Denis Varanda

“ESTUDO HISTOLÓGICO DA IMPLANTAÇÃO DE NERVO PERIFÉRICO NO OSSO”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Prof[a]. Adj. Érika Veruska de Paiva Ortolan

Co-orientador: Prof. Dr. Trajano Sardenberg

BOTUCATU – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Varanda, Denis.
Estudo histológico da implantação de nervo periférico em osso / Denis Varanda. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Érika Veruska Paiva Ortolan
Coorientador: Trajano Sardenberg
Capes: 40102149

1. Tumores. 2. Nervos periféricos. 3. Fêmur - Cirurgia. 4. Cirurgia - Técnica. 5. Ossos - Cirurgia.

Palavras-chave: Implantação; Neuroma; Osso

Dedicatória

Aos meus pais Luzia e Têrencio;

À minha esposa Itamara;

Aos meus irmãos Thaís e Carlos

Aos meus sobrinhos: Carlos, Maria e João.

Agradecimentos Especiais

Aos professores

Alfredo Alcântara Barreto

Érika Veruska de P. Ortolan

Hamilton da Rosa Pereira

Maria Aparecida C. Domingues

Trajano Sardenberg

Agradecimentos

Agradeço a todos que colaboraram na elaboração deste trabalho principalmente:

Sra. Maria Cecilia Salgado Mercadante, bióloga do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp;

Sra. Marluci Betini, supervisora técnica da seção de referência, atendimento e documentação da Biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp;

Sr. Luis Carlos E. Bardella, técnico do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp;

Sr. Carlos Luís Miguel, Técnico de Informática do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp;

Sr. Marcos Eduardo Barreira Aloise, Desenhista Científico do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp;

Professores e Médicos da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

Epígrafe

“Superar é preciso

Seguir em frente é essencial

Olhar pra trás é perda de tempo

Passado se fosse bom era presente.”

Clarice Lispector

Resumo

RESUMO

Introdução - Há diversas técnicas cirúrgicas para o tratamento dos neuromas doloridos, porém não há consenso em relação a mais eficaz. A implantação do neuroma ou do nervo dentro do osso é uma das cirurgias que proporciona bons resultados clínicos. Contudo, não há conhecimento detalhado sobre o destino do nervo ou neuroma implantado no osso. **Objetivos** - Os objetivos do estudo foram desenvolver modelo experimental de implantação de nervo no osso e analisar morfologicamente o destino no nervo implantado no osso. **Material e Métodos** - 24 ratos foram submetidos à implantação do nervo tibial caudal no terço distal do fêmur e estudados histológicamente nos períodos de 1, 3, 6, 13, 24 e 28 semanas por meio de microscopia ótica. **Conclusões** - Análise das imagens demonstrou que a implantação do nervo no osso desencadeia processo inflamatório que evolui da fase aguda para integração nervo-osso, sem formação de neuroma.

Palavras chave - Neuroma, Implantação, Osso, Nervo.

Abstract

ABSTRACT

Introduction - There are several surgical techniques for treatment of painful amputation neuroma. However no consensus has already been reached on the most effective treatment. Burying the neuroma or the nerve in the bone is one of the surgeries which provides good clinical findings. However, there is no deep knowledge of what happens to the nerve or buried neuroma in the bone. **Objectives -** The objectives of this study were to develop an experimental model of this surgical technique and to morphologically analyze the destiny of the implanted nerve in the bone. **Materials and Methods -** A total of 24 four rats underwent implantation of the caudal tibial nerve in the distal third of the femur. They were histologically studied in the periods of 1, 3, 6, 13, 24 and 28 weeks by optical microscopy. **Conclusion -** The analyses of the images showed that implantation of the nerve in the bone triggers an inflammatory response which evolves from the acute phase to the nerve-bone integration with no formation of neuroma.

Key words - neuroma, implantation, bone, nerve

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela1 - Grupos experimentais, tempo de seguimento (semanas), número de animais operados, animais aproveitados, lâminas confeccionadas e lâminas analisadas 32

Tabela 2 - Escala de graduação semiquantitativa dos parâmetros morfológicos observados nas lâminas histológicas dos animais operados 36

Tabela 3 - Resultados da análise morfológica de 5 lâminas histológicas de 3 animais do grupo I (1 semana de pós-operatório).....38

Tabela 4 - Resultados da análise morfológica de 11 lâminas histológicas de 4 animais do grupo II (3 semanas de pós-operatório).....40

Tabela 5 - Resultados da análise morfológica de 5 lâminas histológicas de 4 animais do grupo III (6 semanas de pós-operatório).....42

Tabela 6 - Resultados da análise morfológica de 10 lâminas histológicas de 4 animais do grupo IV (13 semanas de pós-operatório).....43

Tabela 7 - Resultados da análise morfológica de 6 lâminas histológicas de 4 animais do grupo V (24 semanas de pós-operatório).....45

Tabela 8 - Resultados da análise morfológica de 3 lâminas histológicas de 3 animais do grupo VI (28 semanas de pós-operatório).....46

Tabela 9 - Resumo das alterações morfológicas nos grupos experimentais.....47

Tabela10 - Resumo das alterações morfológica observadas no estudo de Boldrey em cães (implantação do nervo ulnar no úmero) 51

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - A: Animal anestesiado e posicionado em decúbito ventral; B: Incisão de pele e musculatura 33

Figura 2 - C: Exposição do nervo ciático; D: Dissecção do nervo ciático e suas divisões (nervo tibial caudal e nervo fibular caudal). 34

Figura 3 - E: Exposição do fêmur distal; F: Secção do nervo tibial caudal (ramo do nervo ciático) 34

Figura 4 - G: Perfuração do fêmur distal; H: Implantação do nervo tibial caudal no osso.....35

Figura 5 - Primeira Semana. A: Posição do nervo dentro do espaço ósseo. Aumento de 10X, H.E; B: Processo inflamatório 3+ e 4+ com neutrófilos. Aumento de 10X, H.E; C e D: Processo inflamatório com linfócitos 1+ a 2+, com plasmócitos 1+ a 2+ e vasos 2+ a 3+. Aumento de 20X, H.E; E e F: Reação periosteal 3+ a 4+.Aumento de 20X, H.E.....39

Figura 6 - Terceira Semana. A: Proliferação vascular 3+ a 4+ e reação periosteal 3+ a 4+. Aumento 10 X e 20X, H.E; B: Processo inflamatório 2+ a 3+ (tecido de granulação), edema 2+ a 3+. Aumento 20X, H.E; C: Reação periosteal 3+ a 4+. Aumento 20X, H.E.....41

Figura 7 - Sexta Semana. A e B: Reação inflamatória 1+. Aumento 20X, H.E. Décima terceira semana. C, D, E e F: Proliferação de vasos 2+ e reação periosteal 2+. Aumento 20X, H.E.....44

Figura 8 - Vigésima quarta e vigésima oitava semanas. A e B: Integração nervo-osso (metaplasia nervo–óssea*).* Aumento 20X, H.E 46

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO 21

2. OBJETIVO 30

3. MATERIAL E MÉTODOS 32

4. RESULTADOS.....38

4.1 Observações clínicas 38

4.2 Observações histológicas.....38

5. DISCUSSÃO 49

5.1 Desenvolvimento de modelo experimental de implantação de nervo periférico no osso.....49

5.2 Análise histológica.....50

6. CONCLUSÕES.....54

7. REFERÊNCIAS.....56

ARTIGO ORIGINAL.....64

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A primeira descrição do neuroma foi em 1811, quando Odier[1] descreveu ocorrência de edema desenvolvido no coto proximal de nervos sensitivos após lesão. O primeiro estudo histopatológico desta lesão foi realizado por Wood[2] em 1828, quando surgiu o termo neuroma. Em 1920, Huber e Lewis[3], por meio de estudo experimental, descrevem o processo de formação do neuroma.

A incidência dos neuromas sintomáticos está estimada em aproximadamente 3 a 5% de todos os pacientes com lesões de nervos periféricos[4]. Os neuromas ocorrem, com mais frequência, em adultos na fase produtiva da vida e nas pessoas que estão envolvidos com trabalhos manuais. No Reino Unido estimam-se 60 mil lesões de nervos periféricos por ano[5].

Após lesão do nervo periférico, inicia-se imediatamente o processo de cicatrização e regeneração. Há crescimento local das fibras nervosas e, caso não ocorra união das extremidades dos cotos, haverá crescimento desorganizado e, consequentemente, regeneração anormal dessas fibras, evoluindo para o aparecimento do neuroma.

Histologicamente os neuromas são caracterizados como fibras nervosas regeneradas em vários estágios de maturação com orientações aleatórias e envolvidas por tecido colagenoso cicatricial e células como os miofibroblastos. A existência de miofibroblatos no neuroma pode ser outra manifestação da resposta típica da cicatrização encontrada em muitas fibromatoses humanas, como a Doença de Dupuytren, a cicatriz hipertrófica e as tenossinovites[6].

De acordo com Yuksel et al.[7], a integridade do perineuro também influencia a formação do neuroma, ou seja, o perineuro é uma barreira impenetrável para regeneração dos axônios. Contudo, quando há uma ruptura dessa barreira, por meio da lesão do perineuro, ocorre o escape dos fascículos nervosos. Este fenômeno permite o crescimento desorganizado dos axônios e de outras estruturas, como os fibroblastos, as células de Schwan e os vasos sanguíneos. Os fibroblastos e as células de Schwan determinam o tamanho do neuroma, porém não há relação entre o tamanho do neuroma e a sua capacidade de gerar sintomas clínicos ou mesmo influenciar na intensidade destes sintomas. Os vasos sanguíneos não influenciam no tamanho do neuroma, sendo responsáveis pela sua nutrição.

Nervos que possuem fascículos menores são mais susceptíveis a esse "escape" e como consequência, à formação do neuroma[8].

Outro fator que contribui para o surgimento do neuroma é a fibrose neural. Ela age bloqueando ou desviando a orientação normal da cicatrização dos axônios e, como consequência, afeta o crescimento, o desenvolvimento e a função neurológica [8, 9, 10].

Após traumatismo do nervo periférico, iniciam-se fenômenos fisiológicos na tentativa de reparação. Nesse instante, do ponto de vista bioquímico, observa-se liberação de neurotropinas, citocinas, interleucinas e fatores de crescimento do fibroblasto. Essas substâncias ativam os receptores tirosinoquinase e, como consequência, aumentam a afinidade ao fator de crescimento neural[11]. O fator de crescimento neural é liberado pelas células de Schwan e pelos macrófagos[12]. Seu papel é de grande importância na cicatrização dos neurônios sensitivos e no crescimento dessas estruturas, mas tem pouca influência nos neurônios motores[5]. O fator de crescimento neural contribui para a regulação da excitabilidade das fibras nociceptivas, alterando a expressão do RNA mensageiro, os canais de sódio, os receptores e os neuropeptídeos. Essas substâncias estão envolvidas na transmissão da dor[5]. O acúmulo desses elementos promove hiperexcitabilidade e descargas espontâneas. Estudo experimental realizado em 1991 por Burchiel e Ochoa[13] demonstrou que o bloqueio dos canais de sódio diminui a condução nervosa e consequentemente a dor neuropática.

O fator de crescimento neural tem papel importante na formação do neuroma e na dor neuropática [14,15].

Lewin et al.[16] realizaram aplicação sistêmica de fator de crescimento neural em modelos experimentais e observaram alteração profunda no comportamento e no mecanismo da hiperalgesia.

Harpf et al.[17] demonstraram aumento dos receptores para o fator de crescimento neural em neuromas, resultando numa mudança no fenótipo das fibras sensoriais.

Hazberg et al.[18], Ro et al.[15] e Kryger et al.[19] desenvolveram molécula antifator de crescimento neural denominada trkA-IgG. Essa molécula é uma proteína que possui alta afinidade aos receptores do fator de crescimento neural e também possui capacidade de diminuir os níveis do fator de crescimento neural. Como

resultado, essa substância foi capaz de prevenir a formação do neuroma e de inibir a dor neuropática em modelos experimentais.

Dyck et al.[20] realizaram aplicação intradérmica do fator de crescimento neural em humanos e constataram indução de alodínia e hiperalgesia.

Atherton et al.[5] publicaram estudo mostrando que o excesso de fator de crescimento neural pode estar presente em neuromas dolorosos e, ao implantá-lo em outro tecido como, por exemplo, osso[21] ou músculo[22] pode haver melhora da dor. Esses resultados podem ser explicados pelos baixos níveis do fator de crescimento neural no tecido implantado.

Apesar dos neuromas fazerem parte das lesões dos nervos periféricos, as quais podem ser classificadas pelos sistemas de Seddon[23] ou de Sunderland[24], existe classificação específica para esse tipo de lesão: neuroma em contiguidade, neuroma de amputação, neuroma de lesão completa e neuroma após reparo neural.

Não há estudos epidemiológicos detalhados sobre os neuromas dolorosos, contudo, a maior incidência ocorre provavelmente nos neuromas de amputação e nos neuromas de lesões completas [25, 26].

Os fatores responsáveis pelo aparecimento dos neuromas são: irritação crônica, pressão, estiramento, sutura inadequada de lesão nervosa, ferimentos corto contusos, esmagamento, amputações das extremidades e lacerações. Dentre estes fatores, o mais comum é o estiramento do nervo[8].

Os fenômenos fisiológicos que ocorrem após a lesão do nervo periférico podem contribuir para o desenvolvimento de dores intensas denominadas neuropáticas, de difícil controle e tratamento. Somente os nervos que possuem fibras sensitivas podem desenvolver neuromas que podem, por sua vez, acarretar dor neuropática[25, 26]. Os mecanismos do desencadeamento da dor neuropática não são totalmente compreendidos e envolvem fenômenos complexos do sistema nervoso central e periférico.

A dor aparece devido ao aumento da nocicepção que se inicia imediatamente após lesão do nervo periférico. A nocicepção está alterada e há conexão anormal entre as fibras A-β, que normalmente são responsáveis pela inervação da pele e modulam a resposta da dor (intensidade, duração e frequência). Há sensibilização geral e hipersensibilidade das fibras, surgindo o estado de hiperexcitabilidade e hiperalgesia. Foram observadas descargas espontâneas

nessas fibras anormais que alteram sua função de condutor de sinais nervosos para gerador de impulsos elétricos[27].

Estudos demonstram acúmulo dos canais de sódio de maneira incomum nos neuromas que pode ser à base do aparecimento da hiperexcitabilidade elétrica exuberante e impulsos ectópicos e, como consequência, surgimento de fenômeno sensorial anormal local [28, 29, 30, 31].

De acordo com Sood[32] existem quatro tipos de dores decorrentes dos neuromas: dor espontânea, dor devido à pressão no local do neuroma, dor à movimentação da articulação e dor com hiperestesia. Os locais mais comuns do aparecimento dos neuromas são, segundo este autor, polegar do jogador de boliche, ramo sensitivo do nervo radial, nervo cutâneo palmar (ramo do mediano), cotos de amputação (onde ocorre a secção completa do nervo) e as suturas inadequadas de lesão nervosa.

O desenvolvimento dos neuromas pode ser muito incapacitante para o paciente, interferindo na sua produtividade profissional, no seu estilo de vida e até mesmo no seu humor. Também promove altos gastos com os sistemas de saúde. Portanto, os neuromas dolorosos são um grande problema para os pacientes e um grande desafio para os cirurgiões.

Edstron e Karacaoglu[26] afirmam que os neuromas dolorosos são uma das principais sequelas devastadoras do membro superior, sendo que um simples neuroma pode comprometer a função da extremidade na sua totalidade.

O diagnóstico do neuroma é clínico: dor extrema na cicatriz, alodínia e alteração da sensibilidade em território inervado pelo nervo acometido. Muitas vezes o neuroma é palpável, o paciente apresenta sinal de Tinel positivo e pode haver hipoestesia, anestesia ou hiperalgesia.

Pacientes referem também intolerância ao frio, com piora dos sintomas que podem não desaparecer com o tempo ou tratamento cirúrgico[33].

Thomas, Bill e Howard[34] realizaram estudo revelando que o ultrassom é método eficaz para o diagnóstico e localização dos neuromas.

Sunderland[24] afirmou “que a prevenção dos neuromas após uma lesão do nervo periférico é um objetivo difícil de obter, tendo em vista a capacidade ilimitada dos axônios em se regenerarem”. Entretanto, há alguns métodos que podem auxiliar na prevenção dos neuromas. São eles: cobertura do coto do nervo

com silicone, transferências com retalhos na área cicatricial, implantação na fáscia, no tecido subcutâneo, na musculatura, nas veias e até mesmo a implantação no seu próprio tronco (neurorrafia do coto em seu próprio tronco). Nos cotos de amputação há a possibilidade de realizar neurorrafia término-terminal entre os cotos nervosos.

O tratamento do neuroma deve ter como objetivos: alívio da dor, restaurar a sensibilidade, principalmente nos dedos da mão quando ocorrer nessa região, restaurar a perda funcional causada pela lesão do nervo periférico e promover ao paciente o retorno às atividades cotidianas e profissionais.

Em 1624, Ambroise Pare descreveu, pela primeira vez, tratamento para os neuromas com massagem e óleos[27].

Há aproximadamente 150 tipos de tratamentos para os neuromas, compreendendo desde os conservadores até os invasivos[35]. Os tratamentos conservadores ou métodos não invasivos consistem, entre outros, em massagens do local afetado, terapia com ultrassom, estímulo elétrico intermitente (fisioterapia para dessensibilização), readaptação às atividades diárias e laborais e uso de fármacos. Há os métodos semi-invasivos, como acupuntura, aplicações de agentes químicos neurotrópicos, como por exemplo, as triancinolonas, o álcool e o fenol. Os tratamentos cirúrgicos ou métodos invasivos incluem neurólise, simpatectomia axilar, ressecção do neuroma, transposição, implantação em gordura, músculo ou osso, cobertura com retalhos ou tecidos vascularizados, implantação de tubos de silicone, ressutura do nervo, associado ou não a enxerto, e anastomoses entre os cotos. Porém não há consenso em relação ao melhor tratamento[36, 27].

Bierman em 1954[37] descreveu pela primeira vez o uso do ultrassom como método de tratamento para o neuroma. Uygur e Sener[38] realizaram trabalho com apenas sete pacientes com amputação traumática da perna que desenvolveram neuroma no coto de amputação, com dificuldade para o uso da prótese. Nesse estudo foi realizado aplicação de 1mhz na intensidade de 0,5 W/$cm2$ por 5 minutos de forma contínua. Concluíram que houve eficácia do tratamento com diminuição dos sintomas e início da marcha com prótese.

No tratamento conservador também é descrito o uso de fármacos de ação no sistema nervoso central como, por exemplo, gabapentina, pregabalina, amitriptilina e a carbamazepina. Apesar da ausência de estudos clínicos detalhados

sobre a eficácia dessas terapêuticas, observam-se fracassos acentuados desses tratamentos.

Richards et al.[39] demonstraram a redução da dor neuropática após o abandono do fumo. Stokvis et al.[40], observaram que os fumantes têm o pior resultado, com menor redução da dor e menor satisfação com o tratamento, quando comparado com os não fumantes. Esse fenômeno pode ser explicado pela ação da nicotina. Embora a nicotina seja conhecida por ter propriedades analgésicas, acredita-se que ela estimula os nociceptores periféricos, piorando assim os sintomas do neuroma. Porém, mais estudos são necessários para investigar o efeito da nicotina e o tratamento da dor neuropática.

Kiverlã e Nieminen[41] realizaram bloqueio neurolítico com glicerol- fenol (agente químico neurotrópico). Referem que essa substância é menos irritativa e dolorosa que o álcool e tiveram resultados bons com melhora das dores. Concluíram que esse método de tratamento é efetivo e seguro para os neuromas de extremidades.

Robbins[42] observou diminuição do tamanho do neuroma e alívio dos sintomas com a injeção de acetato de triancinolona dentro do neuroma.

Masquelet[43] refere que o objetivo do tratamento cirúrgico consiste em retirar o neuroma dos estímulos externos promovendo a sua proteção ou a sua destruição ou a sua transposição. A escolha do tratamento depende da experiência do cirurgião.

O tratamento cirúrgico consiste na proteção do coto diminuindo fatores irritativos e, consequentemente, diminuindo os sintomas[44, 45, 46, 47, 48]. Entretanto, a prevenção da resposta fisiológica da formação do neuroma é um desafio no tratamento.

A primeira implantação descrita de neuromas em músculos foi em 1918 por Moszkowicz[49].

Em 1976, Tupper e Booth[50] realizaram apenas a neurectomia do neuroma e apresentaram 65% de resultados bons/satisfatórios.

Lundborg[51] descreve série de bons resultados usando tubos de silicone para tratar os neuromas dolorosos.

Dellon e Mackinnon em 1986[48] descreveram a preferência pela implantação do neuroma no músculo e obtiveram apenas três resultados ruins de 26 implantações.

Laborde[47] reoperou 65 % dos pacientes que foram submetidos apenas a neurectomia do neuroma e relatou melhora dos sintomas com a implantação do neuroma em osso.

Atherton et al.[52] revelaram em seu estudo que o resultado de única neurólise ou neurólise com cobertura com veia ou fáscia nas lesões do nervo radial sensitivo foi decepcionante. Porém, alegam resultados bons na implantação do neuroma em músculos.

Uma das técnicas descritas é enxerto de veia autólogo, formando assim uma ponte entre os cotos do nervo (conduíte vascular) permitindo o crescimento do axônio de maneira uniforme e orientada. Contudo, esta técnica é limitada a apenas até três centímetros de espaço entre os cotos [53, 54, 55, 56].

Há forte consenso da necessidade de, quando possível, utilizar-se de técnicas cirúrgicas que evitem a formação dos neuromas, principalmente nas amputações do membro superior [25, 36, 43, 47, 50, 52, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63].

O objetivo de algumas técnicas cirúrgicas é envolver o neuroma em tecidos biológicos. Contudo, não há consenso na literatura em relação a implantar o nervo com o neuroma ou ressecar o neuroma e implantar o coto proximal do nervo[57, 59].

A eficácia dos procedimentos cirúrgicos é imprevisível e apesar de haver muitas opções de tratamento, não existe ainda método aceito universalmente eficaz para controle da dor e para evitar a formação do neuroma.

A maior parte dos estudos relativos ao tratamento dos neuromas doloridos é clínica, tratando-se, geralmente, de séries de pacientes operados. Há escassez de estudos experimentais.

A técnica de implantação do neuroma no osso ou a ressecção do neuroma e a inclusão óssea do coto terminal ou a implantação intraóssea do nervo terminal nas amputações, isto é, colocar o neuroma ou nervo sem neuroma dentro do osso, é um dos tratamentos referidos na literatura de grande sucesso[43, 57, 59, 61]. O objetivo da implantação óssea é confinar a regeneração dos axônios em espaço ósseo e assim, por consequência, proteger o coto distal de eventuais traumas.

Na literatura pesquisada observou-se somente um estudo experimental sobre implantação do neuroma ou do nervo no osso, desenvolvido por Boldrey[64] e publicado em 1943, no qual foi implantado o nervo ulnar no úmero de quatro cães adultos e realizadas observações histológicas ao longo do tempo (entre 133 a 219 dias após a implantação). Boldrey[64] relatou a formação de pequenos neuromas e cisto ósseo no local da implantação.

Devido à escassez de trabalhos experimentais e a existência de resultados conflitantes na literatura, o tratamento dos neuromas dolorosos ainda permanece um desafio. Além disto, o destino do neuroma ou do nervo implantado no osso permanece pouco conhecido.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Desenvolver modelo experimental de implantação de nervo periférico no osso;

- Analisar a sequência das alterações morfológicas da implantação do nervo periférico (tibial caudal) dentro do osso (fêmur distal) em ratos ao longo de 28 semanas.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

Foram utilizados 24 ratos adultos, do sexo masculino, da raça Rattus novergicus albinus, da linhagem Wistar, clinicamente saudáveis, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Campus Botucatu. Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de implantação de nervo periférico dentro do osso.

Os animais foram divididos igualmente em seis grupos de acordo com o tempo de seguimento pós-operatório e sacrifício: grupo I – uma semana; grupo II – três semanas; grupo III – seis semanas; grupo IV – treze semanas; grupo V – vinte e quatro semanas e grupo VI – vinte e oito semanas (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos experimentais, tempo de seguimento (semanas), número de animais operados, animais aproveitados, lâminas confeccionadas e lâminas analisadas.

Grupos	Tempo de seguimento (semanas)	Nº de animais operados	Nº de animais aproveitados	Nº de lâminas confeccionadas	Nº de lâminas analisadas
I	1	4	3	27	5
II	3	4	4	24	11
III	6	4	4	24	5
IV	13	4	4	24	10
V	24	4	4	24	6
VI	28	4	3	24	3

A cirurgia nos animais foi realizada em ambos os membros inferiores, de acordo com os seguintes passos:

1. Anestesia com pentobarbital sódico a 3% (30 mg por quilo de peso) via intraperitoneal;
2. Tricotomia da região da coxa e perna bilateral;
3. Posicionamento do animal na goteira cirúrgica;
4. Antissepsia do membro inferior bilateral com álcool iodado a 5%;
5. Acesso cirúrgico ao nervo tibial caudal e dissecação do mesmo;

6. Liberação distal do nervo tibial caudal;
7. Perfuração do fêmur distal na região metafisária com broca de 1,5 milímetros;
8. Colocação do nervo tibial caudal no orifício do fêmur e sutura com fio de nylon 8-0 entre o periósteo e o perineuro com pontos simples;
9. Sutura de pele com nylon 4-0 com pontos simples;
10. Curativo.

As figuras 1, 2, 3 e 4 demonstram os tempos cirúrgicos mais importantes.

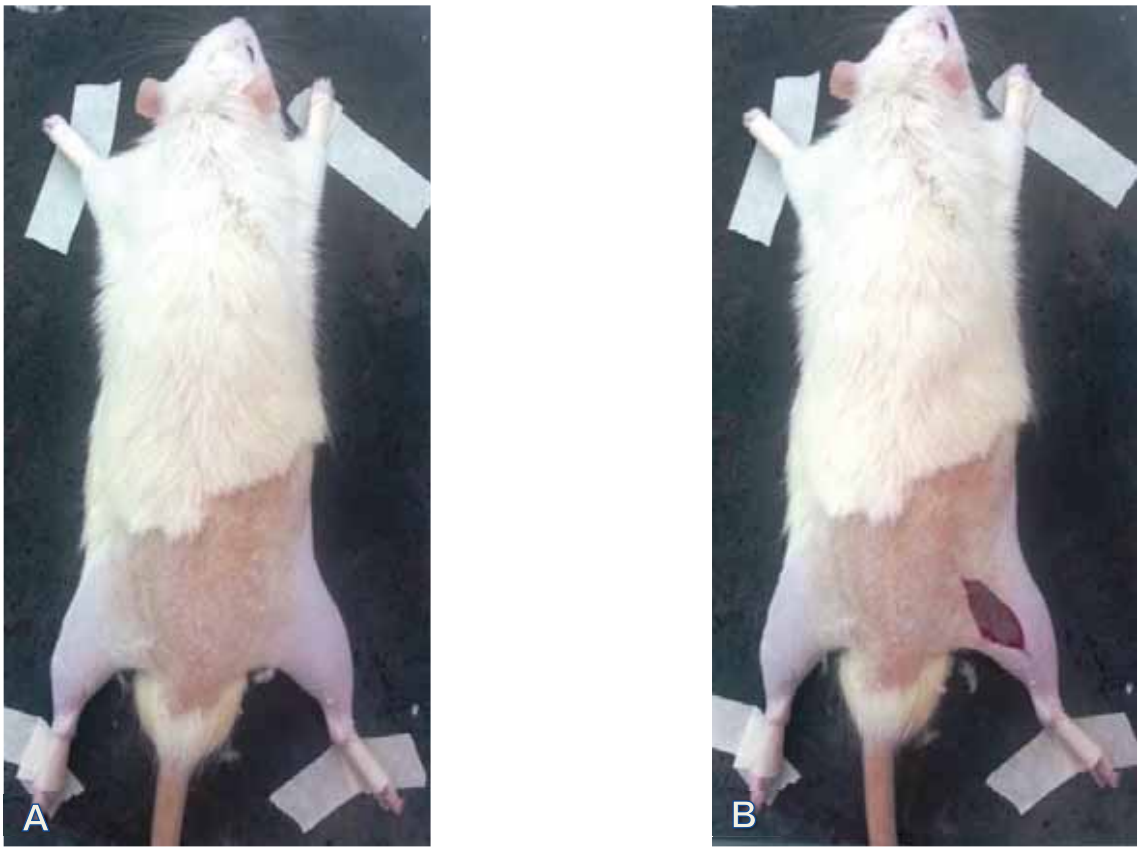


Fig.1 - A: Animal anestesiado e posicionado em decúbito ventral; B: Incisão de pele e musculatura.

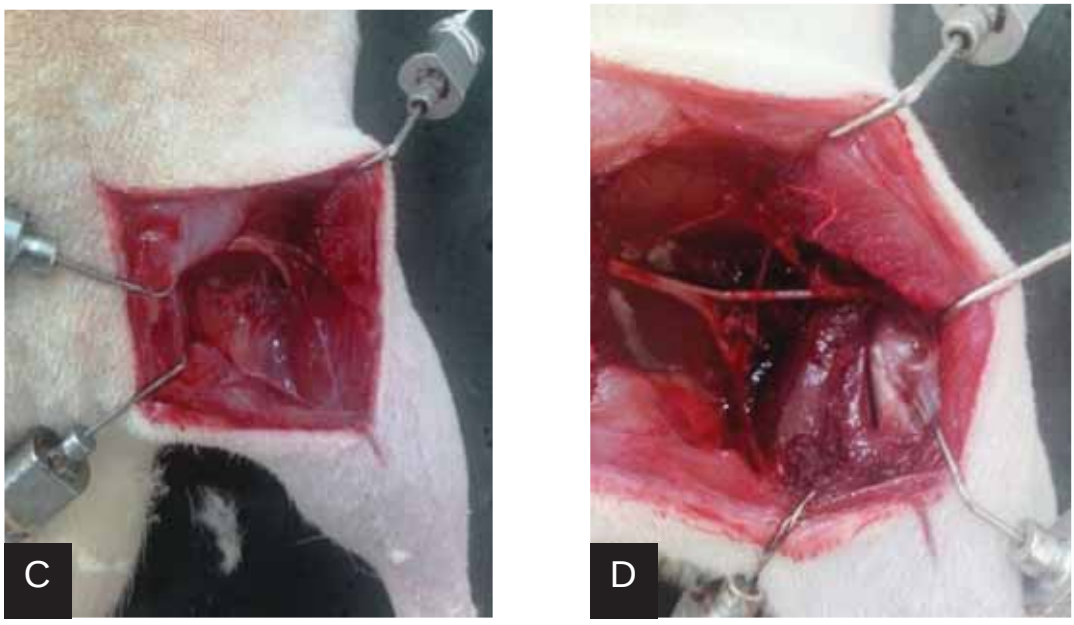


Fig. 2 - C: Exposição do nervo ciático; D: Dissecção do nervo ciático e suas divisões (nervo tibial caudal e nervo fibular caudal).

.

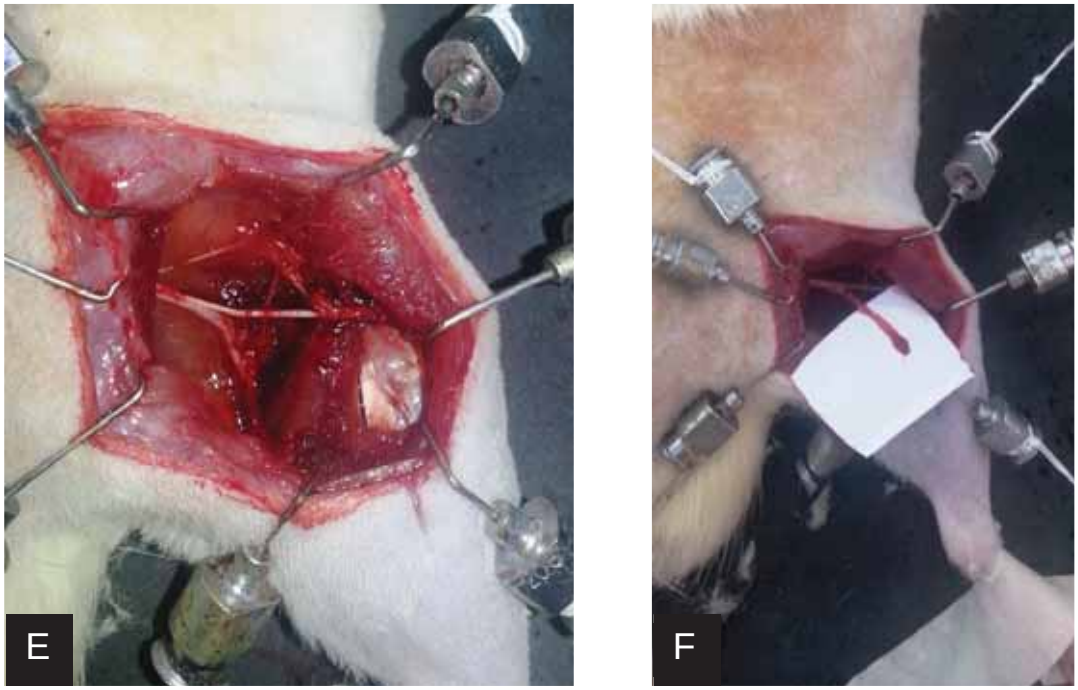


Fig. 3 – E: Exposição do fêmur distal; F: Secção do nervo tibial caudal (ramo do nervo ciático).

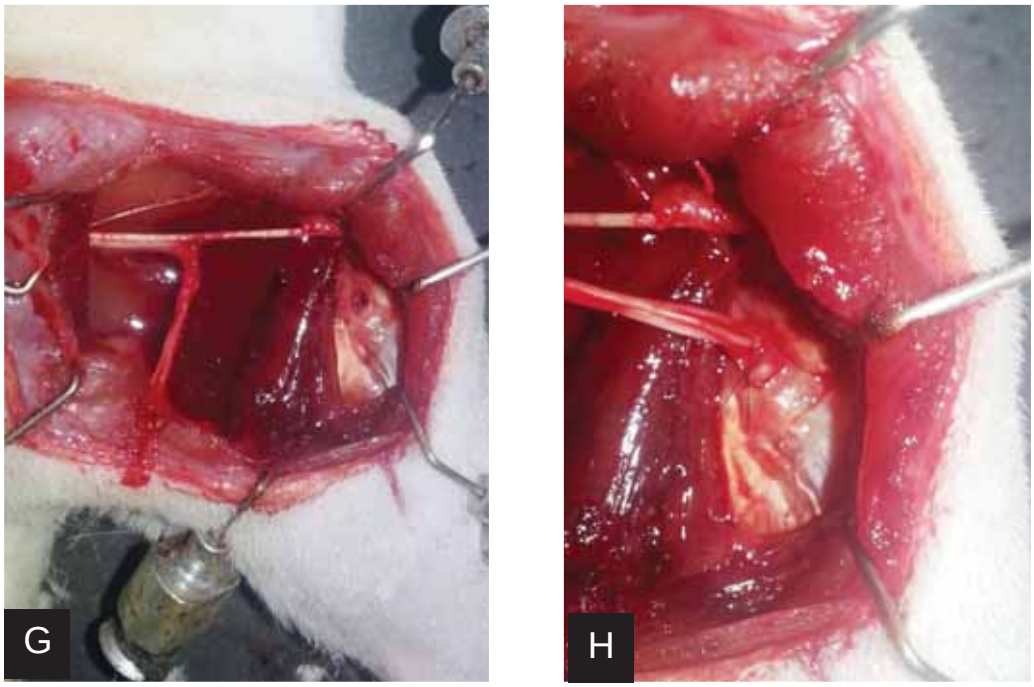


Fig. 4 – G: Perfuração do fêmur distal; H: Implantação do nervo tibial caudal no osso.

No pós-operatório, os animais foram mantidos em caixas de plástico (quatro animais por caixa) com oferta padrão de ração, água ad libitum e ciclo de dia/noite. Foi utilizado antibiótico profilático e analgésico para dor.

Diariamente os animais foram observados clinicamente em relação às condições gerais de saúde e, especificamente, em relação à ferida cirúrgica, à marcha e à presença de lesões no tegumento dos membros caudais.

O sacrifício foi realizado com dose letal de anestésico no período estabelecido de acordo com os grupos. A retirada do material para análise foi realizada da seguinte maneira:

1. Eutanásia com pentobarbital sódico;
2. Tricotomia da região da coxa e da perna;
3. Posicionamento do animal em goteira cirúrgica;
4. Incisão de pele e musculatura e identificação do nervo ciático;
5. Neurotomia do ciático proximal;
6. Osteotomia do fêmur no terço médio e na tíbia proximal;

As preparações macroscópica e microscópica foram realizadas seguindo os seguintes passos:

1. A peça foi retirada de ambos os membros caudais medindo aproximadamente 5 cm X 3 cm, contendo o fêmur distal e a tíbia proximal. O fio de sutura, que fixava o nervo no periósteo do fêmur distal, facilitou a identificação do local do membro caudal a ser retirado;
2. A peça foi mergulhada em recipiente apropriado e identificado contendo solução descalcificadora (solução de Boan) em volume dez vezes o da peça. Foi mantido nesse local por 10 dias.
3. Após a descalcificação, o material foi cortado no sentido longitudinal em três fragmentos para a confecção das lâminas histológicas;
4. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) conforme a padronização do Laboratório de cirurgia experimental da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP – Campus Botucatu).

Foram confeccionadas 147 lâminas histológicas, as quais foram examinadas por três observadores independentes e, desse modo, foram selecionadas 40 lâminas (27,21%) com material representativo e adequado para a observação do nervo implantado no osso (Tabela 1).

As lâminas selecionadas foram novamente observadas por meio de microscopia ótica em aumento de 10 e 20 vezes. Os seguintes parâmetros morfológicos foram analisados de forma semiquantitativa e descritiva: processo inflamatório, presença de linfócitos, neutrófilos, plasmócitos, histiócitos, edema, reação periosteal, vasos neoformados e hemorragia.

Os parâmetros morfológicos foram graduados (0 a 4+) de acordo com o a tabela 2.

Tabela 2 - Escala de graduação semiquantitativa dos parâmetros morfológicos observados nas lâminas histológicas dos animais operados.

Graduação	0	1+/2+	3+/4+
Quantidade	Ausente	Moderada	Intensa

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Observações clínicas

Todos os animais permaneceram em bom estado geral de saúde e as feridas cirúrgicas cicatrizaram adequadamente sem infecções. Houve paralisia parcial de ambos os membros caudais, dificultando a marcha dos animais, que permaneceram arrastando os membros durante todo o período do experimento. Não se observaram lesões do tegumento dos membros caudais e nem autofagia dos pés.

4.2 Observações histológicas

Grupo I (1 semana)

Deste grupo foram confeccionadas 27 lâminas, porém apenas 5 (18,5%) tiveram material representativo para análise, correspondendo a três animais dos quatro operados (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da análise morfológica de 5 lâminas histológicas de 3 animais do grupo I (1semana de pós-operatório).

P.I.	Linf.	Neu.	Plas.	Hist.	Ede.	R.P.	Vaso	Hem.
2+	1+	1+	3+	0	2+	3+	2+	2+
3+	2+	1+	1+	0	1+	3+	3+	0
2+	1+	1+	1+	0	1+	3+	2+	0
3+	2+	2+	2+	0	3+	3+	3+	1+
4+	2+	3+	2+	0	3+	4+	2+	0

P.I. – processo inflamatório; Linf. – linfócitos; Neu. – neutrófilos; Plas. – plamócitos; Hist. – histiócitos; Ede. – edema; R.P. – reação periosteal; Vaso – vasos; Hem. – hemorragia

Na primeira semana ocorreu predomínio do processo inflamatório de grau moderado a intenso, com predomínio de neutrófilos e plasmócitos, presença de edema moderado e intensa reação periosteal com proliferação incipiente de vasos sanguíneos (Figura 5).

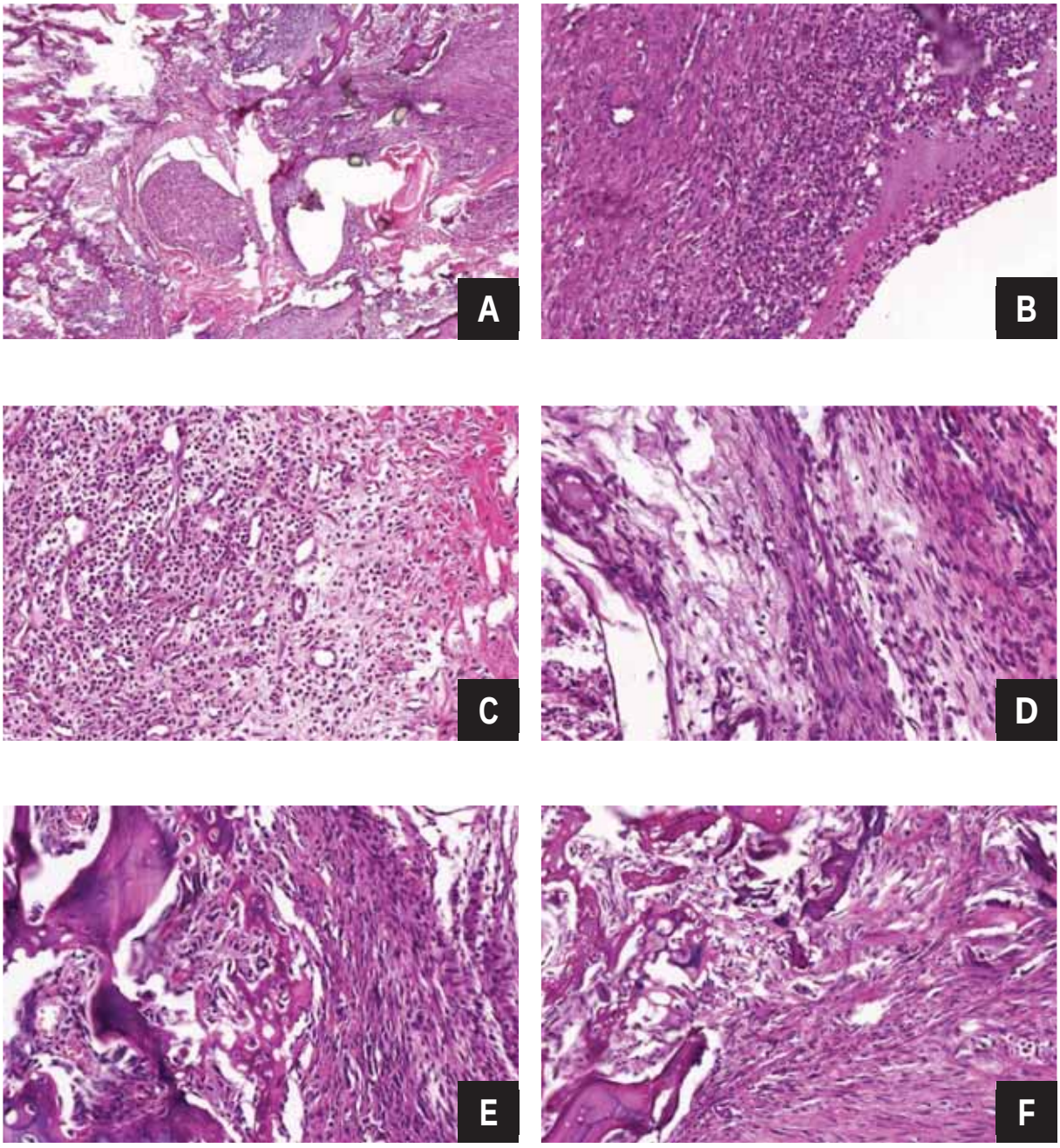


Fig. 5 - Primeira Semana. A: Posição do nervo dentro do espaço ósseo. Aumento de 10X, H.E; B: Processo inflamatório 3+ e 4+ com neutrófilos. Aumento de 10X, H.E; C e D: Processo inflamatório com linfócitos 1+ a 2+, com plasmócitos 1+ a 2+ e vasos 2+ a 3+. Aumento de 20X, H.E; E e F: Reação periosteal 3+ a 4++. Aumento de 20X, H.E.

Grupo II (3 semanas)

Deste grupo foram confeccionadas 24 lâminas, porém apenas 11 (45,83%) tiveram material representativo para análise, correspondendo a todos os quatro animais operados (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da análise morfológica de 11 lâminas histológicas de 4 animais do grupo II (3 semanas de pós-operatório).

P.I.	Linf.	Neu.	Plas.	Hist.	Ede.	R.P.	Vaso	Hem.
1+	1+	0	0	0	1+	2+	4+	2+
2+	1+	1+	1+	0	0	3+	3+	0
2+	2+	0	1+	0	1+	3+	4+	0
3+	3+	1+	2+	0	3+	3+	4+	0
2+	2+	0	2+	0	2+	3+	4+	0
2+	2+	0	2+	0	3+	3+	4+	0
2+	2+	0	1+	0	3+	2+	3+	0
3+	2+	3+	2+	0	2+	4+	3+	0
2+	2+	1+	1+	0	1+	4+	3+	0
3+	2+	3+	2+	0	2+	4+	3+	0
2+	1+	1+	2+	0	2+	3+	3+	0

P.I. – processo inflamatório; Linf. – linfócitos; Neu. – neutrófilos; Plas. – plamócitos; Hist. – histiócitos; Ede. – edema; R.P. – reação periosteal; Vaso – vasos; Hem. – hemorragia

Na terceira semana observou-se manutenção do processo inflamatório, porém de forma moderada e com predomínio de linfócitos e plasmócitos. O edema permaneceu semelhante ao da primeira semana e houve aumento da neovascularização e da reação periosteal (Figura 6).

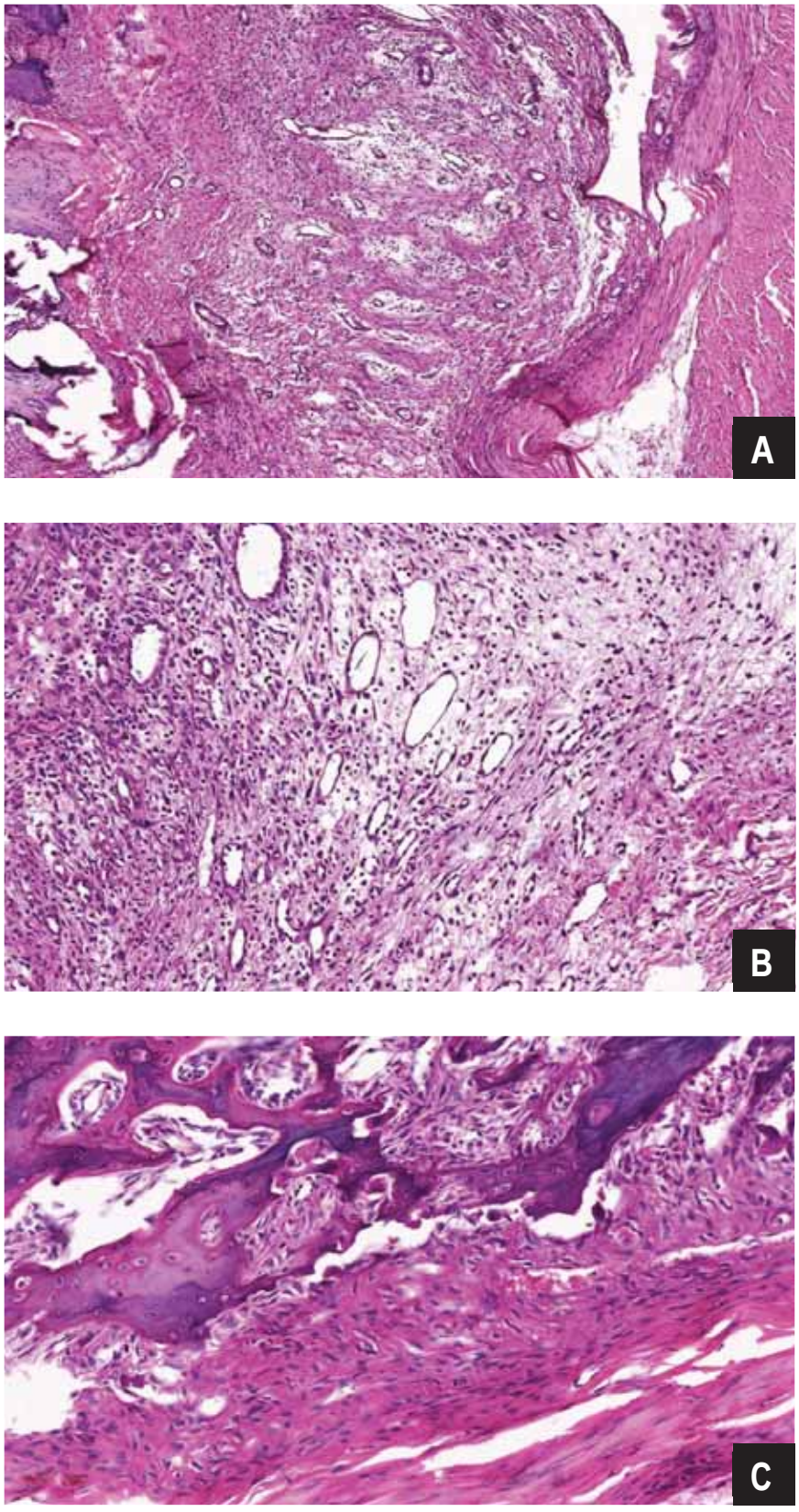


Fig. 6 - Terceira Semana. A: Proliferação vascular 3+ a 4+ e reação periosteal 3+ a 4+. Aumento 10 X e 20X, H.E; B: Processo inflamatório 2+ a 3+ (tecido de granulação), edema 2+ a 3+. Aumento 20X, H.E; C: Reação periosteal 3+ a 4+. Aumento 20X, H.E.

Grupo III (6 semanas)

Deste grupo foram confeccionadas 24 lâminas, porém apenas 5 (20,8%) tiveram material representativo, correspondendo a todos os quatro animais operados (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da análise morfológica de 5 lâminas histológicas de 4 animais do grupo III (6 semanas de pós-operatório).

P.I.	Linf.	Neu.	Plas.	Hist.	Ede.	R.P.	Vaso	Hem.
1+	1+	0	1+	0	0	1+	3+	0
0	1+	0	1+	0	1+	1+	2+	0
0	0	0	0	0	0	1+	2+	0
0	0	0	0	0	0	1+	0	0
0	0	0	0	0	0	1+	0	0

P.I. – processo inflamatório; Linf. – linfócitos; Neu. – neutrófilos; Plas. – plamócitos; Hist. – histiócitos; Ede. – edema; R.P. – reação periosteal; Vaso – vasos; Hem. – hemorragia

Na sexta semana notou-se diminuição do processo inflamatório, manutenção da reação periosteal e da neovascularização, porém com menor intensidade em relação à terceira semana (Figura 7).

Grupo IV (13 semanas)

Deste grupo foram confeccionadas 24 lâminas, porém apenas 10 (41,6%) tiveram material representativo, correspondendo a todos os quatro animais operados (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da análise morfológica de 10 lâminas histológicas de 4 animais do grupo IV (13 semanas de pós-operatório).

P.I.	Linf.	Neu.	Plas.	Hist.	Ede'.	R.P.	Vaso	Hem.
0	0	0	0	0	2+	2+	2+	0
0	1+	0	0	1+	0	2+	2+	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1+	1+	0	1+	0	1+	2+	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1+	0
0	1+	2+	1+	1+	0	1+	1+	2+
0	0	0	0	0	2+	2+	2+	0
0	0	0	0	0	2+	1+	2+	0
0	0	0	0	0	0	2+	2+	0
0	0	0	0	0	2+	2+	2+	0

P.I. – processo inflamatório; Linf. – linfócitos; Neu. – neutrófilos; Plas. – plamócitos; Hist. – histiócitos; Ede. – edema; R.P. – reação periosteal; Vaso – vasos; Hem. – hemorragia

Na décima terceira semana houve manutenção da reação periosteal e da neovascularização. O processo inflamatório estava praticamente inexistente (Figura 7)

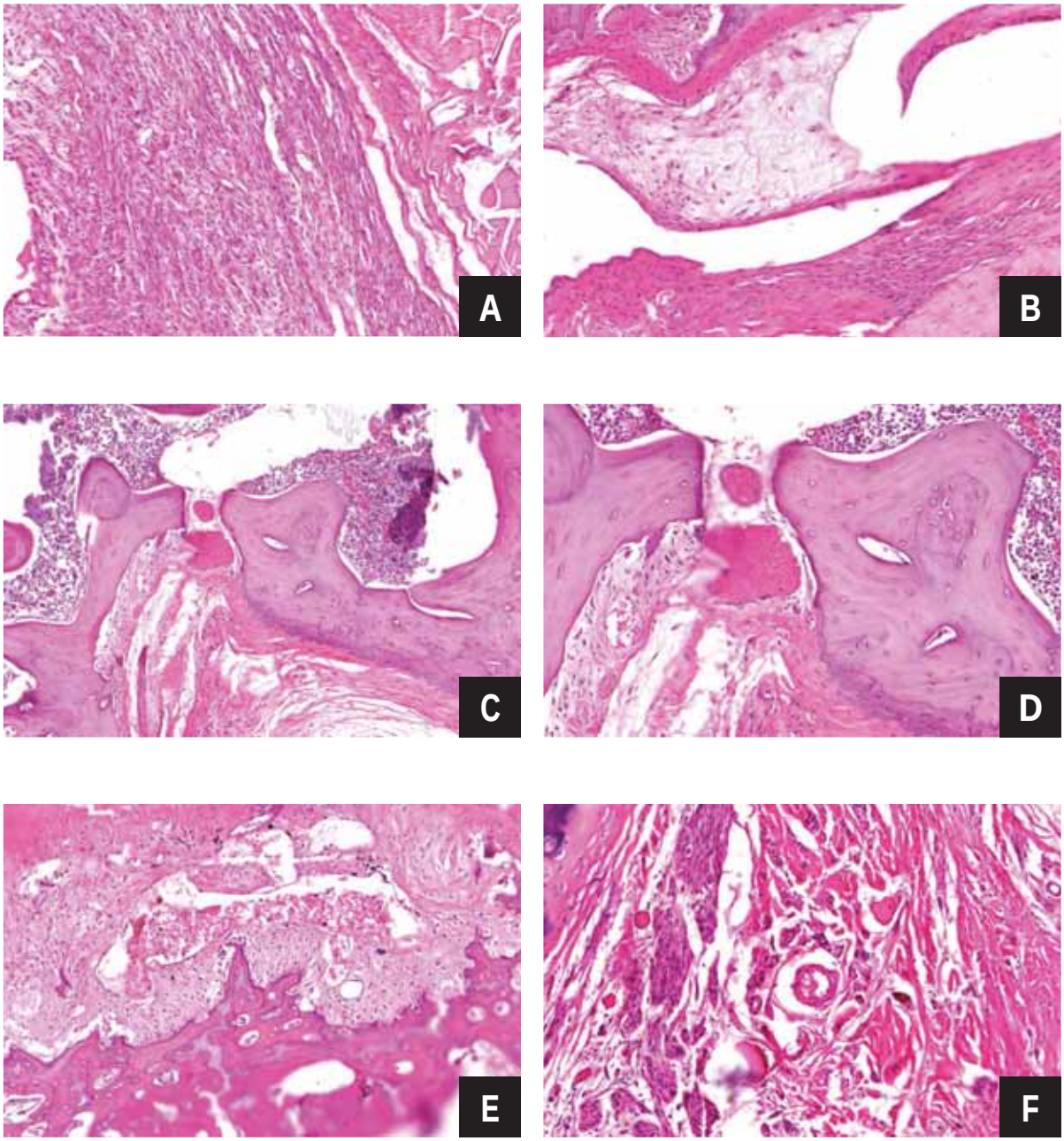


Fig. 7 - Sexta Semana. A e B: Reação inflamatória 1+. Aumento 20X, H.E. Décima terceira semana. C, D, E e F: Proliferação de vasos 2+ e reação periosteal 2+. Aumento 20X, H.E.

Grupo V (24 semanas)

Deste grupo, foram confeccionadas 24 lâminas, porém apenas 6 (25%) tiveram material representativo, correspondendo a todos os quatro animais operados (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da análise morfológica de 6 lâminas histológicas de 4 animais do grupo V (24 semanas de pós-operatório).

P.I.	Linf.	Neu.	Plas.	Hist.	Ede.	R.P.	Vaso	Hem.
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	2+	0
0	0	0	0	0	0	0	2+	0
0	0	0	0	0	0	0	3+	0

P.I. – processo inflamatório; Linf. – linfócitos; Neu. – neutrófilos; Plas. – plamócitos; Hist. – histiócitos; Ede. – edema; R.P. – reação periosteal; Vaso – vasos; Hem. – hemorragia

A partir da vigésima quarta semana observou-se integração do nervo periférico com o espaço ósseo, tanto no periósteo como na região medular do osso, não ocorrendo formação de neuroma. Nesse período o processo inflamatório estava inexistente (Figura 8).

Grupo VI (28 semanas)

Deste grupo foram confeccionadas 24 lâminas, porém apenas 3 (12,5%) tiveram material representativo, correspondendo a três animais dos quatro operados (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da análise morfológica de 3 lâminas histológicas de 3 animais do grupo VI (28 semanas de pós-operatório).

P.I.	Linf.	Neu.	Plas.	Hist.	Ede.	R.P.	Vaso	Hem.
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1+	0	0
0	0	0	0	0	1+	0	2+	0

P.I. – processo inflamatório; Linf. – linfócitos; Neu. – neutrófilos; Plas. – plamócitos; Hist. – histiócitos; Ede. – edema; R.P. – reação periosteal; Vaso – vasos; Hem. – hemorragia

Não houve alterações em relação ao grupo anterior (Figura 8).

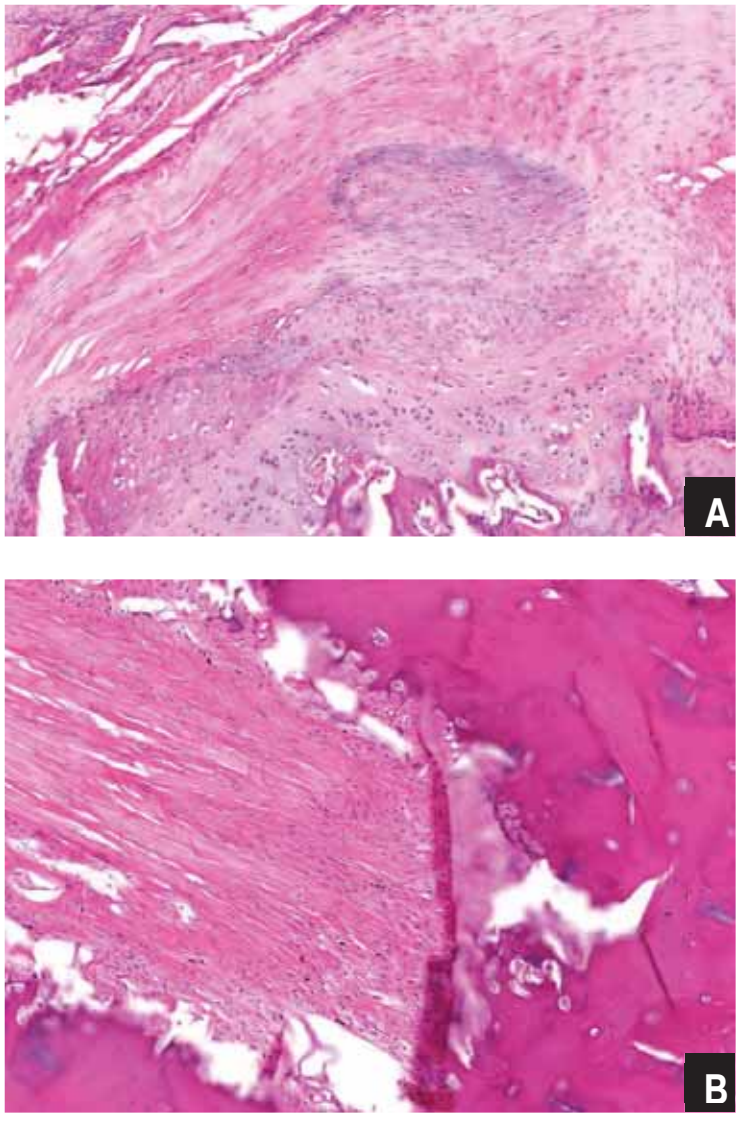


Fig. 8 - Vigésima quarta e vigésima oitava semanas. A e B: Integração nervo-osso. Aumento 20X, HE.

A tabela 9 apresenta resumo das alterações morfológicas observadas.

Tabela 9 - Resumo das alterações morfológicas nos grupos experimentais.

Grupos	Alterações morfológicas
I (1 semana)	Processo inflamatório intenso Neutrófilos e plasmócitos Edema moderado Reação periosteal intensa Inicio de vascularização
II (3 semanas)	↓Processo inflamatório Linfócitos e plasmócitos ↑Reação periosteal ↑Neovascularização
III (6 semanas)	↓Processo inflamatório ↓Reação periosteal ↓Neovascularização
IV (13 semanas)	Desaparecimento do processo inflamatório
V (24 semanas)	Integração nervo/osso Não há neuroma
VI (28 semanas)	Integração nervo/osso Não há neuroma

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de modelo experimental de implantação de nervo periférico no osso

Apesar dos recursos de imagens de alta resolução para tecidos ósseos e das partes moles, como a ressonância magnética nuclear, o estudo detalhado do destino do nervo implantado no osso exige análise histológica dos tecidos, que somente pode ser realizada por meio de modelos experimentais em animais.

O modelo desenvolvido no presente estudo, utilizando o rato como animal de experimentação, no qual se implantou o nervo tibial caudal na região distal do fêmur, mostrou-se adequado, uma vez que as imagens coloridas em HE das lâminas histológicas permitiram observar o destino do nervo implantado. A secção do nervo tibial caudal bilateralmente causou paralisia parcial dos membros caudais dos animais, contudo, a preservação do nervo fibular caudal garantiu alguma movimentação dos membros. A preservação do nervo fibular caudal garantiu ainda a presença de algum grau de sensibilidade cutânea, suficiente para que não ocorressem lesões do tegumento e autofagia dos membros.

A realização da cirurgia experimental somente em um membro caudal permitiria aos animais marcha mais eficiente, porém exigiria maior número de animais, com implicações éticas e operacionais.

A implantação do nervo sem neuroma no osso foi baseada na experiência clinica, na qual, no tratamento do paciente com neuroma dolorido, resseca-se o neuroma e implanta-se o nervo no osso. Esta opção, que contraria a de implantar o neuroma no osso, parece-nos mais lógica, uma vez que o objetivo do tratamento é controlar os efeitos deletérios dos próprios neuromas.

A perda acentuada de lâminas histológicas que não permitiram análise morfológica, uma vez que não incluíam áreas de nervo e osso, indica a dificuldade de estudar histologicamente a integração de tecidos diferentes, no caso, nervo e osso.

O único estudo de implantação de nervo no osso em animal encontrado na literatura é o de Boldrey[64] em 1943, que utilizou o nervo ulnar, sem neuroma, implantado no úmero de quatro cães.

5.2 Análise histológica

Análise dos achados histológicos indica que na primeira semana de implantação do nervo na cavidade óssea houve processo inflamatório perineural rico em neutrófilos, com moderado número de linfócitos e plasmócitos, além do edema. É interessante observar que houve reação periosteal e de neovascularização ao redor no nervo e no seu interior. Na terceira semana o processo inflamatório diminuiu, havendo predomínio de linfócitos e plasmócitos, porém a reação periosteal e a neovascularização se mantiveram e predominaram. A formação de vasos é importante porque permite a nutrição do nervo e sua integração ao osso. As células que promovem a angiogênese e os fatores de crescimento neural são derivados das células tronco mesenquimais da medula óssea[65]. A partir da vigésima quarta semana houve integração do nervo com o periósteo, a cortical e a medular do osso, sem o desenvolvimento de neuroma.

Em 1943, Boldrey[64] implantou o nervo ulnar no terço distal do úmero em cães e realizou análise histológica. Utilizou seis cães adultos e o período estudado foi de 133 a 318 dias. A primeira análise foi realizada após 133 dias de implantação e observou a formação de neuroma pequeno dentro da medular óssea. A segunda análise foi realizada após 262 dias e notou também pequeno neuroma e um cisto ósseo próximo ao local de implantação. A terceira análise, realizada após 276 dias, constatou a formação de um pequeno neuroma dentro da medular óssea. A quarta análise foi realizada após 299 dias e observou a formação de um pequeno neuroma subcortical. Dois animais foram submetidos somente à secção do nervo ulnar, servindo como controles. Esses cães foram analisados após 314 e 318 dias, observando-se a formação de neuroma duas a quatro vezes maior que os implantados (Tabela 10).

Tabela 10 – Resumo das alterações morfológicas observadas no estudo de Boldrey[64] em cães (implantação do nervo ulnar no úmero).

Nº de animais	Tempo de seguimento	Alterações Morfológicas
1	133 dias (19 semanas)	Pequeno neuroma na medular o osso
1	262 dias (37,4 semanas)	Pequeno neuroma e cisto ósseo
1	276 dias (39,4 semanas)	Pequeno neuroma na medular o osso
1	299 dias (42,7 semanas)	Pequeno neuroma no osso subcondral
2 (somente secção do nervo)	314 dias (44,5 semanas) 318 dias (45,4 semanas)	Neuroma maior

Análise comparativa dos resultados do presente estudo com o de Boldrey[64] é muito prejudicada devido às grandes diferenças metodológicas. De qualquer modo, chama a atenção que no estudo de Boldrey[64] houve formação de pequeno neuroma intramedular observado com 133 dias de seguimento (19 semanas), diferente do presente estudo, que mesmo com 28 semanas não houve formação de neuroma.

Zhang et al.[66] demonstraram que o tempo de formação do neuroma de nervo periférico em ratos é de quatro semanas. Nesse estudo utilizou-se 16 ratos submetidos a procedimento operatório em ambos os membros caudais. No membro esquerdo o nervo ciático foi seccionado e o coto proximal implantado na musculatura. No membro direito o nervo ciático também foi seccionado, porém o coto proximal não foi implantado (grupo controle). Após quatro semanas de pós-operatório, os animais foram sacrificados e os cotos proximais do nervo ciático foram analisados por meio de histologia e de métodos eletrofisiológicos. Observaram que o neuroma formou-se somente no lado direito, isto é, quando não houve implantação

do coto nervoso na musculatura, concluindo que a implantação do nervo periférico em músculo pode prevenir a formação do neuroma traumático.

No presente estudo não foi encontrado a formação de neuroma dentro da cavidade óssea, mesmo nos grupos com períodos maiores de observação (6, 13, 24 e 28 semanas). Algumas hipóteses poderiam explicar este fenômeno: 1) alteração do microambiente do nervo após a implantação, ou seja, na região medular do osso pode haver diminuição dos estímulos fisiológicos e bioquímicos que promovem a formação do neuroma; 2) o espaço restrito da região medular óssea permitiria uma orientação no crescimento das fibras nervosas e 3) a cortical óssea funcionaria como epineuro, agindo como barreira para a regeneração dos axônios.

A integração do nervo ao osso, sem a formação do neuroma, poderia, em tese, implicar em alterações na inervação do osso, porém o presente estudo não possui condições de realizar estas análises.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A técnica cirúrgica de implantação do nervo tibial caudal na região distal do fêmur bilateralmente no rato permitiu o desenvolvimento adequado de modelo experimental de implantação de nervo em osso;

- Nas condições deste experimento e no rato, a implantação intraóssea de nervo periférico misto desencadeia processo inflamatório que evolui da fase aguda da inflamação para integração nervo-osso, sem a formação de neuroma.

Referências

7. REFERÊNCIAS

01- Odier L. Manual de medicine pratique. Geneva: JJ Pachoud;1811 .

02- Burchiel KJ, Ochoa J. Surgical management of post-traumatic neuropathic pain. Neurosurgery Clin Am. 1991;2:117-26.

03- Huber CG, Lewis D. Amputation neuromas. Arch Surg.1920;1:85.

04- Sunderland S. Nerves and nerves injuries. London: Churchil Living stone;1993.

05- Atherton DD, Taherzadeh O, Facer P, Elliot D, Anand P. The potential role of nerve growth factor (NGF) in painful neuromas and the mechanism of pain relief by their relocation to muscle. J Hand Surg. 2006;31B:652-6.

06- Gabbiani G, Majno G. Dupuytren's Contracture: Fibroblast Contraction? An ultrastructural study. Am J of Patho.1972;66:131-46.

07- Yuksel F, Kislaoglu E, Durac N, Uçar C, Karacaoglu E. Prevention of painful neuromas by epineural ligatures, flaps and grafts. Br J Plast Surg.1997;50:182-5.

08- Watson J, Gonzalez M, Romero A, Kerns J. Neuromas of the hand and upper extremity. J Hand Surg. 2010;35A:499-510.

09- Lewin-Kowalik J, Marcol W, Kotulska K, Mandera M, Klimczak A. Prevention and management of painful neuroma. Neurol Med Chir. 2006;46:62-8.

10- Nath RK, Mackinnon SE. Management of neuromas in the hand. Hands Clin.1996;12(4):745-56.

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

12- Anand P. Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. British J Anaest.1995;75:201-8.

13- Burchiel KJ, Ochoa JL. Pathophysiology of injured axons. Neurosurg Clin N Am.1991;2:105-16.

14- Schwob JE, Youngentob SL, Meiri KF. On the formation of neuromata in the primary olfactory projection. J Compar Neurol.1994;340:361-80.

15- Ro LS, Chen ST, Jacobs JM. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. Pain.1999;79:265-74.

16- Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. J Neuroscience.1993;13:2136-48.

17- Harpf C, Dabernig J, Humpel C. Receptors for NGF and GDNF are highty expressed in human peripheral nerve neuroma. 2002;25:612-5.

18- Herzberg U, Eliav E, Dorsey JM, Gracely RH, Kopin IJ.NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve.Neuroreport.1997;8:1613-8.

19- Kryger GS, Kryger Z, Zhang F, Shelton D, Lineaweaver WC, Jackson MS et al. Nerve growth factor inhibition prevents traumatic neuroma formation in the rat. J Hand Surgery. 2001;26A:635-644.

20- Dyck PJ, Peroutka S, Rask C. Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans. Neurol.1997;48:501-5.

21- Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. J Pathol. 2002;197:286-92.

22- Toti P, Villanova M, Vatti R. Nerve growth factor expression in human dystrophic muscles. Muscle nerve.2003;27:370-3.

23- Seddon HJ. A classification of nerve injuries. Brithish Med J. 1942;1:237-9.

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

25- Birch R. Nerve repair. In: Wolfe SW, Hitchkiss RN, Pederson WC, Kozin SH. Green's Operative Hand Surgery.6 ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.p.1035-74.

26- Edstrom LE, Karakacaoglu E. Chronic nerve injuries and treatment of neuromas. In: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.p.857-65.

27- Vernadakis AJ, Koch H, Mackinnon SE. Management of neuromas. Clinics in Plast Surg. 2003;30:247-268.

28- Coward K, Plumpton C, Faer P, Birch R, Carlstedt T, Tate S, et al. Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. Pain.2000;85:41-50.

29- Kretschmer T, Nguyen DH, Beuerman RW, Happed LT, England JD, Tiel RL, et al. Painful neuromas: a potential role for a structural transmembrane protein, ankyrin G. J Neurosur. 2002; 97:1424-31.

30- Matzer O, Devor M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive NA+ channels. J Neurophys.1994;72:349-59.

31- Mobbs RJ, Vonau M, Blum P. Treatment of painful peripheral neuroma by vein implantation. J Clin Neuro. 2003;10(3):338-339.

32- Sood MK, Elliot D. Treatment of painful neuromas of the hand and wrist by relocation into the pronador quadratus muscle. J Hand Surg. 1998;23B:214-19.

33- Stokvis A, Ruijs AC, Van Neck JW, Coert JH. Cold intolerance in surgically treated neuroma patients: a prospective follow-up study. J Hand Surg. 2009;34A:1689-1695.

34- Thomas AJ, Bull MJ, Howard AC , Saleh M. Peri operative ultrasound guided needle localization of amputation stump neuroma. Inter J Care Injured. 1999;30:689-691.

35- Snyder C. The surgical handling of tissue. In: Am Assoc Equine Prac; 1961 Dec; Fort Worth Texas: Proceedings of the Seventh Annual Convention;1961.

36- Herndon JH, Eaton RG, Littler JW. Management of painful neuromas in the hand. Journal Bone joint Surgery.1976;58A(3):369-73.

37- Bierman,W. Ultrasound in the treatment of scars. Arch Phys Med Rehab. 1954;35:209-13.

38- Uygur F, Sener G. Application of ultrasound in neuromas: experience with seven below-knee stumps. Physiotherapy. 1985;81:758-62.

39- Richards JS, Kogos Jr SC, Ness TJ, Oleson CV. Effects of smoking on neuropathic pain in two people with spinal cord injury. J Spinal Cord Med.2005;28:330-2.

40- Stokvis A, Avoort DJ, Van Neck JW, Hovius SER , Coert JH. Surgical management of neuroma pain: a prospective follow-up study. Pain. 2010;151:862-869.

41- Kirvelã O, Nieminen S. Treatment of painful neuromas with neurolytic blockade. Pain. 1990;41:161-165.

42- Robbins TH. The response of tender neuromas and scars to triamcinolone injections. J Plastic Surg. 1977;30:68-69.

43- Masquelet AC, Bellivet C, Nordin JY. Traitement des névromes douloureux à la main par enfouissement intra-osseux. Ann Chir Main.1987;6:64-66.

44- Burchiel KJ, Johans Tj, Ochoa J. The surgical treatment of painful traumatic neuromas. J Neurosur.1993;15:105-15.

45- Dellon AL, Mackinnon SE. Treatment of the painful neuroma by neuroma resection and muscle implantation. Plas Reconst Surg.1986;77:427-36.

46- Evans GRD, Dellon Al. Implantation of the palmar cutaneous branch of the median nerve into the pronador quadratus for treatment of painful neuroma. J Hand Surg.1994;19A:203-6.

47- Laborde KJ, Kalisman M, Tsai TM. Results of surgical treatment of painful neuromas of the hand. J Hand Surg.1982;7:190-3.

48- Mackinnon SE, Dellon AL, Hudson AR, Hunter DA. Alteration of neuroma formation by manipulation of this microenvironment. Plas Reconst Surg.1985;76:345-52.

49- Moszkowicz W. Zur behandlung der schmerzhaften neuroma. Zentralblat fur Chirurgie.1918;45:547.

50- Tupper JW, Oakland C, Booth DM. Treatment of painful neuromas of sensory nerves in the hand: a comparison of traditional and newer methods. J Hand Surg. 1976;1(2):144-151.

51- Lundborg G. Tubular repair of nerves. In: Saffar P, Amadio PC, Foucher G. Current practice in hand surgery. London, Martin Dunitz, 1997:161-9.

52- Atherton DD, Fabre J, Anand P, Elliot D. Recolocation of painful neuromas in zone III of the hand and forearm. J Hand Surg.2008;33(2):155-62.

53- Calteaux N, Bins EJ, Schoofs M, Coninck A. Utilisation d'um segment veineux dans la reparation des nerfs peripheriques. Ann Chir Main.1984;3:149-55.

54- Chiu DTW, Strauch B. A prospective evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. Plast Recons Surg.1990;86:928-34.

55- Rice DH, Berstein FD, The use of autogenous vein for nerve grafting. Head Neck Surg.1984;92:410-12.

56- Tang JB, Gu YQ, Song YS. Repair of digital nerve defect with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2. J Hand Surg.1993;18B:449-53.

57- Goldstein SA, Sturim H. Intraosseous nerve transposition for treatment of painful neuromas. J Hand Surg.1985;10A:270-274.

58- Gorkish K, Boese-Landgraf J, Vaubel E. Treatment and prevention of amputation neuromas in hand surgery. Plastic Reconst Surg. 1984;73:293-299.

59- Hazari A, Elliot D. Treatment of end-in-continuity and scarred nerves of the digits by proximal relocation. J Hand Surg. 2004; 29B(4):338-350.

60- Hebert TJ, Filan SL. Vein implantation for treatment of painful cutaneous neuromas. J Hand Surg. 1998; 23B(2):220-224.

61- Mass DP, Ciano MC, Tortosa R, Newmeyer WL, Kilgore ES. Treatment of painful hand neuromas by their transfer into bone. Plast and reconst surg.1984;74(2):182-185.

62- Nath RK, Mackinnon SE. Management of neuromas in the hand. Hands Clin.1996;12(4):745-756.

63- Wood VE, Mudge K. Treatment of neuromas about a major amputation stump. J Hand Surgery.1987;12A:302-306.

64- Boldrey E. Amputation neuroma in nerves implanted in bone. Ann Surg. 1943;118:1052-1057.

65- Walsh DA, McWilliams DF, Turley MJ, Dixon MR, Francès RE, Mapp PI , et al. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Rheumatology.2010;49:1852-1861.

66- Zhang B, Guo Y, Liang Y. Experimental study on prevention and treatment of neuroma by implanting nerve stump into muscle. Zhongguo Xiu Fu.1997;11(6):325-327.

Artigo de Orinal

Estudo Histológico de Implantação de Nervo Periférico no Osso

D. Varanda

Department of Surgery and Orthopaedics, Botucatu Medical School, UNESP, Brazil

T. Sardenberg

Department of Surgery and Orthopaedics, Botucatu Medical School, UNESP, Brazil

M.A.C. Domingues

Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP, Brazil

E.V.P. Ortolan

Department of Surgery and Orthopaedics, Botucatu Medical School, UNESP, Brazil

Abstract

There are several surgical techniques for treatment of painful neuroma. However no consensus has already been reached on the most effective treatment. Burying the neuroma or the nerve in the bone is one of the surgeries which provides good clinical findings. However, there is no deep knowledge of what happens to the nerve or buried neuroma in the bone. The objectives of this study were to develop an experimental model of this surgical technique and to morphologically analyze the destiny of the implanted nerve in the bone. A total of twenty rats underwent implantation of the caudal tibial nerve in the distal third of the femur. They were histologically studied in the periods of 1, 3, 6, 13 and 24 by optical microscopy. The analyses of the images showed that implantation of the nerve in the bone triggers an inflammatory response which evolves from the acute phase to the nerve-bone integration with no formation of neuroma.

Key words - neuroma, implantation, bone, nerve

Introdução

A incidência dos neuromas sintomáticos está estimada em aproximadamente 3 a 5% de todos os pacientes com lesão de nervo periférico (Sunderland, 1993).

A implantação do neuroma ou do coto terminal do nervo no osso é um dos tratamentos cirúrgicos de sucesso relatado na literatura (Goldstein e Sturim 1984; Mass et al., 1984; Masquelet et al., 1985; Hazari and Elliot, 2004). Revisão da literatura sobre o destino do neuroma ou do nervo implantado no osso demonstrou somente um estudo experimental realizado em seis cães no ano de 1943 (Boldrey, 1943).

Os objetivos do presente estudo foram padronizar modelo experimental de implantação de nervo em osso no rato e avaliar o destino da relação nervo/osso.

Materiais e métodos

O estudo foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Instituição.

20 ratos adultos machos da raça Rattus novergicus albinus, linhagem Wistar, foram submetidos à implantação do nervo tibial caudal no fêmur distal em ambos os membros caudais. Os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com o tempo de seguimento (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos experimentais, número de animais e tempo de seguimento.

Grupo	Número de animais	Follow-up (semanas)
I	4	1
II	4	3
III	4	6
IV	4	13
V	4	24

Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico a 3% (30 mg/Kg) via intraperitoneal. Realizado acesso dorsal na coxa, exposição e secção distal do nervo tibial caudal. Perfuração com broca de 1,5 mm da cortical dorsal do fêmur distal e implantação do nervo tibial caudal, fixando-o com ponto simples entre o epineuro e periósteo com fio de nylon 8-0. Fechamento da pele com fio de nylon 4-0 (Figura 1).

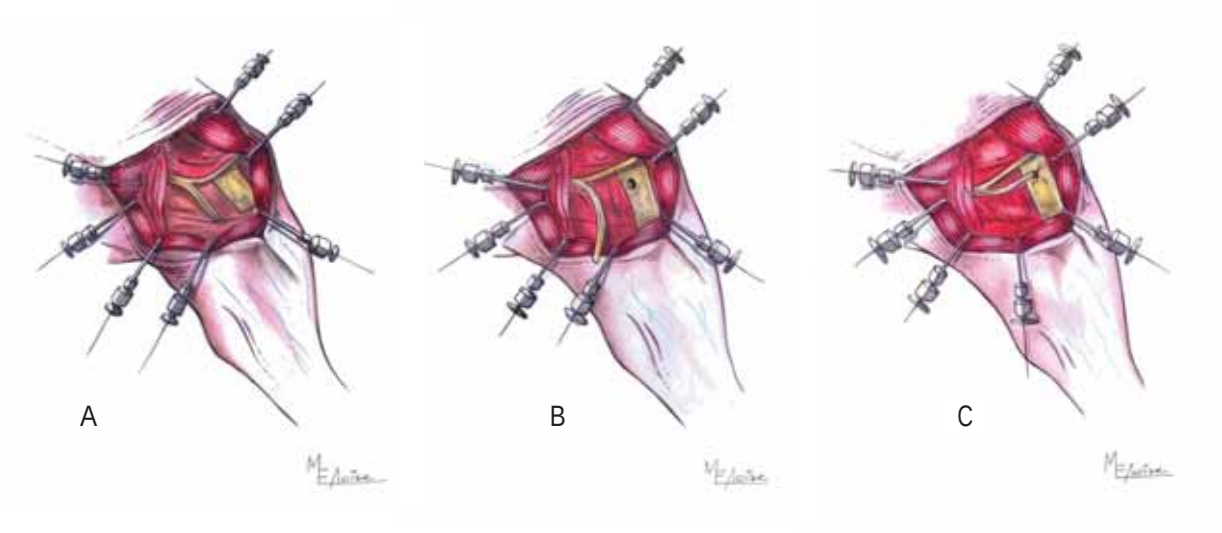


Figura 1. A – Exposição do nervo ciático e suas divisões (nervo tibial caudal e nervo fibular caudal) e do fêmur. B – Secção do nervo tibial caudal e perfuração do fêmur.

C – Implantação do nervo tibial caudal no fêmur.

Seguimento pós-operatório

Diariamente os animais foram observados clinicamente em relação às condições gerais de saúde e, em relação à ferida cirúrgica, à marcha e à presença de lesões no tegumento dos membros caudais.

Sacrifício dos animais de preparação dos tecidos

Os animais foram sacrificados com 1, 3, 6, 13 e 24 semanas após a operação com injeção intraperitoneal de anestésico. O fêmur distal foi retirado junto com parte da musculatura da coxa, fixado em solução de formalina a 10% e

descalcificado em solução de ácidos nítrico e bórico. Os cortes histológicos foram de 4mm no plano sagital e corados com hematoxilina e eosina.

Resultados

Observações clinicas

Todos os animais permaneceram em bom estado geral de saúde e sem infecções. Houve paralisia parcial de ambos os membros caudais, dificultando a marcha dos animais. Não se observaram lesões do tegumento dos membros caudais.

Observações histológicas

Grupo I (1semana)

Houve processo inflamatório intenso, com predomínio de neutrófilos e plamócitos, presença de edema moderado e intensa reação periosteal com proliferação incipiente de vasos (Figura 2).

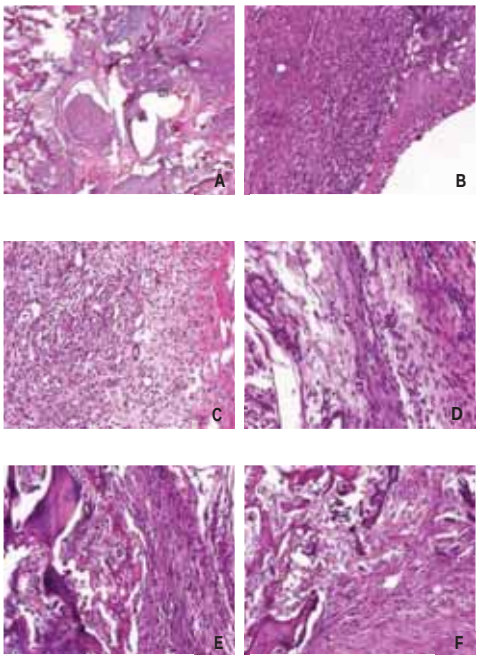


Figure 2. Primeira Semana. A: Posição do nervo dentro do espaço ósseo. Aumento de 10X, H.E; B: Processo inflamatório intenso com neutrófilos. Aumento de 10X, H.E; C e D: Processo inflamatório com linfócitos, plasmócitos e vasos. Aumento de 20X, H.E; E e F: Reação periosteal intensa . Aumento de 20X, H.E.

Grupo II (3 semanas)

Observou-se manutenção do processo inflamatório, porém com menor intensidade e predomínio de linfócitos e plasmócitos. O edema permaneceu semelhante e houve aumento da neovascularização e da reação periosteal (Figura 3).

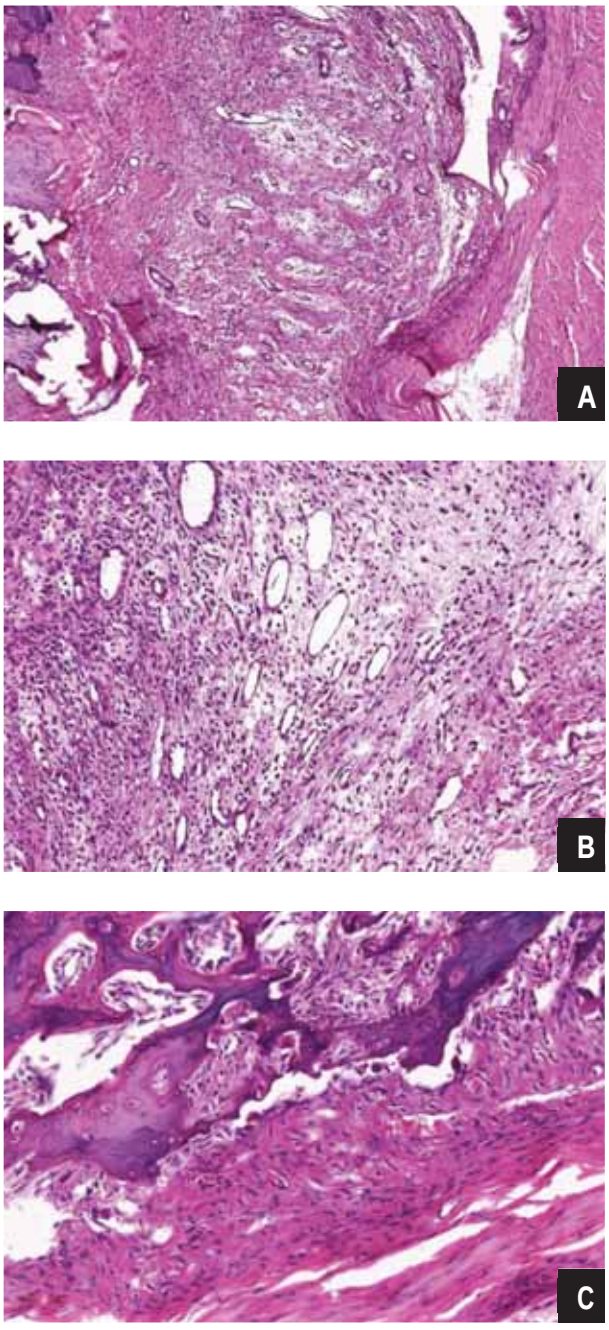


Figura 3. Terceira Semana. A: Proliferação vascular e reação periosteal intensa. Aumento 10 X e 20X, H.E; B: Processo inflamatório (tecido de granulação) e edema moderados. Aumento 20X, H.E; C: Reação periosteal intensa. Aumento 20X, H.E.

Grupo III (6 semanas)

Notou-se diminuição do processo inflamatório, manutenção da reação periosteal e da neovascularização, porém com menor intensidade (Figure 4).

Grupo IV (13 semanas)

Houve manutenção da reação periosteal e da neovascularização. O processo inflamatório está quase inexistente (Figura 4).

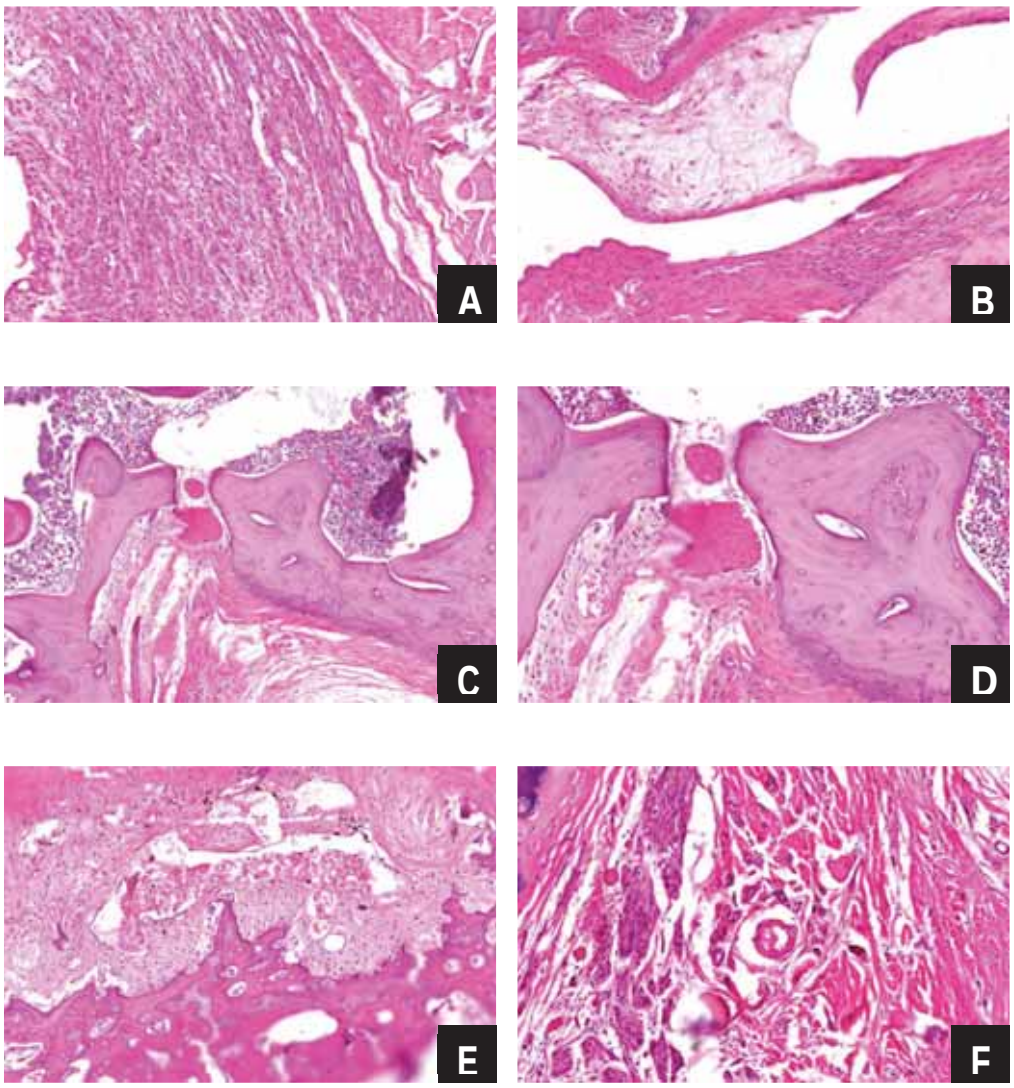


Figura 4. Sexta Semana. A e B: Reação inflamatória com pouca intensidade. Aumento 20X, H.E. Décima terceira semana. C, D, E F: Proliferação de vasos e reação periosteal moderados. Aumento 20X, H.E.

Grupo V (24 semanas)

Observou-se integração do nervo com o osso cortical e medular. Não há processo inflamatório. Não se observou presença de neuroma (Figura 5).

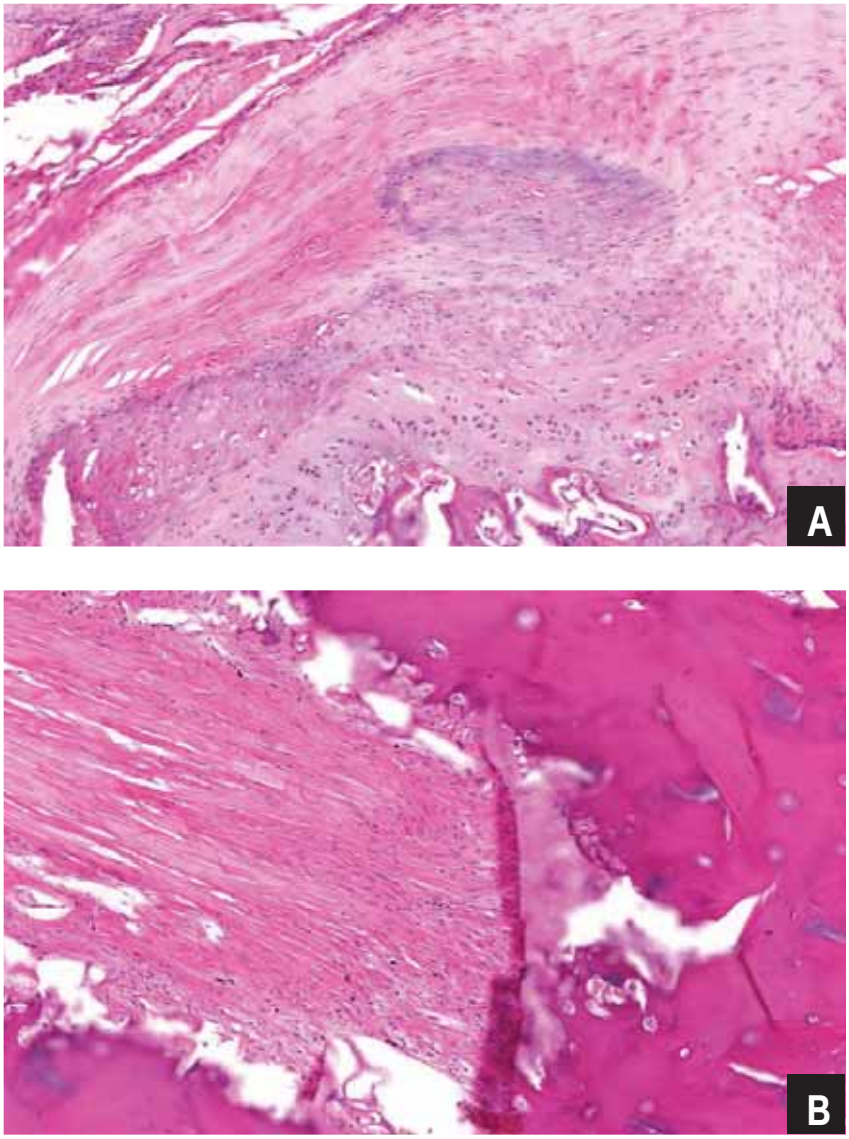


Figura 5. Vigésima quarta e vigésima oitava semanas. A e B: Integração nervo-osso, sem sinais de neuromas. Aumento 20X, H.E.

Discussão

Na primeira semana de implantação do nervo na cavidade óssea houve processo inflamatório perineural rico em neutrófilos, com moderada quantidade de linfócitos e plasmócitos, além do edema. É interessante observar que houve reação

periosteal e de neovascularização ao redor no nervo e no seu interior. Na terceira semana o processo inflamatório diminuiu, havendo predomínio de linfócitos e plasmócitos, porém a reação periosteal e a neovascularização se mantiveram e predominaram. A formação de vasos é importante porque permite a nutrição do nervo e sua integração ao osso. As células que promovem a angiogênese e os fatores de crescimento neural são derivados das células tronco mesenquimais da medula óssea (Wash et al., 2010). A partir da vigésima quarta semana houve integração do nervo com o periósteo, a cortical e a medular do osso. Não ocorreu a formação de neuroma.

Boldrey (1943) implantou o nervo ulnar no terço distal do úmero em 4 cães e realizou análise histológica no período de 133 a 318 dias, observando a formação de pequeno neuroma na medular do osso e no osso subcortical, próximo um cisto ósseo; em 2 cães, somente ressecou o nervo e observou, após 314 e 318 dias, neuroma duas a quatro vezes maior que os implantados. Apesar das diferenças metodológicas, chama a atenção que no estudo de Boldrey (1943) houve formação de pequeno neuroma intramedular, observado com 133 dias de seguimento (19 semanas), diferente do presente estudo, que mesmo com 24 semanas não houve formação neuroma. De qualquer modo, a colocação do nervo dentro do osso preveniu a formação de neuroma de maior dimensão ou impediu a sua formação. Zhang et al. (1997) em estudo com nervo ciático do rato observou que a implantação do nervo na musculara previne a formação de neuroma.

No presente estudo não foi encontrado neuroma dentro da cavidade óssea, mesmo nos grupos com períodos maiores de observação (6,13 e 24 semanas). Algumas hipóteses poderiam explicar este fenômeno: 1) alteração do microambiente do nervo após a implantação, ou seja, na região medular do osso pode haver diminuição dos estímulos fisiológicos e bioquímicos que promovem a formação do neuroma; 2) o espaço restrito da medula óssea permitiria uma orientação no crescimento das fibras nervosas e 3) a cortical óssea funcionaria como epineuro, agindo como barreira para a regeneração dos axônios.

Referências

Boldrey E. Amputation neuroma in nerves implanted in bone. Ann Surg. 1943;118:1052-7.

Goldstein SA, Sturim H. Intraosseous nerve transposition for treatment of painful neuromas. J Hand Surg.1985;10A:270-4.

Hazari A, Elliot D. Treatment of end-in-continuity and scarred nerves of the digits by proximal relocation. J Hand Surg. 2004; 29B(4):338-50.

Masquelet AC, Bellivet C, Nordin JY. Traitement des névromes douloureux à la main par enfouissement intra-osseux. Ann Chir Main.1987;6:64-6.

Mass DP, Ciano MC, Tortosa R, Newmeyer WL, Kilgore ES. Treatment of painful hand neuromas by their transfer into bone. Plast and reconst surg.1984;74(2):182-5.

Sunderland S. Nerves and nerves injuries. London: Churchil Living stone;1993.

Walsh DA, McWilliams DF, Turley MJ, Dixon MR, Francès RE, Mapp PI , et al. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Rheumatology.2010;49:1852-61

Zhang B, Guo Y, Liang Y. Experimental study on prevention and treatment of neuroma by implanting nerve stump into muscle. Zhongguo Xiu Fu.1997;11(6):325-7.