultado, não encontramos diferença significativa na avaliação funcional, entre os nossos grupos.

O padrão histológico apresentado pelo GII do nosso trabalho assemelha-se muito ao encontrado por Frutan et al. (2011), no grupo que sofreu NLT com janela epineural, resultado esse, bastante superior aos outros grupos: com NTT e com NLT sem janela, após 6 semanas.

Quanto ao segmento N2, ou seja, segmento proximal do n. fibular comum esquerdo, as fibras nervosas desorganizadas já eram esperadas, assim como poucos axônios, ou até mesmo a ausência deles, e extensa proliferação conjuntiva.

6.6 Atuação do FK-506

Desde 1994, quando dois relatos demonstraram a possibilidade de o FK-506 estar influenciando a capacidade de regeneração neural, *in vitro* (Lyons et al., 1994) e *in vivo* (Gold et al., 1994), diversos autores também começaram a observar a sua possível atuação como neurorregenerador no SNP (Gold et al., 1995; Wang et al., 1997; Udina et al, 2002; Yang et al., 2003; Udina et al., 2004; Brenner et al., 2004; Yildirim et al., 2008; Yan et al., 2012), nos conduzindo também a esse experimento.

Assim como para o estudo da NLT, os ratos também são os animais de escolha na grande maioria dos trabalhos que estudam a ação do FK-506 (Gold et al., 1994; 1995; Wang et al., 1997; Doolabh & Mackinnon, 1999; Jost et al., 2000; Brenner et al., 2004; 2005; Costa et al., 2006; Yildirim et al., 2008; Chen et al., 2009; Cheng et al., 2011), embora também encontra-se trabalhos que utilizaram coelhos (Diaz et al., 2004) e macacos (Aubá et al., 2006).

A via de aplicação por nós escolhida, a subcutânea, é a mais utilizada na literatura (Udina et al., 2002; Kvist et al., 2003; Brenner et al., 2004; 2005; Costa et al., 2006; Yildirim et al., 2008), embora Doolabh & Mackinnon (1999) e Jost et al. (2000) tenham utilizado a via intraperitoneal e Cheng et al. (2011) a via intramuscular.

O momento em que a dose inicial do FK-506 é administrada é variável. Há trabalhos na literatura que a aplicam a partir do primeiro dia após a cirurgia (Gold et al., 1994; 1995; Doolabh & Mackinnon, 1999; Yildirim et al.,2008), no mesmo dia da cirurgia (Sobol et al., 2003; Costa et al.,2006) e uma dia antes da cirurgia (Jost et al., 2000). A administração do FK-506, no nosso trabalho, foi iniciada já no dia da cirurgia, pois autores, como Sobol et al. (2003) e Breener et al. (2004) demonstraram que o efeito da droga diminui, sensivelmente, quando não aplicada de imediato .

A dose de escolha para o experimento baseou-se na dose utilizada para o uso do FK-506 com funções imunossupressoras. Nessa situação, a dose inicial varia entre 0,75-0,3 mg/Kg/dia, para adultos, e 0,15-0,3 mg/Kg/dia, para crianças. Empregamos, portanto, uma

dose bem maior (1 mg/Kg/dia), uma dose aproximadamente maior (0,5 mg/Kg/dia) e uma dose aproximadamente menor (0,25 mg/Kg/dia), embora na literatura as doses utilizadas variem entre 1 mg/Kg/dia (Gold et al., 1994; 1995; Doolabh & Mackinnon, 1999; Jost et al., 2000; Yildirim et al., 2008), 2 m/Kg/dia (Wang et al., 1997; Udina et al., 2002; Pan et al., 2003; Sobol et al., 2003; Breener et al., 2004; Yeh et al., 2007; Sun et al., 2012) e 5 mg/Kg/dia (Wang et al., 1997; Pan et al., 2003; Kvist et al., 2003; Udina et al., 2004; Costa et al., 2006), aparecendo esporadicamente doses mais altas, 10 mg/Kg/dia (Udina et al., 2002).

Os autores que utilizaram FK-506 em experimentos onde foi realizado o esmagamento do nervo (Gold et al., 1994; 1995; Wang et al., 1997; Udina et al., 2002; Yeh et al., 2007; Yildirim et al., 2008) e não a transecção, mostraram a ação neurorregeneradora, acelerando o processo de recuperação funcional, utilizando variadas doses da droga (0,2 mg/Kg/dia - Udina et al., 2002; 1 mg/Kg/dia – Gold et al., 1994; 1995; Yildirim et al., 2008; 2 mg/Kg/dia – Udina et al., 2002; 5 mg/Kg/dia – Wang et al., 1997; Udina et al., 2002).

Sobol et al. (2003) e Brenner et al. (2004), utilizando FK-506 em experimentos onde houve secção do nervo e imediato reparo epineural, encontraram diferenças significativas, tanto morfológicas quanto funcionais para os nervos tratados com 2 mg/Kg/dia, já no 21º dia após a cirurgia. Jost et al. (2000) também observaram diferenças significativas mas utilizando 1 mg/Kg/dia, após 32 dias e administrando a primeira dose um dia antes da cirurgia. Os três autores utilizaram o nervo tibial para estudo.

Experimentos comparando resultados de isoenxertos e aloenxertos nervosos tratados com FK-506 têm demonstrado que a partir de três semanas, o aloenxerto tratado com baixas doses (0,5 mg/Kg/dia) já apresenta resultados semelhantes ao do isoenxerto, tanto na contagem de axônios quanto na resposta eletrofisiológica, tanto para n. tibial quanto para o n. ulnar (Brenner et al., 2005; Aubá et al., 2006). Doolabh & Mackinnon (1999) compararam a ação do FK-506 e da Ciclosporina em enxertos de nervos através do TAM e com sete semanas demonstraram que a recuperação funcional dos animais tratados com FK-506 era melhor do que os animais tratados com a Ciclosporina e melhor com relação, também, aos animais não tratados, com uma quantidade de fibras mielínicas maiores e estas com dimensões maiores.

Autores como Kvist et al. (2003), Pan et al. (2003) *e* Yan et al. (2012) não observaram estes mesmos resultados em enxertos nervosas. Kvist et al. utilizando 5 mg/Kg/dia observou resultados melhores em nervos esmagados, mas nenhuma diferença na regeneração em

enxertos autólogos. Pan et al. utilizando 2 mg/Kg/dia encontraram resultados melhores também em nervos esmagados, mas ao utilizarem 5 mg/kg/dia no nervo safeno seccionado, observaram apenas pequeno aumento de velocidade de regeneração, mas não aumento na proporção da população de axônios regenerados ao final do experimento. Yan et al. também afirmam terem encontrado diminuição no tempo de recuperação, entre 21 % e 29 %, com a atuação do FK-506 em nervos seccionados e enxertos, mas que essa diferença acontece até a 6ª semana. Após esse tempo o processo de reparação se iguala.

A diferença da recuperação funcional, nesses dois casos (esmagamento e seccionamento), é significativa, como observado em um mesmo trabalho por Kvist et al. (2003). A reparação em um nervo esmagado é eficiente, bem orientada e semelhante de animal para animal, enquanto que em um nervo seccionado, ela é ineficiente, pobremente orientada e varia de animal para animal (Pan et al., 2003).

O FK-506 também foi associado a enxertos com tubulização. Diaz et al. (2004) utilizaram topicamente no n. facial (ramo bucal) em coelhos, sendo analisado de três a oito semanas e mostraram resultados superiores aos animais não tratados ou que receberam enxertos autógenos. Costa et al. (2006) utilizaram tubos de ácido poliglicólico mais FK-506 (5 mg/Kg/dia) e observaram que após 6 semanas os animais tratados com a droga apresentavam resultados morfológicos e contagem de axônios melhores que os grupos não tratados e melhor também que o grupo que recebeu enxerto autógeno, mas não observaram diferenças significativas na recuperação funcional avaliada através do TAM.

Alguns autores, utilizando períodos de pós-operatório mais longos, têm encontrado resultados satisfatórios (Udina et al., 2004 – 4 meses; Hayashi et al., 2005 – 2 meses; Doolabh & Mackinnon, 1999 – 7 semanas), mas segundo Fansa et al. (1999) e Tuma Junior et al. (2008), o crescimento axonial se dá principalmente nas primeiras duas semanas, diminuindo gradativamente até a 6ª semana e, talvez por isso, em experimentos com poucas semanas (Gold et al., 1994 – 14 dias; Gold et al., 1995 – 15 dias; Wang et al., 1997 – 18 dias; Udina et al., 2002 – 7 dias; Brenner et al., 2004 – 18 dias; Yeh et al., 2007 -9 dias; Yan et al., 2012 – 20 dias; Sun et al., 2012 – 21 dias) os grupos tratados com o FK-506 demonstrem, aparentemente, uma melhor resposta, sendo necessário, portanto, propor experimentos com prazos mais longos, que permitam comparações nos diferentes períodos de pós-operatório, pois ainda não há resposta conclusiva se o FK-506 pode, realmente, aumentar a regeneração do axônio, ou simplesmente acelerar o crescimento já esperado.

O aumento do número de axônios mielinizados regenerados aparecem na literatura, principalmente em experimentos que trabalharam com nervos esmagados (Gold et al., 1994; 1995; Wang et al., 1997; Udina et al., 2002; Yeh et al., 2007; Yildirim et al., 2008), e em alguns experimentos com nervos seccionados (Breener et al., 2004; Costa et al., 2006; Yan et al., 2012), mas a recuperação funcional nem sempre acontece mesmo com a regeneração axonial (Pan et al., 2003; Costa et al., 2006; Yan et al., 2012). Essas diferenças entre os achados funcionais e histológicos, e as diferenças entre os tratamentos em esmagamento e secção nervosa, podem ser explicadas pela importância da precisão das conexões restabelecidas dos axônios regenerados com o órgão-alvo, e não somente no número total de novas fibras. Além disso, Udina et al. (2002) testaram diferentes doses após esmagamento em nervo ciático (0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10 mg/Kg/dia), por 7 dias, e encontraram os melhores resultados com a dose de 5 mg/Kg/dia, embora as doses de 0,2 e 2 mg/Kg/dia também apresentassem resultados similares. Já as doses intermediárias, 0,5 e 1 mg/Kg/dia, e a mais alta, 10 mg/Kg/dia, não diferiam do controle, levantando à hipótese de que há pelo menos dois mecanismos de ação distintos do FK-506 sobre a regeneração nervosa, talvez duas áreas funcionais distintas de ligação. Sendo um primeiro, bem estabelecido, atuante sobre os neurônios e um segundo, mecanismo ainda não definido, que afetaria a degeneração Waleriana (Sun et al., 2012).

Existe uma lacuna entre a regeneração axonial, que sofre interferências de fatores como, entre outros, o número de células de Schwann no local da coaptação, o ângulo entre nervo doador e o receptor, o tempo de coaptação, fatores de crescimento no sítio da coaptação, o tipo de músculo a ser reinervado (Jung et al., 2009) e a recuperação funcional propriamente dita, onde fatores como a idade, natureza e tipo da lesão, tipo e diâmetro das fibras afetadas, tempo transcorrido entre lesão e reparo, distância entre o local da lesão e o corpo celular, escolha adequada da técnica cirúrgica, entre outros, alteram diretamente o resultado (Silva & Camargo, 2010). Seria relativamente simples, se a recuperação funcional dependesse apenas do crescimento axonial na área lesada, mas nela estão envolvidas toda uma sequência de eventos e uma integração de processos, dentro de um espaço temporal que tem que ser apropriado à conduta terapêutica. Portanto, essa lacuna entre a regeneração axonial e o restabelecimento funcional talvez permita que o FK-506 consiga melhorar um aspecto sem alterar o outro (Costa et al., 2006).

Não podemos, ainda, deixar de levar em consideração que é estreita a faixa entre a dose terapêutica do FK-506 e seus efeitos tóxicos (Garcia et al., 2004; Moreira, 2008), haja

visto que Estevez (2004) encontrou efeitos tóxicos em ratos com a dose de 5 mg/kg/dias (14 dias).

A partir desse volume de informações, presentes na literatura, e mais os resultados do nosso trabalho, surgem algumas dúvidas que poderiam servir de base para outras pesquisas:

- Doses altas de FK-506 trazem efeitos tóxicos, mas poderíamos utilizá-las por um período curto a partir do pós-cirúrgico, obtendo um crescimento adicional em um período que é crítico, e após este curto período, manteríamos uma dose mais baixa e menos tóxica;
- Utilizando altas doses em um curto período ou em experimentos de longo prazo, a quantificação do nível sanguíneo da droga seria fundamental;
- Além da aplicação sistêmica, da qual nos referimos até agora, também há a possibilidade do FK-506 ser utilizada na forma tópica (Estevez, 2004 – epitélio da córnea, Diaz et al., 2004 – n. facial, Li et al., 2010 e Azizi et al., 2012 – n. isquiático). Se tivéssemos uma inibição de células inflamatórias diretamente na área da NLT, a resposta no crescimento axonial poderia ser diferente.

Acreditamos que há muito a ser estudado sobre a atuação do FK-506 na neurorregeneração, e muitas questões permanecem ainda sem respostas. Um motivo a mais para dedicarmos mais experimentos para essa droga é que poucas drogas de uso sistêmico conseguem aumentar o crescimento neural, visto que a grande maioria dos fármacos têm que ser utilizados diretamente no sítio do nervo lesado (Glazner et al., 1993; Gold et al., 1995), mas não podemos negar que há necessidade de reavaliações para o direcionamento de seu uso.

A literatura disponível é altamente contraditória quanto às respostas encontradas. Em nosso experimento há situações difíceis de serem explicadas, tais como os resultados do grupo GII, que mesmo apresentando a menor massa do MTC (correspondente a menor massa corporal entre os quatro grupos estudados) apresentou dados positivos de regeneração nervosa como um menor número de fibras musculares por campo, maior número de fibras nervosas por campo, e ainda, maior valor de amplitude, mostrando assim, que há um maior número de fibras musculares que responderam ao estímulo elétrico e, consequentemente, maior número de axônios excitáveis. Esse grupo, que recebeu 0,5 mg/Kg/dia, coincidente com a dose

utilizada por Brenner et al. (2005), também apresentando o melhor resultado quando associado ao anticorpo CD40. E, embora, obtendo todas essas vantagens microscópicas, não apresentou diferença na avaliação funcional final com os outros grupos estudados. Situação também encontrada por Phan & Schuind (2012) que utilizaram a dose de 5 a 8 ng/ml durante 60 dias em pacientes jovens e observaram pequena melhora na velocidade de recuperação, mas sem impacto no resultado final.

O FK-506 associado à NLT, como no nosso trabalho, foi proposto apenas por Chen et al. (2009), que encontraram diferenças significativas na recuperação funcional após 12 semanas, enquanto nós analisamos apenas até a 8ª semana e não encontramos diferenças. Talvez pudéssemos ter encontrado resultados diferentes em tempo mais longo.

6.7 Considerações Finais

Estamos iniciando uma nova fase, com uma geração de novos artifícios, como terapia molecular específica, estimulação elétrica precisa e bioengenharia, empregados na tentativa de se conseguir uma regeneração axonial consistente e sincronizá-la com a recuperação funcional (Sebben et al., 2011).

Atualmente, reconhece-se ser necessário conhecer como ocorrem as modificações a nível celular e molecular, a fim de promover um microambiente adequado para a regeneração axonial (Midha & Zager, 2008). Os conhecimentos da bioengenharia e dos fármacos serão os possíveis aliados. Fármacos com funções neuroprotetoras, acetil-carniline e N-acetil-cisteína, já estão sendo testados, na busca de impedir a morte celular após axotomia, através de mecanismo de preservação mitocondrial. A terapia celular e engenharia de tecidos surgem como uma alternativa para estimular e auxiliar a regeneração de nervos periféricos, otimizando o processo de regeneração (Sebben et al., 2011).

Fazemos parte de um processo em que cada tentativa é como uma nova gota de conhecimento, que nos leva a um mar de questionamentos. Muitas contribuições virão para melhorar a regeneração nervosa e qualidade de vida de inúmeros pacientes.

... tenho certeza de que nessa caminho chamado
"Vida" só vou passar uma vez,
por isso peço a Deus que eu
nunca caminhe por ela apoiada na inteligência,
mas somente na sabedoria...a de Deus....

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com base em nosso modelo experimental, pudemos concluir que a administração de FK-506 na dose de 0,5 mg/Kg/dia diminuiu o ganho de massa corporal e massa do músculo tibial cranial e aumentou a regeneração das fibras nervosas. Não houve diferença entre os grupos quanto à resposta funcional.

...com uma única referência é possível encontrar tudo o que é necessário para a vida....a "Bíblia".

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accioli de Vasconcellos ZA. Contribuition à I'étude dês neurotisations intra-et extra – plexuelles Du plexus braquial et de sés branches terminales – étude chez Le rat et chez I'homme [tese]. França: Faculdad Medicin, Universite de Paris V (Rene Descartes); 1999.

Akeda K, Hirata H, Matsumoto M, Fukuda A, Isuji M, Nagakura T, et al. Regenerating axons emerge far proximal to the coaptation site in end-to-side nerve coaptation without a perineurial window using a T-sharped chamber. Plast Reconstr Surg. 2006;117:1194-203.

Al-Qattan MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeration following end-to-side neurorraphy. Br J Plast Surg. 1998;51:238-42.

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

Al-Qattan MM. Terminolateral neurorrhaphy: review of experimental and clinical studies. J Reconstr Microsurg. 2001;17:99-108.

Amr SM, Moharram AN. Repair of brachial plexus lesions by end-to-side side-to-side grafting neurorrhaphy: experience based on 11 cases. Microsurgery. 2005;25:126-46.

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

Armstrong VW, Oellerich M. New developments in the immunosupressants drug monitoring cyclosporine, tacrolimus ada azthioprine. Clin Biochem. 2001;34:9-16.

Artico M, Cervoni, L, Nucci F, Giufflé R. Birthday of peripheral nervous system surgery: the contribution of Gabriele Ferrara (1543-1627). Neurosurgery. 1996;39:380-3.

Aszmann OC, Moser V, Frey M. Treatment of painful neuromas via end-to-side neurorraphy. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2010;42:225-32.Atikins S, Loescher A, Boissonade FM, Smith KG, Occleston N, O'Kane S. Interleukin-10 reduces scarring and enhances regeneration at a side of sciatic nerve repair. J Peripher Nerv Syst. 2007;12:269-76.

Aubá C, Hontanilla B, Arcocha J, Govia O. peripheral nerve regeneration through allografts compared with autografts in FK506 treated monkeys. J Neurosurg. 2006;105:602-9.

Australian Government. Department of Health and Ageing Therapeutics Goods Administration. Australina Public Assessment Report for Tacrolimus Aus PAR Prograf-XL Tacrolimus. Sydney: Jansse-Cilag Pty Ltd; 2010.

Ayan I, Bora A, Karakaplan M, Inan M, Bostan B, Germen B, et al. Effect of end-to-side repair of proximal nerve stumps pf transected peripheral nerves on the development of neuroma (experimental study). Hand. 2007;2:199-205.

Azizi S, Mohammadi R, Amini K, Fallh R. Effects of topically administred FK-506 on sciatic nerve regeneration and reinnervation after vein graft repairo f short nerve gaps. Neurosurg Focus. 2012;32:21-5.

Babcock W. A standard technique for operations on peripheral nerves with reference to the closed of large gaps. Surg Gynecol Obstet. 1927;45:364-78.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg. 1989;83:129-38.

Bain JR,Mackinnon SE, Hudson AR, Wade J, Evans P, Makino A, Hunter D. The peripheral nerve allograft in the primate immunosuppressed with Cyclosporin A: I. Histologic and electrophysiologic assessment. Plast Reconstr Surg. 1992;90:1036-46.

Bajrovic F, Kovacic V, Pavinik M, Sketeji J. Interneuronal signaling is involved in induction of collateral sprouting of nociceptive axons. Neuroscience. 2002;111:587-96.

Ballance CA, Ballance HA, Steward P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. Br Med J. 1903;1:1009-13.

Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Insidede-out veingraft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. Microsurgery. 2003;23:66-71.

Batista KT, Araujo HJ. Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo perifério do membro superior. Rev Bras Cir Plast. 2010;25:1-15.

Battat Mn, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Matsuda H. Cross facial nerve grafting by end-to-side neurorrhphy with ou without removal of the epineurium in rats. J Plast Reconstr Surg. 1996;16:641-7.

Battiston B, Tos P, Geuna S, Gracobini-Roliichi MG, Gugliemone R. Nerve repair by meens with muscle grafts: Morphological Analysis of Regeneration. Microsurgery. 2000; 20:37-41.

Belkas JS, Schoichet MS, Midha R. Axonal guindace channels in peripheral nerve regeneration. Oper Tech Orthop. 2004;14:190-8.

Benetoli A, Milani H. Efeito neuroprotetor do tacrolimus (FK506) após isquemia cerebral no rato: uma análise histológica e comportamental. In: Resumos do XI EAIC- Encontro Anual de Iniciação Científica; 1-4 out 2002; Maringá, Paraná. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2002. p.16-18.

Beris AE, Lykissas MG. Chapter 13: Experimental results in end-to-side neurorrhaphy**.** Int Rev Neurobiol. 2009;87:269-79.

Bersaneti JÁ, Viterbo F, Jorge J, Denadai R. Muscle reinnervation in one or two stages? Experimental study in rats with end-to-side nerve graft. Acta Cir. Bras. 2012;27:841-47.

Bertelli JA, dos Santos ARS, Calixto JB. Is axonal sprouting able to traverse the conjuctive layers of the peripheral Nerves? A behavioral, motor and sensory study of end-to-side-nerves anastomosis. J Reconstr Microsurg. 1996;12:559-63.

Betini J. Influência do exercício de natação no processo de regeneração nervosa, reinervação muscular e recuperação funcional em ratos após neurotmese [dissertação]. Piracicaba: Universidade Metodista de Piracicaba; 2010.

Bontioti E, Kanje M, Lundborg G, Dahlin LB. End-to-side nerve repair in the upper extremity of rat. J Peripher Nerv Syst. 2005;10:58-68.

Bontioti E, Dahlin LB, Kataoka K, Kanje M. End-to-side nerve repair induces nuclear translocaton of activating transcriptions factor 3. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 2006;40:321-8.

Braun RM. Comparative studies of neurorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. Surg Gynecol Obstet. 1966;122:15-8.

Brenner MJ, Fox IK, Kawamura DH, Yu VM, Lowe JB, Hunter DA, et al. Delaye nerve repair is associated with diminished neuroenhancement by fk506. Laryngoscopy. 2004; 114:570-6.

Brenner MJ, Mackinnon SE, Rickman SR, Jaramellio A, Tung THH, Hunter DA, et al. FK-506 and anti-CD40 ligand in peripheral nerve allotransplantation. Restor Neurol Neurosci. 2005; 23:237-49.

Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration throught end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. Plast Reconstr Surg. 2007;120:215-23.

Brown PW. Fatores que influem no sucesso do reparo cirúrgico dos nervos periféricos. In: Clinicas Cirurgicas da América do Norte. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1972. p.1137-55.

Burnett MG, Zager EL. Pathophisiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurg Focus. 2004;16:1-7.

Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, Iwasaki K, Sharkey J. Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. J Neurosci. 1997;17:6939- 46.

Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. Clin Neurophys. 2008;119:1951-65.

Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK. Effects of IGF-II in a new end-to-side model. J Reconstr Microsurg. 1999;15:351-8.

Cao X, Shidao H, Yu J. Experimental study on the collateral sprouting after end-to-side anastomosis of nerve trunk. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 1997;11:321-4.

Cardoso AD. Paralisia facial e reanimação da face. In: Mélega SM, Zanini AS, Psillakis JM. Cirurgia plástica estética e reparadora. 2a ed. São Paulo: Médica e Científica Ltda; 1992. p.53-60.

Carvalho GA, Samii M. Tratamento neurológico das lesões traumáticas do plexo braquial. In: Tatagiba M, Mazzer N, Aguiar PHP, Pereira CU, editores. Nervos periféricos: diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p.85-7.

Casha S, Young VW, Midha R. Minocycline for axonal regeneration after nerve injuries: double-edged sword. Exp Neurol. 2008;23:245-8.

Castilho RF, Hansson O, Brundin P. FK506 and Cyclosporin A enhance the survival of cultured and grafted rat embryonic dopamine neurons. Exp Neurol. 2000;164:94-101.

Castro APM. Guia prático para o manejo de Dermatite atópica. Rev Bras Alerg Imunopatol. 2006;29:268-81.

Cederna OS, Kalliainen LK, Urbanchek MG, Rovak Jm, Kuzon WM. "Donor" muscle structure and function after end-to-side neurorrhaphy. Plast Reconstr Surg. 2001;107:789-96.

Chen B, Song Y, Liu Z. Promotion of nerve regeneration in peripheral nerve by short-course FK506 after end-to-side neurorrhaphy. J Surg Res. 2009;152:303-10.

Cheng CH, Ku YF, Hou CH, Yeh LS, Chang FC. Nerve re-innervations by an end-to-side Neurorrhaphy of Myocutaneous transplantation in rats. Taiwan Vet J. 2011;37:143-51.

Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TE, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. Acta Ortop Bras. 2006;14:25-9.

Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TE, Cortes HJZRC, Ferreira MC. Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos. Acta Ortop Bras. 2009;17:266-90.

Delistoianov N, Macoris DG, Godoy RF, Alessi AC. Comparative study of two techniques of digital palmar. Neurorrhaphy in horses. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006;58:44-51.

Dellon AL, Ferreira MC, Williams EH, Rosson GD. Which end is up? Terminology for Terminolateral (End-to-side) Nerve Repair: A Review. J Reconstr Microsurg. 2010;26:295-31.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. Na índex of the functional condition of rat sciatic nerve based on meaurements made from walking tracks. Exp Neurol. 1982;77:634-43.

De Medinaceli L. Cell surgery to repair divided nerves. New York: C.A.S.I.S; 1994.

De Sá, M. The end to side pheripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. J Neurosci Methods. 2004;136:45-53.

Diaz LM, Steele MH, Guerra AB. The role of topically administered FK506 (tacrolimus) at the time of facial nerve repair using entubulation neurorrhaphy in a rabbit model. Ann Plast Surg. 2004;52:407-13.

Dong C, Gao W, Jia R, Li S, Shen Z, Li B. Reconstruction of anorectal function through end-to-side neurorrhaphy by autonomic nerves and somatic nerv in rats. J Surg Res. 2012;2:30-4.

Doolabh V, Mackinnon SE. FK506 accelerates functional recovery following nerve grafting in a rat. Plast Reconstr Surg. 1999;103:1928-36.

Dourado E. Reparacíon Microquirúrgica del nervio facial de conejo. Estudio comparativo de La sutura epineural y El sistema adhesivo de fibrina [tese]. Barcelona: Departamento de Ciências Morfológicas y Odontoestomatológica, Universidad de Barcelona; 2002.

Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TPA. Técnicas Microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. Rev Cir Traumatol Buco Maxilo Fac. 2003;3:50-4.

Dubový P, Raska O, Klusáková I, Stejskal L, Celakovský P, Haninec P. Ciliary neurotrophic factor promotes motor reinnervation of the musculocutaneus nerve promotes in experimental model of end-to-side neurorrhaphy. BMC Neurosci. 2011;12:58-70.

Dvali LT, Myckatyn TM. End-to-side nerve repair: review of literature and clinical indications. Hand Clin. 2008;24:455-60.

El-Sherbeni KM, El-Badawy AS, Badran, HA. Termino Lateral Neurorrhaphy (TLN): a new approach for nerve repair. Egypt J Plast Reconstr Surg. 2004;28:181-7.

Estévez RA. Ação do tacrolimus na reepitelização corneana em coelhos [tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

Evans GR. Challenges to nerve regeneration. Semin Surg Oncol. 2000;19:312-8.

Faijko B, Janez S, Marko Z. Collateral sprouting of sensory axons into end-to-side nerve anastomosis [Internet]. 2004 [08/10/2012]. Disponível em: http:// www.ist-wordl.org .

Fagiuoli S, Gasbarrini A, Azzarone A, Francavilla A, Van Thiel DH. FK 506: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. Pharmacology, mechanism of action and clinical application. Ital J Gastroenterol. 1992;24:355-60.

Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Schneider W. The effect of the immunosuppressant FK506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. J Hand Surg. 1999;24:38-42

Favero M, Lorenzetto E, Bidoia C, Biffelli M, Busetto G, Cangiano A. Synapse formation and elimination: role of activity studied in different models of adult muscle-reinervation. J Neurosci Res. 2007;85:2610-9.

Fawcett JW. Intrinsec neuronal determinants of regeneration. Trends Neurosci. 1992;15:5-8.

Fernandez E, Lauretti L, Tufo T, D'Ercole M, Ciampini A, Doghietto F. End-to-side nerve neurorrhaphy: critical appraisal of experimental and clinical data. Acta Neurochir Suppl. 2007;100:77-84.

Ferreira AS. Lesões nervosas periféricas. Santos: Livraria Editorial Santos; 1999.

Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. Am J Orthop (Belle Mead NJ). 2000;29:167-73.

Flores LP. Neurorrafia término-lateral: uma evolução da técnica de reparo de lesões de nn. periféricos? Arq Bras Neurocir. 2006;25:66-73.

Fortes WM, Noah EM, Lizzi FJ, Terzis JK. End-to-side neurorrhaphy: evaluation of axonal response and upregulation of IGF-I and IGF-II in a non-injury model. J Reconst Microsurg. 1999;15:449-57.

Francaville A, Gaiaber JS, Makowka L, Baroone M, Mazzaferro V, Ambrosino G, et al. Estradiol and testosteronae levels in patients undergoing partial hepatoctomy: a possible signal for hepatic regeneration. Dig Dis Sci. 1989;34:818-22.

Franco RG. Estudo comparativo com diferentes números de pontes de neurorrafia término-laterais em ratos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2010.

Frey M, Giovanoli P. End to side neurorraphy of sensory nerves. Eur J Plast Surg. 2003;26:85-8.

Frutan SK, Salehi H, Mansouri K, Bakhtyari M, Abootaleb H, Sepehr P. Comparison of nerve repair with end to end, end to side with window e end to side without window methods in lower extremity of rat. Med J Islam Ir. 2011;25:40-6.

Gao WS, Dong CJ, Li SQ, Kunwar KJ, Li Bing. Re-innervation of the bladder through end-to-side neurorrhaphy of autonomic nerve and somatic nerve in rats. J Neurotrauma. 2012;29:1704-13.

Garcia SC, Lopes LS, Schott KL, Beck ST, Pomblum VJ. Ciclosporina A e Tacrolimus: uma revisão. J Bras Patol Med Lab. 2004;40:393-401.

Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosa. Arch Ital Chir. 1938;48:155-71.

Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R, Gracobini-Robecchi MG. Morphologycal analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. Anat Embryol (Berl). 2000;201:475-82.

Geuna GA, Papalia I, Tos P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: A challenger for neuroscientists comin from na intriguing nerve reapir concept. Brain Res Rev. 2006;52:381-8.

Geuna S, Tos P, Battiston B. Essays on peripheral nerve repair and regeneration. Int Rev Neurobiol. 2009;87:600.

Gibson KL, Daniloff JK. Peripheral nerve repair. Cont. Educ. Article. 1989;11:938-44.

Gigo-Benato D, Geuna S, Rodrigues AC. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. Lasers Med Sci. 2004;19:57-65.

Giovanoli PMD, Koller RMD, Meuli-Simmen CMD, Rab MMD, Haslik W, Mittlböck M, et al. Functional and Morphometric Evaluation of End-to-Side Neurorrhaphy for Muscle Reinnervation. Plastic Reconst Surg. 2000;106:383-92.

Glazner GW, Lupien S, Miller JA, Ishii DN. Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. Neuroscience. 1993;54:791-7.

Goheen-Robilland B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. Laringoscope. 2002;112:899-905.

Gold BG, Storm-Dickerson T, Austin DR. The immunossupressant FK506 increase functional recovery and nerve regeneration following peripheral nerve injury. Restor Neurol Neurosci. 1994;6:287-96.

Gold BG, Katoh K, Storn –Dickerson T. The immunossupressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. J Neurosci. 1995;15:7509-16.

Gold BG, Villafranca JE. Neuroimmunophilin ligands the development of novel neuroregenerative neuroprotective compounds. Curr Top Med Chem. 2003;3:1368-75.

Grabb WC, Bement SL, Koephe GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral suturing in monkeys. Plast Reconstr Surg. 1970;46:31-8.

Grant GA, Goodkin R, Klio M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. Neurosurgery. 1999;44:825-40.

Guo X, Dawson VL, Dawson TM. Neuroimmunophilin ligands exert neuroregeneration and neuroprotection in midbrain dopaminergic neurons. Eur J Neurosci. 2001;13:1683-93.

Haastert K, Joswig H, Jäschke KA, Samii M, Grothe C. Nerve repair by end-to-side nerve coaptation: histologic and morphometric evaluation of axonal origin in a rat sciatic nerve model. Neurosurgery. 2010;66:567-76.

Hakstian RW. Funicular orientation by direct stimulation. An aid to peripheral nerve repair. J Bone Joint Surg Am. 1968;50:1178-86.

Hakstian RW. Perineural neurorraphy. Orthop Clin North Am. 1973;4:945-56.

Hall S. Nerve repair: a neurobiologist's view. J Hand Surg Br. 2001;26:129-36.

Haninec P, Dubory P, Samal F, Houstava L, Stijskal L. End-to-side anastomosis of peripheral nerve in experimental and clinical model. In: Developments in neurosciences. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 471-7. International Congress Series,1259.

Haninec P, Kaiser R, Dubový P. A comparison of collateral sproutin of sensory abd motor axons after end-to-side neurorrhaphy with and without the perineurial window. Plast Reconstr Surg. 2012;130:609-14.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, et al. Walking Track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. Plast Reconstr Surg. 1992;89:251-8.

Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. Plast Reconstr Surg. 2004;114:129-37.

Hayashi Y, Shunsy JS, Connors T, Otsuka T, Fischer I, Tessler A, et al. Immunosupression with either Cyclosporine A ou FK506 supports survival of transplants fibroblasts and promotes growth of host axons into the transplants after spinal cord injury. J Neurotr. 2005;22:1267-81.

Heath CA, Rutkowski G. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral nerve regeneration. Trends Biotechnol. 1998;16:163-8.

Henriques JC. Traumatismo dos nervos periféricos [Monografia]. Moçambique: Programa Nacional de Cirurgia e Programa Nacional de Traumatologia, Universidade de Nampula; 2004.

Höke A. Mechanisms of disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? Natl Clin Pract Neurol. 2006;2:448-54.

Hontanilla B, Auba C, Arcocha J, Gorria O. Nerve regeneration through nerve autografts and cold preserved allografts using tacrolimus (FK506) in a facial paralysis model: a topographical and neurophysiological study in monkeys. Neurosurgery. 2006;58:768-79.

Ide C. Peripheral nerve Regeneration. Neurosci Res. 1996;25:101-21.

Ijkema–Paassen J, Jasen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effects evaluation. Biomateriais. 2004;25:1583-92.

Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanide N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbts. Neurosurgery. 2003;23:359-62.

Jain FM, Fung JJ. Cyclosporin and tacrolimus in clinical transplantation: A comparative review: Clin Immunother. 1996;5:351-73.

Jaquet JB, Luijsterburg AJ, Kalmijn S, Kuypers PD, Hofman A, Horvius SE. Median, ulnar, and combined median-ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. J Trauma. 2001;51:687-92.

Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factor in peripheral nerve regeneration. Injury. 2008;39:537-42.

Jost SC, Doolabh VB, Mackinnon SE, Lee M, Hunter D. Acelleration of peripheral nerve regeneration following FK506 administration. Restor Neurol Neurosci. 2000;17:39-44.

Jung Jun MD, Chung MS, Kim MB, Baek GH. Contribution of the proximal nerve stump in end-to-nerve repair: in a rat model. Clin Orthop Surg. 2009;1:90-5.

Kale SS, Glauss SW, Yee A, Nicoson MC, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Reverse end-to-side nerve transfer: from animal model to clinical use. J Hand Surg Am. 2011;36:1631-9.

Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. Plast Reconstr Surg. 1999;103:1919-27.

Kanje M, Arsi T, Lundborg G. Collateral sprouting from sensory and motor axons into an end to side attached nerve segment. Neuro Report Ud. 2000;11:2455-9.

Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Güler MM. Nerve regeneration throught an epineural sheath. Its functional aspect compared with nerve and vein grafts. Microsurgery. 2001;21:196-201.

Kettle SJA, Starrith NE, Glasby MA, Hens TE. End-to-side nerve repair in a large animal model: how does it compare with conventional methods of nerve repair? J Hand Surg. 2012;38:192-202.

Kimura J. Eletrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice. Philadelphia: F.A. Davis Company; 1983.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M. Fk506, a novel immunosupressant isolated from streptomyces. I. Fermetation, isolation and physiochemical end biological characteristics. J Antibiot. 1987a;40:1249-55.

Kino T, Hatanaka H, Myata S, Inamura N, Nishiymma M, Yajima T, et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from streptomyces. II. Imunossupressive effect of FK506 in vitro. J Antibiot. 1987b;40:1256-65.

Kino T, Goto T. Discovery of FK506 and up date. Ann Acad Sci. 1993;685:13-21.

Kline DG. Surgical repair of peripheral nerve injury. Muscle Nerve. 1990;13:843-52.

Koch D. 2nd Continuing Education Course for Japan Small animal surgeons at the small animal surgery clinic,university of Zurich, Switzerland. Small animal orthoph. Neurosurg. 2002;1-57.

Kostakoglu N. Motor and sensory reinnervation in the hand after an end-to-side median to ulnar nerve coaption in the forearm. Br J Plast Surg. 1999;52:404-7.

Kotulska K, Marcol W, Larysz-Brysz M, Tendera Z, Malinowska-Kolodziej I, Slusarczy KW. Effect of oblique nerve grafting on peripheral nerve regeration in the rats. Microsurgery. 2006;26:579-84.

Kovacic U, Tonsic M, Sketelj, Bajrovic FF. Collateral sproutin of sensory axons after end-to-side nerve coaptation – a longitudinal study in the rat. Exp Neurol. 2007;203:358-69.

Krivolutskaia EG, Chumasov EI, Matina VN, Mel'tsova GM, Kirillov AL. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. Stomatologiia (Mosk). 1989;68:35.

Kvist M, Danielse N, Dahlin LB. Effects of FK506 on regeneration and macrophages in injured rat sciatic nerve. J Peripher Nerv Syst. 2003;8:251-9.

Landwehrs GM, Bruser P. Clinical results of terminolateral neurorrhaphy in digital nerves. Handchir Mikvochir Plast Chir. 2008;40:318-21.

Lee SK, Wolf SW. Peripheral nerve injury and repair. J Am Acad Orthop Surg. 2000;8:243-52.

Létiévant E. Traité des sections nerveuses: physiologie, pathologique: indications--procédés opératoires. Paris: J.B. Baillière; 1873. Publisher unknown.

Levinthal R, Brown WJ, Rand RW. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. J Neurosurg. 1997;47:744-50.

Li X, Wang W, Wei G, Wang G, Zhang W, Ma X. Immunophilin Fk-506 loaed in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration. Biotechnol Lett. 2010;32:1333-7.

Liao WC, Chen JR, Wang YT, Tseng GF. The efficacy of end and end-to-side nerve repair neurorrahaphy in the rat brachial plexus. J Anat. 2009;1:1-15.

Liu HJ, Dong MM, Chi FL. Functional remobilization Evaluation of the paralyzed vocal cord by end-to-side neurorraphy in rats. Laryngoscope. 2005;11:1418-20.

Liu K, Chen LE, Seaber AN, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. J Orthop Res. 1999;17:293-300.

Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. Acta Orthop. 1987;58:145-69.

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in repair nerve regeneration. J Reconstr Microsurg. 1994a;10:345-54.

Lundborg G, Zhao Q, Kange M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerves by end-to-side anastomosis? J Hand Surg. 1994b;19B:277-82.

Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. J Hand Surg. 2000;25:391-414.

Luo Y, Wang T, Fang H. Preliminary investigation of treatment of ulnar nerve defect by end-to-side neurorrhaphy. Zhonnggvo Xiu Fu Chong Jian Waike Za Zhi. 1997;11:338-9.

Lutz BS, Chuang DCC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerves – an important factor in end-to-side neurorraphy. Br J Plast Surg. 2000;53:149-54.

Lykissas MG, Korompilias AV, Batistaton AK, Mitsiony GI, Beris AE. Can end-to-side neurorrhaphy bridge large defects? An experimental study in rats. Muscle Nerve. 2007;36:664-71.

Lykissas MG. Current concepts in end-to-side neurorraphy. World J Orthop. 2011;18:102-6.

Lyons WE, George EB, Dawson TM, Steiner JP, Snyder SH. Imunossupressant FK506 promotes outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:3191-5.

Maciel FO. Efeito da estimulação elétrica do músculo tibial cranial após neurorrafia término-lateral do nervo fibular em ratos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2011.

Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. Ann Plast Surg. 1989;22:257-73.

Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. Plast Reconst Surg. 2001;107:1419-29.

Madsen JR, Macdonald P, Irwin N. Tacrolimus (FK506) Increases neuronal expression of gap43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. Exp Neurol. 1998;154:673-83.

Martins SF. Mecanismos básicos da regenração de nervos. Arq Bras Neurocir. 2005;1:20-5.

Martins RS, Siqueira MG, Siva CF, Godoy BO, Plese JPP. Electrophysiologic assessment of regeration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. Arq. Neuropsiquiatr. 2005;63:601 -04.

Matsuda H, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Battat MN. Experimental study of nerve regeneration in end-to-side nerve coaptation. J Jpn Plast Reconstr Surg. 1995;15:910-8.

Matsuda H, Hato Y, Osami I. End-to-side nerve coaptation: clinical applications for corss face nerve grafts. J Reconst Microsurg. 1997;13:376-82.

Matsuda K, Kakibuchi M, Fukuda K, Kubo T, Madura T, Kawai K, et al. End-to-side nerve grafts: sperimental study in rats. J Reconstr Microsurg. 2005;21:581-91.

Matsuda K, Kakibuchi M, Kubo T, Tomita K, Fujiwara T, Hattori R, et al. A new model of end-to-side nerve graft for multiple branch reconstruction: end-to-side cross-face nerve graft in rats. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008;61:1357-67.

Matsumoto M, Hirata H, Nishiyama M. Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. J Reconstr Microsurg. 1999;15(40):281-6.

May M, Drucker C. Temporalis muscle for facial reanimation. A 13 year experience with 224 procedures. Arch Otolaryng Head Neck Surg. 1993;119:378-82.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci. 1999;22:295-318.

McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. J Reconstr Microsurg. 1999;15:597-603.

Mennen U. End-to-side nerve suture in the primate (chacma Baboo). J Hand Surg. 1998a;3:1-6.

Mennen U. End-to-side nerve suture in the human patient. J Hand Surg. 1998b;3:7-15.

Mennen U. End-to-side nerve suture in clinical practice. J Hand Surg. 2003;8:33-42.

Midha R, Zager EL. Nerve regeneration and nerve repair. Neurol Res. 2008;30:997-98.

Millesi H. Te current state of peripheral nerve surgery in the upper limb. Ann Chir Main. 1984;3:18-34.

Millesi H, Schmidhammer R. Nerve fiber transfer by end-to-side coaptation. Hand Clin. 2008;24:461-83.

Monte-Raso VV. Índice Funcional do Ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Moraes LHR. A reinervação do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos (*Rattus norvegicus)* seria influenciada pelo uso do laser de baixa potência e d tecido adiposo na técnica de tubulização? [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2009.

Moreira M. Estudo de ação do Imunossupressor tacrolimus na pancreatite aguda experimental induzida pela argenina [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008.

Mueller SF. Regeneração axonial proveniente de nervo intacto parcialmente lesado utilizando neurorrafia término-lateral: tratamento experimental no plexo braquial de ratos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Nehme A, Kany J, Sales-de-Gauzy J, Charlet JP, Dautel G, Cahuzac JP. Obstetrical brachial plexus palsy. Prediction of outcome in upper root injuries. J Hand Surg Br. 2002;27:9-12.

Noah EM, Wiliams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorraphy: a histologic and morphmetric study of axonal sprouting into an and to-side nerve graft. J Reconstr Microsurg. 1997;13:99-105.

Noditi G, Siclovan H, Galosi L, Cojocaru M, Nicodemos N, Noditi G. End-to-side neurorrhaphy in reconstruction of large posttraumatic defects of peripheral nerves. TMJ. 2007;57:151-6.

Nunes e Silva D. Anastomose nervosa término-lateral utilizando cola de fibrina. Estudo experimental em ratos [dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2008.

Ögun TC, Özdemir M, Senaran H, Üstün ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. J Neurosurg. 2003;99:180-5.

Ozbek S, Kurt A. Silmutaneous end-to-side coaptations of the severed nerves to a single healthy nerve in rats. J Neurosurg. 2006;4:43-50.

Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, Sames JR. Effects of neurotoxic and neuroprotective agentsnon peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. J Neurosci. 2003;23:11479-88.

Pannucci C, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hayashi A. End-to-side nerve repair: review of the literature. Restor Neurol Neurosci. 2007;25:45-63.

Pardini Junior G, Freitas AD, Plentz EGA. Avaliação da sensibilidade após neurorrafia término-lateral de nn. digitais: nota prévia. Rev Bras Ortop. 2005;40:543-54.

Peters DH, Fitton A, Plosker Gl, Faulds D. Tacrolimus: A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplation. Drugs. 1993;46:746-94.

Phan DQ, Schuind F. Tolerance and effects of FK-506 (tacrolimus) on nerve regeneration: a pilot study. J Hand Surg Eur. 2012;37:537-43.

Platt H, Bristow WR. The remote results of operations for injuries of peripheral nerves. Br J Surg. 1924;11:535.

Pollock LJ, Davis L. Peripheral nerve injuries. New York: Hoeber; 1933.

Pondaag W, Gilbert A. Results of end-to-side nerve coaptation in severe obstetric brachial plexus lesion. Neurosurgery. 2008;62:656-63.

Portincasa A, Gozzo G, Parisi D, Annacontini L, Campanale A, Basso G, et al. Microsurgical treatment of injury to peripheral nerves in upper and lower limbs: a critical review of the 8 years. Microsurgery. 2007;27:455-62.

Prada FS. Estudo comparative da rejeição do transplante vascularizado do membro inferior homógeno submetido a três diferentes protocolos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Ramos AFLH, Rodrigues JK, Silva LR, Guerra MO, Peter VM. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com Tacrolimus durante a fase de pré-implantação. Bras Ginecol Obstet. 2008;1:11-6.

Reyes-Perez MCH, Medeiros-Domingo M. Uso de tacrolimus em pediatria. Bol Med Hosp Inf Mex. 2006:63:21-25.

Robinson JA, Snyder-Mackler L. Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico. 3a ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2010.

Rodrigues FF, Perez RO. Técnicas microcirúrgicas usadas em La reparacion de los nervios periféricos: revision de La literatura. Rev Argent Neurocir. 2009;23:173-81.

Romão AM, Viterbo F, Stipp EJ, Garbino JÁ, Rodrigues JÁ. Muscle electro stimulation of the cranial tibial muscle after crushing of the common fibular nerve: neurophysiologic and morphometric study in rats. Rev Bras Ortop. 2007;42:41-6.

Romão AM. Lesão do nervo fibular comum. Avaliação neuronal, muscular e funcional após neurotmese parcial: estudo no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2011.

Roque DD. Enxerto venoso ao avesso e normal, com ou sem preenchimento de músculos, em regeneração nervosa em ratos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Rosa Junior GM. Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: uma nova proposta [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2010.

Rosén B, Balkenius C, Lundborg G. Sensory re-education today and tomorrow: a review of envolving concepts. Br J Hand Ther. 2003;8:48-56.

Ross DA, Matsuda H, Zuker RM. End-to-side nerve coaptation for muscle reinnervation. In: Torii S, Nakajima T, Aoyama H, Matsuo K, editor. Transactions of the 11th Congress of the International Confederation of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery; 1995 Apr 16-21; Yokohama, Japan. Amsterdam: Kugler Publications BV; 1995.

Rosseto M, Fagundes DJ, Taha MO, Souza HS, Aydos RD, Guimarães RB, et al. Regeneration of periferic nerves after end-to-side anastomoses, mainteining epineuron, in rats. Acta Cir Bras . 2001;16:1-6.

Rovak JM, Cederna PS, Macionis V, Urbanchek M, Meuler JHVD, Kuzon WM. Termino-lateral neurorraphy: the functional axonal anatomy. Microsurgery. 2000;20:6-14.

Rovak JM, Cederna PS, Kuzon Wm. Terminolateral Neurorrhaphy: a review of the literrature. J Reconstr Microsurg. 2001;17:615-24.

Ruis AC, Jaquet JB, Kalmijin S, Gisele H, Hovis SE. Median and ulnar nerves injuries: a meta-analysis of predators of motor and sensory aft modern microsurgical nerve repair. Plast Reconstr Surg. 2005;116:484-94.

Rupp A, Dornseifer U, Fischer A, Schmahl W, Rodemacker K, Jütting U, et al. Eletrophysiologic assessment os sciatic nerve regeneration in the rat: surrounding limb muscle feature strongly in records from the gastrocnemius muscle. J Neurosci Methods. 2007;166:266-77.

Sámal F, Haninec P, Raska O, Dubovỳ P. Quantitative assessment of the ability of collateral sprouting of the motor and primary sensory neurons after the end-to-side neurorrhaphy of the rat musculocutaneous nerve with the ulnar nerve. Ann Anat. 2006;188:337-44.

Samii M, Koerbel A, Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Samii A, Gharabaghi A. Using an end-to-side interposed sural nerve graft for facial nerve reinforcement after vestibular schwannoma resection. Technical note. J Neurosurg. 2006;105:920-3.

Sanapanich K, Galea M, Morrison WA, Messina A. Quantitative characterization of regeneration axons after end-to-side and end-to-end coaptation in a rat brachial pexus model a retrograde tracer study. J Neurotrauma. 2002;24:864-75.

Sato KM. Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos [Trabalho de Conclusão do Curso]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Sawamura L, Abe H. Hipoglossal-facial nerve side-to-side anastomosis for preservation of hipoglossal function: results of delayed treatment with a new technique. J Neurosurg. 1997;86:203-6.

Schmidhammer R, Redl H, Hopf R, Van der Nest DG, Millesi H. Synergistic terminal motor end-to-side nerve graft repair: investigation in a non human primate model. Acta Neurochir Suppl. 2007;100:97-101.

Schultes G, Gaggl A, Klenner R, Kärcher H. Vascularized vs non-vascularized nerve transfers: histologic study in rats. J Reconstr Microsurg. 2001;17:637-42.

Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Ploskeer GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. Drugs. 2003;63:1247-97.

Sebben AD, Cocolichio F, SchmittAPV, Curra MD, Silva PV, Tres GL, et al. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico. Scient Med. 2011;21:81-9.

Secer Hi, Solmaz I, Anik I, Izci Y, Duz B, Daneyemez MK, et al. Surgical outcomes of the brachial plexus lesions caused by gunshot wounds in adults. J Brach Plex Peripher Nerve Inj. 2009;23:4-11.

Seddon HJ. Three types of nerves injury. Brain. 1943;66:237-88.

Selzner N, Durand F, Bernuau J, Heneghan M, Tuttle-Newhall JE, Belghiti J, et al. Conversion from cyclosporine to fk506 in adult liver transplant recipients: a combined North American and European Experience. Clin Transplant. 2001;72:1061-5.

Sherren I. Some points in the surgery of the peripheral nerves. Edin Med J. 1906; 20:297-301.

Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. Rev Saúde Pesqui. 2010;3:93-8.

Silva FAZ, Azevedo CAV. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: Proceedings of the VII World Congress on Computers in Agriculture; 2009 Jun 22-24; Reno, Nevada. Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2009. p.16-21.

Silva Neto JC. Estudo clínico e histopatológico do uso de gangliosídeos na regeneração nervosa em ratos após axonotemese [dissertação]. Camaragibe: Faculdade de Odontologia, Universidade de Pernambuco; 2003.

Siqueira R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. Rev Neurocienc. 2007;15:226-33.

Snyder SH, Sabatini DM. Immunophilins and the nervous system. Nat Med. 1995;1:32-7.

Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. Drugs. 1997;54:925-75.

Sobol JB, Lowe IJB, Yang RK, Sen SK, Hunter DA, Macknnon SE. Effects of delaying FK506 administration on neuroregeneration in a rodent model. J Reconstr Microsurg. 2003;19:113-8.

Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK506 for liver, kidney and transplantation. Lancet. 1989;2:1000-4.

Steiner JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Conolly MA, et al. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;4:2019-24.

Stipp EJ, Viterbo F, Labbé D, Garbino JA. Analysis of tibial cranial muscle after muscular double innervations with end-to-side neurorrhaphy. J Venom Anim Toxins Trop Dis. 2007;13:911.

Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basis Insights. Brain Pathol. 1999;9:313-25.

Sun HH, Saheb-Al-Zanani M, Yan Y, Hunter DA, Mackinnon SE, Johson PJ. Geldanamycin accelerated peripheral nerve regeneration in comparison to FK-506 in vivo. Neuroscience. 2012;223:114-23.

Sunderland S. Nerves and nerves injury. Baltimore: Willians and Willins Co.; 1968. Cap. 58, p.200-2.

Sunderland S. Nerve injuries and their repair. A critical appraisal. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1991.

Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, et al. The use of end-to-side nerve grafts to reinnervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. Plast Reconstr Surg. 2003;111:2255-64.

Tansey KE, Seifert JL, Botterman B, Delgado MR, Romero MI. Peripheral nerve repair through multi-laminal biosynthetic implants. Ann Biomed Eng. 2011;24:211-5.

Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon SE, Strasberg SR, Haughey BH, Hunter DA. End-to-side neurorrahphy resulting in limited sensory axonal regeneration in a rat model. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1997;106:506-12.

Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon SE, Strasberg SR, Haughey BH, Hunter DA. End-to-side neurorraphy: a long-term study of neural regeneration in a rat model. Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;119:337-41.

Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. History and basic science revew: past, present and future of nerve repair. J Reconstr Microsurg. 1997;13:215-25.

Terzis JK, Papakonstantinou KC. The surgical treatment of brachial plexus injuries in adults. Plast Reconstr Surg. 2000;106:1097-122.

Tham SK, Morrison WA. Motor collateral sprouting throughout an end-to-side nerve repair. J Hand Surg Am. 1998;23:844-51.

Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. Ther Drug Monit. 1995;17:584-91.

Tuma Junior P, Ferreira MC, Nakamoto HA, Micckeski DA, Chuoto Filho A. Influência da Imunossupressão na regeneração nearvosa com utilização de aloenxertos. Estudo experimental em ratos. Acta Ortop Bras. 2008;16:41-4.

Tupper JW, Crick JC, Matteck, LR. Fascicular nerve repair: a comparative study of epineural and fascicular (perineuroal) techniques. Orthop Clin North Am. 1988;19:57-69.

Udina E, Ceballos D, Verdú E, Gold B, Navarro X. Bimodal dose-dependence of FK506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. Muscle Nerve. 2002;26:348-55.

Udina E, Bruce GG, Navarro X. Comparison of continuous and discontinuous FK506 administration on autgraft or allograft repair of sciatic nerve resection. Muscle Nerve. 2004;29:812-22.

Ülkür E, Yüksel F, Açikel C, Okar I, Bahattin O. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorraphy. Microsurgery. 2003;23:40-8.

Urbaniak JR. Fascicular nerve suture. Clin Orthop Rel Res. 1982;163:57-64.

Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJ, Patrícia JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking Track analysis. J Neurosc Methods. 2001;108:1-9.

Vaughan DW. Effects of advacing age on peripheral nerve regeneration. J Comp Neurol. 1992; 323:219-37.

Ventakamanan R, Jain A, Warty VS, Abud-Elmaqd K, Alessiani M, Lever J, et al. Pharmacokinetics of FK506 in transplant. Patients Transpl Proc. 1991;23:2736-40.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influene of aging on peripheral nerve function and regeneration. J Peripher Nerv Syst. 2000;5:191-208.

Vieira S, Hossne WS. Metodologia ceintífica para a área da saúde. 2a ed. Rio de Janeiro: Campus; 2001.

Virmond M, Pereira HR. Tubular repair of the sciatic nerve in the rat with preserved bonive pericardium. In: Anais do Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão; 2000; Botucatu, São Paulo. Botucatu; 2000. p.27.

Viterbo F. Neurorrafia látero-terminal, estudo experimental no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1992a.

Viterbo F. Cross-face termino-lateral neurorraphy: a new method for treatment of facial paly. In: Proceedings of the 61st Annual Scientific Meeting of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons; 1992 Sep 20; Washington, DC. Washington: The Plastic Surgery Educational Foundation, American Society of Maxillo-facial Surgeons; 1992b. p.356-8.

Viterbo F. A new method for treatment of parcial palsy: the cross-face nerve with end-to-side neurorrhaphy. Rev Soc Bras Cir Plast Est Reconstr .1993;8:29-38.

Viterbo F. Neurorrafia término-lateral. In: Tatagiba M, Pereira CU, editores. Nervos periféricos: tratamento clínico e cirúrgico. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p.85-7.

Viterbo F, Ripari WT. Nerve grafts prevent paraplegic pressure ulcers. J Reconstr Microsurg. 2008;24:251-3.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni AN. Latero-terminal neurorraphy without removal of the epineural sheat: a experimental study in rats. São Paulo Med J. 1992;110:267-75.

Viterbo F, Thomazini IA, Gianini MJSM. Reparação de nervos periféricos com cola de fibrina derivado de veneno de cobra. Resultados preliminares. Acta Cir Bras. 1993;2:85.

Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve: a new aplication of lateral-terminal neurorrhaphy (case report). Rev Soc Bras Cir Plast Reconstr. 1994a;8:85-7.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Two end-to-side neurorraphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. Br J Plast Surg. 1994b;47:75-80.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineural shealth: an experimental study in rats. Plast Reconstr Surg. 1994c; 94:1038-47.

Viterbo F, Teixera F, Hoshino K, Padovani, CR. End-to-side neurorraphy with epineurium versus without epineurium. The same result. In: Proceedings of the 64th Annual scientific Meeting of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgery; 1995 oct 11; Montreal, Canada. Montreal: Plasctic Surgery Educational Foundation and American Society of Maxillofacial Surgeons; 1995.

Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. Rev Paul Med. 1998;116:1808-14.

Viterbo F, Faleiros HRP. Técnicas de neurorrafia. In: Mélega JM. Cirurgia plástica: fundamentos e arte. Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p.477-83.

Viterbo F, Amr AH, Stipp EJ, Reis FJ. End-to-side neurorrhaphy: past, present and future. Plast Reconstruc Surg. 2009;124:351-8.

Viterbo F, Salvio AG, Griva BL, Maciel FO. The embracing end-to-side neurorrhaphy in rats. Acta Cir Bras. 2012;27:260-5.

Voche P, Quattara D. End-to-side neurorrhaphy for defects of palmar sensory digital nerves. Brit J Plast Surg. 2005;58:239-44.

Xiong G, Ling L, Nakamua R, Sugiura Y. Retrograde tracing and elecrophysiological findings of collateral sprouting after end-to-side neurorrhaphy. Hand Surg. 2003;8:145-50.

Waldram M. Perip Nerve Injur. Trauma. 2003;5:79-96.

Walker JC, Brenner MJ, Mackinnon SE, Winograd JM, Hunter DA. Effect of perineurial window size on nerve regeneration, Blood-nerve Barrier integrity, and functional recovery. J Neurotrauma. 2004;21:217-27.

Wallemacq PE, Reding E. FK506 (Tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical and analytical aspects. Clin Chem. 1993;39:2219-28.

Waller A. Experiments on the section of the glossopharingeal and hipoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. Philos Trans R Soc Lond. 1851;21:423-9.

Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG. Comparative dose-dependent study of FK506 an cyclosporine A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. J Pharm Exp Ther. 1997;282:1084-93.

Watanabe K, Tsukagoshi T, Kuroda M, Hosaka Y. nerve conduit using fascia wrapped fibrocollagenous tube. J Reconstr Microsurg. 2001;17:183-90.

Yamamoto S, Jiang H, Kato R. Stimulation of hair growth by topical application of FK506, a poten immunosupressive agent. J Invest Deramatol. 1994;102:160-4.

Yamauchi T, Yajima H, Tamai S, Ohgushi H, Tamai M, Maeda M, et al. Neurohistochemical analysis of regeneration in rat peripheral nerve after end-to-side neurorrhaphy. J Orthop Sci. 2001;6:82-7.

Yan JG, Matloud SS. A modified end to side method for peripheral nerve repair: large epineural window helicoids technique versus small epineural window standart end-to-side technique. J Hand Surg. 2002;27:484-92.

Yang RK, Lowe JB, Sobol JB, Sem SK, Hunter DA, Mackinnon SE. Dose-dependent effects of FK506 on neuroregeneration in a rat model. Plant Reconstr Surg. 2003;112:1832-40.

Yan Y, Sun HH, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Efficacy of short-term FK506 administration on accelerating nerve regeneration. Neurorehabil Nerve Repair. 2012;26:8-12.

Yeh C, Bowers Danmel BS, Hadcock TA. Effects of FK506 or functional recovery after facial nerve injury in the rat. Arch Facial Plast Surg. 2007;9

Yildirim FB, Sarikcioglu L, Ozsoy U, Demir N, Demirtrop A, Ucar Y. Effect of FK506 administration after obturator nerve imjury: a functional and ultrastructural study. Acta Neurobiol Exp. 2008;68:477-83.

Yüksel F, Peker F, Celiköz B. Two applications of end-to-side nerve neurorrhaphy in severe upper-extremity nerve injuries. Microsurgery. 2004;24:363-8.

Zhang F, Fischer KA. End-to-side neurorraphy. Microsurgery. 2002;22:122-7.

Zhang S, Ji F, Tong D, Li M. Side-to-side neurorrhaphy for high-level peripheral nerve. A Neurochir (Wien). 2012;154:527-32.

Zhang Z, Soucacos PN, Bo J, Beris AE. Evaluation of collateral sprouting after end-to-side nerve coaptation using a fluorescent Double-labelling technique. Microsurgery. 1999;19:281-6.

Zhang Z, Soucacos PN, Beris AE, Bo J, Ioachim E, Johnson EO. Long-term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurorrhaphy. J Reconstr Microsurg. 2000;16:303-11.

Zhang Z, Soucacos PN, Bo J, Beris AE, Malizos KN, Ioachim E, et al. Reinnervation after end-to-side nerve coaptation in a rat model. Am J Orthop. 2001;30:400-6.

Zhao JZ, Chen ZW, Chen TY. Nerve regeneration after terminolateral neurorraphy: experimental study in rats. J Reconstr Microsurg. 1997;13:31-7.

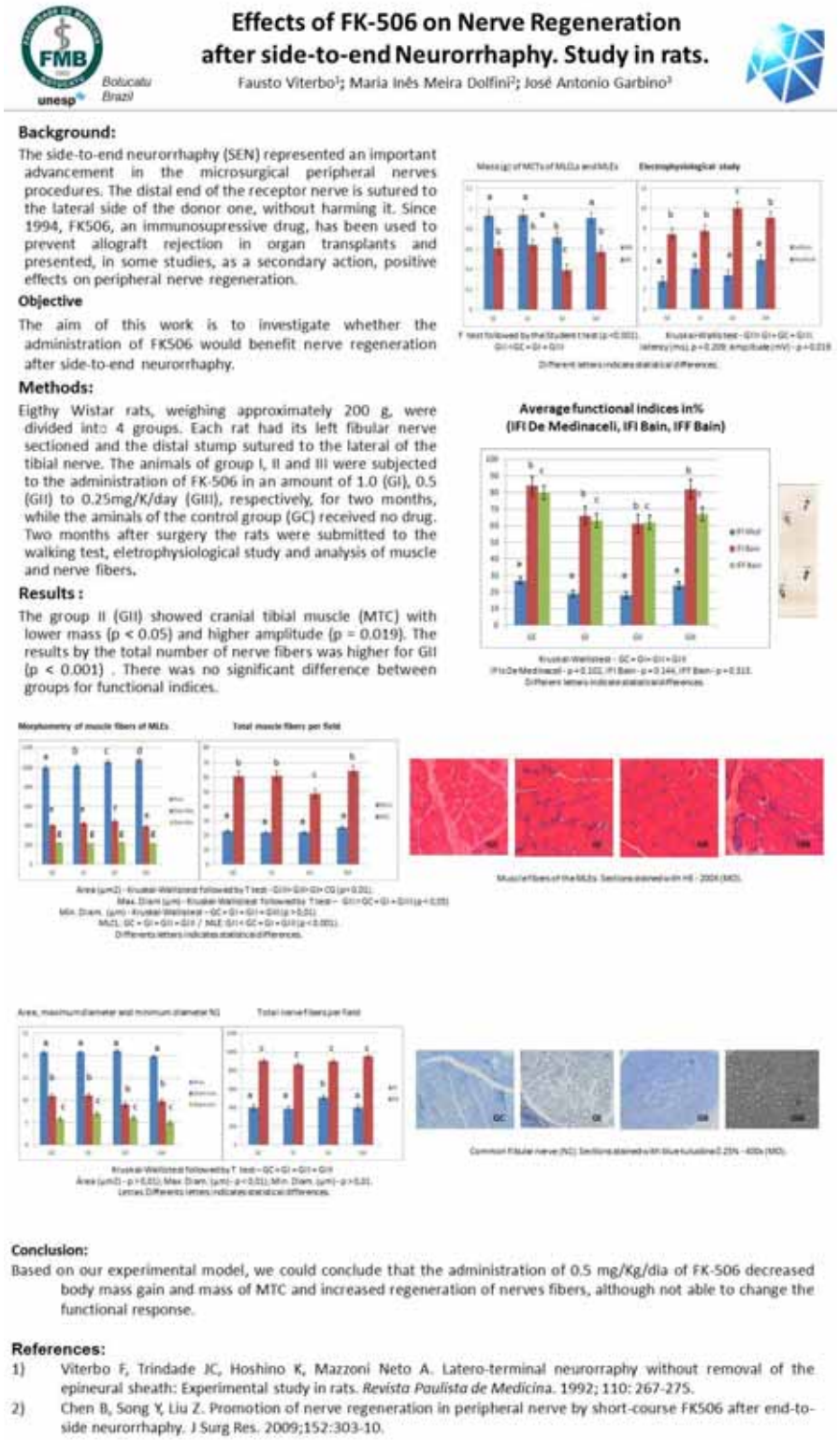
Zhu QT, Zhu JK, Lao Z. Collateral sprouting at end-to-side neurorrhaphy site demonstrated by nerve fibers micro-tease technique. Zhongguo Xiu Fu Chong Jlan Wal Ke Zal Zhl. 2005;19:868-70.

Zhu QT, Zhu JK, Cheng GY. Location of collateral sprouting of donor nerve following end-to-side neurorrhaphy. Muscle Nerve. 2008;38:1506-9.

9. Anexos

9. Anexos

9.1 Painel Apresentado em: 2014 Annual Mettings Kauai, Hawai - AAHS, ASPN, ASRM



Effects of FK-506 on Nerve Regeneration after side-to-end Neurorrhaphy. Study in rats.

Fausto Viterbo[1]; Maria Inês Meira Dolfini[2]; José Antonio Garbino[3]

FMB unesp Botucatu Brazil

Background:

The side-to-end neurorrhaphy (SEN) represented an important advancement in the microsurgical peripheral nerves procedures. The distal end of the receptor nerve is sutured to the lateral side of the donor one, without harming it. Since 1994, FK506, an immunosupressive drug, has been used to prevent allograft rejection in organ transplants and presented, in some studies, as a secondary action, positive effects on peripheral nerve regeneration.

Objective

The aim of this work is to investigate whether the administration of FK506 would benefit nerve regeneration after side-to-end neurorrhaphy.

Methods:

Eigthy Wistar rats, weighing approximately 200 g, were divided into 4 groups. Each rat had its left fibular nerve sectioned and the distal stump sutured to the lateral of the tibial nerve. The animals of group I, II and III were subjected to the administration of FK-506 in an amount of 1.0 (GI), 0.5 (GII) to 0.25mg/K/day (GIII), respectively, for two months, while the aminals of the control group (GC) received no drug. Two months after surgery the rats were submitted to the walking test, eletrophysiological study and analysis of muscle and nerve fibers.

Results :

The group II (GII) showed cranial tibial muscle (MTC) with lower mass ($p < 0.05$) and higher amplitude ($p = 0.019$). The results by the total number of nerve fibers was higher for GII ($p < 0.001$) . There was no significant difference between groups for functional indices.

Average functional indices in%
(IFI De Medinaceli, IFI Bain, IFF Bain)

Conclusion:

Based on our experimental model, we could conclude that the administration of 0.5 mg/Kg/dia of FK-506 decreased body mass gain and mass of MTC and increased regeneration of nerves fibers, although not able to change the functional response.

References:

1) Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorraphy without removal of the epineural sheath: Experimental study in rats. *Revista Paulista de Medicina*. 1992; 110: 267-275.

2) Chen B, Song Y, Liu Z. Promotion of nerve regeneration in peripheral nerve by short-course FK506 after end-to-side neurorrhaphy. J Surg Res. 2009;152:303-10.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE MEDICINA FMB 1963 BOTUCATU

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho EFFECTS OF FK-506 ON NERVE REGENERATION AFTER END-SIDE NEURORRAPHY

do(s) autor(es) DOLFINI, MARIA INÊS MEIRA (UNESP); VITERBO, FAUSTO (UNESP); GARBINO, JOSÉ ANTONIO (ILSL) foi apresentado no VII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU,realizado no período de 16 a 19 de maio de 2012 em Botucatu, São Paulo, na categoria Poster.

Botucatu, 19 de maio de 2012.

MARCIA GUIMARÃES DA SILVA
PRESIDENTE DA COMISSÃO ORGANIZADORA

SILVANA ARTIOLI SCHELLINI
DIRETORA DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp - CEP 18618-970 - Campus Universitário de Botucatu - Botucatu / São Paulo - Fone/Fax (14) 3811-6235 E-mail:gtdrh@fmb.unesp.br

9.3 Tabelas

TABELA A - Massa Individual Inicial x Massa Individual Final

Grupo Controle			Grupo I (1mg/Kg)			Grupo II (0.5mg/kg)			Grupo III (0.25mg/)		
N	Inicial	Final	N	Inicial	Final	N	Inicial	Final	N	Inicial	Final
01	0,195	0,550	21	0,175	0,421	41	0,195	0,355	61	0,210	0,475
02	0,212	0,558	22	0,177	0,540	42	0,223	0,397	62	0,179	0,545
03	0,198	0,612	23	0,178	0,549	43	0,187	0,299	63	0,182	0,515
04	0,188	0,567	24	0,215	0,417	44	0,191	0,314	64	0,218	0,475
05	0,222	0,495	25	0,219	0,530	45	0,201	0,360	65	0,171	0,361
06	0,184	0,473	26	0,216	0,474	46	0,179	0,346	66	0,240	0,539
07	0,195	0,471	27	0,254	0,578	47	0,190	0,324	67	0,195	0,477
08	0,190	0,418	28	0,223	0,453	48	0,175	0,354	68	0,220	0,380
09	0,219	0,498	29	0,220	0,424	49	0,171	0,330	69	0,200	0,390
10	0,205	0,460	30	0,248	0,447	50	0,181	0,381	70	0,198	0,449
11	0,238	-------	31	0,218	0,418	51	0,190	0,393	71	0,195	0,423
12	0,237	0,567	32	0,230	0,443	52	0,179	0,363	72	0,247	0,500
13	0,245	0,607	33	0,196	0,415	53	0,181	0,336	73	0,227	0,482
14	0,190	0,436	34	0,181	0,416	54	0,182	0,361	74	0,161	0,459
15	0,181	0,470	35	0,188	0,381	55	0,178	0,312	75	0,237	0,586
16	0,210	0,602	36	0,195	0,414	56	0,167	0,313	76	0,179	0,388
17	0,184	0,525	37	0,208	0,569	57	0,186	0,345	77	0,229	0,504
18	0,171	0,471	38	0,216	0,559	58	0,208	0,321	78	0,249	0,419
19	0,175	-------	39	0,186	0,535	59	0,200	0,311	79	0,232	0,416
20	0,232	0,468	40	0,293	0,394	60	0,298	0,359	80	0,214	0,508

TABELA B - MTC (g) (pata sem neurorrafia) X MTC (g) (pata com neurorrafia)

MCL(membro sem NLT) ME(membro com NLT)

Controle			Grupo I (1mg/Kg)			Grupo II (0,5mg/Kg)			Grupo III (02,5mg/Kg)		
N	MN	ME	N	MN	ME	N	MN	ME	N	MN	ME
01	0,880	0,558	21	0,800	0,559	41	0,724	0,372	61	0,921	0,862
02	0,890	0,813	22	1,780	0,355	42	0,646	0,437	62	0,998	0,184
03	1,053	0,680	23	1,042	0,900	43	0,665	0,172	63	1,287	0,617
04	0,836	0,491	24	0,875	0,633	44	0,668	0,171	64	0,992	0,764
05	1,046	0,719	25	1,071	0,400	45	0,736	0,290	65	0,728	0,564
06	0,910	0,560	26	0,880	0,727	46	0,631	0,297	66	1,104	0,447
07	0,950	0,404	27	1,053	0,693	47	0,744	0,380	67	0,980	0,561
08	0,784	0,533	28	0,848	0,833	48	0,553	0,263	68	0,819	0,732
09	0,978	0,716	29	0,805	0,750	49	0,652	0,393	69	0,790	0,511
10	0,880	0,670	30	0,887	0,377	50	0,629	0,387	70	0,746	0,339
11	-------	--------	31	0,834	0,315	51	0,621	0,347	71	0,871	0,780
12	0,980	0,589	32	0,853	0,811	52	0,559	0,389	72	0,965	0,599
13	0,973	0,387	33	0,650	0,633	53	0,664	0,509	73	0,813	0,524
14	0,860	0,244	34	0,971	0,651	54	0,544	0,322	74	0,721	0,359
15	0,916	0,814	35	0,793	0,587	55	0,730	0,162	75	1,085	0,580
16	1,057	0,513	36	0,753	0,635	56	0,707	0,256	76	0,747	0,655
17	1,061	0,898	37	0,971	0,780	57	0,672	0,421	77	0,817	0,426
18	0,769	0,659	38	1,097	0,799	58	0,658	0,265	78	0,950	0,769
19	-------	-------	39	1,027	0,870	59	0,717	0,419	79	0,789	0,533
20	0,868	0,704	40	0,717	0,509	60	0,458	0,355	80	0,978	0,680

TABELA C - Medidas obtidas a partir do Teste da Avaliação da Marcha

Rato (N)	Grupo	APE Mm	APN Mm	CPN Mm	CPE Mm	ATAE Mm	ATAN Mm	AIAE Mm	AIAN Mm	IFI Medinaceli	IFI Bain	IFF Bain
01	Controle	113	85	35	28	6*	22	6*	13.5	30%	87%	100%
02	Controle	59	78	39	41	6*	25	6*	17	36%	100%	65%
03	Controle	36	166	34	32	6*	26	6*	16	35%	99%	85%
04	Controle	63	120	31	33.5	12	24	11	15	15%	69%	42%
05	Controle	70	145	34	23.5	6*	23	6*	14	32%	87%	100%
06	Controle	102	69	37	22	6*	22	6*	14	30%	80%	100%
07	Controle	70	123	34.5	20	6*	24	6*	16.5	34%	83%	100%
08	Controle	104	124	24	28	6*	24	6*	13.5	30%	100%	44%
09	Controle	69.5	86	33	33	6*	23	6*	14.5	32%	97%	72%
10	Controle	93	63	35	22	6*	22	6*	11.5	24%	80%	100%
12	Controle	130	142	35	34	21	22	10	15	18%	17%	22%
13	Controle	117	84	36	33	6*	23	6*	19	37%	95%	87%
14	Controle	79	108.5	33	25	6*	23	6*	14	32%	88%	100%
15	Controle	29.5	180	41	36	6*	19	6*	10.5	23%	84%	89%
16	Controle	148.5	64	36	30	6*	23	6*	14.5	30%	90%	100%
17	Controe	126	75	35	32	6*	22	6*	13.5	29%	92%	86%
18	Controe	75	147.5	27	21	6*	22	6*	13	30%	87%	100%
20	Controle	108	139	35	33	16	20	11	13	08%	30%	39%
21	I	48	91	33	33.5	6*	26	6*	15.5	34%	100%	75%
22	I	125	108	26.5	20	6*	28	6*	18	36%	94%	100%
23	I	100	111.5	27	37	22	22	15	15	0%	22%	51%
24	I	72	86	32	33	18	23	12	15	11%	36%	25%
25	I	82.5	71	35	31	12.5	21	11	13	08%	53%	67%
26	I	58	158	35	33.5	6*	21	9	12	15%	88%	80%
27	I	75	139	36	34	6*	24	6*	16	35%	97%	83%
28	I	124	144	33.5	33.5	16	26	11	17	19%	55%	44%
29	I	80	96	37	38	6*	24.5	6*	12	21%	98%	68%
30	I	70	87.5	33	17.5	6*	24	6*	14	31%	79%	58%
31	I	92	51	33.5	18	6*	24	6*	13.5	28%	80%	100%
32	I	72	75	42	31	20.5	21	11.5	13	08%	06%	63%
33	I	67	12º	25	26	6*	24.5	6*	14.5	32%	100%	66%
34	I	44	130	31	35	16.5	23.5	11	14	12%	49%	15%

35	I	75	120	34	30	6*	17	6*	12	28%	81%	85%
36	I	122	92	24	35	17	20	10	13	12%	45%	54%
37	I	66.5	119	32	20	6*	23	6*	15	33%	83%	100%
38	I	76	112	37	40	6*	26	6*	16	35%	100%	60%
39	I	70	136	26	25	18	23	15	16	04%	31%	37%
40	I	77	164	33	32	20	22	12.5	13	04%	18%	26%
41	II	105	61	36	29.5	6*	24	6*	15	32%	91%	100%
42	II	67.5	126	33	20	6*	24	6*	12	28%	82%	100%
43	II	64.5	87	26	32	18.5	24	14	16.5	07%	46%	06%
44	II	83	115	33.5	22	6*	23.5	6*	14.5	31%	84%	100%
45	II	85	80	29.5	17.5	6*	23	6*	14.5	31%	81%	100%
46	II	97	141	42	36	18.5	20	12	15	11%	16%	46%
47	II	105	102	36	42	6*	22	6*	13	30%	100%	42%
48	II	76.5	82	29.5	36.5	19	22	11	13	08%	35%	17%
49	II	82.5	116	40	38.5	6*	23	6*	12.5	28%	94%	81%
50	II	121	88.5	32	26	6*	23	6*	13.5	29%	89%	100%
51	II	120	135	36	37	6*	23	6*	14	32%	98%	67%
52	II	68	96	29	35	16.5	20	12	12	00%	38%	06%
53	II	113.5	65	32.5	19	6*	23	6*	17	34%	82%	100%
54	II	65.5	100	25.5	17	6*	25	6*	15	33%	87%	100%
55	II	110	82	39	35	6*	23	12.5	14	08%	87%	90%
56	II	85	183	40	34	22.5	22	14	15	04%	03%	39%
57	II	78	150	25	30	18	24.5	12.5	15	11%	46%	01%
58	II	88	87	30	31	16.5	19	11	09	12%	24%	20%
59	II	82.5	119	31	26	16	20.5	13	12.5	04%	23%	57%
60	II	74	91	28	22	20	22	13	15	07%	12%	58%
61	III	103.5	72	34	40	14	22	10	09	01%	53%	11%
62	III	18	54	36	54	18	20.5	11	11	32%	41%	00%
63	III	46	85	33	32.5	*6	23	*6	14	30%	96%	75%
64	III	73	126	33.5	21	6*	23	6*	13	31%	82%	100%
65	III	62	100	36	35.5	6*	21.5	6*	13.5	25%	94%	73%
66	III	66	81	34	21	*6	20	*6	11	29%	76%	100%
67	III	73	68	40	31	6*	23	6*	12.5	32%	88%	100%
68	III	28	170	32	38	*6	27	*6	13.5	28%	100%	43%

69	III	88	92	34	45	11	23.5	7	14	30%	86%	00%
70	III	67	130	57	34	6*	22	6*	13	32%	80%	100%
71	III	73	100	32.5	38	6*	26	6*	14	32%	100%	45%
72	III	72	84	42	44	*6	22.5	*6	15	33%	98%	64%
73	III	96	123	28	24	6*	22.5	6*	14	32%	91%	97%
74	III	82	149	35	28	6*	21	6*	13	30%	86%	100%
75	III	95	77	33	44	6*	21	*6	13.5	31%	100%	12%
76	III	55	91.5	28	44	16	23.5	9	11.5	13%	68%	00%
77	III	122	72.5	38	20	*6	21	*6	8.5	15%	72%	100%
78	III	63	98	34	28.5	*6	23	*6	13	30%	90%	100%
79	III	73	81	51.5	34	*6	20.5	*6	13	29%	80%	100%
80	III	69	114.5	32	29	16	22.5	8.5	13.5	21%	41%	53%

TABELA D - Resultados do Teste Eeltrofisiológico

Ratos	Grupo	Lat (ms)	Amp (mV)	Ratos	Grupo	Lat (ms)	Amp (mV)	Ratos	Grupo	Lat (ms)	Amp (mV)	Ratos	Grupo	Lat (ms)	Amp (mV)
01	Cont	2.38	2.44	21	I	1.56	2.46	41	II	1,45	7,18	61	III	1.70	1.66
02	Cont	2.16	2.20	22	I	1.6	4.49	42	II	3,17	7,81	62	III	2.24	8.81
03	Cont	1.82	14.3	23	I	1.98	6.57	43	II	2,01	11,9	63	III	1.72	8.69
04	Cont	1.58	9.11	24	I	1.6	4.49	44	II	3,03	8,09	64	III	1.56	7.57
05	Cont	1.92	5.62	25	I	1.98	6.57	45	II	2,4	10,4	65	III	2.02	5.26
06	Cont	4.02	5.25	26	I	2.04	3.78	46	II	5,84	14,9	66	III	2.72	9.77
07	Cont	2.24	7.7	27	I	1.6	4.49	47	II	1,91	16,5	67	III	24.8	.659
08	Cont	2.26	0.97	28	I	2.12	13.5	48	II	8.09	17,3	68	III	2.32	6.08
09	Cont	2.06	4.01	29	I	1.6	4.49	49	II	3,76	13,71	69	III	1.92	18.1
10	Cont	1.60	7.52	30	I	2.96	11.3	50	II	2,98	5,42	70	III	3.2	12.7
11	Cont			31	I	2.62	4.64	51	II	2,14	15,6	71	III	16.8	16.8
12	Cont	3.44	6.44	32	I	2.32	6.08	52	II	1,76	2,66	72	III	3.54	2.46
13	Cont	5.98	7.91	33	I	2.52	9.33	53	II	1,76	24,09	73	III	1.72	13.1
14	Cont	1.56	3.27	34	I	16.2	17.57	54	II	5,64	5,98	74	III	2.20	6.32
15	Cont	1.78	7.85	35	I	1.76	4.3	55	II	1,92	6,87	75	III	2.02	5.06
16	Cont	1.6	4.10	36	I	1.6	1.15	56	II	2,05	17,5	76	III	1.74	6.03
17	Cont	1.52	15.0	37	I	1.56	.439	57	II	2,39	5,6	77	III	1.76	15.5
18	Cont	2.08	5.37	38	I	1.58	11.7	58	II	2,45	6,81	78	III	2.64	11.0
19	Cont			39	I	1.52	24.3	59	II	6,55	8,99	79	III	1.64	12.5
20	Cont	1.52	28.9	40	I	30.2	9.06	60	II	4,51	5,44	80	III	18.6	16.2

9.4 Análises estatísticas

Verificação de significância estatística entre os grupos (massa individual)

Variável Massa

Em uma primeira fase foram aplicados testes de normalidade para averiguar se devemos aplicar testes paramétrica ou não-paramétrico e a estatística descritiva para o estudo morfológico (massa individual).

==========

ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA

http://www.assistat.com

==========

NORMALIDADE (a = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.19443	0.07044	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	1.15038	0.12561	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	6.94057	0.76854	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.31086	0.11666	p < .01	Não
Watson (U2)	1.10266	0.11564	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.19443	0.07004	p < .01	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.88247	-	0.00000	Não

ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Número de dados	=	160
Menor valor (min)	=	.161
Maior valor (max)	=	.612
Aplitude (max - min)	=	.451
Soma dos dados	=	52.165
Média aritmética(M)	=	0.32603
Lim.conf.inf.da M(95%)	=	0.30482
Lim.conf.sup.da M(95%)	=	0.34724
Mediana	=	.2985
Moda	=	.195
Desvio médio	=	0.12273
Desvio padrão(para N-1)	=	0.13690
Desvio padrão(para N)	=	0.13647
Variância(para N-1)	=	0.01874
Variância(para N)	=	0.01862
Coef.Variação(para N-1)	=	41.98961
Coef.Variação(para N)	=	41.85818
Coef.de assimetria	=	.4661
Coef.de curtose	=	-1.21747

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica, portanto a próxima etapa foi realizada utilizando-se de um teste não-paramétrico.

O teste não-paramétrico escolhido foi o de TESTE de FRIEDMAN seguido do teste T, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras dependentes que não apresentam normalidade.

ASSISTAT - TESTE DE FRIEDMAN
http://www.assistat.com
==========

Hipótese nula (H0):
Não há diferença entre os tratamentos

F-krit(1%) = 2.7761 T2 = 111.3168 p < .00100
T2 é a estatística do Teste de Friedman
A hipótese nula (H0) foi rejeitada

Tratamento	Média	SomaDosPostos	Classific.	Grupos
1	0.20355	53.000	d	Controle-pesoinicio
2	0.51355	149.000	a	controle-pesofinal
3	0.21180	54.000	d	grupo1-pesoinicio
4	0.46885	135.000	b	grupo1-pesofinal
5	0.19310	37.500	d	grupo2-pesoinicio
6	0.34370	100.000	b	grupo2-pesofinal
7	0.20915	55.500	d	grupo3-pesoinicio
8	0.46455	136.000	c	grupo3-pesofinal

DMS(Diferença mínima significativa) = 11.996
Foi aplicado o Teste t ao nível de 5%

Foram observados aumento de massa em todos os animais estudados, se comparadas as massas iniciais com as finais (Tabela 05).

De acordo o teste de Friedman, a hipótese nula foi rejeitada, ou seja, pelo menos dois grupos diferem estatisticamente entre si com nível de confiança de 95%. Para verificar quais grupos diferem, foi aplicado o método de comparações múltiplas.

Com isso, podemos afirmar que os grupos de animais nas massas iniciais não diferem entre si, Tratamento 1, 3, 5 e 7. Nos grupos de animais dos pesos finais, o Tratamento 2 e 6 diferem dos outros dois grupos, Tratamento 4 e 8. Porém, se analisarmos somente os grupos sem distinção de peso inicial e final verifica-se que os GI e GIII são iguais estatisticamente e diferem dos GC e GII. Quanto às diferenças dentro de cada grupo entre os pesos iniciais e finais, houve diferenças significativas em todos eles.

Verificação de significância estatística entre os grupos
Índices funcionais do isquiático (IFI)

1 - Índice Funcional do Isquiático (IFI) conforme De Medinaceli (1982).

Foram aplicados sete testes de normalidade para averiguar se os testes posteriores devem ser aplicados como testes paramétrico ou não-paramétrico e a estatística descritiva para a variável resposta→ IFI (%).

ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA para IFI(%)

NORMALIDADE (a = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.24669	0.09912	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.85121	0.12522	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	4.74390	0.75232	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.35967	0.16388	p < .01	Não
Watson (U2)	0.81147	0.11528	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.23419	0.09906	p < .01	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.85561	-	0.00000	Não

ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Número de dados	= 80
Menor valor (min)	= 0
Maior valor (max)	= 37
Aplitude (max - min)	= 37
Soma dos dados	= 1746
Média aritmética(M)	= 21.82500
Lim.conf.inf.da M(95%)	= 19.19680
Lim.conf.sup.da M(95%)	= 24.45320
Mediana	= 28
Moda	= 32
Desvio médio	= 10.85563
Desvio padrão(para N-1)	= 11.99343
Desvio padrão(para N)	= 11.91824
Variância(para N-1)	= 143.84241
Variância(para N)	= 142.04438
Coef.Variação(para N-1)	= 54.95272
Coef.Variação(para N)	= 54.60819
Coef.de assimetria	= -.55507
Coef.de curtose	= -1.28441

OBS:(para N-1)= Amostra (para N)=População

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica.

Os testes não paramétricos são considerados de menor rigor (menos poderosos) em relação aos testes paramétricos, porém torna-se necessário utilizá-los em casos de ausência de normalidade na distribuição das amostras.

O teste não-paramétrico escolhido foi o de KRUSKAL-WALLIS, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras que apresentam normalidade e que possuem tratamentos com número de repetições diferenciadas. Esta escolha foi devido a dois animais que morreram antes de chegar a etapa do sacrifício.

==========
ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
==========

Hipóteses:
H0: As médias não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade
H = 2.6098 Hkrit = 7.8147
p-valor > 0.05 H0 não rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade
H = 2.6098 Hkrit = 11.3449

p-valor > 0.01 H0 não rejeitada

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos	Classific.
1	18	25.25000	934.000	a
2	20	20.30000	787.500	a
3	20	19.00000	700.000	a
4	20	22.75000	818.500	a

Tabela 2a - Estatística para o ìndice Funcional do isquiático conforme Medinaceli

Teste Não Paramétrico de Kruskal-Wallis Anova em Ranques					
Group	N	Missing	Median	25%	75%
Col 1	18	0	-30,686	-32,365	-24,66
Col 2	20	0	-24,162	-33,122	-10,008
Col 3	20	0	-19,982	-31,673	-7,458
Col 4	20	0	-30,165	-31,929	-23,11

Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com (P = 0,102).

Tabela 2b- Estatística para o ìndice Funcional do Isquiático conforme Bain

Teste Não Paramétrico de Kruskal-Wallis Anova em Ranques					
Group	N	Missing	Median	25%	75%
Col 1	18	0	-87,628	-95,643	-80,509
Col 2	20	0	-80,316	-95,987	-41,155
Col 3	20	0	-81,987	-88,73	-29, 717
Col 4	20	0	-86,301	-95,677	-74,818

Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com (P = 0,144).

Tabela 2c- Estatística para o ìndice Funcional do Fibular conforme Bain

Teste One Way Analysis of Variance (ANOVA)					
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	18	0	-90,258	37,221	8,773
Col 2	20	0	-58,068	51,663	11,552
Col 3	20	0	-68,899	54,566	12,201
Col 4	20	0	-68,476	64,1	12,333
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	10236,34	3412,115	1,209	0,313
Residual	74	208902,7	2823,009		
Total	77	219139			

Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com (P = 0,313).

Estatisticamente o teste de KRUSKAL-WALLIS concluiu que a hipótese H_0 é válida ao nível de 5 e 1% de probabilidade ou seja, não existem diferenças significativas entre as médias de IFI, IFI Bain e IFF em%, dos quatro grupos em estudo.

Verificação de significância estatística

Estudo eletrofisiológico.

Testes de normalidade foram aplicados para averiguar se os testes posteriores deveriam ser aplicados como teste paramétrico ou não-paramétrico e a estatística descritiva das duas variáveis respostas → latência, amplitude.

Abaixo se apresenta o resultado dos testes de normalidade somente para a variável latência, a outra variável (amplitude) apresentou resultado semelhante.

```
================================================
ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA
================================================
```

NORMALIDADE (a = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.39412	0.09912	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	4.25618	0.12522	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	20.5641	0.75232	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.74910	0.16388	p < .01	Não
Watson (U2)	3.97919	0.11528	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.39412	0.09906	p < .01	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.36350	-	0.00000	Não

ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Número de dados	=	80
Menor valor (min)	=	1.45
Maior valor (max)	=	30.2
Aplitude (max - min)	=	28.75
Soma dos dados	=	262.56
Média aritmética(M)	=	3.28200
Lim.conf.inf.da M(95%)	=	2.20240
Lim.conf.sup.da M(95%)	=	4.36160
Mediana	=	1.91
Moda	=	1.6
Desvio médio	=	2.35105
Desvio padrão(para N-1)	=	4.92659
Desvio padrão(para N)	=	4.89570
Variância(para N-1)	=	24.27128
Variância(para N)	=	23.96789
Coef.Variação(para N-1)	=	150.10936
Coef.Variação(para N)	=	149.16823
Coef.de assimetria	=	4.07125
Coef.de curtose	=	16.72962

OBS:(para N-1)=Amostra (para N)=População

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não foi paramétrica.

O teste não-paramétrico escolhido foi o de TESTE de KRUSKAL-WALLIS, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras independentes que não apresentam normalidade.

```
==================================
ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
      http://www.assistat.com
==================================

 H0: As médias não são diferentes


 Ao nível de 5% de probabilidade
 H =    4.5386   Hkrit =   7.8147
 p-valor > 0.05  H0 não rejeitada

 Ao nível de 1% de probabilidade
 H =    4.5386   Hkrit =  11.3449
 p-valor > 0.01  H0 não rejeitada
```

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos	Classific.
1	18	2.28500	822.000	a
2	20	4.04600	756.000	a
3	20	1.95400	681.000	a
4	20	4.84300	981.000	a

Análise Estatística para Latência

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA em Ranques

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Lat Cont	18	0	1,990	1,600	2,280
Lat 1mg	20	0	1,870	1,600	2,420
Lat 0,5mg	20	0	1,760	1,590	2,235
Lat 0,25mg	20	0	2,110	1,730	2,960

Os resultados não mostram diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos com (P = 0,209).

Análise Estatística para Amplitude

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA em Ranques

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Amp Cont	18	0	7,715	4,890	9,620
Amp 1mg	20	0	5,360	4,395	10,315
Amp 0,5mg	20	0	10,355	8,690	17,800
Amp 0,25mg	20	0	8,750	4,405	12,900

H = 9,910 with 3 degrees of freedom. (P = 0,019)

Comparação entre os grupos com teste de Tukey :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
Amp 0,5mg vs Amp 1mg	433,000	4,167	Yes
Amp 0,5mg vs Amp Cont	355,500	3,421	No
Amp 0,5mg vs Amp 0,25mg	285,500	2,747	Do Not Test
Amp 0,25mg vs Amp 1mg	147,500	1,419	No
Amp 0,25mg vs Amp Cont	70,000	0,674	Do Not Test
Amp Cont vs Amp 1mg	77,500	0,746	Do Not Test

Os resultados mostram diferença, estatisticamente significativa, entre o GC e o GII, as demais comparações não apresentam diferença, estatisticamente significativa.

Foram aplicados testes de normalidade para averiguar se deveríamos aplicar testes paramétrico ou não-paramétrico e a estatística descritiva para o estudo morfológico (MTC).

```
================================================
ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA
            http://www.assistat.com
================================================

                NORMALIDADE (a = 5%)
```

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.05051	0.07133	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.06972	0.12560	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.53949	0.76809	p > .15	Sim
Kuiper (V)	0.09501	0.11812	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.06891	0.11563	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.04451	0.07094	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.97280	-	0.00354	Não

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em apenas um deles não ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral foi paramétrica, portanto utilizamos os testes paramétricos (ANOVA e teste T-student).

O teste paramétrico escolhido foi o Teste F, para um experimento inteiramente casualizado, para verificar se existem diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Depois de observada a existência de diferenças estatísticas, aplicou-se o teste T-student para verificar entre quais grupos estavam estas diferenças estatísticas.

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	7	6.19566	0.88509	37.5413 **
Resíduo	148	3.48933	0.02358	
Total	155	9.68499		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)

GL: 7, 148 F-krit(1%) = 2.762 F = 37.5413 p < .00100

MÉDIAS E MEDIDAS

	Médias de tratamento	grupos
1	0.92728 a	Controle-musculo PSN
2	0.60844 b	Controle-musculo PCN
3	0.93535 a	grupo1-musculo PSN
4	0.64085 b	grupo1-musculo PCN
5	0.64890 b	grupo2-musculo PSN
6	0.33035 c	grupo2-musculo PCN
7	0.90505 a	grupo3-musculo PSN
8	0.57430 b	grupo3-musculo PCN

DMS = 0.30336 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)
Onde nr1 e nr2 são os números de
repetições de duas médias comparadas
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

MG = 0.69448 CV% = 22.10955

De acordo com o teste paramétrico ANOVA, podemos verificar que, ao nível de 99% de confiança, podemos rejeitar a hipótese nula, ou seja, que as médias dos tratamentos são diferentes. E para verificar quais tratamentos diferem entre si estatisticamente, foi utilizado o método de comparações múltiplas, teste T-Student, sendo que as massas dos MTCs dos MNs e dos MEs dos animais dos GC (tratamento 1 e 2), GI (tratamento 3 e 4) e GIII (tratamento 7 e 8) diferem estatisticamente do GII (tratamento 5 e 6).

Variável área

Foram aplicados sete testes de normalidade para averiguar se os testes posteriores devem ser aplicados como testes paramétrica ou não-paramétrico.

ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA

http://www.assistat.com

NORMALIDADE (a = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.15466	0.10036	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.55961	0.12520	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	3.26160	0.75155	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.30451	0.16591	p < .01	Não
Watson (U2)	0.55934	0.11526	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.14985	0.10032	p < .01	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.85534	-	0.00000	Não

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica.

O teste não-paramétrico escolhido para este trabalho foi o de KRUSKAL-WALLIS, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras que apresentam normalidade e que possuem tratamentos com número de repetições diferenciadas em tratamentos independentes.

```
==================================
ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
      http://www.assistat.com
==================================

 H0: As médias não são diferentes

 Ao nível de 5% de probabilidade
 H =    8.2610   Hkrit =   7.8147
 p-valor < 0.05  H0 foi rejeitada

 Ao nível de 1% de probabilidade
 H =    8.2610   Hkrit =  11.3449
 p-valor > 0.01  H0 não rejeitada
```

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos	Classific.
1	18	1042.26444	770.000	c
2	20	1148.38550	836.000	b
3	20	990.59550	546.000	d
4	20	1082.44800	929.000	a

Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Estatisticamente o teste de KRUSKAL-WALLIS concluiu que a hipótese H_1 é válida ao nível de 5% de probabilidade ou seja, existem diferenças significativas entre pelo menos

dois grupos. Para verificar quais grupos se diferem estatisticamente aplicou-se o Teste t ao nível de 5% de probabilidade e observou-se que **todos os grupos diferem estatisticamente quanto a variável área.**

Variável diâmetro maior

Foram aplicados sete testes de normalidade para averiguar se os testes posteriores devem ser aplicados como testes paramétrica ou não-paramétrico.

```
================================================
ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA
http://www.assistat.com

================================================
NORMALIDADE (a = 5%)
------------------------------------------------------------
Teste (Estatística)      Valor    Vcrit   p-valor  Normal
------------------------------------------------------------
Kolmogorov-Smirnov (D)  0.08831  0.09912  p > .10    Sim
Cramér-von Mises (W2)   0.06647  0.12522  p > .15    Sim
Anderson-Darling (A2)   0.42329  0.75232  p > .15    Sim
Kuiper (V)              0.14246  0.16388  p > .15    Sim
Watson (U2)             0.06368  0.11528  p > .15    Sim
Lilliefors (D)          0.08831  0.09906  p > .10    Sim
Shapiro-Wilk (W)        0.98485     -     0.46602    Sim
------------------------------------------------------------
```

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em todos eles a distribuição dos dados em relação à média é considerada normal.

O teste paramétrico escolhido para este trabalho foi inicialmente o Teste F com objetivo de verificar se existem diferenças significativas entre os grupos estudados. Caso exista, será aplicado também os testes T-student e teste Tukey para verificar quais grupos diferem estatisticamente.

Teste-F

```
========================================================================
ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage http://www.assistat.com
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.16/10/2010
========================================================================

                EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

                          QUADRO DE ANÁLISE
------------------------------------------------------------------------
F.V.           G.L.       S.Q.             Q.M.             F
------------------------------------------------------------------------
Tratamentos     3      63055.65964     21018.55321       3.4048 *

Resíduo        76     469161.68070      6173.18001
------------------------------------------------------------------------
Total          79     532217.34034
------------------------------------------------------------------------
** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)
ns não significativo (p >= .05)
```

Teste-t

```
                          MÉDIAS E MEDIDAS
                        Médias de tratamento
                       ----------------------
                          1     387.08950  b
                          2     430.51900  ab
                          3     391.40000  b
                          4     454.74300  a
                       ----------------------
                        DMS =      49.48254
  MG =      415.93788                          CV% =      18.88974
          As médias seguidas pela mesma letra não diferem
          estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
                t ao nível de 5% de probabilidade
```

Teste Tukey

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	387.08950	b
2	430.51900	ab
3	391.40000	ab
4	454.74300	a

DMS = 65.33705

MG = 415.93788 CV% = 18.88974

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Estatisticamente o teste F concluiu que a hipótese H_1 é válida ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, existem diferenças significativas entre pelo menos dois grupos. Para verificar quais grupos se diferem estatisticamente aplicou-se o Teste t ao nível de 5% de probabilidade e também o teste Tukey e observou-se que nos dois testes aplicados o GIII difere estatisticamente do GC, os outros grupos não diferem estatisticamente quando comparados entre si.

Variável diâmetro menor

Foram aplicados sete testes de normalidade para averiguar se os testes posteriores devem ser aplicados como testes paramétrica ou não-paramétrico.

```
================================================
ASSISTAT - NORMALIDADE E ESTATÍSTICA DESCRITIVA
http://www.assistat.com
================================================
NORMALIDADE (a = 5%)
-----------------------------------------------------------
Teste (Estatística)      Valor    Vcrit   p-valor  Normal
-----------------------------------------------------------
Kolmogorov-Smirnov (D)  0.15375  0.09912  p < .01    Não
Cramér-von Mises (W2)   0.54124  0.12522  p < .01    Não
Anderson-Darling (A2)   2.86087  0.75232  p < .01    Não
Kuiper (V)              0.27306  0.16388  p < .01    Não

Watson (U2)             0.47711  0.11528  p < .01    Não
Lilliefors (D)          0.15375  0.09906  p < .01    Não
Shapiro-Wilk (W)        0.88820     -     0.00000    Não
-----------------------------------------------------------
```

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica.

O teste não-paramétrico escolhido para este trabalho foi o de KRUSKAL-WALLIS, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras que apresentam normalidade em amostras com tratamentos independentes.

```
==================================
ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
http://www.assistat.com
==================================
H0: As médias não são diferentes
Ao nível de 5% de probabilidade
H =    3.3156   Hkrit =   7.8147
p-valor > 0.05  H0 não rejeitada
Ao nível de 1% de probabilidade
H =    3.3156   Hkrit =  11.3449
p-valor > 0.01  H0 não rejeitada
-----------------------------------------------------------
Tratamento  Repetições   Média   SomaDosPostos  Classific.
-----------------------------------------------------------
1        18          216.51800      716.000   a
2        20          218.14500      722.000   a
3        20          261.44900      937.500   a
4        20          234.27150      864.500   a
```

Estatisticamente o teste de KRUSKAL-WALLIS concluiu que a hipótese H_0 é válida ao nível de 5 e 1% de probabilidade ou seja, não existem diferenças significativas entre as médias dos grupos analisados para a variável diâmetro.

Variável Área

Foram aplicados testes de normalidade para averiguar se deveríamos aplicar testes paramétrica ou não-paramétrico e a estatística descritiva para o estudo morfométrico.

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica, portanto nas próximas etapas faremos uso de testes não-paramétricos.

O teste não-paramétrico escolhido foi o de Kruskal-Wallis seguido do teste T, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras independentes que não apresentam normalidade.

Kruskal-Wallis :

```
H0: As médias não são diferentes
Ao nível de 5% de probabilidade
H =    4.9572   Hkrit =   7.8147
p-valor > 0.05  H0 não rejeitad0
Ao nível de 1% de probabilidade
H =    4.9572   Hkrit =  11.3449
p-valor > 0.01  H0 não rejeitada
```

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos	Classific.
1	18	20.64600	867.000	a
2	20	20.96600	806.500	a
3	20	20.47300	939.500	a
4	20	20.22550	627.000	a

Estatisticamente o teste de KRUSKAL-WALLIS concluiu que a hipótese H_0 é válida ao nível de 5% e 1% de probabilidade, ou seja, não existem diferenças significativas entre os grupos estudados.

Variável Diâmentro Maior

Foram aplicados testes de normalidade para averiguar se devemos aplicar testes paramétrica ou não-paramétrico e a estatística descritiva para o estudo morfométrico.

NORMALIDADE (a = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.20005	0.09912	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.45566	0.12522	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	2.07894	0.75232	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.32761	0.16388	p < .01	Não
Watson (U2)	0.45551	0.11528	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.20005	0.09906	p < .01	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.94890	-	0.00298	Não

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica, portanto nas próximas etapas faremos uso de testes não-paramétricos.

O teste não-paramétrico escolhido foi o de Kruskal-Wallis seguido do teste T, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras independentes que não apresentam normalidade.

Kruskal-Wallis:

```
H0: As médias não são diferentes
                Ao nível de 5% de probabilidade
                H =   12.2952   Hkrit =   7.8147
                p-valor < 0.05  H0 foi rejeitada
                Ao nível de 1% de probabilidade
                H =   12.2952   Hkrit =  11.3449
                p-valor < 0.01  H0 foi rejeitada
```

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos	Classific.
1	18	10.92650	724.500	a
2	20	11.11600	805.000	a
3	20	10.61550	709.000	a
4	20	11.57100	701.500	a

```
Foi aplicado o Teste t ao nível de 1% de probabilidade
     DMS(Diferença mínima significativa) = 18.183
```

Nenhum grupo difere estatisticamente.

Média do Diâmetro maior do segmento do **N1** do **ME** dos quatro grupos estudados.

Variável Diâmentro Menor

Foram aplicados testes de normalidade para averiguar se devemos aplicar testes paramétrica ou não-paramétrico e a estatística descritiva para o estudo morfológico.

NORMALIDADE (a = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.17240	0.09912	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.39882	0.12522	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	2.01780	0.75232	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.33073	0.16388	p < .01	Não
Watson (U2)	0.39463	0.11528	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.17240	0.09906	p < .01	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.94093	-	0.00108	Não

De acordo com os testes de normalidade aplicados observou-se que em nenhum deles ocorreu normalidade, ou seja, a distribuição dos dados no campo amostral não é paramétrica, portanto nas próximas etapas faremos uso de testes não-paramétricos.

O teste não-paramétrico escolhido foi o de Kruskal-Wallis seguido do teste T, pois corresponde, porém com menor rigor, aos testes de comparação de médias em amostras independentes que não apresentam normalidade.

Kruskal-Wallis:

H0: As médias não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade
H = 4.9758 Hkrit = 7.8147
p-valor > 0.05 H0 não rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade
H = 4.9758 Hkrit = 11.3449
p-valor > 0.01 H0 não rejeitada

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos	Classific.
1	18	7.02500	745.000	a
2	20	7.02050	729.000	a
3	20	7.49050	1010.000	a
4	20	7.07000	756.000	a

Estatisticamente o teste de KRUSKAL-WALLIS concluiu que a hipótese H_0 é válida ao nível de 5% e 1% de probabilidade, ou seja, não existem diferenças significativas entre as médias dos quatro grupos em estudo.

9.5 Artigo