

Fábio José Reis

**“Neurorrafia término-lateral com neurotização muscular
direta associada à neurorrafia término-terminal,
visando à recuperação funcional do músculo alvo.
Estudo em ratos”**

TESE DE DOUTORADO

Botucatu

2010

Fábio José Reis

**“Neurorrafia término-lateral com neurotização muscular
direta associada à neurorrafia término-terminal,
visando à recuperação funcional do músculo alvo.
Estudo em ratos”**

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

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

Botucatu

2010

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

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Reis, Fábio José.

Neurrorrafia término-lateral com neurotização muscular direta associada à neurrorrafia término-terminal, visando à recuperação funcional do músculo alvo. Estudo em ratos / Fábio José Reis. – Botucatu : [s.n.], 2010. End-to-side neurrorrhaphy with direct muscle neurotization and end-to-end neurrorrhaphy in the recovery of target muscle. Study in rats .

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Fausto Viterbo
Assunto CAPES: 40102017

1. Nervos - Enxerto - Estudos experimentais 2. Músculos 3. Neurrorrafia

CDD 617.483

Palavras chave: Enxerto; Nervo periférico; Neurrorrafia término-lateral; Neurotização muscular; Ratos

Key words: Direct muscle neurotization; End-to-side neurrorrhaphy; Graft; Peripheral nerve; Rats

Àquela que é a razão de minha existência: minha filha Mariana.

À minha esposa Ana, por todo carinho, compreensão e incentivo.

*Aos meus Pais, que me deram a vida e cultivaram em mim o valor
do trabalho árduo e da atenção ao detalhe.*

*Ao meu irmão Fred, pois juntos aprendemos a ver onde
nada parecia ser visível,
a compreender o silêncio,
e agir no lugar de apenas
sentir dor.*

*Ao Mestre, Professor Fausto Viterbo, por sua generosidade intelectual
e por compartilhar comigo
a arte da pesquisa.*

À Deus por ter me dado saúde, paz e tranquilidade.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Departamentos de Cirurgia e Ortopedia e de Urologia pelo apoio logístico.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Regina, Nathanael, Janete, Lilian e Andréa.

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

À Selma Maria de Jesus pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos funcionários do GAP – Grupo de Apoio à Pesquisa, em especial ao Hélio.

À todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial à Maria Cecília por me ensinar a técnica de neurorrafia, e à Irene e ao Edinelson pelo auxílio técnico durante as cirurgias.

À todos os funcionários do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial ao José Lucas de Carvalho pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

Às colegas do curso de Pós-Graduação, Suzana Fabíola Mueller, Adriana Maria Romão e em especial à Elisângela Jeronymo Stipp Brambilla, por todos os momentos que passamos juntos.

Um agradecimento especial às muitas pessoas que, de diferentes maneiras, sabem que foram importantes, em minha vida, para a realização deste trabalho, um projeto idealizado e realizado, a partir do desejo incessante pela busca do conhecimento.

À Todos

Meu Muito Obrigado!

Aprender é a única coisa

de que a mente

nunca se cansa,

nunca tem medo e

nunca se arrepende.

Leonardo Da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Anatomia do nervo periférico	18
1.2 Lesões no nervo periférico	19
1.3 Regeneração do nervo periférico	21
1.4 Tratamentos cirúrgicos no nervo periférico	23
2. OBJETIVO	39
3. MÉTODO	40
3.1 Animais	40
3.2 Grupos experimentais	40
3.3 Procedimentos cirúrgicos	42
3.4 Avaliação da marcha	50
3.5 Estudos eletrofisiológicos	53
3.6 Coleta do material para preparação histológica	55
3.7 Massa do músculo tibial cranial	56
3.8 Processamento histológico do músculo tibial cranial	57
3.9 Processamento histológico dos segmentos de nervos	59
3.10 Análise estatística	64
4. RESULTADOS	65

4.1	Análise da massa corporal inicial e final dos animais	65
4.2	Teste de avaliação da marcha	66
4.3	Teste eletrofisiológico	68
4.4	Análise da massa do músculo tibial cranial	70
4.5	Análise morfométrica do músculo tibial cranial	72
4.6	Análise morfológica do músculo tibial cranial	75
4.7	Análise morfométrica do segmento de nervo N1	77
4.8	Análise morfológica do segmento de nervo N1	81
4.9	Análise morfométrica do segmento de nervo N3	84
4.10	Análise morfológica do segmento de nervo N3	89
4.11	Análise morfométrica do segmento de nervo N5	89
4.12	Análise morfológica do segmento de nervo N5	94
4.13	Análise morfométrica do segmento de nervo N7	95
4.14	Análise morfológica do segmento de nervo N7	99
5.	DISCUSSÃO	101
5.1	Análise da massa corporal	108
5.2	Análise da marcha	109
5.3	Análise eletrofisiológica	112
5.4	Análise do músculo tibial cranial	114
5.4.1	Massa do músculo tibial cranial	114
5.4.2	Análise morfométrica do músculo tibial cranial	116
5.4.3	Análise morfológica do músculo tibial cranial	118
5.5	Análise dos segmentos de nervos N1, N3, N5 e N7	119
5.5.1	Análise do segmento de nervo N1	120
5.5.2	Análise do segmento de nervo N3.....	122

5.5.3 Análise do segmento de nervo N5.....	123
5.5.4 Análise do segmento de nervo N7.....	124
5.6 Considerações finais.....	125
6. CONCLUSÕES.....	132
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
8. ANEXO	155

RESUMO

As injúrias aos nervos periféricos levam à perda parcial ou total da função sensorial e ou motora, determinando aos indivíduos, prejuízos emocionais, sociais e financeiros. Apesar de existirem diversos métodos microcirúrgicos para a reparação destas áreas desnervadas, apenas uma recuperação limitada pode ser obtida. Deste modo, nosso objetivo foi avaliar se a associação de duas técnicas de reparo nervoso, um enxerto de nervo com neurorrafia término-lateral (NTL) e neurotização muscular direta (NMD) associados a uma neurorrafia término-terminal (NTT), podem superar o reparo funcional insatisfatório obtido com as diferentes técnicas empregadas isoladamente; se a utilização de outra via de reinervação poderia prejudicar a recuperação funcional obtida apenas com a NTT; se a associação de dois enxertos poderia aumentar a taxa de recuperação funcional obtida com um enxerto. Para tanto, foram utilizados 140 ratos machos Wistar, divididos em 7 grupos: G1 - Normal; G2 - Desnervado; G3 - NTT; G4 - NTT + enxerto simples (NTL e NMD); G5 - NTT + enxerto duplo; G6 - enxerto simples; G7 - enxerto duplo. O nervo fibular foi seccionado e imediatamente após, foi realizada a NTT. Os enxertos foram realizados com segmentos do nervo sural, coletados para esse propósito. O segmento do nervo sural teve seu coto proximal suturado por NTL à lateral do nervo tibial, sem janela epineural, e seu coto distal implantado no músculo tibial cranial, através de NMD. Após 6 meses, foi realizada a avaliação funcional da marcha, estudo eletrofisiológico, avaliação da massa do músculo tibial cranial (MTC), avaliação histológica do músculo e dos segmentos do nervo fibular e dos enxertos. Os resultados foram submetidos à ANOVA e, se detectada diferença estatística, ao teste de Tukey. Na avaliação funcional da marcha não houve diferenças estatísticas entre os grupos G1 (normal), G3, G4 e G5. O grupo G7 alcançou um índice funcional maior que os grupos G2 (desnervado) e G6, porém menor que dos grupos G1, G3, G4 e G5. Nos testes eletrofisiológicos de latência e amplitude, não houve diferença entre os grupos G3, G4, G5 e G7. Entretanto obtiveram resultados significativamente maiores que o grupo G2 (desnervado) e menores que o grupo G1 (normal). Na avaliação da massa do MTC os grupos G3, G4 e G5 foram semelhantes, porém com massa menor que o grupo G1 (normal). Os grupos G6 e G7 apresentaram massa significativamente menor que a média dos grupos G3, G4 e G5, entretanto apresentaram massas significativamente maiores que o grupo G2 (desnervado). Estes dados indicam que enxertos de nervo adicionais com NTL e NMD associados à NTT, não aumentaram a recuperação funcional muscular; enxertos de nervo adicionais, criando novas vias de regeneração, associados à NTT não prejudicaram a regeneração e ou recuperação funcional alcançada por esta última (NTT); a utilização de apenas um enxerto de nervo com NTL e NMD permitiu a reinervação muscular; a utilização de dois enxertos de nervo com NTL e NMD foram superiores, quando comparados com apenas um enxerto, na reinervação muscular.

Palavras chave: Enxerto; Nervo periférico; Neurorrafia término-lateral; Neurotização muscular; Ratos

ABSTRACT

The injuries to peripheral nerves causes total or subtotal loss of sensory and/or motor function, with social and financial problems. In spite of different microsurgical techniques, the results of peripheral nerve repair have today reached a plateau where functional recovery is still unsatisfactory. We tested the efficacy of association of two microsurgical techniques, end-to-side neurorrhaphy (ESN) and direct muscle neurotization (DMN), with nerve graft, and end-to-end neurorrhaphy (EEN) to functional recovery of desnerved muscle; if the other offer to reinnervation could affect the functional recovery of EEN; if the association of two nerves grafts could increase the functional recovery achieved with one nerve graft. 140 rats, male, Wistar, were divided into seven groups: G1 - normal; G2 - desnerved; G3 - end-to-end neurorrhaphy (EEN); G4 - EEN + single graft (ESN and DMN); G5 - EEN + double graft; G6 - single graft; G7 - double graft. The peroneal nerve was transected and immediately re-anastomosed with EEN. The grafts were making with the sural nerve. The proximal stump of sural nerve was sutured to the tibial nerve with ESN, without epineural window. The distal stump was implanted into the lateral head of the tibial cranial muscle (TCM). After six months, the animals were subjected to Walking Tracks Analysis, electrophysiologic tests, sacrificed, and the muscles and nerves of interest were taken to examination. There aren't differences significant to functional evaluating among groups G1 (normal), G3, G4 and G5. The group G7 had better recovery than G6 and G2 (desnerved), however worst than G1, G3, G4 and G5. In the electrophysiologic tests, there wasn't differences among G3, G4, G5 and G7. However, were better than G2, and worst than G1. In the mass of tibial cranial muscle, there weren't difference among G3, G4 and G5, however lower than G1. The mass of muscle of groups G6 and G7 were lower than G3, G4 and G5, however higher than G2. The data indicate that the additional nerve grafts with ESN and DMN in association EEN doesn't improve the functional recovery of muscle; the additional nerve grafts in association with EEN doesn't damage the functional recovery of EEN; the one nerve graft achieved the reinnervated the TCM; the use of two nerve grafts were better than one graft, to reinnervated the TCM.

Key words: Direct muscle neurotization; End-to-side neurorrhaphy; Graft; Peripheral nerve; Rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da cirurgia no G 1	44
Figura 2: Esquema da cirurgia no G 2	44
Figura 3: Esquema da cirurgia no G 3	45
Figura 4: Esquema da cirurgia no G 4	46
Figura 5: Esquema da cirurgia no G 5	47
Figura 6: Esquema da cirurgia no G 6	48
Figura 7: Esquema da cirurgia no G 7	49
Figura 8: Avaliação da Marcha: Walking Track Analysis	51
Figura 9: Esquema da análise das pegadas	52
Figura 10: Exemplo de impressões das pegadas	53
Figura 11: Eletromiógrafo Sapphire II 4ME; posicionamento dos eletrodos	55
Figura 12: Segmentos dos nervos N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 e músculo tibial cranial	56
Figura 13: Exemplo de cinco fibras musculares em uma mesma lâmina	58
Figura 14: Sequência do processamento histológico dos nervos N1, N3, N5 e N7	61
Figura 15: Massas iniciais e finais dos animais	65
Figura 16: Índice Funcional do Ciático	67
Figura 17: Eletrofisiologia – Latência	69
Figura 18: Eletrofisiologia – Amplitude	69
Figura 19: Massa do músculo tibial cranial direito	71
Figura 20: Área das fibras musculares	73

Figura 21: Diâmetro mínimo das fibras musculares.....	74
Figura 22: Cortes histológicos das fibras do músculo tibial cranial direito	76
Figura 23: Densidade axonal no segmento de nervo N1	77
Figura 24: Área dos axônios no segmento de nervo N1	79
Figura 25: Diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N1	80
Figura 26: Área da bainha de mielina no segmento de nervo N1	81
Figura 27: Cortes histológicos das fibras axoniais no segmento de nervo N1	83
Figura 28: Densidade axonal no segmento de nervo N3	84
Figura 29: Área dos axônios no segmento de nervo N3	86
Figura 30: Diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N3	86
Figura 31: Área da bainha de mielina no segmento de nervo N3	88
Figura 32: Cortes histológicos das fibras axoniais no segmento de nervo N3	90
Figura 33: Densidade axonal no segmento de nervo N5	91
Figura 34: Área dos axônios no segmento de nervo N5	92
Figura 35: Diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N5	92
Figura 36: Área da bainha de mielina no segmento de nervo N5	93
Figura 37: Cortes histológicos das fibras axoniais no segmento de nervo N5	95
Figura 38: Densidade axonal no segmento de nervo N7	96
Figura 39: Área dos axônios no segmento de nervo N7	97
Figura 40: Diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N7	97
Figura 41: Área da bainha de mielina no segmento de nervo N7	98
Figura 42: Cortes histológicos das fibras axoniais no segmento de nervo N7	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massas iniciais e finais dos animais	66
Tabela 2: Índice funcional do nervo ciático	67
Tabela 3: Eletrofisiologia – amplitude e latência	70
Tabela 4: Massa do músculo tibial cranial direito	72
Tabela 5: Fibras do músculo tibial cranial direito - área e diâmetro mínimo	74
Tabela 6: Segmento de nervo N1- densidade axonal	78
Tabela 7: Segmento de nervo N1 - área e diâmetro mínimo dos axônios	80
Tabela 8: Segmento de nervo N1 - área da bainha de mielina	82
Tabela 9: Segmento de nervo N3 - densidade axonal	85
Tabela 10: Segmento de nervo N3 - área e diâmetro mínimo dos axônios	87
Tabela 11: Segmento de nervo N3 - área da bainha de mielina	88
Tabela 12: Segmento de nervo N5 - densidade axonal	91
Tabela 13: Segmento de nervo N5 - área e diâmetro mínimo dos axônios	93
Tabela 14: Segmento de nervo N5 - área da bainha de mielina	94
Tabela 15: Segmento de nervo N7- densidade axonal	96
Tabela 16: Segmento de nervo N7 - área e diâmetro mínimo dos axônios	98
Tabela 17: Segmento de nervo N7 - área da bainha de mielina	99
Tabela 18: Coletânea dos resultados de todas as análises	126

INTRODUÇÃO

Anatomia do nervo periférico

Durante o desenvolvimento embrionário, cada motoneurônio da coluna espinal emite prolongamentos que percorrem grandes distâncias até alcançarem seus alvos distais (Brown et al., 1981). Após o processo de crescimento e maturação, o neurônio apresenta-se com uma estrutura esquemática predominante: corpo celular, prolongamento desse corpo celular, denominado de axônio e vários dendritos (Schmidt, 1979).

Ao redor do axônio encontra-se uma camada de células de Schwann, as quais podem apresentar-se de duas formas: as formadoras de bainha de mielina e as não formadoras da bainha de mielina (Frostick & Kemp, 1998). A presença ou ausência da bainha de mielina classifica as fibras nervosas em mielínicas ou amielínicas (Hollinshead & Rose 1991; Erhart, 1992).

Uma fibra nervosa é formada por um axônio envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo, o endoneuro, constituído de fibras colágenas tipo III (Da-Silva, 1995b), fibroblastos destituídos de membrana basal, células de Schwann, mastócitos e células endoteliais (Da-Silva, 1995a). As fibrilas colagenosas endoneurais, encontradas ao redor da fibra nervosa, formam os tubos endoneurais (Lundborg, 1987).

O conjunto de fibras nervosas, envolvidos por tecido conjuntivo dos tipos I e III e fibroblastos dispostos em lamelas concêntricas, dão origem aos fascículos (Montes et al. 1984; Lundborg, 1987). Este envoltório, denominado perineuro,

constitui uma barreira química-mecânica às substâncias difusíveis e às lesões externas, mantendo o microambiente intrafascicular (Olsson & Kristensson, 1973).

Finalmente, o conjunto de fascículos de fibras nervosas envolvidas pelo epineuro, forma um nervo misto (Erhart, 1965). O epineuro é um tecido ricamente vascularizado, onde se encontram fibroblastos organizados em camadas concêntricas e separados por fibras colágenas dispostas longitudinalmente, macrófagos e mastócitos (Lundborg, 1987).

Lesões no nervo periférico

Devido à atividade metabólica do neurônio estar situada no seu corpo celular, as estruturas axoniais periféricas são dependentes da continuidade e integridade das partes centrais (Lundborg, 1987). Segundo Grafstein (1975), as injúrias que acometem os nervos periféricos usualmente provocam alterações na estrutura, metabolismo e atividade fisiológica do corpo celular neuronal, podendo interromper a inervação dos órgãos distas à lesão.

As lesões que ocorrem nos troncos nervosos foram inicialmente classificadas por Seddon (1943) em três níveis: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. Em 1951 Sunderland, baseado na anatomia dos vários tecidos que compõem o tronco nervoso, subdividiu esta classificação em lesões do Tipo I, II, III, IV e V.

Na neuropraxia (Seddon, 1943), ou lesão do Tipo I (Sundeland, 1951), ocorre bloqueio da condução do impulso nervoso devido à injúria que ocorre exclusivamente na bainha de mielina do nervo (Ferreira, 1999). A continuidade dos axônios, excitabilidade da fibra nervosa e a integridade dos órgãos distais à lesão estão preservadas (Lundborg, 1987). Devido a estas características, a

recuperação funcional pode ocorrer espontaneamente, variando de dias a semanas (Watson-Jones, 1976; Dimeglio, 1990).

Na axoniotmese (Seddon, 1943) ou lesão do Tipo II (Sundeland, 1951), ocorre perda da condução do impulso nervoso no sítio da injúria e no segmento distal do nervo, porém o tubo endoneural estaria preservado (O'Sullivan & Schmitz, 1993). Neste caso, a recuperação funcional dos alvos distais pode ocorrer, porém em um tempo maior do que para as lesões do Tipo I, devido à preservação dos tubos endoneurais (Lundborg, 1987; Dimeglio, 1990).

Na neurotmese (Seddon, 1943) ocorre a transecção total do tronco nervoso. Sunderland (1951) subdividiu a neurotmese de acordo com o envolvimento anatômico do nervo, ou seja, lesão envolvendo tubos endoneurais, perineuro ou epineuro (Lundborg, 1987).

Nas lesões do tipo III, o endoneuro é comprometido, estando preservados o perineuro e a bainha de mielina. Deste modo a lesão fica limitada ao fascículo. O brotamento axonal que segue por tubos endoneurais diferentes dos originais, assim como a fibrose intrafascicular, pode dificultar a recuperação funcional.

Nas lesões do tipo IV ocorre a interrupção dos fascículos, devido ao comprometimento do endoneuro e do perineuro. Apenas o epineuro permanece preservado. O brotamento axonal pode ocupar tubos endoneurais diferentes ou espaços interfasciculares, levando a uma recuperação parcial.

Nas lesões do tipo V ocorre a transecção total do tronco nervoso, envolvendo tubos endoneurais, perineuro e epineuro. Neste caso é necessário reparo cirúrgico, obtendo-se apenas uma recuperação limitada da área desnervada (Watson-Jones, 1976; Kimura, 1987).

Regeneração do nervo periférico

Após a lesão do nervo periférico, ocorrem no segmento distal à lesão, em alguns nodos terminais do coto proximal, e também no corpo celular do neurônio, alterações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas (Ide, 1982; Fu & Gordon, 1997; Ferreira, 1999; Junqueira & Carneiro, 1999). Esta série de alterações, relatadas inicialmente por Waller em 1850, e posteriormente por Ranvier em 1878 e Ramon-y-Cajal em 1928, os quais descreveram a degeneração da bainha de mielina (Koeppen, 2004), foram coletivamente denominadas de degeneração “Walleriana”, sendo que constituem uma forma de estabelecer o meio adequado à regeneração dos axônios (DeMedinaceli & Merle, 1991; Fu & Gordon, 1997). O processo de degeneração Walleriana é dependente de diversos fatores como a espécie animal (Lubinska, 1975; Chaudhry et al., 1992); a idade dos animais (Chaudhry et al., 1992; Verdú et al., 1995); tipo de fibra nervosa, ou seja, mielínica ou amielínica (Lubinska, 1975; Martinez & Canavarro, 2000); e tipo de lesão (Gold et al., 1992).

Imediatamente após a secção de um nervo, os cotos, proximal e distal, retraem-se alguns milímetros, porém há uma permanência do fluxo axoplasmático provocando o vazamento de material intracelular. Subseqüentemente ocorre uma fusão da membrana axonal na superfície da secção, isolando o axoplasma do material extracelular. As extremidades, proximal e distal, ficam edemaciadas devido à persistência do fluxo axoplasmático (Burt, 1995).

Segundo Ide (1996) e Frisén (1997), o decréscimo dos fatores derivados do tecido alvo, assim como, a síntese de determinadas proteínas denominadas de “regenerinas”, por células não necessariamente neuronais (Kanje, 1992), que

alcançariam o corpo celular através de transporte retrógrado, seriam fundamentais para o início do processo de regeneração.

No corpo celular do neurônio ocorre a migração do núcleo para a periferia, assim como alterações no citoplasma caracterizadas pela fragmentação em pequenos grumos dos corpúsculos de Nissl e por um intumescimento do soma, denominadas de cromatólise (Junqueira & Carneiro, 1999). Essas reações provavelmente representem alterações metabólicas ligadas à síntese protéica (Fawcett & Keynes, 1990). Segundo Fu & Gordon (1997), nesta fase o neurônio deixa de transmitir impulsos nervosos, passando a desenvolver a função de crescimento.

A degeneração do coto proximal estende-se até o primeiro nodo de Ranvier proximal à lesão, para posteriormente iniciar a formação de numerosos brotos colaterais e terminais, que avançam distalmente (Lundborg, 1987; Da-Silva, 1995). Os brotos colaterais exteriorizam-se a partir dos nodos de Ranvier próximos à lesão (Hopkins & Slack, 1981).

Na extremidade distal dos brotos de crescimento há expansões filiformes, ou seja, cones de crescimento que exploram o ambiente da área lesionada (Ferreira, 1999). Esses cones de crescimento são direcionados por uma quimiotaxia à substratos com certa adesividade, sendo que as propriedades químicas e físicas destes substratos são essenciais para o avanço dos cones de crescimento (Lundborg, 1987).

No segmento distal à lesão inicia-se um processo autolítico, com tumefação e lise mitocondrial, desintegração de microtúbulos e neurofilamentos, intumescimento axoplasmático e finalmente a fragmentação do axônio (Schlaepfer & Micko, 1978). Ocorre principalmente uma migração de macrófagos,

e em menor quantidade, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (Mueller et al., 2003), os quais promovem a remoção do debris, ou seja, dos restos de mielina (Perrin et al., 2005).

A perda da continuidade axonal é seguida de proliferação de células de Schwann, as quais se alinham em colunas formando as bandas de Bungner (Koeppen, 2004), sendo estas fundamentais para o crescimento axonal (Bunge, 1881; Ide et al., 1990; Ide, 1996). À medida que os axônios entram em contato com as células de Schwann, inicia-se a formação da bainha de mielina ao redor dos prolongamentos axoniais (Oliveira, 1996).

Com o passar do tempo, o número de brotos axoniais diminui continuamente. Esta redução ocorre à medida que as fibras pioneiras vão estabelecendo conexões com o órgão alvo, passando por um processo de maturação. Os brotos que não estabelecem tais conexões desaparecem, ocorrendo uma redução do número de axônios que brotaram inicialmente (Lundborg, 1987).

Tratamento cirúrgico das lesões de nervos

Entre os anos de 850 a 932, Rhazes fez o primeiro relato sobre a sutura de um nervo periférico. Porém, foi atribuído a William de Saliceto (1210-1277) o primeiro registro de uma neurorrafia (Terzis et al., 1997).

Entretanto, somente em 1964 foi introduzido o uso do microscópio para melhor visualização e auxílio nas técnicas cirúrgicas, possibilitando a obtenção de melhores resultados funcionais (Smith, 1964).

Segundo Watchmaker & MacKinnon (1997), o sucesso de um reparo cirúrgico de nervo periférico é dependente de alguns fatores como: utilização de

equipamentos como lupa ou microscópio e materiais cirúrgicos adequados; conhecimento da técnica microcirúrgica; reparo primário sempre que possível; reparo secundário realizado dentro de até três semanas após a lesão; aproximação dos cotos sem tensão na linha de sutura; na presença de perda de tecido nervoso (“gap”), deve-se interpor entre os cotos um enxerto; e realizar educação sensitiva e motora para obtenção de melhores resultados.

Atualmente, várias formas de tratamento podem ser utilizadas para o reparo das lesões que acometem os troncos de nervos, possibilitando assim uma recuperação funcional, mesmo que parcial, de áreas desnervadas.

Neurorrafia término-terminal

Quando se dispõem dos cotos, proximal e distal, do nervo seccionado, pode ser realizado o reparo cirúrgico através da neurorrafia término-terminal, ou seja, uma sutura direta entre os cotos. Neste processo realiza-se a aproximação dos condutos do epineuro possibilitando a regeneração das fibras nervosas através da lesão (Edshage, 1964; Bora Junior, 1978). Neste tipo de reparo pode-se realizar a sutura epineural, um processo relativamente atraumático, porém que não assegura a correta orientação fascicular interna do nervo, podendo prejudicar a regeneração nervosa (Edshage, 1964; Lundborg, 1987). Para se obter uma melhor orientação fascicular, pode ser realizada a sutura perineural ou fascicular. Nesta técnica realiza-se a dissecação dos grupos fasciculares de ambos os cotos nervosos e as estruturas fasciculares são então suturadas individualmente, obtendo a correta orientação e adaptação dos fascículos (Stopliglia & Erhart, 1987). Entretanto a ressecção do tecido epineural para a exposição dos fascículos leva a um prejuízo do suprimento vascular do nervo (Bora, 1967) e a

formação de um tecido cicatricial prejudicando o processo de regeneração (Lundborg, 1987).

Estes dois tipos de sutura podem ser associados em um mesmo procedimento, ou seja, uma sutura epiperineural (Ferreira et al., 1974; Venault et al., 1981). Alguns estudos comparando as duas técnicas de sutura não demonstraram diferenças significativas entre elas (Kline et al., 1981; Braun, 1982).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que uma possível tensão na linha de sutura pode prejudicar a microcirculação intraneural ou possibilitar a formação de fibrose, prejudicando a regeneração axonal (Sunderland, 1978; Lundborg, 1987). Deste modo, a neurorrafia término-terminal é indicada nos casos em que não ocorre perda de tecido nervoso (Braun, 1982).

Neurorrafia látero-terminal

Com relação ao método citado anteriormente, a presença do coto proximal é essencial para a reparação de lesões de nervos. Entretanto, algumas situações podem não apresentar o coto proximal, impossibilitando a cirurgia de reparo através da neurorrafia término-terminal. Para estes casos, sacrificava-se um nervo de menor importância, com o objetivo de fornecer axônios para a reinervação de outro nervo de maior importância. Este procedimento pode ser exemplificado no tratamento da paralisia facial, no qual se secciona o nervo hipoglosso e o coto proximal deste é suturado no coto distal do nervo facial. Entretanto, este procedimento apresenta como conseqüências, prejuízos funcionais às estruturas inervadas pelo nervo doador, ou seja, nervo hipoglosso, como atrofia da metade da língua (Forte et al., 1999; Bersaneti, 2001).

Com o objetivo de evitar tais prejuízos ao nervo doador, Ballance et al. (1903) introduziram a técnica da neurografia término-lateral no tratamento da paralisia facial. Neste caso os autores suturaram o coto distal do nervo facial, após sua secção, lateralmente ao nervo acessório. Entretanto, não obtiveram um resultado satisfatório, pois os movimentos da face ficaram associados aos movimentos do ombro.

Após este trabalho, vários outros foram realizados com resultados satisfatórios. Spiller et al. (1906) suturaram o nervo mediano ao nervo ulnar e Tunstall & Taylor (1906) suturaram o nervo poplíteo externo à face lateral do nervo poplíteo interno. Ao contrário, outros autores obtiveram resultados insatisfatórios (Yang, 1903; Kennedy, 1905; Tubby, 1906). Segundo Sherren (1906), nestes procedimentos realizava-se uma incisão no nervo doador, permanecendo íntegro apenas o epineuro do lado oposto à neurografia, possibilitando assim o contato direto entre os axônios dos dois nervos. Esta “lesão” no nervo doador provocava prejuízos às estruturas por ele inervadas. Babcock (1927), baseado neste fato sugeriu o abandono da neurografia término-lateral.

Com o intuito de reduzir os efeitos negativos no nervo doador, Krivolutskaia et al. (1989) e May et al. (1991) empregaram respectivamente a neurografia término-lateral com escarificação e a incisão parcial no nervo doador, favorecendo o brotamento axonal do nervo doador para o nervo receptor.

Em trabalho experimental pioneiro, Viterbo et al. (1992a) introduziram um novo procedimento para a reparação de nervos periféricos: a neurografia látero-terminal sem incisão no nervo doador, evitando desta forma prejuízo a este nervo. Neste trabalho, após a secção do nervo fibular, seu o coto distal foi suturado à

face lateral do nervo tibial intacto, sem a remoção do epineuro. Deste modo não houve prejuízo ao nervo doador e nem às estruturas por ele inervadas. Estes autores observaram que a presença do epineuro não impediu a regeneração axonal do nervo doador para o nervo receptor suturado lateralmente.

Diversos trabalhos foram realizados para o estudo desta nova técnica de neurorrafia látero-terminal, sendo os resultados experimentais promissores (Noah et al., 1997a; Zhao et al., 1997; Giovanoli et al., 2000; Papalia et al., 2001).

O crescimento axonal do nervo doador para o interior do nervo receptor foi demonstrado através de observações histológicas, eletrofisiológicas e exames ultra-estruturais, após a neurorrafia término-lateral sem remoção do epineuro (Noah et al., 1997a; Zhao et al., 1997). Diferentes métodos de pesquisa também confirmaram a validade desta técnica (Viterbo, 1992b; Lundborg et al., 1994a; McCallister et al., 1999).

Viterbo et al. (1994a) demonstraram que após seis meses, a neurorrafia látero-terminal possibilita o crescimento axonal do nervo doador para o interior do coto distal do nervo receptor, recuperando as estruturas anteriormente desnervadas, sem prejuízos tanto à função do nervo doador como das estruturas por ele inervadas.

Entretanto, a coaptação nervosa após uma neurorrafia término-lateral pode causar uma desnervação aguda no músculo inervado pelo nervo doador, porém após seis meses a estrutura e função deste músculo encontram-se recuperadas (Cederna et al., 2001). Segundo Frey et al. (1998), neste músculo pode ocorrer uma remodelação compensatória na sua unidade motora, a qual seria responsável pela manutenção da força de contração, após uma neurorrafia término-lateral.

A eficácia da neurografia término-lateral para a reinervação de músculos desnervados foi demonstrada em diversos estudos (McCallister et al., 1999; Cederna et al., 2001; Papalia et al., 2001). Com modelo experimental em coelhos, Ross (1995) demonstrou a reinervação muscular de uma área desnervada, após a realização de neurografia término-lateral. Viterbo et al. (1995) também obtiveram resultado eletrofisiológico utilizando a neurografia término-lateral para o tratamento de avulsão do plexo braquial, no qual o nervo frênico serviu como doador de axônios.

Liu et al. (1999) demonstraram aumento na força de contração muscular e no peso do músculo de ratos com lesões nervosas, que foram submetidos à neurografia término-lateral, quando comparados com animais que apresentavam áreas desnervadas, porém não submetidos ao processo de reparação. Por meio de avaliação funcional, eletrofisiológica e histológica, Tarasidis et al. (1997) estudaram o grau de reinervação e recuperação funcional em ratos submetidos à neurografia término-lateral, e observaram predominância de reinervação sensitiva. Entretanto, uma recuperação motora também pode ser observada após a neurografia término-lateral com incisão perineural em um modelo animal no qual se utilizou o nervo ulnar ou radial como doador e o nervo mediano como receptor (Lutz et al., 2000).

Vários trabalhos foram realizados comparando as técnicas de neurografia término-terminal e neurografia término-lateral. Yuksel et al. (1999) e Zhao et al. (1997) observaram melhor regeneração em animais submetidos à neurografia término-terminal. Quanto à recuperação da função muscular, Kallianen & Kuzon (1997) concluíram que ambos os métodos são igualmente eficazes.

Utilizando modelo experimental em ratos, Lohman et al. (1997) encontraram resultados semelhantes entre os animais submetidos à neurorrafia término-terminal e término-lateral e ambos os grupos tiveram a condução nervosa restaurada. Kalliainen et al. (1999) avaliaram a força de contração muscular do músculo extensor longo dos dedos de ratos que foram submetidos às neurorrafias término-terminal e término-lateral, e não observaram diferença significativa entre os dois grupos. Entretanto encontraram maior massa muscular e menor porcentagem de fibras atrofiadas nos músculos dos animais submetidos à neurorrafia término-terminal.

Diversos estudos, utilizando como técnica reparadora a neurorrafia término-lateral, demonstraram que existe um brotamento axonal oriundo do nervo intacto para dentro do enxerto nervoso autogênico. Este brotamento colateral pode ser devido a uma regeneração axonal pós-lesão ocorrida durante o procedimento da neurorrafia término-lateral (Lundborg et al., 1994; Noah, et al., 1997b; Matsumoto et al., 1999).

Entretanto, Reis (1999) uniu o enxerto de nervo sural à face lateral do nervo vago utilizando adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente (produzido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, UNESP/Botucatu). Neste modelo experimental, este autor eliminou a possibilidade de lesão no nervo doador, uma vez que não utilizou sutura entre o coto receptor e a face lateral do nervo doador. Mesmo assim, verificou crescimento axonal oriundo do nervo doador, atingindo o coto do enxerto.

Uma possível explicação para a regeneração axonal após a neurorrafia término-lateral pode ser a produção de fatores de crescimento do nervo após a coaptação nervosa, os quais estimulariam os neurônios. Este contato direto entre

o coto nervoso e o nervo intacto parece ser um pré-requisito para a reinervação, pois permite a interação das células de Schwann entre os dois nervos, aumentando a produção de fatores de crescimento, induzindo e direcionando o brotamento axonal para dentro do enxerto (Liu et al., 1999).

Com relação à neurografia término-lateral, há discussão na literatura referente à nomenclatura deste procedimento. Ballance et al. (1903) descreveram o procedimento realizado como sendo neurografia término-lateral. Papalia et al. (2007) definem a neurografia término-lateral como sendo a sutura do coto do nervo seccionado ao epineuro do nervo doador intacto, sem divisão de partes de seus axônios.

Entretanto Viterbo et al. (1992a) utilizam o termo neurografia látero-terminal, o qual é também encontrado em outros trabalhos (Gatta, 1938; Viterbo et al., 1992b; Viterbo et al., 1993; Viterbo et al., 1994a). O termo neurografia látero-terminal foi primeiramente utilizado por Gatta em 1938. Papalia et al. (2001), publicaram um trabalho experimental utilizando o termo neurografia término-lateral, porém estes autores relatam na discussão do trabalho que o termo correto seria neurografia látero-terminal.

Viterbo et al. (1994c) descrevem um modelo experimental no qual o nervo peroneal é seccionado e seus cotos, proximal e distal, são suturados na musculatura adjacente, causando desnervação do músculo tibial cranial. Para a reinervação deste músculo, os autores utilizaram enxerto conectando o nervo tibial intacto ao segmento distal do nervo peroneal previamente seccionado. Para tanto, realizaram a abertura de janela epineural na face lateral do nervo tibial, o qual serviu como doador de axônios, e na face lateral do segmento distal do nervo peroneal. No nervo tibial, foi suturado o coto proximal do enxerto. O coto distal, ou

terminal, do enxerto foi suturado na face lateral do segmento distal do nervo peroneal. Os autores relataram crescimento axonal oriundo do nervo doador, atravessando toda a extensão do enxerto e reinervando o músculo tibial cranial. Assim, na conexão entre o nervo doador e o coto proximal do enxerto, observa-se crescimento axonal no sentido do nervo doador para o enxerto, caracterizando a neurografia látero-terminal. A segunda conexão, ou seja, entre o coto terminal do enxerto e a face lateral do nervo peroneal, observa-se crescimento axonal do enxerto para o nervo peroneal, caracterizando a neurografia término-lateral. Deste modo, observa-se que o sentido do crescimento axonal, após a coaptação dos segmentos de nervos, pode indicar a correta nomenclatura dos procedimentos.

Neurotização muscular direta

Em algumas situações pode ocorrer uma perda extensa da conexão entre o nervo periférico e seu músculo correspondente, devido a uma destruição traumática do nervo e ou da região neural do músculo. Nestes casos as técnicas citadas anteriormente não podem ser utilizadas para restabelecer a inervação muscular, uma vez que não se dispõem do coto distal.

O reparo cirúrgico utilizado nestes tipos de lesões pode ser a neurotização muscular direta (NMD), método citado por Heineke em 1914 (abud Papalia et al., 2001) e por Steindler (1915).

O procedimento consiste na realização de uma pequena fenda no músculo desnervado, na qual será implantado o mais profundo possível o coto proximal do nervo seccionado, possibilitando a interface nervo-músculo, com o objetivo de fornecer nova inervação a este músculo. O coto proximal é ancorado ao músculo por meio de uma sutura entre o epineuro e a fáscia muscular, objetivando evitar a

sua regressão e ou movimentação (Brunelli, 1982). Quando se dispõem do coto proximal com perda da região neural do músculo e um extenso espaço entre o coto proximal e o músculo, realiza-se a neurotização muscular direta através de enxerto de um segmento de nervo, interpondo o coto proximal do nervo seccionado e o próprio músculo (McNamara et al., 1987; Brunelli, & Brunelli, 1993).

A investigação através de microscopia eletrônica, na área muscular próxima ao implante nervoso, evidenciou a formação de novas placas motoras. Nesta mesma região, a maioria das fibras musculares apresentava características de normalidade (Brunelli, 1982).

McNamara et al. (1987) compararam a neurotização muscular direta (NMD) com a neurorafia término-lateral e um enxerto de nervo em um “gap”. As três técnicas evidenciaram algum grau de recuperação da função neuromuscular. A NMD foi a técnica que apresentou menor índice de recuperação da força de contração muscular. Após dois meses da cirurgia de reparo, nenhuma das três técnicas evidenciou recuperação funcional significativa, comparado ao controle. Entretanto, após quatro meses, na estimulação com frequência de 8 Hz e voltagem de 10 mV, a neurorafia possibilitou a recuperação da capacidade de produzir tensão, equivalente ao controle, sendo de $9,19 \pm 1,13$ e $9,42 \pm 2,27$ respectivamente. O grupo reparado por enxerto de nervo no gap atingiu uma tensão média de $6,34 \pm 2,31$, enquanto o grupo da NMD atingiu $2,67 \pm 0,87$.

Alguns relatos clínicos, no qual a neurotização muscular direta foi empregada como forma de reparo cirúrgico para músculos desnervados, demonstraram resultados satisfatórios (Brunelli, 1982; Mackinnon et al., 1993).

Enxerto de nervo

Nas lesões onde ocorre a perda de tecido nervoso com conseqüente formação de um “gap”, impossibilitando a aproximação dos cotos proximal e distal, e realização de uma neurorrafia término-terminal, pode ser indicada a utilização de enxertos de segmentos de nervo sensitivo, entre os dois cotos (Seddon, 1963; Millesi, 1986).

Em casos específicos nos quais ocorre perda, tanto da região neural do músculo como do segmento proximal do nervo lesionado, pode-se utilizar enxerto de nervo, sendo este suturado a um nervo vizinho por neurorrafia término-lateral e seu o coto distal implantado no músculo desnervado através de uma neurotização muscular direta (Papalia et al., 2001).

Os primeiros estudos sobre os enxertos nervosos autogênicos foram realizados por Philipeaux (1863) e Vulpian (1870) (Abud Dellon & Lee Dellon, 1993), a partir de experimentos com cachorros. Na realização de enxertos autogênicos, normalmente utiliza-se um nervo sensitivo para a substituição do nervo lesado, sendo o nervo sural o mais utilizado (Bunnell, 1927; Millesi, 1982; Viterbo et al., 1993a). Segundo Seddon (1947), os enxertos devem ter um diâmetro semelhante ou menor que o nervo receptor, evitando assim a necrose central deste. Entretanto Fawcett & Keynes (1990) relataram que a remoção de um segmento do nervo doador induz um prejuízo à área desnervada, uma vez que se observa perda da sensibilidade desta região. Porém, uma neurorrafia término-lateral entre o coto distal do nervo doador do enxerto e a lateral de um nervo íntegro devolve a sensibilidade perdida nesta região (Viterbo et al. 1993).

Os enxertos simples são utilizados em leitos receptores altamente vascularizados. Em regiões pobremente vascularizadas (Dói et al., 1987;

Boorman & Sykes, 1987; Breidenbach, 1988), assim como em lesões com “gap” acima de seis centímetros de comprimento (Dói et al., 1992), é indicada a utilização de enxertos nervosos vascularizados. A utilização de enxerto vascularizado melhora a taxa de regeneração e maturação axonal, quando comparado com o enxerto simples (Koshima & Harii, 1981). Entretanto, em leitos vascularizados, Dói et al. (1992) não observaram diferenças significativas entre os dois tipos de enxertos.

Tubulização

Outra alternativa para o reparo de “gap” é a utilização de tubos interligando os cotos, proximal e distal (Mackinnon et al., 1985; Mackinnon & Dellon, 1990). Vários materiais sintéticos ou biodegradáveis, combinados ou não com agentes bioquímicos neurotróficos podem, assim como artérias e veias autólogas podem ser empregados para este procedimento (Weiss & Taylor 1946; Matson et al. 1948; Lundborg et al., 1982; Chiu et al., 1982; Dahlin et al., 1987; Fields et al., 1989; Mackinnon & Dellon, 1990; Shirley et al., 1996; Gilchrist et al., 1998).

Lundborg et al. (1982) utilizaram tubos de silicone para unir cotos de nervos periféricos com espaços intersegmentares de 6, 10 e 15 mm, em trabalho experimental. Os tubos foram colocados de duas formas distintas: sistema proximal-distal (os cotos proximal e distal foram introduzidos nas extremidades do tubo) e o sistema proximal-aberto (apenas o coto proximal foi introduzido no tubo). No espaço intersegmentar de seis milímetros o nervo regenerado cresceu através do tubo, atingindo o coto distal, nos dois grupos. No espaço de 10 mm, houve crescimento total no sistema proximal-distal e crescimento parcial no sistema

proximal-aberto. No espaço de 15 mm não houve regeneração em nenhum dos grupos.

Em outro trabalho experimental, Kiotani et al. (1996) avaliaram e regeneração axonal em espaço intersegmentar de 25 mm. Os autores utilizaram tubo biodegradável composto de malha de colágeno-ácido poliglicólico preenchido com fatores neurotróficos, possibilitando a regeneração de fibras nervosas, as quais foram encontradas no interior do tubo após cinco meses de pós-operatório. Em espaços intersegmentares de 30 mm, a utilização de tubo artificial microporoso, constituído de filamentos de “chitosan” e ácido poliglicólico (PGA), foi eficaz no reparo do nervo periférico (Wang et al., 2005).

Limitações do reparo cirúrgico

Algumas lesões que acometem o sistema nervoso periférico podem levar ao desenvolvimento progressivo de deformidades músculo-esqueléticas. As deformidades são causadas, segundo Salter (1985), por alguns fatores como desequilíbrio muscular, contratura muscular ou atrofia muscular podendo induzir retardo no crescimento ósseo. Durante a vida adulta, as lesões nervosas periféricas podem influenciar tanto os aspectos sociais como profissionais do indivíduo, repercutindo sobre serviços de saúde, organismos de previdência pública e privada, com elevados custos sociais e econômicos (Mendes, 2003).

Segundo Kessler (1932), a evolução de uma incapacidade motora, gerada após a lesão de nervos periféricos, pode ser resumida na seguinte seqüência: lesão nervosa, período de inatividade motora pós-lesão concomitante ao tratamento da injúria, retorno ao trabalho, período de consolidação e período de adaptação e reabilitação. Deste modo, o futuro do indivíduo, ou seja, sua

reconstrução emocional, social e financeira está diretamente relacionada com o grau da lesão nervosa, assim como com a extensão da perda funcional que pode permanecer mesmo após o processo de reparo.

Considerando as etapas sumarizadas por Kessler, o sucesso do tratamento a ser instituído é de considerável importância na recuperação da área lesionada.

Esta possível recuperação funcional obtida após o reparo cirúrgico de um nervo lesionado pode ter como base a notável característica de crescimento observada nos neurônios durante o desenvolvimento embrionário, a qual também pode ser vista em motoneurônios adultos (Edds, 1953; Brown et al., 1981). Entretanto, este processo de regeneração pode ser influenciado por diversos fatores, como o tipo de fibra nervosa (Fu & Gordon, 1997), o tipo de lesão (Schaumburg, 1993), a distância entre os cotos, proximal e distal, chamado de “gap” (Hall, 1997), a técnica de reparo adotada (Watchmaker & Mackinnon, 1997; Vicente, 1999) e a idade do paciente (Fawcett, 1992; Verdú et al., 1995).

O tempo de desnervação muscular também pode influenciar o processo de regeneração nervosa e a recuperação funcional do músculo desnervado. Em algumas situações, o tempo elevado de desnervação muscular pode induzir atrofia irreversíveis (Viterbo et al., 1989). Após um período de dois anos de desnervação, as fibras musculares podem sofrer uma atrofia severa, resultando em um processo de fragmentação das mesmas (Lundborg, 1987). Segundo Daniel & Terzis (1977), após a atrofia muscular definitiva induzida por um longo período de desnervação, a recuperação funcional somente seria possível com o processo de reparo mediante transplantes musculares.

Apesar de existirem diversos métodos de técnicas cirúrgicas para o reparo de uma transecção total do tronco nervoso, apenas uma recuperação limitada da

área desnervada pode ser obtida (Watson-Jones, 1976). Segundo Daniel & Terzis (1977), nos casos de avulsão do plexo braquial, paralisias faciais com conseqüente incapacidade de contração dos músculos da face e em lesões de nervos motores de membros inferiores, a reparação exclusiva dos nervos normalmente leva a resultados insatisfatórios.

Viterbo (1992) observou que a resposta muscular à estimulação elétrica do músculo tibial cranial de ratos submetidos à neurorrafia término-lateral, foi menor do que no grupo controle de normalidade. No teste eletrofisiológico, a resposta muscular foi de 90% nos animais submetidos à neurorrafia término-lateral com remoção do epineuro no nervo doador, enquanto que nos animais em que não houve remoção do epineuro para a realização da neurorrafia, a resposta muscular foi de 75%, quando comparados com seus respectivos controles. Com relação à área e o diâmetro mínimo das fibras musculares, este autor observou uma diminuição destes parâmetros quando comparados com os músculos controles.

Entretanto Viterbo et al. (1998) compararam a neurorrafia término-lateral com e sem remoção do epineuro. Após seis de meses de pós-operatório, as avaliações histológicas foram realizadas a partir de cortes longitudinais no local da neurorrafia término-lateral e transversais no nervo receptor. Estes autores observaram brotamento lateral e desaparecimento do epineuro e perineuro no local da sutura em ambos os grupos, não encontrando diferença estatisticamente significativa na análise eletrofisiológica, como também nas características morfológicas, entre os grupos estudados.

Em todos os trabalhos citados anteriormente, os autores sempre observaram que tanto em animais jovens como em adultos ocorreu apenas uma

recuperação limitada do músculo desnervado, quando comparado com os animais controles, demonstrando as limitações funcionais das técnicas cirúrgicas.

Nos casos de lesões de nervos onde estão presentes os cotos, proximal e distal, a neurorrafia término-terminal seria o procedimento de escolha. Porém, devido à recuperação limitada observada também com esta técnica, a associação de outras técnicas cirúrgicas possibilitariam um aumento na taxa de recuperação da função muscular? Ou esta associação poderia ser prejudicial ao processo de regeneração que pode ser alcançado com a NTT?

OBJETIVO

1. Avaliar se a associação de uma neurorrafia término-terminal entre os cotos proximal e distal de um nervo lesionado, e mais um enxerto de nervo entre um nervo íntegro e o mesmo músculo desnervado, como segunda via de reinervação, poderiam aumentar a taxa de recuperação funcional obtida com as técnicas empregadas separadamente.
2. Avaliar se a utilização de outra via de reinervação poderia prejudicar a recuperação funcional obtida com a neurorrafia término-terminal.
3. Avaliar se, nos casos de avulsão do nervo com conseqüente destruição da região neural do músculo desnervado, a associação de dois enxertos entre um nervo doador e o músculo desnervado poderia aumentar a taxa de recuperação funcional obtida com um enxerto.

MÉTODO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia e Ortopedia (cirurgias, avaliação da marcha, coleta das peças para histologia e sacrifício dos animais) e no Laboratório de Urologia (avaliação eletrofisiológica, preparo e leitura das lâminas histológicas), ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Todos os procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob o protocolo nº 407.

3.1. Animais

Foram utilizados 140 ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com massa inicial, em média de 193,04 (\pm 21,9) g, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu/SP.

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em sete grupos experimentais de 20 ratos cada, os quais foram selecionados por meio de sorteio. Para tanto, foram confeccionadas sete fichas identificadas como G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7. Uma vez selecionado o animal, foi sorteada uma ficha, definindo a qual grupo pertenceria o animal.

Os grupos foram os seguintes:

G1 – Grupo NORMAL: Foi realizada cirurgia para exposição e dissecação dos nervos fibular, tibial e cutâneo caudal da sura. Neste grupo não foi realizada nenhuma neurografia, sendo então finalizada a cirurgia (Fig. 1).

G2 – Grupo DESNERVADO: O nervo fibular foi seccionado e seu coto proximal foi encurvado 100° e introduzido no interior do músculo adutor. O coto distal também foi introduzido no interior do músculo adutor, porém em sentido contrário (Fig. 2).

G3 – Grupo NTT (neurografia término-terminal): O nervo fibular foi seccionado aproximadamente 10 mm após a trifurcação do nervo ciático e em seguida seu coto distal foi suturado ao coto proximal deste mesmo nervo, através de uma neurografia término-terminal (Fig. 3).

G4 – Grupo NTT + 1 ENX (enxerto): Foi realizado o mesmo procedimento do grupo G3. Em adição, foi realizado um enxerto com segmento do nervo cutâneo caudal da sura, lateralmente ao nervo tibial, através de neurografia término-lateral, à aproximadamente cinco milímetros após a trifurcação do nervo ciático. A extremidade livre do enxerto foi introduzida no músculo tibial cranial do mesmo lado, perfazendo uma neurotização muscular direta (NMD) (Fig. 4).

G5 – Grupo NTT + 2 ENX: Foram realizados os mesmos procedimentos do grupo G4. Em adição foi realizado mais um enxerto, com uma distância de aproximadamente 10 mm do primeiro enxerto, na região distal à primeira NTL (Fig. 5).

G6 – Grupo 1 ENX: O nervo fibular foi seccionado na mesma região onde foi realizada a NTT no grupo G3. O coto proximal deste nervo foi curvado 100° e introduzido no interior do músculo adutor. O coto distal também foi introduzido no interior do músculo adutor, porém em sentido contrário. Foi realizado um enxerto

com um segmento do nervo cutâneo caudal da sura, à aproximadamente cinco milímetros após a trifurcação do nervo ciático, lateralmente ao nervo tibial, através de neurorafia término-lateral. A extremidade livre do enxerto foi introduzida no músculo tibial cranial do mesmo lado, perfazendo uma neurotização muscular direta (NMD) (Fig. 6).

G7 – Grupo 2 ENX: Foram realizados os mesmos procedimentos do grupo G6. Em adição, foi realizado mais um enxerto, como descrito para o grupo G5, com uma distância de aproximadamente 10 mm entre os enxertos, na região distal à primeira NTL (Fig. 7).

3.3. Procedimentos cirúrgicos

Os animais tiveram seus pesos aferidos e posteriormente foram anestesiados com pentobarbital sódico (Nembutal[®]) intraperitoneal, na dose de 30mg/kg de peso. Foi realizada tosquia na face dorsal posterior dos membros pélvicos do lado direito e esquerdo. O animal foi imobilizado em decúbito ventral sobre uma placa de cortiça, através da fixação de suas quatro patas com fita adesiva e alfinete. A anti-sepsia da área cirúrgica foi realizada com solução detergente de PVPI a 10% (1% de iodo ativo).

O procedimento operatório teve início com incisão longitudinal de aproximadamente três centímetros na face dorsal do membro posterior direito, atingindo pele e tecido celular subcutâneo. O músculo bíceps femural foi divulgionado, possibilitando a dissecação cuidadosa do nervo ciático e seus ramos, ou seja, nervo fibular, nervo tibial e nervo cutâneo caudal da sura em uma extensão de aproximadamente três centímetros, utilizando-se para este

procedimento um microscópio DF Vasconcelos com 16 aumentos. O mesmo procedimento foi realizado no membro posterior esquerdo.

Em todos os animais foi retirado um segmento de três centímetros do nervo cutâneo caudal da sura, em ambos os membros posteriores. O segmento obtido no membro direito foi posteriormente utilizado para a realização do enxerto entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial, nos grupos G4, G5, G6 e G7. O segmento obtido no membro esquerdo foi utilizado para a realização do segundo enxerto nos grupos G5 e G7. Em adição, nos demais grupos, os segmentos para os enxertos foram retirados, porém os enxertos não foram realizados. Nesta fase cirúrgica foi realizado o sorteio para definição de qual grupo experimental pertenceria o animal, ou seja, antes da realização das neurorrafias e enxertos. Após o sorteio foram realizados os procedimentos descritos a seguir.

No grupo G1, controle de normalidade, realizou-se apenas a exposição da área cirúrgica, dissecação dos nervos e remoção dos segmentos para enxertos. Nenhum outro procedimento relacionado às neurorrafias foi realizado (Fig. 1).

No grupo G2, controle de desnervação, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o grupo G1. Em adição, o nervo fibular foi seccionado a aproximadamente um centímetro para a distal da trifurcação do nervo ciático, de tal forma que se obteve dois cotos, um proximal e um distal. O coto proximal foi curvado em cerca de 100° e fixado no músculo adutor com um ponto de fio polipropileno 7-0. O coto distal foi curvado em cerca de 100° e introduzido no músculo adutor, como descrito anteriormente, porém em sentido contrário, de tal forma a prevenir a reinervação (Fig. 2).

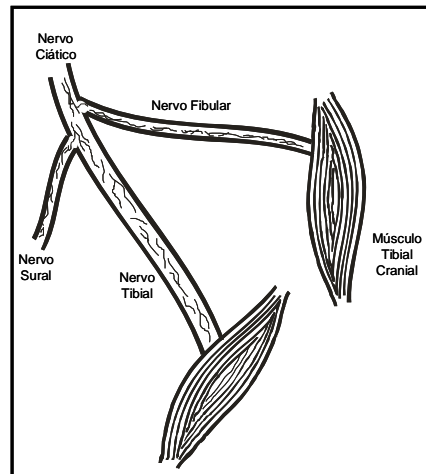


Figura 1 – Esquema da cirurgia em G1.

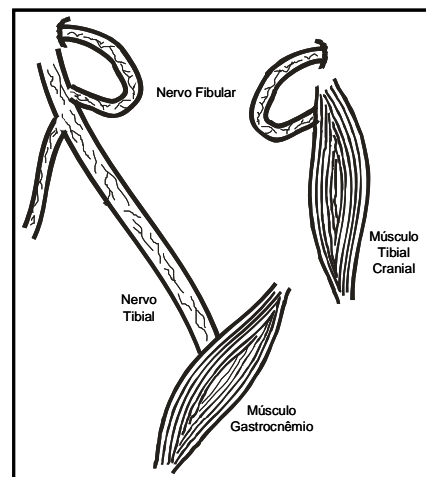


Figura 2 – Esquema de cirurgia em G2.

No grupo G3 (NTT) o nervo fibular foi seccionado a aproximadamente um centímetro após a trifurcação do nervo ciático, de tal forma que se obteve dois cotos, um proximal e um distal. Em seguida, seu coto distal foi suturado ao coto proximal deste mesmo nervo, através de uma neurorrafia término-terminal (NTT), com três pontos simples de fio mononaylon 10-0 (Fig. 3).

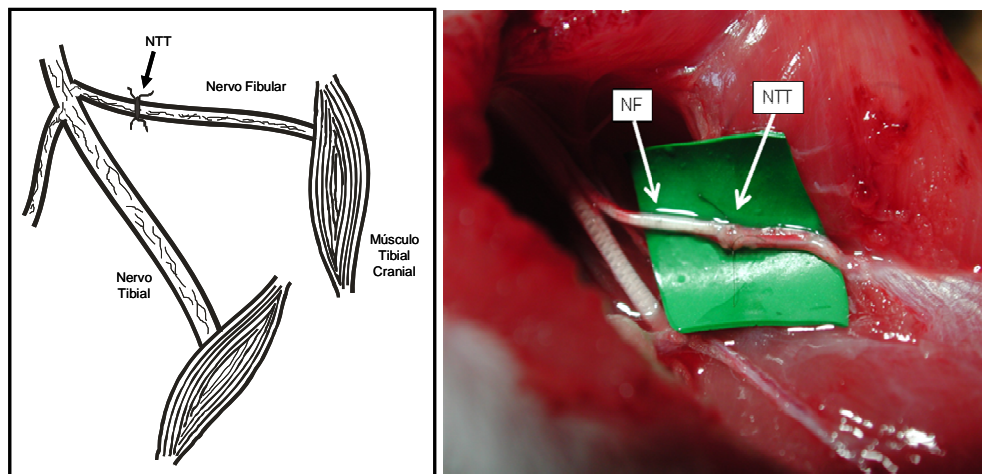


Figura 3 – Esquema da cirurgia realizada no G3. NTT = Neurorrafia término-terminal.
NF = Nervo fibular.

Nos animais do grupo G4, foi realizado o mesmo procedimento feito nos animais do grupo G3. Em adição, o coto proximal do segmento de nervo sural do lado direito, utilizado como enxerto, foi suturado ao nervo tibial, por neurorrafia término-lateral, com três pontos simples com fio mononylon 10-0, aproximadamente um centímetro após a trifurcação do nervo ciático, sem ressecção do epineuro do nervo tibial. No músculo tibial cranial do mesmo lado realizou-se uma pequena fenda onde foi implantado o coto distal do enxerto, o mais profundo possível, perfazendo a neurotização muscular direta. O enxerto foi ancorado ao músculo por meio de sutura entre o epineuro e a fáscia muscular, através de um ponto simples com fio mononylon 10-0, evitando seu deslocamento (Fig. 4). O sentido das fibras nervosas (orientação fascicular) do enxerto foi mantido, seguindo o sentido original das fibras do nervo cutâneo caudal da sura (Brunelli, 1982; McNamara et al., 1987).

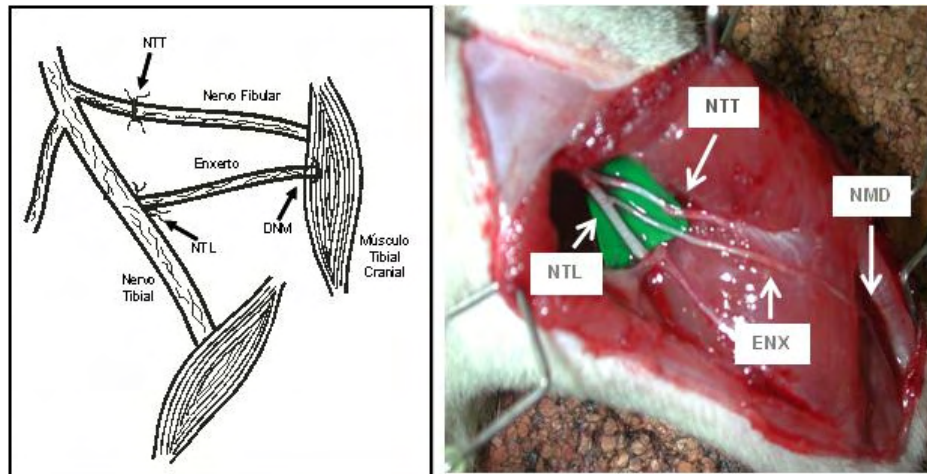


Figura 4 – Esquema da cirurgia no G4. NTT= Neurorrhafia término-terminal; NTL= Neurorrhafia término-lateral; NMD = Neurotização muscular direta; ENX= Enxerto.

Nos animais do grupo G5 foram realizados os mesmos procedimentos do grupo G4. Em adição, foi realizado um segundo enxerto no nervo tibial. Esta segunda neurorrhafia término-lateral foi realizada a aproximadamente meio centímetro após a primeira neurorrhafia no nervo tibial, sendo o coto distal deste enxerto também introduzido no músculo tibial cranial, aproximadamente meio centímetro de distância do primeiro enxerto (Fig. 5). Os procedimentos deste segundo enxerto foram os mesmos descritos para o primeiro enxerto do grupo G4.

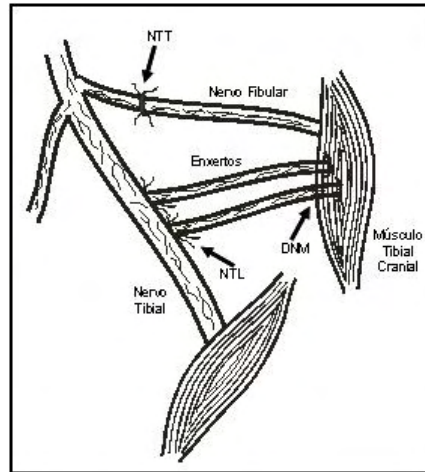


Figura 5 – Esquema da cirurgia em G5. NTT= Neurorrafia término-terminal; NTL= Neurorrafia término-lateral; NMD = Neurotização muscular direta.

No grupo G6, o nervo fibular foi seccionado aproximadamente um centímetro após a trifurcação do nervo ciático, de tal forma que se obteve dois cotos, um proximal e um distal. O coto proximal deste nervo foi curvado 100° e introduzido no interior do músculo adutor, sendo fixado com um ponto simples de fio mononylon 10-0. O coto distal também foi introduzido no interior do músculo adutor, porém em sentido contrário, e também fixado com ponto simples. Foi colocado um enxerto de nervo cutâneo caudal da sura, à aproximadamente cinco milímetros após a trifurcação do nervo ciático, lateralmente ao nervo tibial, através de neurorrafia término-lateral, com três pontos simples de fio mononylon 10-0, aproximadamente um centímetro após a trifurcação do nervo ciático, sem ressecção do epineuro do nervo tibial. No músculo tibial cranial do mesmo lado, foi realizada uma pequena fenda onde foi implantado, o mais profundo possível, o coto distal do enxerto, perfazendo uma neurotização muscular direta. O enxerto foi ancorado ao músculo por meio de uma sutura entre o epineuro e a fáscia

muscular através de um ponto simples com fio mononylon 10-0, evitando seu deslocamento. O sentido das fibras nervosas (orientação fascicular) do enxerto foi mantido, seguindo o sentido original das fibras do nervo cutâneo caudal da sura.

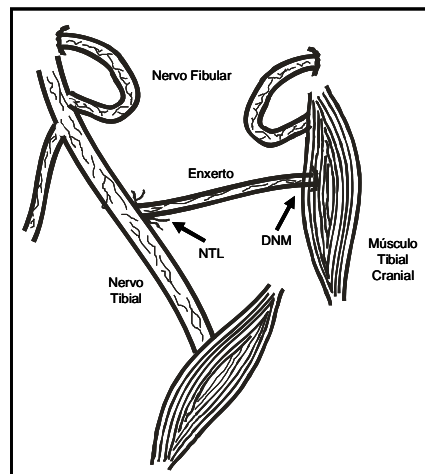


Figura 6 – Esquema da cirurgia realizada no G6. NTL= Neurorrafia término-lateral;
NMD = Neurotização muscular direta.

No grupo G7 foram realizados os mesmos procedimentos do grupo G6. Em adição, foi realizado um segundo enxerto no nervo tibial. Esta segunda neurorrafia término-lateral foi realizada a aproximadamente meio centímetro após a primeira neurorrafia no nervo tibial, sendo o coto distal deste enxerto também introduzido no músculo tibial cranial, aproximadamente a meio centímetro de distância do primeiro enxerto (Fig. 7). Os procedimentos deste segundo enxerto foram os mesmos descritos para o grupo G6.

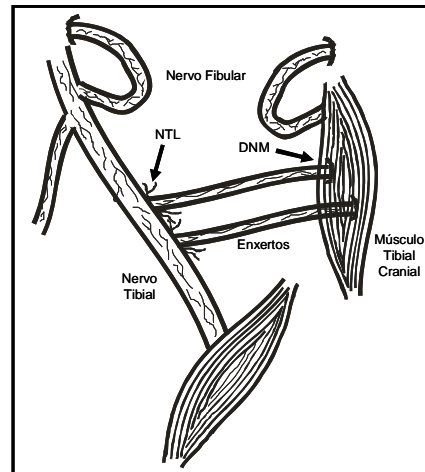


Figura 7 – Esquema da cirurgia realizada no G7. NTL= Neurorrafia término-lateral;
NMD = Neurotização muscular direta.

Em todos os grupos, a incisão para exposição da área cirúrgica foi suturada em planos, com a utilização de pontos simples com fio mononylon 5-0. Durante todos os procedimentos cirúrgicos o campo operatório foi mantido úmido com solução fisiológica a 9%.

Os animais foram mantidos, após as cirurgias, em gaiolas apropriadas no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da FMB-UNESP, com temperatura de 24°C ($\pm 0,5$), com ciclo claro-escuro de 12 horas e recebendo ração para ratos e água *ad libitum*, por um tempo de seis meses. Após este período, os animais foram submetidos à avaliação funcional da recuperação motora, testes eletrofisiológicos, e tiveram os músculos e nervos de interesse removidos para a análise dos demais atributos, sendo posteriormente sacrificados.

3.4. Avaliação da marcha

Os animais foram submetidos ao teste da marcha (*Walking Tracks Analysis*) para a avaliação do grau de recuperação da função motora, baseado no índice funcional do nervo ciático (De Medinaceli et al., 1982). Os testes foram realizados no dia pré-determinado para o sacrifício de cada animal, observando a data de realização de cada cirurgia e o tempo de seis meses pós-cirúrgico. Os animais foram submetidos a uma caminhada em uma caixa de nove centímetros de largura por 78 cm de comprimento, com um abrigo escuro no final (Fig. 8). Após três ensaios, nos quais os animais freqüentemente param para explorar o corredor, eles tendem a caminhar regularmente para o abrigo escuro no final do corredor. Uma folha de papel branco em tamanho apropriado foi colocada no piso do corredor. Os ratos tiveram suas patas traseiras pintadas com tinta nanquim preta e subseqüentemente foram colocados na entrada do corredor, iniciando a caminhada. As patas ficaram impressas na folha imediatamente após a caminhada. A folha foi codificada pelo número do animal, sem referência ao grupo experimental a que pertencia.

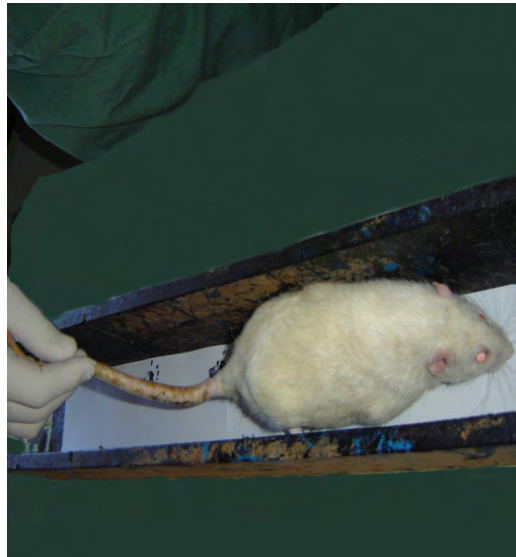


Figura 8 - Avaliação da marcha (*Walking Tracks Analysis*).

Foram analisadas quatro impressões de cada pata traseira do animal, sendo observadas quatro variáveis:

1. *Distância da pata oposta (TOF)*: A projeção ortogonal da distância entre a extremidade dos dedos da pata experimental (E) com a extremidade dos dedos da pata contralateral (N). Deste modo, o valor normal (NTOF) foi o valor observado entre a pata normal e a posterior impressão da pata experimental, e o valor experimental (ETOF) foi entre a pata experimental e a posterior impressão da pata normal.
2. *Comprimento da impressão (PL)*: Foi mensurado o comprimento de cada impressão do lado experimental e contralateral. O maior comprimento de cada lado foi utilizado para a análise.

3. *Distância entre o primeiro e quinto dedo ou extensão total (TS):*
Foi determinada a distância linear entre o centro da impressão do primeiro dedo e do quinto dedo em ambos os lados, sendo utilizado para a análise o maior valor para cada lado.
4. *Distância entre os dedos intermediários (IT):* Foi determinada a distância linear entre o centro da impressão do segundo dedo e do quarto dedo em ambos os lados, sendo utilizado para a análise o maior valor para cada lado.

A partir destas medidas (Fig. 9), foram realizados os cálculos do índice funcional do nervo ciático (IFC), segundo a equação descrita por De Medinacelli et al. (1982):

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

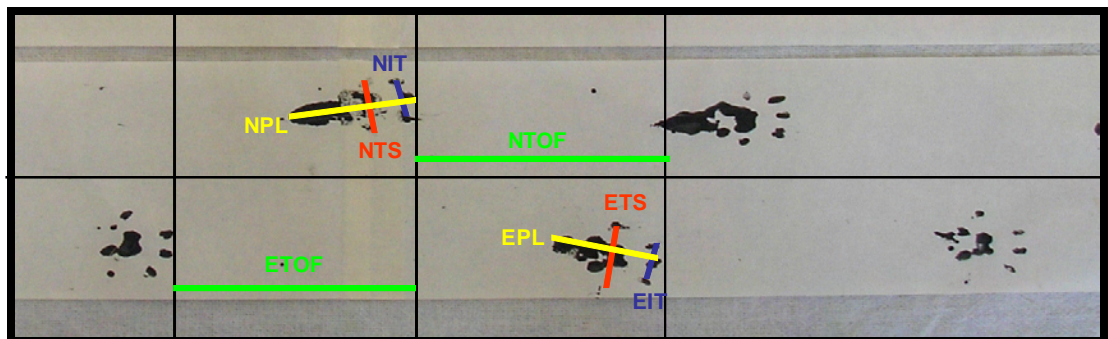


Figura 9: Esquema das medidas para cálculo do índice funcional do nervo ciático (IFC).

Alguns animais caminharam com o dorso da pata experimental, não sendo possível realizar nenhuma medida desta impressão (Fig. 10). Nestes casos, de

acordo com De Medinacelli et al. (1982), foram atribuídos os seguintes valores arbitrários: ETOF = um terço da distância entre duas pegadas normais; NTOF = dois terços da mesma distância; EPL = 80 mm; ETS = 6 mm; EIT = 6 mm.



Figura 10: Exemplo de impressões nas quais foram utilizados valores arbitrários de NTOF, ETOF, EPL, ETS, EIT.

3.5. Estudos eletrofisiológicos

Utilizou-se para os estudos eletrofisiológicos o eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME, sendo que a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C em todos os testes.

Os animais tiveram suas massas aferidas e posteriormente foram submetidos à anestesia, tricotomia e imobilização, conforme descritos nos procedimentos cirúrgicos. Foi realizada uma incisão no membro posterior direito, conforme descrito anteriormente, para um amplo acesso aos nervos tibial, fibular, aos enxertos (NTL) no nervo tibial e ao músculo tibial cranial, possibilitando, com o auxílio de microscópio cirúrgico, a dissecação dos nervos citados e visualização do músculo de interesse.

Realizou-se em todos os animais a secção do nervo cutâneo caudal da sura na altura da trifurcação do nervo ciático, e a secção do nervo tibial

aproximadamente um centímetro abaixo do segundo enxerto (2ª NTL), impedindo deste modo, a propagação de qualquer estímulo elétrico por estes nervos até o músculo tibial cranial, no decorrer do teste eletrofisiológico. Nos grupos em que não foram realizados os enxertos, a secção do nervo tibial foi no mesmo nível, como descrito anteriormente.

A recuperação das propriedades funcionais foi avaliada através da determinação da deflagração de potenciais de ação motor composto no músculo tibial cranial. O potencial de ação motor composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência. O eletrodo ativo foi implantado no centro do músculo tibial cranial direito, e o de referência foi implantado próximo ao tendão de inserção do músculo. A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi realizada através de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este fim, cujo cátodo e ânodo estavam separados por dois milímetros. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente no nervo ciático, antes da trifurcação (Fig. 11).

A freqüência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 s. A intensidade de estímulo utilizada, sempre constante em todos os testes, foi de 5,1 volts.

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

Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os sete grupos.

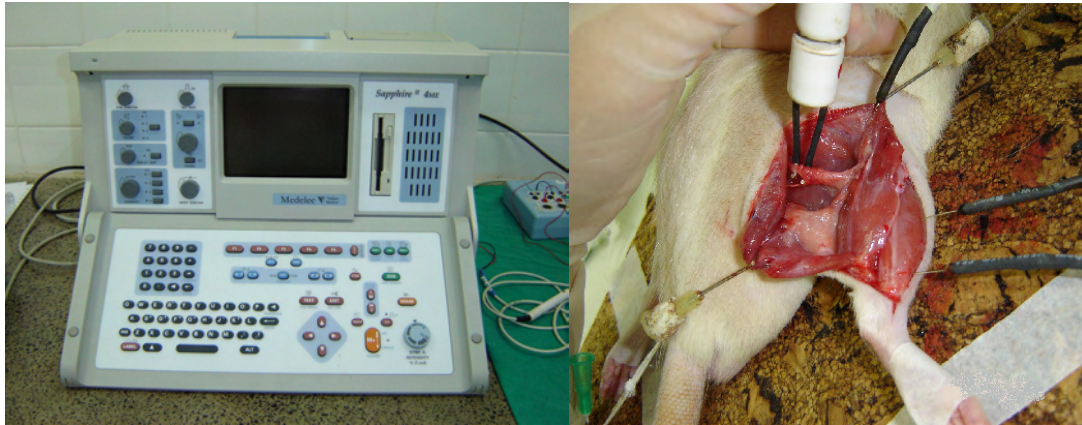


Figura 11: Eletromiógrafo Sapphire II 4ME; posicionamento dos eletrodos de estimulação bipolar e de captação com agulhas.

3.6. Coleta do material para preparação histológica

Após o término dos testes eletrofisiológicos, os músculos tibiais craniais dos lados direito (MTCD) e esquerdo (MTCE) foram removidos por inteiro, desde a sua origem até o seu tendão de inserção. Após este procedimento, foram removidos os segmentos de nervos de interesse (Fig. 12), como descritos a seguir:

N1: segmento proximal do nervo fibular, antes da NTT.

N2: região da NTT no nervo fibular.

N3: segmento distal do nervo fibular, após a NTT.

N4: região da 1ª NTL, do primeiro enxerto ("T").

N5: segmento distal do primeiro enxerto, após a 1ª NTL.

N6: região da 2ª NTL, do segundo enxerto ("T").

N7: segmento distal do segundo enxerto, após a 2ª NTL.

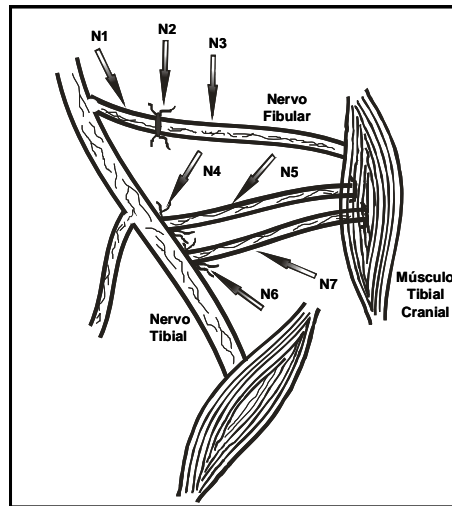


Figura 12: Coleta dos segmentos de nervos n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7 e músculo tibial cranial para posterior análise histológica.

Após a remoção das peças histológicas de interesse, os animais foram sacrificados com dose letal de pentobarbital sódico (Nembutal), administrado por via intraperitoneal.

3.7. Massa do músculo tibial cranial

A massa do músculo tibial cranial foi mensurada em balança analítica, modelo JS-110, marca Chio, sendo aferida em gramas.

Os músculos tibiais craniais do lado direito foram secados com gaze, pesados sem o tendão e mantidos imersos em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento do processamento histológico (Yan et al., 2002).

Os músculos tibiais craniais do lado esquerdo foram secados com gaze, pesados sem o tendão e posteriormente descartados.

3.8. Processamento histológico do músculo tibial cranial

Os músculos tibiais craniais do lado direito (MTCD), congelados em nitrogênio líquido, foram submetidos a cortes histológicos em criostato da marca *LEICA*, modelo CM1850. Os segmentos tinham sete micrômetros de espessura, sendo os cortes realizados na porção central do músculo, transversalmente ao maior eixo do músculo. Foram realizados de quatro a seis cortes em um mesmo músculo, possibilitando a escolha de um corte com menos artefatos histológicos durante a análise. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE) (Zhao et al. 1997, McCallister et al. 1999).

As lâminas foram identificadas com o número de registro no laboratório, sem identificação do animal e ou grupo a que este pertencia. Este registro somente foi revelado para a análise estatística.

Digitalização das imagens histológicas:

As lâminas histológicas foram observadas em microscópio óptico no menor aumento (50 vezes) para escolha do corte com menos artefatos. Foi utilizado o aumento de 200 vezes para a análise das fibras musculares. As imagens foram captadas por uma câmera digital *Leica* DFC 280 e posteriormente salvas em um microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1 GB DDR, HD 80 GB. Foram selecionadas, aleatoriamente, 10 imagens em diferentes campos de um mesmo corte histológico.

Medidas da área e menor diâmetro das fibras musculares

Foram analisadas a área e o menor diâmetro das fibras musculares, a partir das imagens digitalizadas. Para tanto, foi utilizado o software Sigma Pro Image Analysis, versão 5 da Jandel Scientific Corporation.

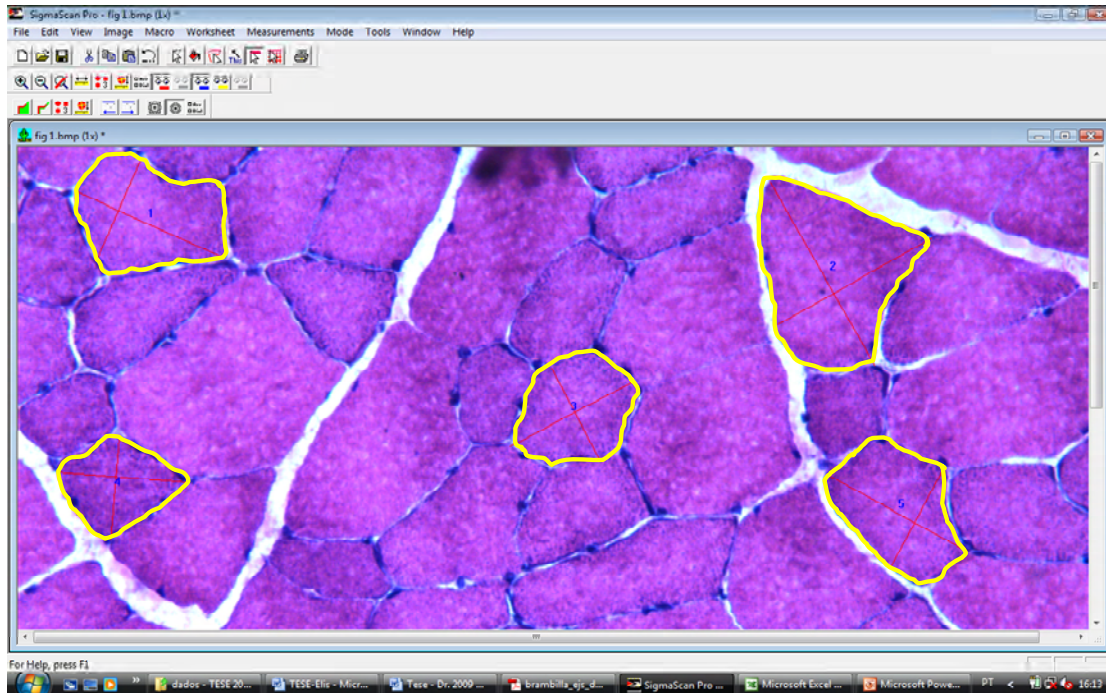


Figura 13: Exemplo de cinco fibras musculares, escolhidas aleatoriamente, em uma mesma lâmina.

Avaliou-se uma fibra de cada quadrante da imagem e uma central, sendo medidas cinco fibras por imagem salva, em um total de 50 fibras por lâmina (Fig. 13). A seleção das fibras foi realizada de forma padronizada, sobrepondo-se um papel com cinco marcações, sobre as figuras. Assim, foram selecionadas as fibras que coincidiam com as marcações. Os resultados de área e menor diâmetro das fibras foram dispostos em uma tabela e posteriormente foi calculada a média

das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias, foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos.

3.9. Processamento histológico dos segmentos de nervos

Os segmentos de nervos removidos foram imediatamente encaminhados para a preparação das lâminas histológicas.

Os segmentos N1, N3, N5 e N7 foram fixados em solução de Karnovisk e processados pela técnica da resina Araldite 502[®] para microscopia eletrônica (Fig. 14).

Após a fixação por um período superior a 24 horas em solução de Karnovisk, e lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por três vezes com duração de cinco minutos cada vez, os segmentos de nervos foram submetidos à pré-coloração com tetróxido de ósmio (1:1) por duas horas. Após nova lavagem com tampão fosfato, foi realizada desidratação por uma bateria de concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). A inclusão em resina Araldite 502[®] foi realizada em duas etapas:

- 1) Em solução de resina e acetona (1:1), permanecendo por 24 horas em dissecador;
- 2) Em resina, após 10 minutos em dissecador, permanecendo em estufa à 37°C por uma hora.

O emblocamento foi realizado posicionando-se o segmento de nervo em resina Araldite 502[®] e mantido em estufa à 60°C por 48 horas para polimerização.

Antes do corte histológico os blocos foram trimados, ou seja, preparados para o corte através da eliminação do excesso de resina ao redor do segmento de

nervo. A trimagem foi realizada sob lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6X, com auxílio de uma lâmina Gillete®.

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

A coloração foi realizada manualmente, lâmina por lâmina, com azul de toluidina 1% durante cinco minutos. Após a secagem a lamínula foi colada e a lâmina identificada com o número do registro no laboratório para que o pesquisador não identificasse a qual grupo pertencia o animal. A numeração real foi revelada apenas para a realização da análise estatística.

Os segmentos de nervos N2, N4 e N6 foram corados pelo método de Bielschowsky e submetidos a cortes longitudinais, para serem analisados quanto ao crescimento dos axônios do nervo doador para dentro do nervo receptor.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NERVOS

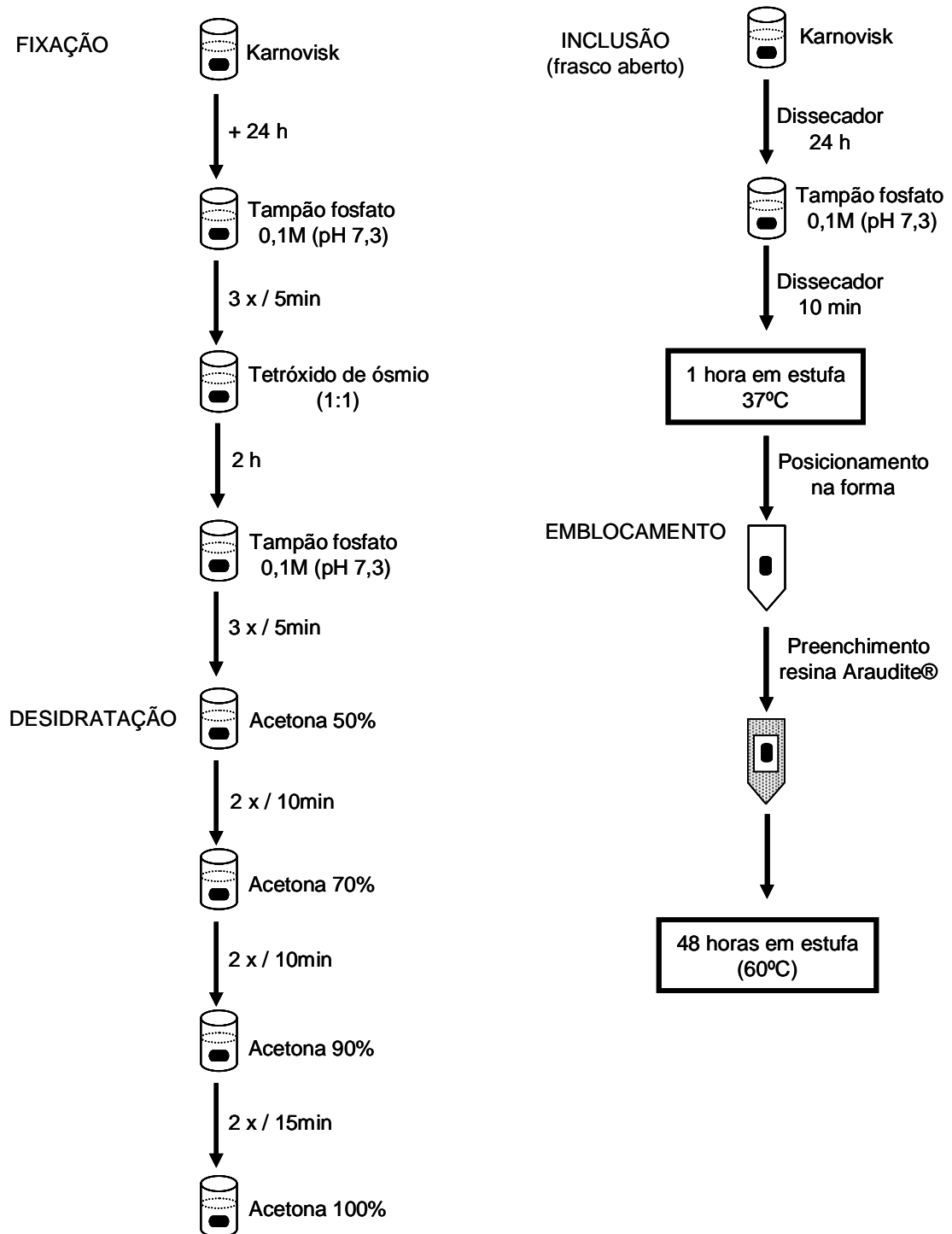


Figura 14: Seqüência do processamento histológico dos segmentos de nervos N1, N3, N5 e N7 em resina araldite®.

Digitalização das imagens histológicas

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

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

Análise dos atributos das fibras de nervos.

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

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

Após abrir a imagem a ser analisada, foi realizado um aumento (“zoom”) e este campo foi medido em 50 imagens, obtendo-se uma área média de 5128,17 m². Foram medidas 50 fibras de nervos inteiras presentes nesta área, com exceção das fibras que apresentavam artefatos de fixação. Posteriormente foram contadas todas as fibras presentes na imagem, com exceção das fibras que apresentavam artefatos de fixação.

Após a contagem das fibras de nervos calculou-se a densidade axonal, medida em axônio/ m², através da fórmula:

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

Foram realizadas as medidas da área da fibra nervosa e do axônio. As medidas da área da bainha de mielina foram obtidas subtraindo-se a área axonal da área da fibra de nervo.

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

3.10. Análise estatística

Quando comparados os sete grupos entre si foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e, se detectada diferença estatística, ao teste de Tukey.

Utilizou-se o teste “t” pareado para a comparação das massas iniciais às massas finais dos animais, e para os dados da eletrofisiologia.

Para comparação das medidas de área, diâmetro mínimo dos segmentos de nervos e da bainha de mielina foi utilizado o teste “t” de Student.

Para os dados de densidade axonal ajustou-se o modelo de regressão de Poisson para comparação entre grupos, obtendo-se as taxas de densidade axonal relativas.

Em todas as análises adotou-se o nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Análise da massa corporal inicial e final dos animais.

A comparação das massas iniciais e finais dos animais evidenciou um ganho de peso em todos os animais, com diferença significativa. A avaliação entre grupos não evidenciou diferença estatística quando comparadas as massas iniciais, assim como quando comparadas as massas finais entre grupos (Fig. 15; Tabela 1).

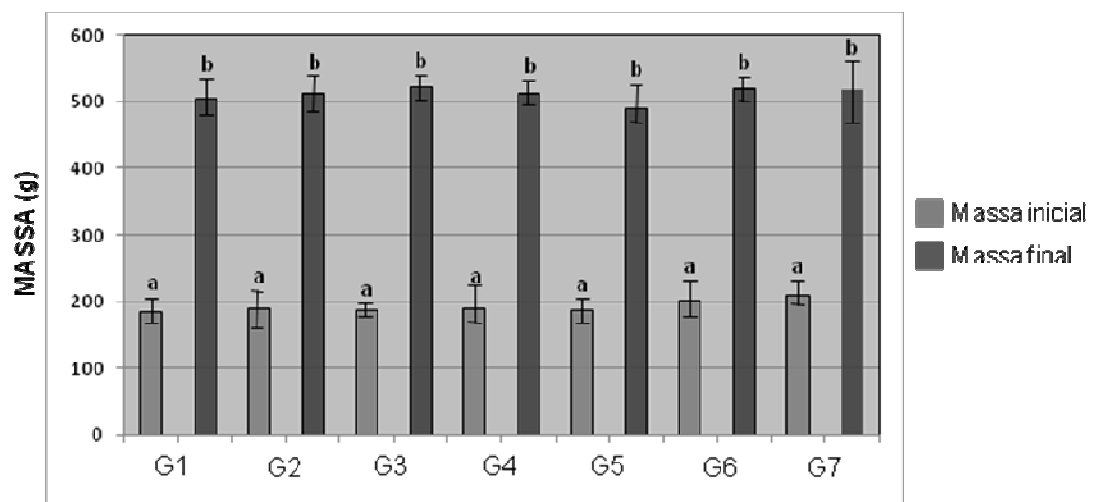


Figura 15: Médias e seus respectivos desvios padrões das massas iniciais e finais dos animais. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 1: Massas iniciais e finais dos animais.

Grupo	Massa inicial (g)	Massa final (g)
G1	184 ± 16 ^a	504 ± 51 ^b
G2	189 ± 22 ^a	513 ± 46 ^b
G3	186 ± 09 ^a	522 ± 32 ^b
G4	190 ± 18 ^a	512 ± 43 ^b
G5	187 ± 13 ^a	490 ± 49 ^b
G6	201 ± 20 ^a	516 ± 37 ^b
G7	210 ± 11 ^a	519 ± 65 ^b

Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

4.2. Teste de avaliação da marcha

Os resultados do índice funcional do ciático (IFC) de cada grupo são expressos como porcentagem da perda da função normal (Fig.16).

Os grupos G1 ($5,5 \pm 0,8$), G3 ($10,4 \pm 2,1$), G4 ($7,5 \pm 1,5$) e G5 ($-7,3 \pm 1,9$) não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si. Entretanto apresentaram diferenças significativas quando comparados com os grupos G2 ($-118,3 \pm 3,1$) e G6 ($-122,3 \pm 5,2$). Entre os grupos G2 e G6 não houve diferença estatística. O grupo G7 ($-89,3 \pm 2,6$) apresentou diferença estatística quando comparado com os grupos G1, G3, G4 e G5 e também quando comparado com os grupos G2 e G6 (Tabela 2).

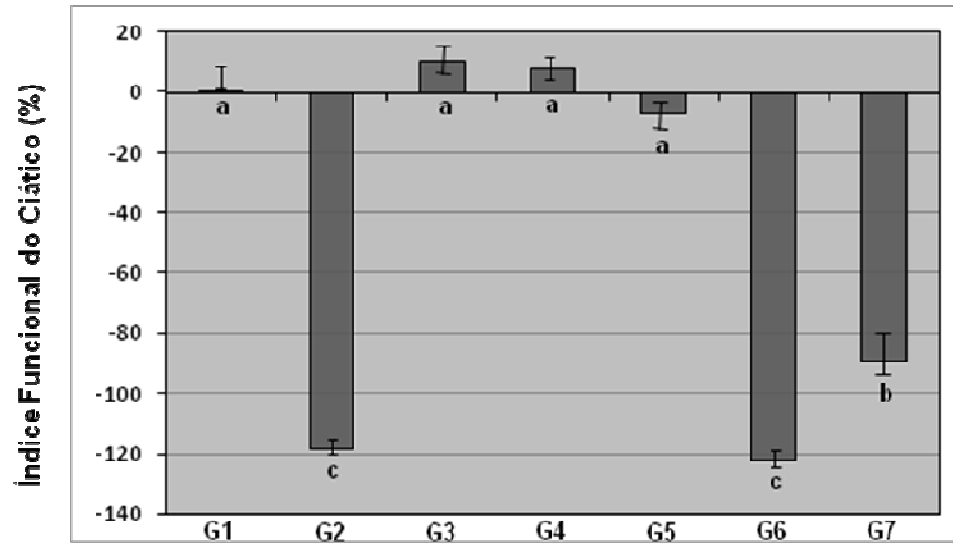


Figura 16: No gráfico estão representadas as médias e seus respectivos erros padrões do índice funcional do ciático, expressos em porcentagem. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2: Índice Funcional do Nervo Ciático.

Grupo	Índice Funcional do Nervo Ciático (%)
G1	0,5 ± 6,2 ^a
G2	-118,3 ± 2,2 ^c
G3	10,4 ± 8,2 ^a
G4	7,5 ± 6,4 ^a
G5	-7,3 ± 7,6 ^a
G6	-122,3 ± 2,6 ^c
G7	-89,3 ± 12 ^b

Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

4.3. Teste eletrofisiológico

Os dados obtidos com relação à latência e amplitude dos testes eletrofisiológicos estão representados nas figuras 17 e 18 e na tabela 3.

Na análise da latência, os dados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos G1 ($1,75 \pm 0,2$ ms), G3 ($1,89 \pm 0,7$ ms), G4 ($1,84 \pm 0,7$ ms), G5 ($1,85 \pm 0,8$ ms) e G7 ($2,18 \pm 0,3$ ms).

Entretanto esses grupos diferiram significativamente do grupo G6 ($2,60 \pm 0,3$ ms), o qual apresentou aumento na latência.

O grupo G2 apresentou uma latência que tendeu ao infinito, diferindo significativamente dos demais grupos.

O grupo G7 ($2,18 \pm 0,3$ ms), submetido aos dois enxertos, apresentou latência significativamente menor que o grupo G6 ($2,60 \pm 0,9$ ms), com apenas um enxerto.

A análise dos dados referentes à amplitude demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos G3 ($13,05 \pm 6,1$ mV), G4 ($12,9 \pm 2,9$ mV), G5 ($13,8 \pm 4,6$ mV), e G7 ($10,6 \pm 3,2$ mV). Entretanto, nestes grupos houve diminuição significativa da amplitude quando comparados com o grupo G1 ($25,8 \pm 6,1$ mV), controle de normalidade.

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos G2 (0 mV) e G6 ($1,6 \pm 0,3$ mV), porém estes grupos foram significativamente diferentes dos demais (G1, G3, G4, G5 e G7).

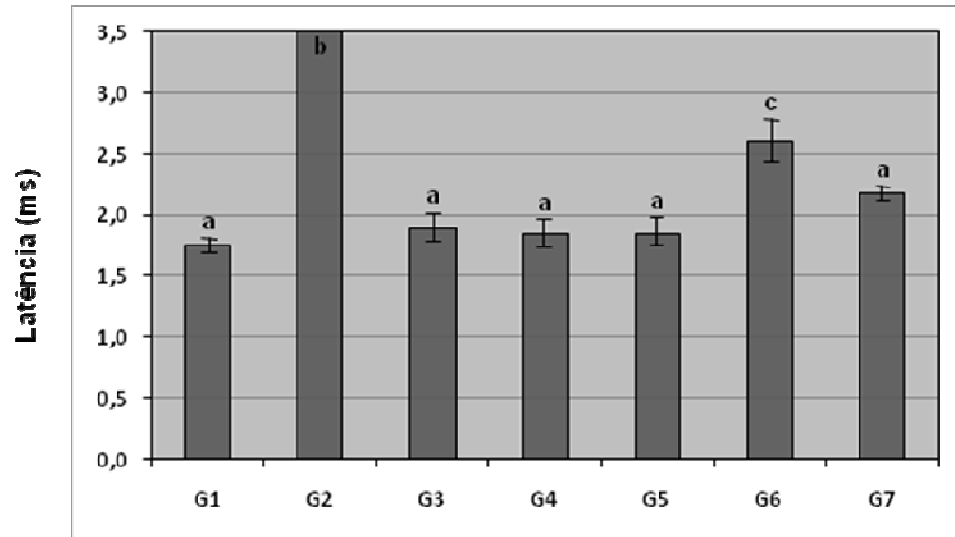


Figura 17: No gráfico estão representadas as médias e seus respectivos erros padrões da latência, expressos em mV. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

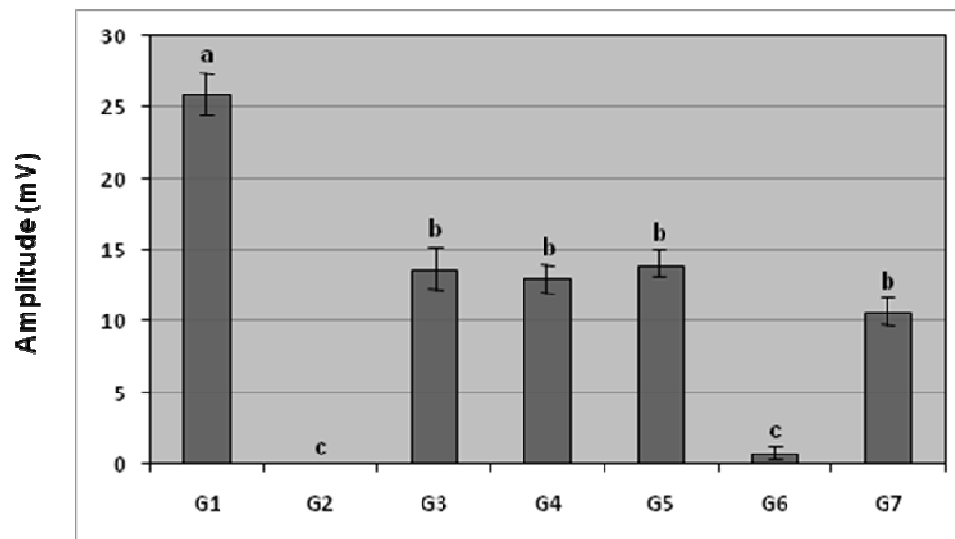


Figura 18: No gráfico estão representadas as médias e seus respectivos erros padrões da amplitude, expressos em ms. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 3: Eletrofisiologia - Amplitude e Latência.

Grupo	Latência (ms)	Amplitude (mV)
G1	1,75 ± 0,2 ^a	25,8 ± 6,1 ^a
G2	∞ ^b	0 ^b
G3	1,89 ± 0,7 ^a	13,5 ± 6,1 ^c
G4	1,84 ± 0,7 ^a	12,9 ± 2,9 ^c
G5	1,85 ± 0,8 ^a	13,8 ± 4,6 ^c
G6	2,60 ± 0,9 ^c	1,6 ± 0,3 ^b
G7	2,18 ± 0,3 ^a	10,6 ± 3,2 ^c

Letras diferentes representam diferenças estatísticas (p<0,05).

Após a deflagração dos estímulos no nervo ciático, observou-se com relação à latência, uma tendência ao infinito no grupo G2, e com relação à amplitude, ausência de contração muscular no músculo tibial cranial.

4.4. Análise da massa do músculo tibial cranial direito

Com relação à massa do músculo tibial cranial direito, foi observada diferença significativa entre os grupos G1 (0,954 ± 0,02 g) e G2 (0,164 ± 0,02 g).

Entres os grupos G3 (0,750 ± 0,03 g), G4 (0,753 ± 0,04 g) e G5 (0,752 ± 0,04 g) não houve diferença significativa. Entretanto, esses grupos apresentaram uma diminuição significativa da massa muscular quando comparados com o controle de normalidade (G1: 0,954 ± 0,2 g).

Não houve diferença entre os grupos G6 ($0,367 \pm 0,03$ g), e G7 ($0,371 \pm 0,3$ g). Estes grupos apresentaram um aumento significativo da massa muscular quando comparados com o controle de desnervação (G2: $0,164 \pm 0,02$ g). Quando comparados com o controle de normalidade, os grupos G6 e G7 apresentaram uma diminuição significativa da massa muscular. Os grupos G3, G4 e G5 diferiram significativamente dos grupos G6 e G7 (Fig. 19, Tabela 4).

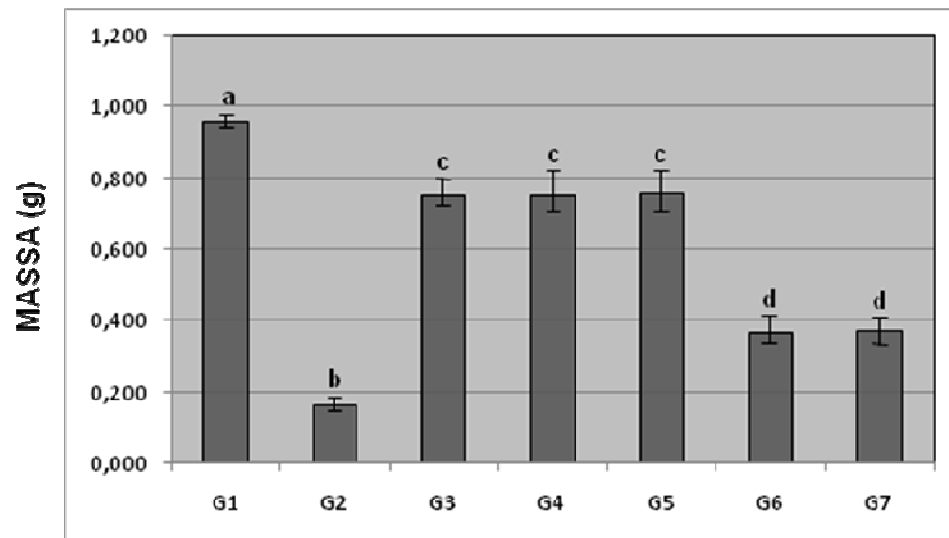


Figura 19: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da massa do músculo tibial cranial direito. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 4: Massa do músculo tibial cranial direito

Grupo	Massa (g)
G1	0,954 ± 0,02 ^a
G2	0,164 ± 0,02 ^b
G3	0,750 ± 0,03 ^c
G4	0,753 ± 0,04 ^c
G5	0,752 ± 0,04 ^c
G6	0,367 ± 0,03 ^d
G7	0,371 ± 0,03 ^d

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.5. Análise morfométrica do músculo tibial cranial direito

A análise dos dados referentes às áreas das fibras do músculo tibial cranial direito de cada grupo (Fig. 20) não demonstrou diferença estatística entre os grupos G1 ($1666,84 \pm 148,5 \mu\text{m}^2$), G3 ($1567,09 \pm 135,1 \mu\text{m}^2$), G4 ($1760,63 \pm 175,3 \mu\text{m}^2$), G5 ($1692,98 \pm 162,3 \mu\text{m}^2$) e G7 ($1609,46 \pm 179,2 \mu\text{m}^2$). Estes grupos apresentaram áreas significativamente maiores que o grupo desnervado (G2: $559,61 \pm 54,8 \mu\text{m}^2$).

O grupo G6 ($1219,84 \pm 137,9 \mu\text{m}^2$) apresentou área significativamente maior que o grupo G2 ($559,61 \pm 54,8 \mu\text{m}^2$), porém apresentou área significativamente menor que os grupos G1, G3, G4, G5 e G7.

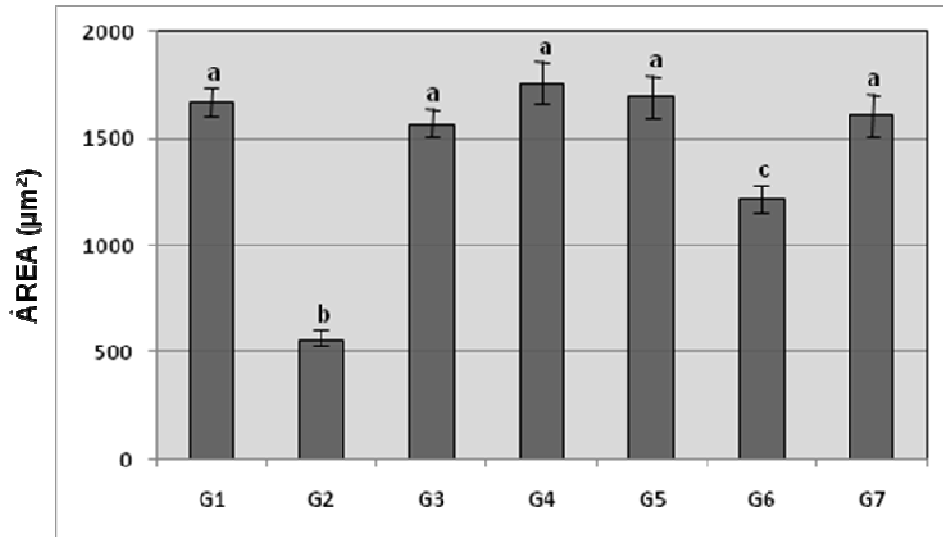


Figura 20: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área das fibras do músculo tibial cranial direito. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Os resultados referentes às medidas do diâmetro mínimo das fibras do músculo tibial cranial direito de cada grupo confirmaram os resultados e diferenças significativas, obtidos nas avaliações da área das fibras musculares (Fig. 20). Os dados referentes ao diâmetro mínimo das fibras musculares estão representados na figura 21 e tabela 5.

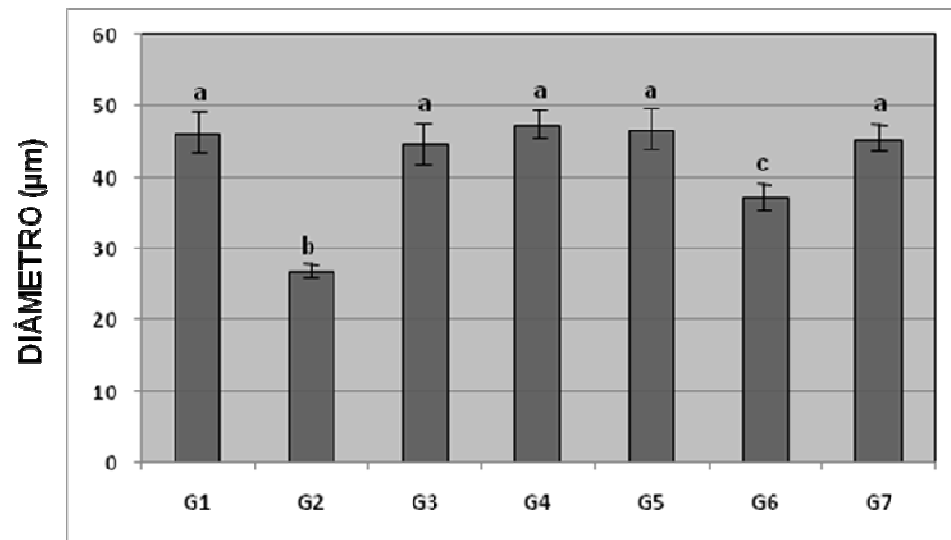


Figura 21: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões do diâmetro mínimo das fibras do músculo tibial cranial direito. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 5: Fibras do Músculo Tibial Cranial Direito – Área e Diâmetro Mínimo.

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro Mínimo (μm)
G1	1666,84 ± 148,5 ^a	46,09 ± 2,7 ^a
G2	559,61 ± 54,8 ^b	26,71 ± 1,1 ^b
G3	1567,09 ± 135,1 ^a	44,68 ± 2,9 ^a
G4	1760,63 ± 175,6 ^a	47,36 ± 2,3 ^a
G5	1692,98 ± 162,3 ^a	46,45 ± 2,5 ^a
G6	1219,84 ± 137,9 ^c	37,15 ± 2,1 ^c
G7	1609,46 ± 179,2 ^a	45,29 ± 2,4 ^a

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.6. Análise morfológica do músculo tibial cranial direito

Observou-se uma semelhança quanto ao tamanho e forma das fibras musculares e quanto à quantidade de tecido conjuntivo entre os grupos G1, G3, G4 e G5. Nestes grupos, as fibras musculares apresentaram-se com contornos poligonais, agrupadas em fascículos e delimitadas por tecido conjuntivo frouxo.

No grupo G7 as fibras apresentaram-se com discreto aumento no polimorfismo e com pequeno aumento de tecido conjuntivo.

O grupo G6 apresentou fibras musculares aparentemente menores, maior polimorfismo, maior desorganização e aumento de tecido conjuntivo.

Entretanto, o grupo G6 apresentou melhor organização das fibras quando comparados com o grupo G2 (desnervado), o qual apresentou, aparentemente, as menores fibras musculares, polimorfismo acentuado, alta desorganização com grande quantidade de tecido conjuntivo.

As imagens representativas de cada grupo, exemplificando as diferenças encontradas entre os grupos, são observadas na figura 22.

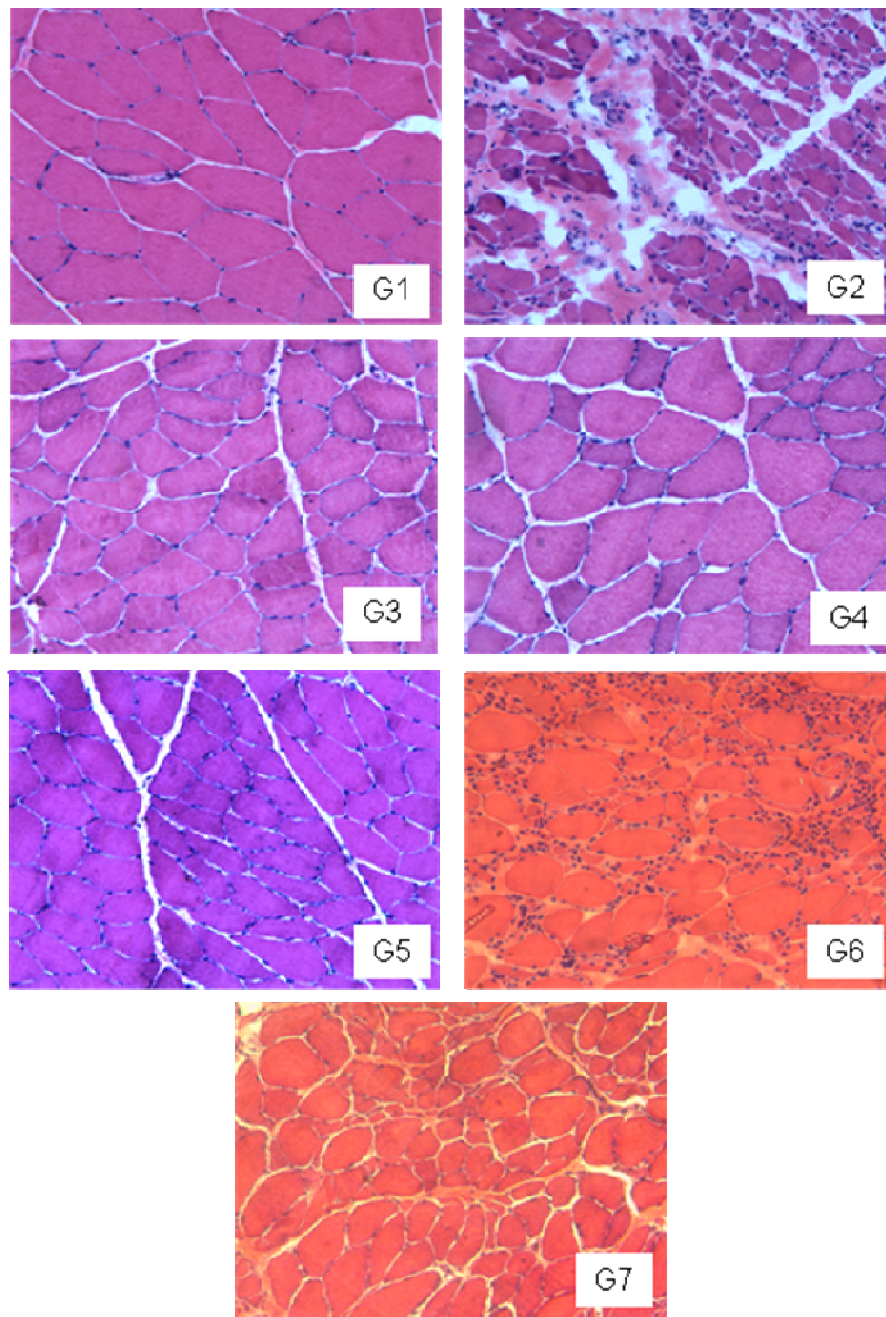


Figura 22: Cortes histológicos das fibras do músculo tibial cranial direito, corados pela técnica de H.E. Microscopia óptica com aumento de 200x. As imagens são representativas de cada grupo: G1, G2, G3, G4, G5, G6 e G7.

4.7. Análise morfométrica do segmento de nervo N1

Os dados referentes à densidade axonal no segmento de nervo N1 (Fig. 23) demonstraram que o grupo G1 ($0,009 \pm 0,0006$ axônio/ μm^2) foi significativamente diferente dos demais grupos, apresentando a menor densidade axonal. Os grupos G2 ($0,011 \pm 0,001$ axônio/ μm^2), G6 ($0,011 \pm 0,003$ axônio/ μm^2) e G7 ($0,011 \pm 0,002$ axônio/ μm^2) não diferiram entre si. Os grupos G3 ($0,014 \pm 0,003$ axônio/ μm^2) e G4 ($0,013 \pm 0,002$ axônio/ μm^2) não diferiram entre si, porém apresentaram uma densidade significativamente maior que os grupos G2, G6 e G7. O grupo G5 ($0,017 \pm 0,004$ axônio/ μm^2) apresentou a maior densidade axonal, sendo significativamente diferente dos demais grupos.

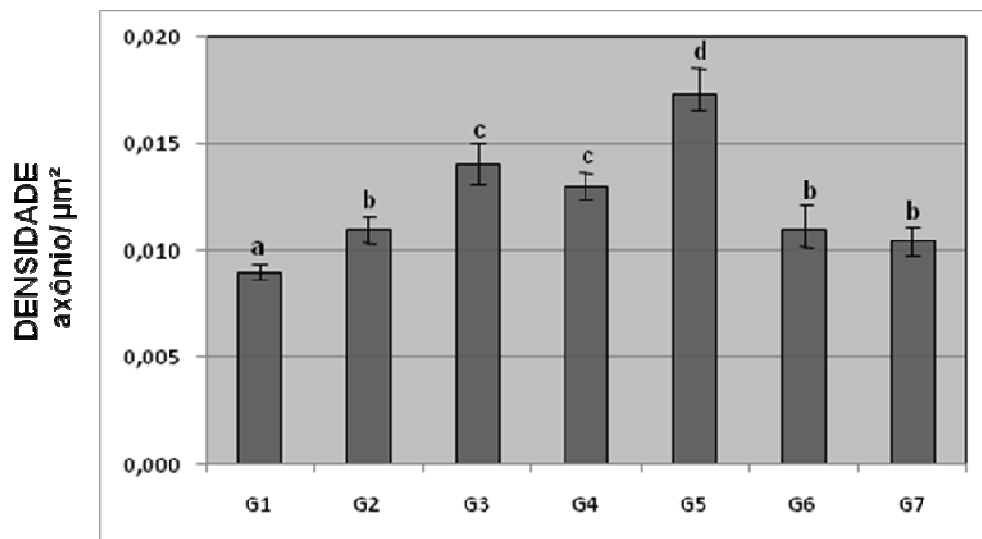


Figura 23: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da densidade axonal no segmento de nervo N1. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 6: Segmento de nervo N1 - Densidade axonal.

Grupo	Densidade axonal (axônio/ μm^2)
G1	0,009 \pm 0,0006 ^a
G2	0,011 \pm 0,001 ^b
G3	0,014 \pm 0,003 ^c
G4	0,013 \pm 0,002 ^c
G5	0,017 \pm 0,004 ^d
G6	0,011 \pm 0,003 ^b
G7	0,011 \pm 0,002 ^b

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

A análise dos dados referentes à área do axônio no segmento de nervo N1 (Fig. 24) não evidenciou diferença significativa entre os grupos G1 ($40,46 \pm 1,8 \mu\text{m}^2$) e G4 ($39,12 \pm 2,4 \mu\text{m}^2$). Entre os grupos G2 ($31,95 \pm 2,1 \mu\text{m}^2$), G3 ($32,75 \pm 1,9 \mu\text{m}^2$), G5 ($30,95 \pm 2,0 \mu\text{m}^2$), G6 ($31,55 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$) e G7 ($32,96 \pm 2,3 \mu\text{m}^2$) não houve diferença significativa. Entretanto estes grupos foram significativamente diferentes dos grupos G1 e G4.

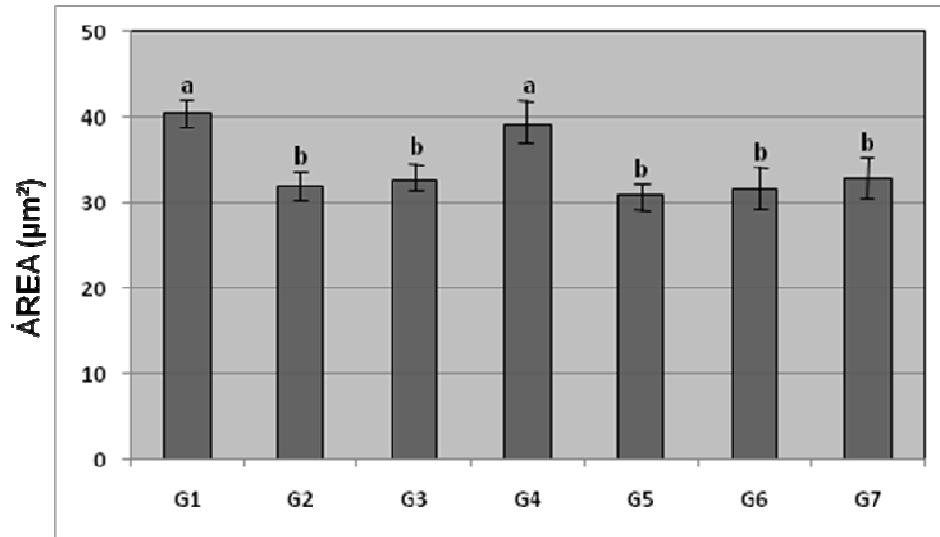


Figura 24: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área dos axônios no segmento de nervo N1. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

A análise dos dados referentes ao diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N1 (Fig. 25) não evidenciou diferença significativa entre os grupos G1 ($7,19 \pm 0,4 \mu\text{m}$) e G4 ($7,06 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Não houve diferença significativa entre os grupos G2 ($6,34 \pm 0,2 \mu\text{m}$), G3 ($6,47 \pm 0,7 \mu\text{m}$), G5 ($6,29 \pm 0,9 \mu\text{m}$), G6 ($6,34 \pm 0,4 \mu\text{m}$) e G7 ($6,48 \pm 0,9 \mu\text{m}$). Porém, estes grupos foram significativamente diferentes dos grupos G1 e G4.

Os dados referentes à área e ao diâmetro mínimo dos axônios no segmento N1 estão representados na tabela 7.

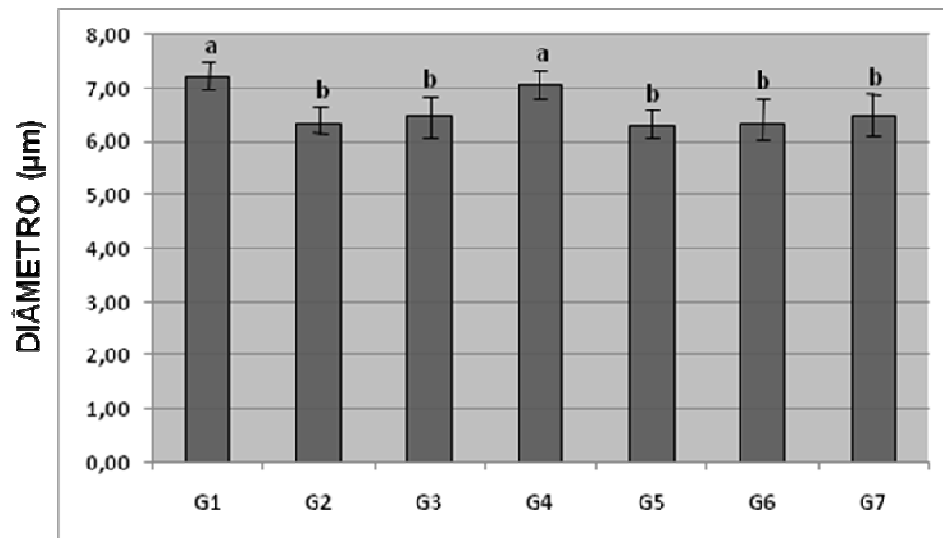


Figura 25: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões do diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N1. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 7: Segmento de nervo N1 - Área e Diâmetro Mínimo dos Axônios.

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro Mínimo (μm)
G1	$40,46 \pm 1,8^a$	$7,19 \pm 0,4^a$
G2	$31,95 \pm 2,1^b$	$6,34 \pm 0,2^b$
G3	$32,75 \pm 1,9^b$	$6,47 \pm 0,7^b$
G4	$39,12 \pm 2,4^a$	$7,06 \pm 0,3^a$
G5	$30,95 \pm 2,0^b$	$6,29 \pm 0,9^b$
G6	$31,55 \pm 2,6^b$	$6,34 \pm 0,4^b$
G7	$32,96 \pm 2,3^b$	$6,48 \pm 0,9^b$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

A análise dos dados referentes à área da bainha de mielina dos axônios no segmento de nervo N1 (Fig. 26) não evidenciou diferença significativa entre os grupos G1 ($2,87 \pm 0,6 \mu\text{m}^2$) e G4 ($2,66 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$). Entre os grupos G2 ($2,05 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$), G3 ($2,02 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$), G5 ($1,95 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) e G6 ($2,05 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$) também não houve diferença significativa, porém estes grupos foram significativamente diferentes dos grupos G1 e G4. O grupo G7 ($1,49 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) apresentou a menor área com relação à bainha de mielina, diferindo significativamente dos demais grupos.

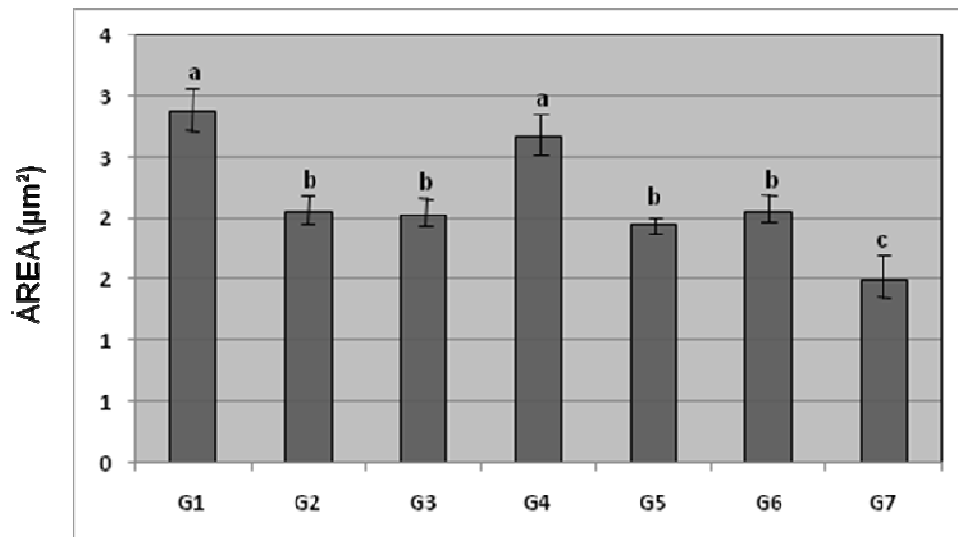


Figura 26: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área da bainha de mielina dos axônios no segmento de nervo N1. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

A análise dos dados referentes ao diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N1 (Fig. 25) não evidenciou diferença significativa entre os grupos G1 ($7,19 \pm 0,4 \mu\text{m}$) e G4 ($7,06 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Não houve diferença significativa entre os grupos G2 ($6,34 \pm 0,2 \mu\text{m}$), G3 ($6,47 \pm 0,7 \mu\text{m}$), G5 ($6,29 \pm 0,9 \mu\text{m}$), G6

($6,34 \pm 0,4 \mu\text{m}$) e G7 ($6,48 \pm 0,9 \mu\text{m}$). Porém, estes grupos foram significativamente diferentes dos grupos G1 e G4.

Tabela 8: Segmento de nervo N1 - Área da bainha de mielina dos axônios.

Grupo	Área da bainha de mielina (μm^2)
C1	$2,87 \pm 0,6^{\text{a}}$
G2	$2,05 \pm 0,3^{\text{b}}$
G3	$2,02 \pm 0,5^{\text{b}}$
G4	$2,66 \pm 0,7^{\text{a}}$
G5	$1,95 \pm 0,2^{\text{b}}$
G6	$2,05 \pm 0,4^{\text{b}}$
G7	$1,49 \pm 0,7^{\text{c}}$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.8. Análise morfológica do segmento de nervo N1

Os cortes histológicos do segmento de nervo N1 estão representados na figura 27. Observa-se semelhança em relação à densidade, tamanho, forma das fibras de nervos assim como bainhas de mielina regulares e delimitadas, em todos os grupos. Entretanto o grupo G1 (normal) apresenta a melhor organização das fibras, quando comparados com os demais grupos.

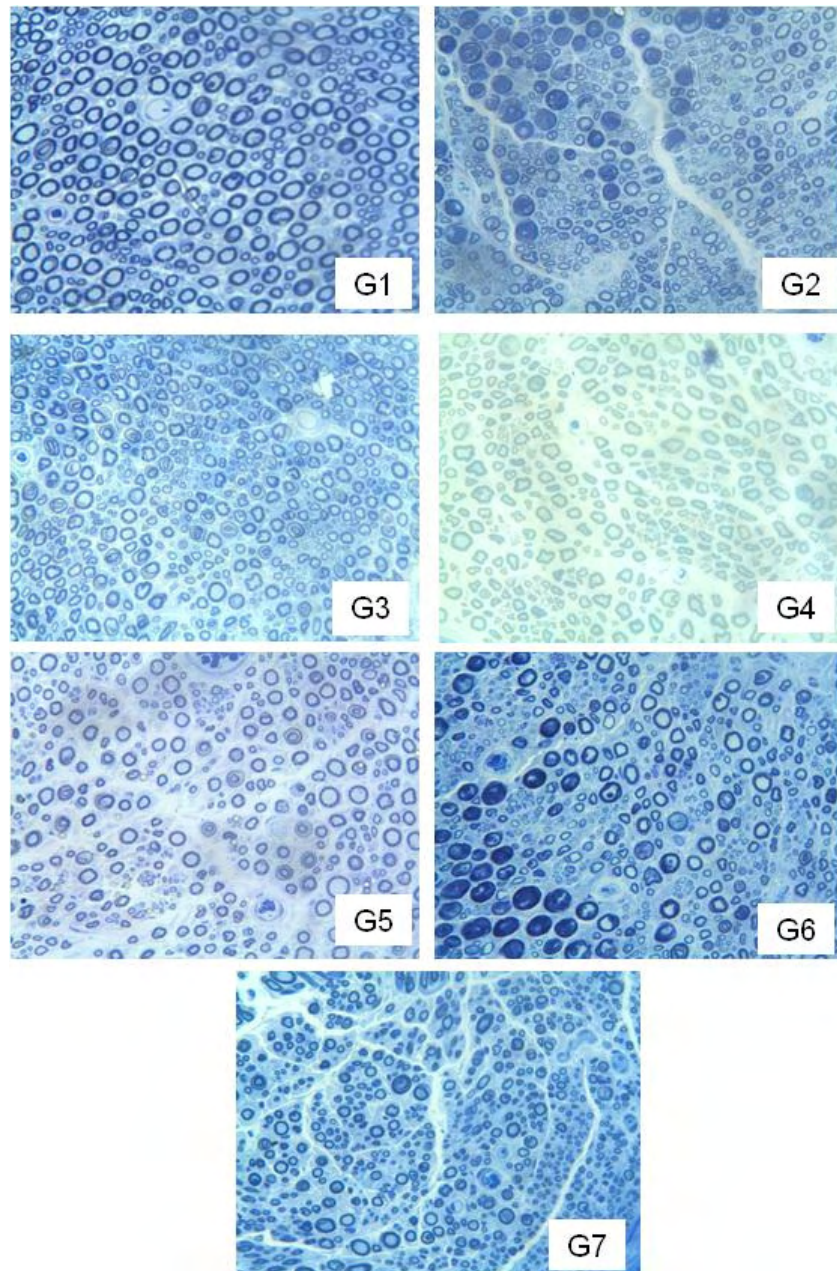


Figura 27: Cortes histológicos representativos dos segmentos de nervos N1 dos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7. Coloração por tetróxido de ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400x.

4.9. Análise morfométrica do segmento de nervo N3

Os dados referentes à densidade axonal em N3 (Fig. 28, Tabela 9) demonstraram que os grupos G2 ($0,001 \pm 0,001$ axônio/ μm^2), G6 ($0,001 \pm 0,001$ axônio/ μm^2) e G7 ($0,001 \pm 0,002$ axônio/ μm^2) não apresentaram diferenças entre si, entretanto apresentaram densidade axonal significativamente menor que os demais grupos. Os grupos G4 ($0,019 \pm 0,007$ axônio/ μm^2) e G5 ($0,017 \pm 0,005$ axônio/ μm^2) não diferiram entre si, entretanto apresentaram densidade axonal significativamente maior que o grupo G3 ($0,013 \pm 0,004$ axônio/ μm^2).

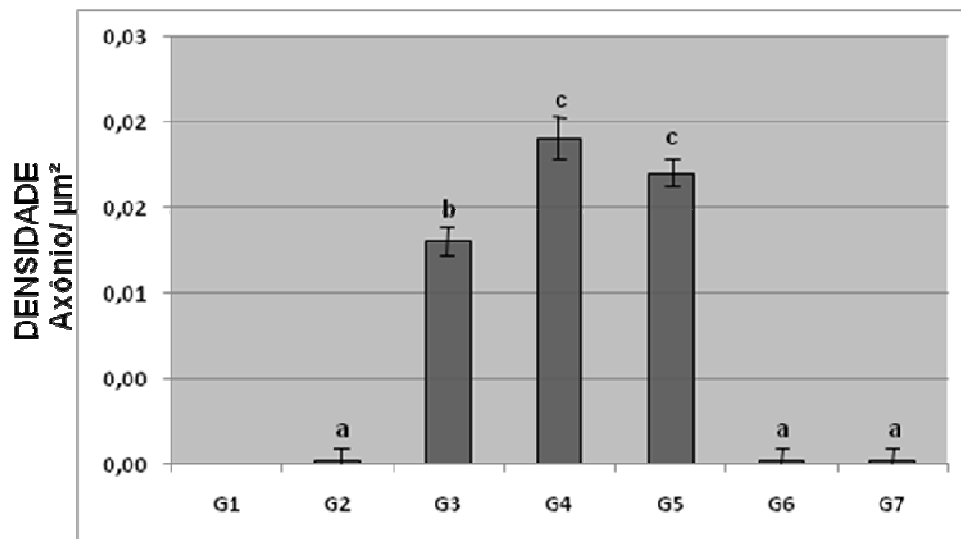


Figura 28: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da densidade axonal no segmento de nervo N3. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 9: Segmento de nervo N3 - Densidade Axonal.

Grupo	Densidade axonal (axônio/ μm^2)
G2	0,001 \pm 0,001 ^a
G3	0,013 \pm 0,004 ^b
G4	0,019 \pm 0,007 ^c
G5	0,017 \pm 0,005 ^c
G6	0,001 \pm 0,001 ^a
G7	0,001 \pm 0,002 ^a

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Os dados referentes à área axonal dos grupos G2 ($1,95 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$), G6 ($1,62 \pm 1,8 \mu\text{m}^2$) e G7 ($2,01 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$) não demonstraram diferenças significativas entre si, entretanto apresentaram densidade axonal significativamente menor que os demais grupos. Os grupos G3 ($25,50 \pm 2,1 \mu\text{m}^2$) e G4 ($26,58 \pm 2,4 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si. O grupo G5 ($15,01 \pm 2,2 \mu\text{m}^2$) foi diferente, significativamente, dos grupos G3 e G4, entretanto também apresentou área significativamente maior que os grupos G2, G6 e G7 (Fig. 29).

Com relação ao diâmetro mínimo (Fig. 30), os grupos G2 ($0,26 \pm 0,1 \mu\text{m}$), G6 ($0,21 \pm 0,2 \mu\text{m}$) e G7 ($0,22 \pm 0,1 \mu\text{m}$) não apresentaram diferenças entre si, entretanto apresentaram diâmetro significativamente menor quando comparado aos demais grupos. Os grupos G3 ($5,71 \pm 0,3 \mu\text{m}$) e G4 ($5,83 \pm 0,5 \mu\text{m}$) não diferiram entre si. O grupo G5 ($4,78 \pm 0,2 \mu\text{m}$) apresentou área axonal

significativamente menor, quando comparado com os grupos G3 e G4. Os dados de área e diâmetro mínimo estão expressos na tabela 10.

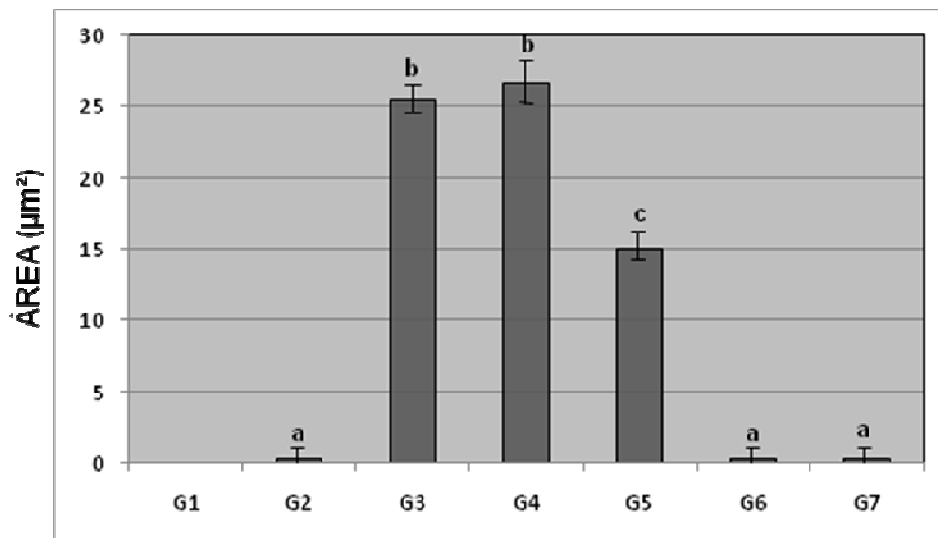


Figura 29: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área axonal no segmento de nervo N3. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

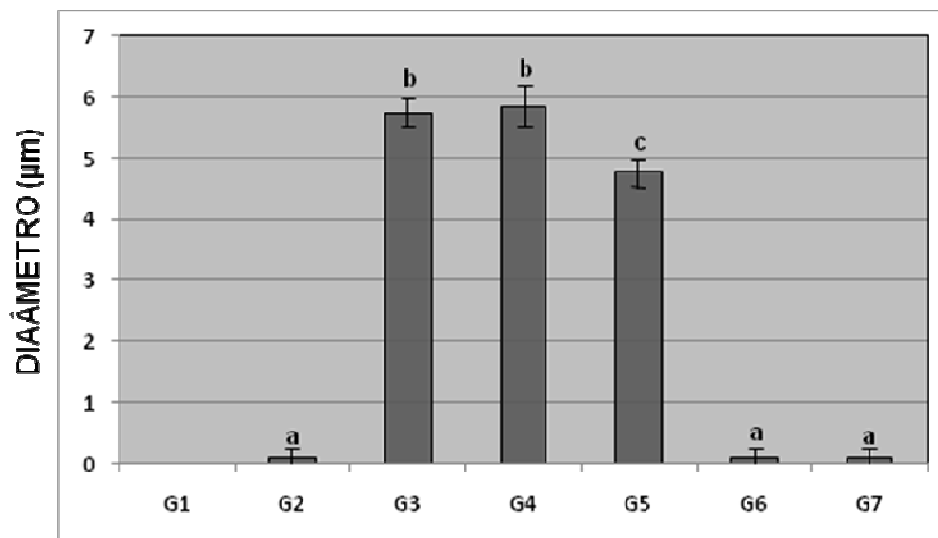


Figura 30: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões do diâmetro mínimo axonal no segmento de nervo N3. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 10: Segmento de nervo N3 – Área e Diâmetro Mínimo dos Axônios.

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro Mínimo (μm)
G2	$1,95 \pm 1,2^{\text{a}}$	$0,26 \pm 0,1^{\text{a}}$
G3	$25,50 \pm 2,1^{\text{b}}$	$5,71 \pm 0,3^{\text{b}}$
G4	$26,58 \pm 2,4^{\text{b}}$	$5,83 \pm 0,5^{\text{b}}$
G5	$15,01 \pm 2,2^{\text{c}}$	$4,78 \pm 0,2^{\text{c}}$
G6	$1,62 \pm 1,8^{\text{a}}$	$0,21 \pm 0,2^{\text{a}}$
G7	$2,01 \pm 1,2^{\text{a}}$	$0,22 \pm 0,1^{\text{a}}$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Os dados referentes à área da bainha de mielina (Fig. 29, Tabela 11) dos grupos G2 ($0,11 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$), G6 ($0,13 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) e G7 ($0,12 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) não demonstraram diferenças significativas entre si, porém apresentaram área significativamente menor que os demais grupos. Os grupos G3 ($1,99 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) e G4 ($1,91 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si. O grupo G5 ($1,70 \pm 0,6 \mu\text{m}^2$) foi significativamente diferente dos grupos G3 e G4.

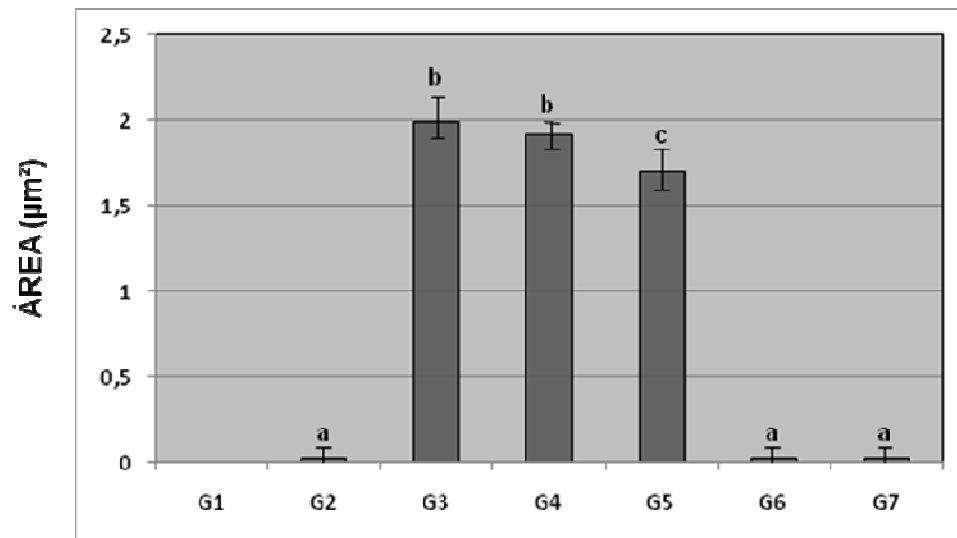


Figura 31: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área da bainha de mielina no segmento de nervo N3. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 11: Segmento de nervo N3 - Área da bainha de mielina.

Grupo	Área da bainha de mielina (µm²)
G2	0,11 ± 0,2 ^a
G3	1,99 ± 0,7 ^b
G4	1,91 ± 0,3 ^b
G5	1,70 ± 0,6 ^c
G6	0,13 ± 0,3 ^a
G7	0,12 ± 0,2 ^a

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.10. Análise morfológica no segmento de nervo N3

Os cortes histológicos do segmento de nervo N3 estão representados na figura 32. Observa-se semelhança nos grupos G2, G6 e G7, os quais apresentaram degeneração das fibras e grande quantidade de tecido conjuntivo. Os grupos G3, G4 e G5 apresentam semelhanças com relação à densidade axonal e área dos axônios, assim como bainhas de mielina delimitadas e regulares. O grupo G5 apresentou, aparentemente, discreta diminuição no diâmetro dos axônios, em relação aos grupos G3 e G4.

4.11. Análise morfométrica do segmento de nervo N5

Os dados referentes à densidade axonal em N5 (Fig. 33, Tabela 12) demonstraram semelhanças entre os grupos G4 ($0,032 \pm 0,005$ axônio/ μm^2) e G6 ($0,029 \pm 0,002$ axônio/ μm^2). Estes grupos apresentaram densidade axonal significativamente maior que os grupos G5 ($0,020 \pm 0,007$ axônio/ μm^2) e G7 ($0,022 \pm 0,008$ axônio/ μm^2), os quais não apresentaram diferenças entre si.

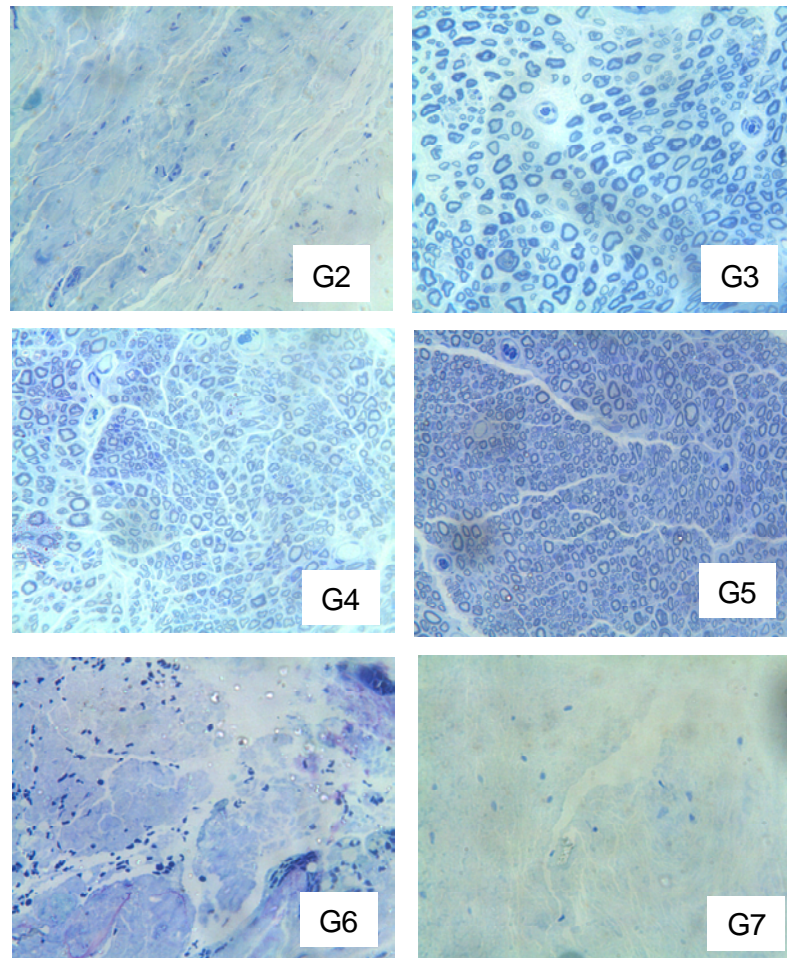


Figura 32: Cortes histológicos representativos dos segmentos de nervos N3 dos grupos G2, G3, G4, G5, G6, G7. Coloração por tetróxido de ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400x.

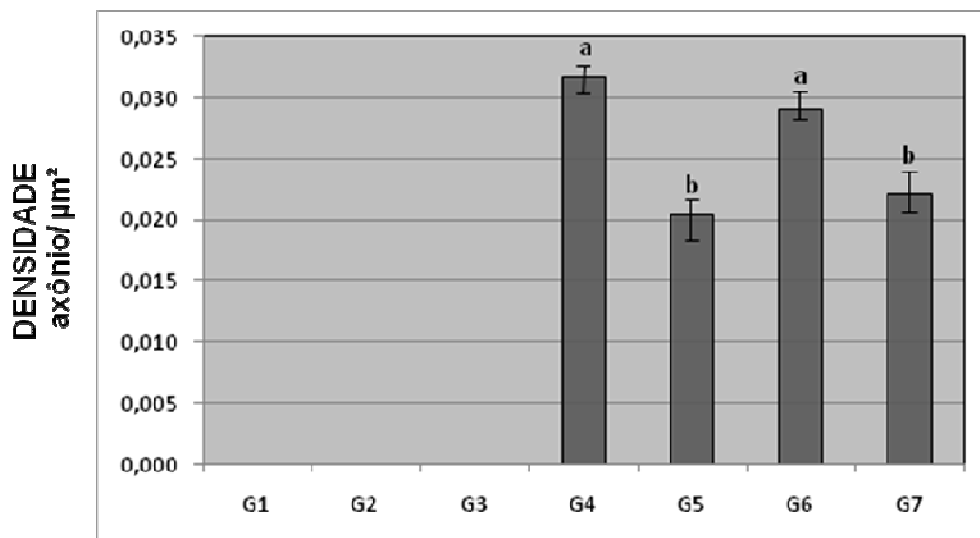


Figura 33: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da densidade axonal no segmento de nervo N5. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 12: Segmento de nervo N5 - Densidade Axonal.

Grupo	Densidade axonal (axônio/μm²)
G4	0,032 ± 0,005 ^a
G5	0,020 ± 0,007 ^b
G6	0,029 ± 0,002 ^a
G7	0,022 ± 0,008 ^b

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

O grupo G4 ($8,45 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) apresentou a menor área axonal, quando comparado com os demais grupos. O grupo G5 ($10,40 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$) não diferiu do grupo G6 ($10,06 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$), entretanto apresentaram área significativamente menor que o grupo G7 ($13,19 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$) (Fig. 34, Tabela 13).

Com relação ao diâmetro mínimo, os grupos G4 ($3,29 \pm 0,2 \mu\text{m}$), G5 ($3,75 \pm 0,7 \mu\text{m}$) e G6 ($3,58 \pm 0,0,7 \mu\text{m}$) não apresentaram diferenças entre si, porém foram significativamente menores que o grupo G7 ($4,11 \pm 0,5 \mu\text{m}$) (Fig. 35, Tabela 13).

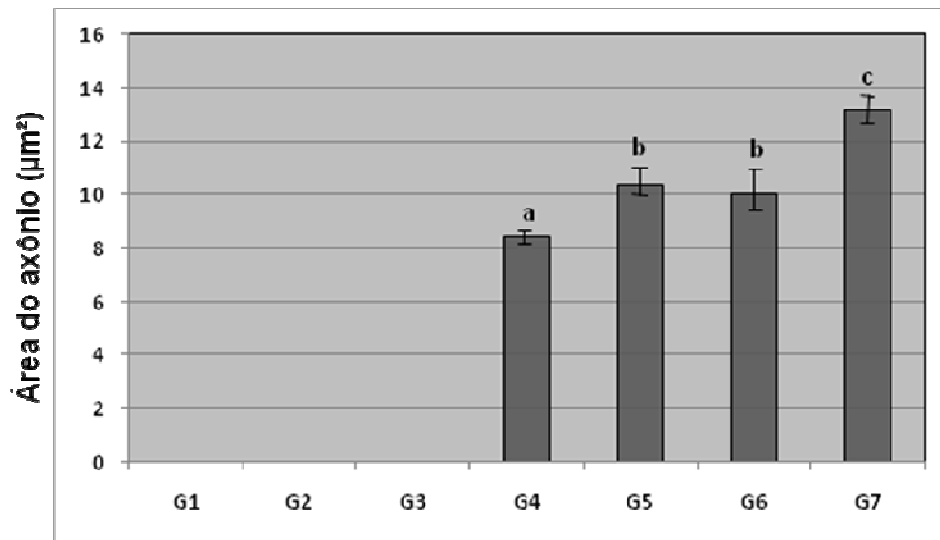


Figura 34: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área dos axônios no segmento de nervo N5. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

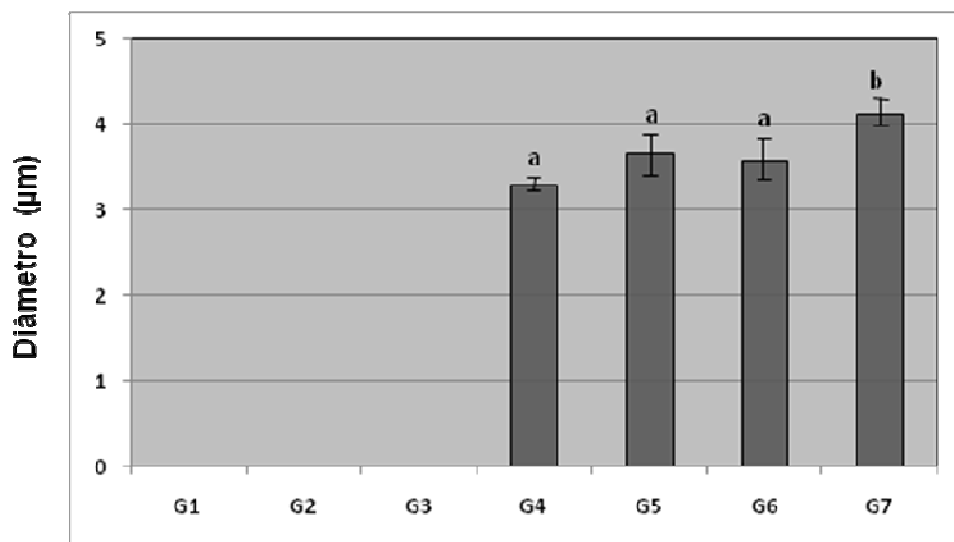


Figura 35: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões do diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N5. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 13: Segmento de nervo N5 – Área e Diâmetro Mínimo dos Axônios.

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro Mínimo (μm)
G4	$8,45 \pm 0,7^a$	$3,29 \pm 0,2^a$
G5	$10,40 \pm 1,2^b$	$3,65 \pm 0,7^a$
G6	$10,06 \pm 1,4^b$	$3,58 \pm 0,7^a$
G7	$13,19 \pm 1,2^c$	$4,11 \pm 0,5^b$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

O grupo G4 ($1,37 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) apresentou a menor área da bainha de mielina, quando comparado com os demais grupos. Os grupos G5 ($1,50 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$), G6 ($1,52 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$) e G7 ($1,52 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) não diferiram entre si (Fig. 36, Tabela 14).

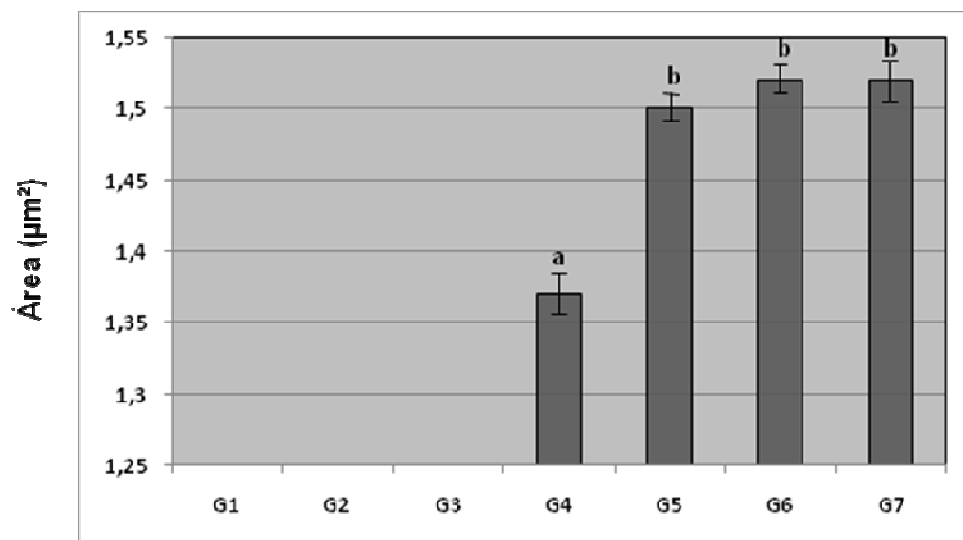


Figura 36: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área da bainha de mielina dos axônios no segmento de nervo N5. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 14: Segmento de nervo N5 - Área da bainha de mielina.

Grupo	Área da bainha de mielina (μm^2)
G4	$1,37 \pm 0,7$ ^a
G5	$1,50 \pm 0,3$ ^b
G6	$1,52 \pm 0,4$ ^b
G7	$1,52 \pm 0,7$ ^b

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.12. Análise morfológica do segmento de nervo N5

Os cortes histológicos representativos do segmento de nervo N5 (Fig. 37) mostram semelhanças, com relação à área axonal, diâmetro mínimo e bainha de mielina, entre os grupos G4, G5, G6 e G7. Os grupos G5 e G7 apresentaram, aparentemente, discreta diminuição na densidade axonal, quando comparados com os grupos G4 e G6.

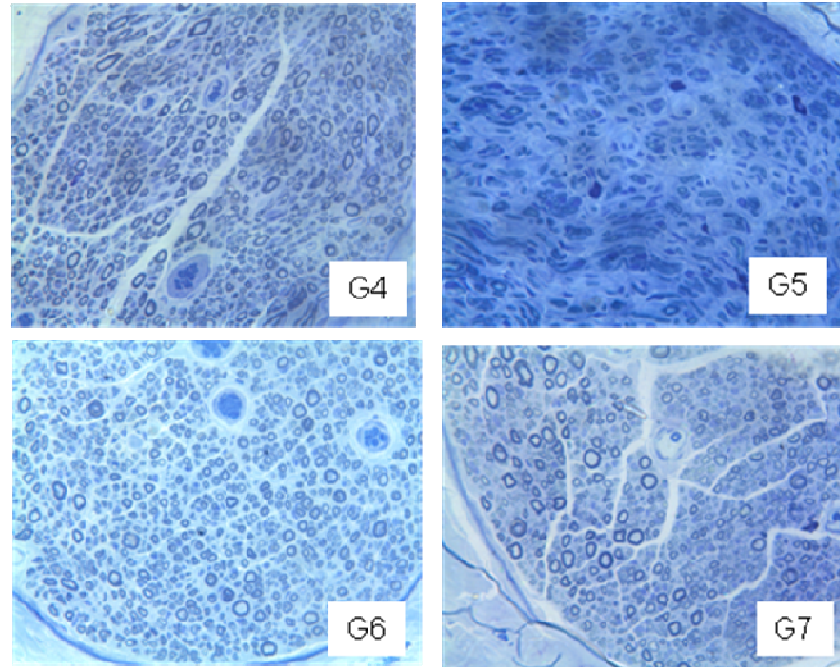


Figura 37: Cortes histológicos representativos dos segmentos de nervos N5 dos grupos G4, G5, G6, G7. Coloração por tetróxido de ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400x.

4.13. Análise morfométrica do segmento de nervo N7

Os dados referentes à densidade axonal em N7 (Fig. 38, Tabela 15) demonstraram semelhanças entre os grupos G5 ($0,030 \pm 0,003$ axônio/ μm^2) e G7 ($0,029 \pm 0,005$ axônio/ μm^2).

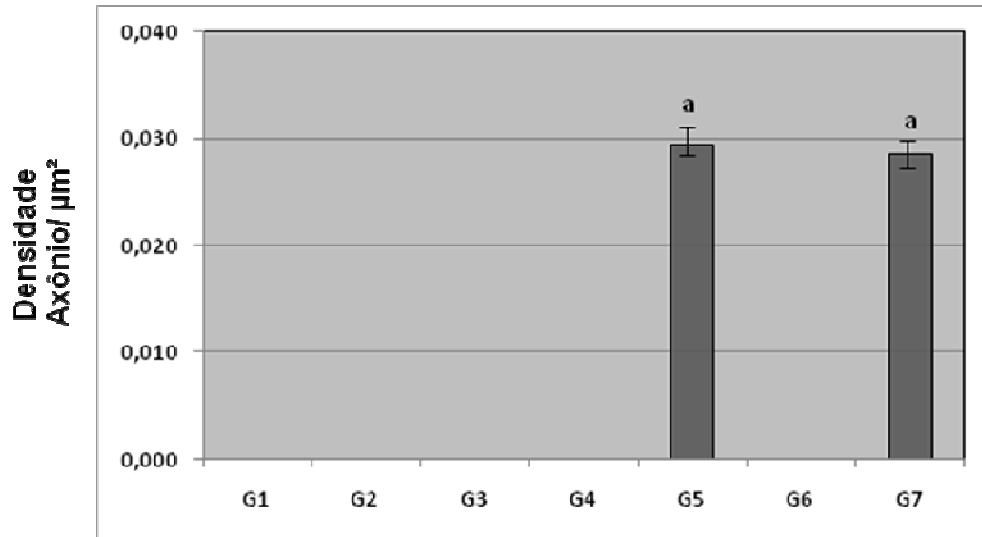


Figura 38: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da densidade axonal no segmento de nervo N7. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 15: Segmento de nervo N7 - Densidade Axonal.

Grupo	Densidade axonal (axônio/μm ²)
G5	0,030 ± 0,003 ^a
G7	0,029 ± 0,005 ^a

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Os grupos G5 ($10,06 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$) e G7 ($8,76 \pm 1,1 \mu\text{m}^2$) não apresentaram diferenças entre si, quanto à área do axônio. O diâmetro mínimo nos grupos G5 ($3,58 \pm 0,6 \mu\text{m}$) e G7 ($3,33 \pm 0,4 \mu\text{m}$) também evidenciou semelhanças entre estes grupos (Fig. 39, 40 e Tabela 16).

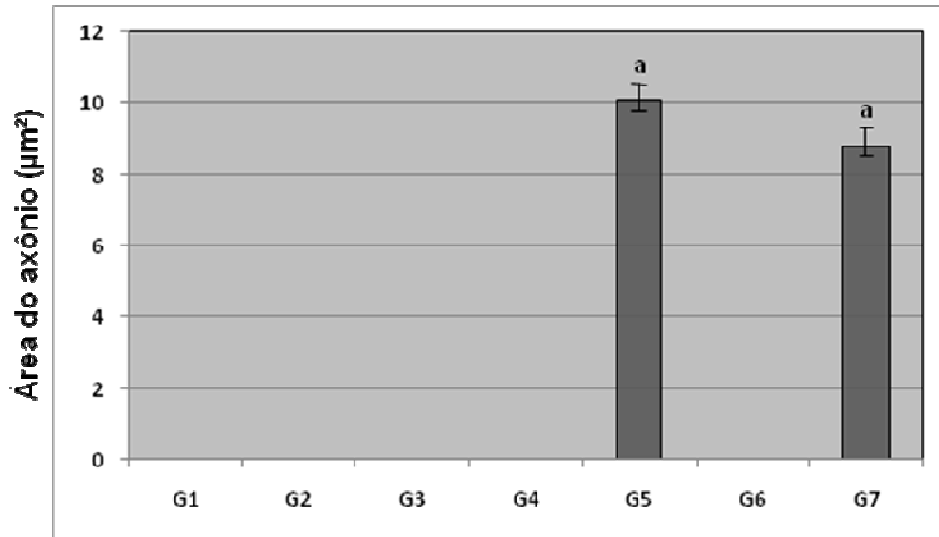


Figura 39: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área do axônio no segmento de nervo N7. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

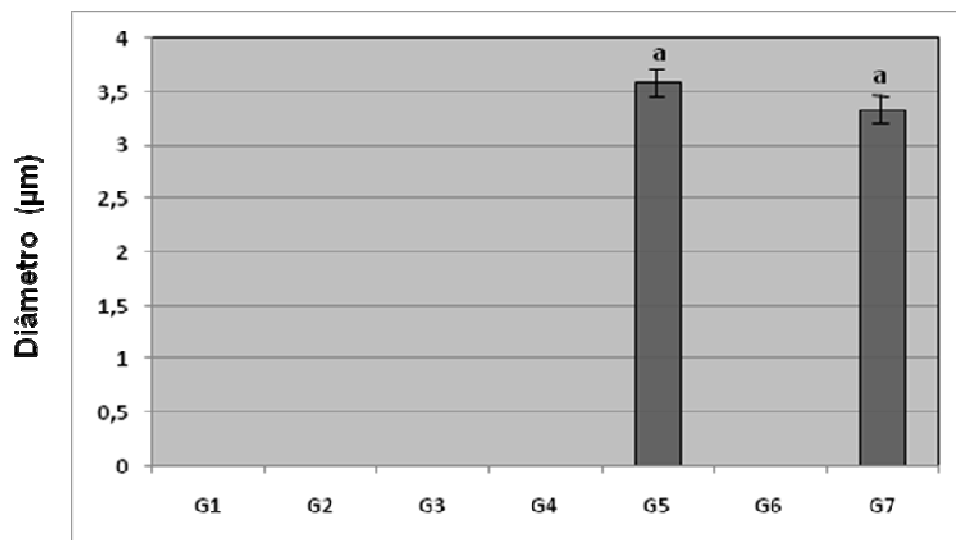


Figura 40: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões do diâmetro mínimo dos axônios no segmento de nervo N7. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 16: Segmento de nervo N7 – Área e Diâmetro Mínimo dos Axônios.

Grupo	Área (μm^2)	Diâmetro Mínimo (μm)
G5	$10,06 \pm 1,4^a$	$3,58 \pm 0,6^a$
G7	$8,76 \pm 1,1^a$	$3,33 \pm 0,4^a$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Com relação à área da bainha de mielina, o grupo G5 ($1,14 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$) apresentou área significativamente menor que G7 ($1,49 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$) (Fig. 41 e Tabela 17).

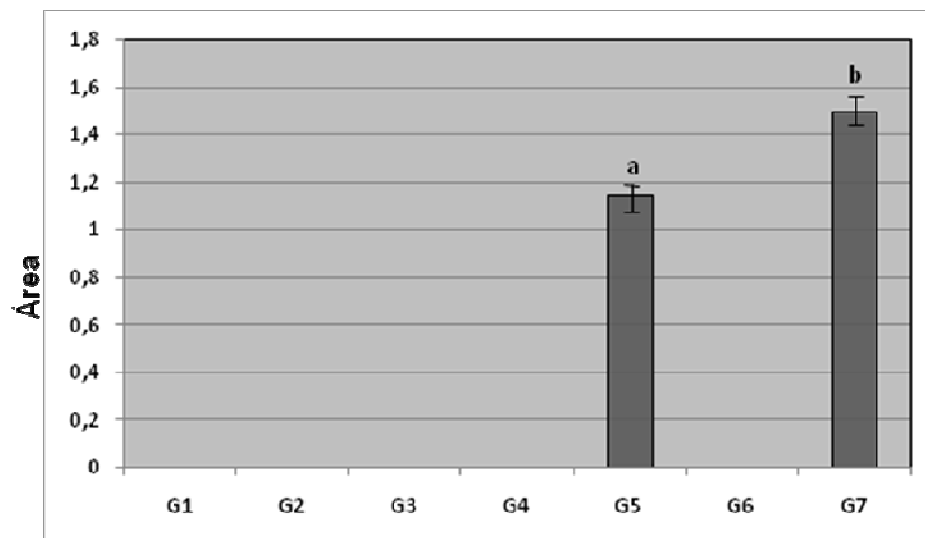


Figura 41: Estão representadas no gráfico as médias e os erros padrões da área da bainha de mielina no segmento de nervo N7. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 17: Segmento de nervo N7 – Área da bainha de mielina.

Grupo	Área da bainha de mielina (μm^2)
G5	$1,14 \pm 0,7^{\text{a}}$
G7	$1,49 \pm 0,5^{\text{b}}$

Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4.14. Análise morfológica do segmento de nervo N7

Os cortes histológicos representativos dos segmentos de nervos N7 (Fig. 42) evidenciaram a grande semelhança entre os grupos G5 e G7. No grupo G7 observa-se apenas discreto e aparente aumento na área da bainha de mielina, em relação ao G5.

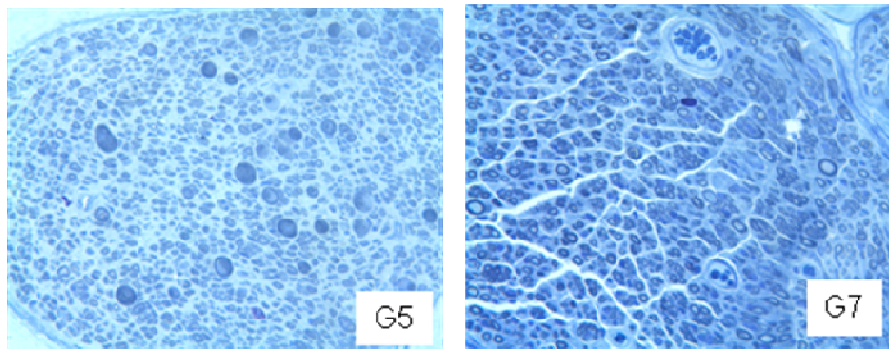


Figura 42: Cortes histológicos representativos dos segmentos de nervos N7 dos grupos G5 e G7. Coloração por tetróxido de ósmio e azul de toluidina. Microscopia óptica com aumento de 400x.

Com relação aos segmentos de nervos N2 (região da neurografia término-terminal), N4 (referente ao “T” da neurografia término-lateral do primeiro enxerto) e N6 (referente ao “T” da neurografia término-lateral do segundo enxerto), não foram obtidos cortes histológicos inteiros, impossibilitando desta forma a visualização e análise das fibras de nervos.

DISCUSSÃO

A escolha do animal de experimentação deve ter como base as características e ou as necessidades da pesquisa a ser realizada, seguindo os Princípios Éticos da Experimentação Animal, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) os quais se apóiam na sensibilidade, bom senso e boa ciência (Schneider & Souza, 2003).

A utilização de diversas espécies de animais para a pesquisa de regeneração de nervos é relatada na literatura, como por exemplo, o uso de coelhos (Cramer & Essen, 1995), gatos (Moldovan et al., 2006), cães (Sundine et al., 2003), camundongos (Myckatyn et al., 2004), ratos (Viterbo, 1992; Bertelli et al., 2006) e primatas (Mackinnon & Dellon, 1990; Mennen, 1998).

Neste trabalho foi utilizado o rato como animal de experimentação por ser um modelo freqüentemente encontrado em diversos trabalhos envolvendo lesão, reparação e regeneração de nervos periféricos (Mackinnon et al., 1985; Cederna et al. 2001). Em adição, é animal resistente, de fácil manipulação e que apresenta baixo custo de manutenção (Viterbo, 1992a; Viterbo et al. 1994a; Bertelli et al., 1996).

A opção por animais do sexo masculino ocorreu no sentido de se eliminar algumas variáveis que pudessem interferir com os resultados finais. As fêmeas apresentam variações dos ritmos hormonais, em decorrência do ciclo estral feminino, com conseqüente ação dos hormônios adenohipofisários e hormônios gonadais, como o estrógeno e a progesterona (Lincoln, 1980; Carandente et al., 1989).

Com o avanço da idade, a qualidade e velocidade da regeneração tecidual (Fawcett, 1992, Vaughan, 1992), assim como a liberação de fatores neurotróficos (Andrews, 1996) são prejudicadas. Devido a estes fatores, foram utilizados animais jovens.

Devido à alta variabilidade de resultados encontrados em pesquisas de regeneração de nervos, e considerando que alguns animais podem evoluir para óbito durante experimentos de longa duração (Nahas & Ferreira, 2005), optou-se por utilizar 20 animais em cada grupo experimental, número correspondente ao dobro de animais proposto por Sébille (1981).

O modelo experimental utilizado neste trabalho foi o proposto por Viterbo (1992a), para estudos de neurorrafia término-lateral. Os nervos fibular comum e tibial são de fácil acesso, apresentam-se anatomicamente próximos e inervam músculos distintos. O músculo tibial cranial, inervado apenas pelo nervo fibular comum, também é de fácil acesso, superficial, palpável e não sofre a atuação de inervações secundárias.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob microscópio cirúrgico. A introdução deste equipamento nos procedimentos de neurorrafias foi realizada por Smith em 1964 e, desde então, a sua utilização é recomendada para aumentar a precisão do ato cirúrgico e conseqüentemente, diminuir o trauma operatório, o que possibilita melhor recuperação funcional (Ferreira et al., 1974; Terzis, 1979; Millesi, 1990).

O anestésico utilizado em todos os procedimentos cirúrgicos e também para o sacrifício dos animais foi o pentobarbital de sódio. Este anestésico é utilizado em diversos trabalhos de regeneração de nervos, apresenta baixo custo

e potência adequada para os procedimentos (Reis et al., 1998; Wang, 1999; Oliveira et al., 2000; Stipp, 2008).

Elegeu-se aleatoriamente o membro pélvico direito dos animais para os estudos de reinervação. O procedimento cirúrgico inicial, realizado em todos os grupos, consistiu na exposição da área anatômica de interesse do lado esquerdo e direito e remoção do enxerto de ambos os lados. A intervenção cirúrgica no lado esquerdo foi realizada apenas para a coleta do segmento de nervo sural, o qual foi utilizado posteriormente como o enxerto. Após a remoção dos segmentos para enxertos, determinou-se por sorteio a qual grupo experimental pertenceria o animal em questão, evitando desta forma tendenciosidade (Berkuo et al., 1981).

Para os enxertos, foi utilizado o nervo cutâneo caudal da sura. Por este ser um nervo predominantemente sensitivo (Swett et al., 1991), a sua remoção não teria influência nas análises de recuperação funcional no membro posterior do animal. Em adição, é o nervo mais utilizado em estudos experimentais de enxertos autogênicos, para regeneração de nervos (Millesi, 1982), sendo o enxerto autólogo uma boa opção para o tratamento de perda de tecido nervoso com espaço intersegmentar longo (Watchmaker & MacKinnon, 1997; Battiston et al., 2000).

A extensão dos enxertos utilizados neste trabalho correspondeu a três centímetros. Este comprimento foi escolhido para evitar a tensão na região da sutura entre o nervo doador e o enxerto, e entre o enxerto e o músculo alvo, o que poderia prejudicar a regeneração tecidual (Fortes et al, 1999; Ferreira et al, 1974; Sunderland, 1978; Watchmaker & Mackinnon, 1997). Em trabalho experimental com ratos, Goheen-Robillard et al.(2002) utilizaram enxerto de nervo longo, com oito centímetros, suturado com neurorrafia término-lateral entre o nervo tibial

intacto e o nervo tibial contralateral, e observaram regeneração através do enxerto. Segundo Jenq & Coggeshall (1987), o tamanho do enxerto autólogo não influencia a qualidade da regeneração.

O modelo experimental desenvolvido por Viterbo (1992a), e também utilizado por Viterbo et al. (1992b; 1994b; 1994c), utiliza-se de enxerto de nervo autólogo fresco, o qual é fixado à face lateral de um nervo intacto com e sem janela epineural, através de três pontos simples com fio de náilon monofilamentar 10-0.

Este procedimento foi seguido neste trabalho, utilizando-se de enxerto autólogo, longo, preservando a orientação das fibras axoniais. Entretanto, a polaridade das fibras axoniais permaneceu invertida, uma vez que o nervo cutâneo caudal da sura é predominantemente sensitivo, sendo que sua polaridade se dá de distal para proximal. O coto proximal do enxerto foi suturado na face lateral do nervo doador, seguindo um ângulo de 90° entre o enxerto e o nervo doador. O coto distal do enxerto foi posteriormente introduzido no músculo tibial cranial direito, com aproximadamente um milímetro de profundidade, e suturado à fáscia muscular com um ponto simples, evitando-se assim seu deslocamento (Papalia et al., 2001). Em estudo experimental com ratos, Sotereanos et al. (1992) inverteram a polaridade de um segmento de nervo ciático e compararam com reparo do mesmo nervo na posição normal e concluíram que a inversão da polaridade não influenciou a recuperação final da função. Nakatsuka et al. (2002), baseados em avaliações eletrofisiológicas e histológicas, também relataram que a orientação das fibras axoniais do enxerto não influencia no resultado final da regeneração, após seis meses de recuperação.

A utilização de sutura com três pontos simples de fio monofilamentar de náilon 10-0 também foi relatada por Mackinnon (1989) e por Lundborg et al. (1994). A utilização de dois pontos (Caplan et al., 1999) ou de quatro pontos (Lundborg et al., 1994b; Goheen-Robillard et al., 2002) também é encontrada na literatura. Segundo Rappeti & Pippi (2000), o fio monofilamentar de náilon induz a menor reação tecidual, quando comparado aos fios de seda e catagute cromado. Para reduzir o risco de lesão não intencional nos axônios do nervo doador, no momento da sutura, foi utilizado o fio com calibre 10-0 (Braun, 1982).

Com relação à preservação ou não do epineuro no nervo doador, neste trabalho realizamos a neurorrafia término-lateral sem remoção de janela epineural no nervo doador, uma vez que Viterbo et al. (1992b; 1994c) realizaram a neurorrafia término-lateral com e sem remoção de janela epineural, e observaram que a preservação do epineuro não impede o crescimento axonal do nervo doador para o nervo receptor.

Segundo Reis et al. (1998), após 12 semanas, já é possível encontrar fibras de nervos em regeneração, dentro de um enxerto. De acordo com Mackinnon (1989) e Viterbo et al. (1992, 1994a, 1998), o resultado de uma neurorrafia estabiliza-se a partir dos seis meses de pós-operatório. Na literatura há trabalhos em que o tempo de acompanhamento pós-operatório varia de sete dias (Matsumoto et al., 1999) até 15 meses (Rab et al., 2002). Em todos os tempos de pós-operatório, há relatos de reinervação muscular. Decidiu-se, neste trabalho, por um tempo de observação pós-operatório de seis meses.

Foram criados sete grupos experimentais no sentido de elucidar os objetivos propostos.

No grupo G1, controle de normalidade, realizou-se a exposição da região anatômica de interesse, a qual correspondeu ao nervo ciático, nervo cutâneo caudal da sura, nervo tibial e nervo fibular comum, assim como do músculo tibial cranial. Neste grupo não foi realizado nenhum procedimento adicional, sendo este grupo utilizado para posterior comparação dos tratamentos com os resultados de normalidade.

No grupo G2, controle de desnervação, realizou-se a secção do nervo fibular comum, induzindo a desnervação do músculo tibial cranial direito, o qual correspondeu ao órgão alvo desnervado, sendo este músculo a fonte de estudo para avaliar a regeneração e recuperação funcional após os procedimentos cirúrgicos de reinervação. Assim, este grupo serviu para comparação e avaliação dos resultados obtidos com os tratamentos nos demais grupos.

Desta forma, estes dois grupos, G1 e G2, serviram para comparação com os tratamentos realizados nos grupos seguintes, avaliando os resultados obtidos, e se estes resultados aproximam-se do controle de normalidade ou do controle de desnervação.

O grupo G3 consistiu de apenas uma neurorrafia término-terminal no nervo fibular. A neurorrafia término-terminal é um procedimento já estabelecido na literatura como de escolha, quando possível, para o reparo primário de lesões de nervos. Deste modo, o grupo G3 serviu de comparação com os grupos em que se realizou a associação de outros procedimentos cirúrgicos para a regeneração e recuperação funcional do órgão alvo desnervado.

O grupo G4 consistiu-se de uma neurorrafia término-terminal no nervo fibular e, em adição, um enxerto de nervo unindo a face lateral do nervo tibial

intacto ao músculo tibial cranial, mediante neurotização muscular direta. Deste modo, se obteve duas vias para a oferta de axônios em regeneração.

O grupo G5 foi submetido aos mesmos procedimentos do grupo G4, porém com a adição de um segundo enxerto entre o nervo tibial intacto e o músculo tibial cranial, distal ao primeiro enxerto. Assim, neste grupo a oferta de axônios em regeneração foi através de três vias.

A comparação entre esses três grupos, ou seja, G3, G4 e G5, foi para elucidar se, a somatória de procedimentos cirúrgicos poderiam aumentar ou prejudicar a taxa de regeneração e recuperação funcional do órgão desnervado, alcançada apenas com a neurorrafia término-terminal.

No grupo G6 não foi realizada a neurorrafia término-terminal no nervo fibular. O nervo fibular foi seccionado e curvado, mantendo a desnervação do músculo tibial cranial. Imediatamente após a secção do nervo fibular, foi realizado o enxerto de nervo entre o nervo tibial intacto e o músculo tibial cranial desnervado, para posterior reinervação do músculo desnervado, via enxerto de nervo com neurorrafia término-lateral e neurotização muscular direta. Deste modo, o grupo G6 teve apenas uma via de oferta de axônios em regeneração, para o processo de reinervação.

No grupo G7 foram realizados os mesmos procedimentos do grupo G6, e em adição, foi realizado um segundo enxerto entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial. Assim, neste grupo houve duas fontes de oferta de axônios em regeneração.

O grupo G6 foi criado para comparar o enxerto de nervo, via neurorrafia término-lateral e neurotização muscular direta, à neurorrafia término-terminal, pois em alguns casos não se dispõem tanto do coto proximal como do coto distal do

nervo lesionado. O grupo G7 serviu para observar se a somatória de dois enxertos poderia aumentar a taxa de regeneração e recuperação funcional alcançada com apenas um enxerto.

Os cotos do nervo fibular comum, seccionados e não submetidos à neurorrafia término-terminal foram curvados e inseridos na musculatura adjacente com o objetivo de evitar regeneração espontânea e conseqüente reinervação muscular (Frey et al., 1982).

A avaliação dos resultados foi realizada a partir de dois métodos de análise funcional, avaliação da marcha e teste eletrofisiológico, avaliação da massa do músculo tibial cranial e análises morfométricas e morfológicas do músculo tibial cranial direito e de segmentos de nervos N1, N3, N5 e N7, correspondentes às regiões submetidas aos tratamentos cirúrgicos. Segundo Varejão et al. (2001), em trabalhos experimentais, a possibilidade de avaliação quantitativa da recuperação funcional após lesão de nervos, é fundamental para a análise dos resultados.

5.1. Análise da massa corporal

A avaliação da massa inicial dos animais é fundamental em estudos que envolvam procedimentos cirúrgicos e, especificamente, em trabalhos que avaliam massa muscular. Segundo Viterbo et al. (1992, 1993a, 1994a), a massa do músculo tibial cranial correlaciona-se diretamente com a massa do animal.

Neste trabalho, a massa dos animais foi semelhante em todos os grupos, demonstrando homogeneidade nas amostras, como sugerido por Vieira & Hossne (2001). Após seis meses de pós-operatório, houve aumento significativo da massa dos animais em todos os grupos, demonstrando que o procedimento cirúrgico não afetou o desenvolvimento normal dos animais. Em adição, entre os

grupos, não houve diferença significativa com relação à massa final dos animais, confirmando a homogeneidade das amostras e a padronização das condições ambientais e do tempo de pós-operatório.

5.2. Análise da marcha

O cálculo do índice da condição funcional do nervo ciático (IFC) avalia a marcha dos animais. Este teste baseia-se no padrão da caminhada dos animais, sendo expresso como porcentagem da perda da função normal (De Medinaceli et al., 1982). É considerado um teste de baixo custo e de fácil aplicação (Monte-Raso et al., 2008).

O índice da condição funcional do nervo ciático é baseado em quatro variáveis. A TOF, ou seja, a distância entre os dedos da pata experimental e os dedos da pata normal à frente, que mede a capacidade da pata experimental em suportar o peso do animal; a PL, distância entre o calcanhar e os dedos da mesma pata, a qual é curta em animais normais, pois eles caminham sobre os dedos; a TS, distância entre o primeiro e o quinto dedos e a IT, distância entre o segundo e o quarto dedos. Todas estas variáveis também indicam as condições do nervo fibular (De Medinaceli et al. 1982).

Goheen-Robillard et al. (2002), avaliaram o déficit muscular após unirem o nervo tibial intacto ao nervo tibial contralateral seccionado, através de enxerto longo, com neurografia término-lateral. Segundo esses autores, o índice funcional do nervo ciático não foi eficaz para demonstrar qualquer evidência de lesão funcional no nervo doador, uma vez que não foi suficiente para detectar pequenas alterações funcionais.

Em trabalho experimental com ratos, Maeda et al. (1999) avaliaram os efeitos da tensão no sítio da sutura, sobre a recuperação funcional após neurorrafia. Esses autores seccionaram o nervo ciático e, posteriormente, realizaram reparo por neurorrafia término-terminal, sem tensão. Em outro grupo, a neurorrafia foi realizada sob tensão e no terceiro grupo, realizaram enxerto de nervo entre os cotos proximal e distal do nervo seccionado. Desta forma, o controle foi o grupo da neurorrafia término-terminal sem tensão. A análise do índice funcional do ciático evidenciou melhor recuperação no grupo submetido à neurorrafia término-terminal sem tensão, quando comparado com o grupo do enxerto. O grupo submetido à tensão apresentou a menor recuperação funcional.

Segundo De Medinaceli et al. (1982), o IFC com porcentagem próxima de zero ($\pm 11\%$) indica a função normal, enquanto a perda da função apresenta-se como -100% , resultante da transecção total do nervo. Neste trabalho, o grupo G1 (normal) apresentou um IFC próximo de zero, confirmando o controle de normalidade, enquanto o grupo G2 (desnervado) apresentou IFC de -118% , confirmando a desnervação do músculo tibial cranial direito.

Os grupos G1 (normal) e G2 (desnervado) corroboram os relatos de De Medinaceli et al. (1982), e são utilizados neste trabalho para comparação com os demais grupos, no sentido de avaliar a recuperação funcional dos animais.

Os grupos G3, G4 e G5, não apresentaram diferença estatística entre si e também não diferiram significativamente do grupo G1 (normal). Estes dados demonstram que a neurorrafia término-terminal (G3) promoveu recuperação funcional, ao nível do controle de normalidade, e que os enxertos nos grupos G4 e G5, associados à neurorrafia término-terminal, não modificaram o índice de recuperação funcional alcançado no grupo G3. Desta forma, a realização dos

enxertos também não prejudicou a recuperação funcional obtida apenas com o procedimento de neurorrafia término-terminal (G3).

O grupo G7, no qual foram realizados dois enxertos, sem a neurorrafia término-terminal, apresentou perda da função normal, diferindo significativamente dos grupos G1 (normal), G3, G4 e G5. Entretanto, o grupo G7 foi diferente significativamente dos grupos G2 (desnervado) e G6.

Estes dados demonstram melhor recuperação funcional com a utilização de dois enxertos, sem neurorrafia término-terminal, quando comparados com a utilização de apenas um enxerto (grupo G6).

O grupo G6, no qual se realizou apenas um enxerto, não diferiu do grupo G2 (desnervado), demonstrando recuperação funcional prejudicada.

Neste modelo experimental, a avaliação do índice funcional do nervo ciático (De Medinaceli et al., 1982) é inadequada para avaliar a neurorrafia término-lateral com neurotização muscular direta. Isto se deve ao fato do teste ser utilizado para avaliação da recuperação dos nervos tibial e fibular, quando seccionados, porém tendo seus cotos, proximal e distal, novamente unidos, mantendo assim o padrão de contração muscular e conseqüentemente da caminhada.

Sendo o músculo gastrocnêmio, músculo flexor inervado pelo nervo tibial e o músculo tibial cranial, músculo extensor inervado pelo nervo fibular, estes nervos transmitem informações neuronais antagônicas. Sendo assim, neste modelo o enxerto entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial, alteraria o padrão de inervação do músculo tibial cranial, pois este músculo passaria a receber informações do nervo tibial, o qual transmite informações para flexão muscular.

Teoricamente esta inversão de inervação poderia alterar os resultados do índice funcional do ciático.

Entretanto, apesar deste fato, alguns grupos (G4, G5 e G7) apresentaram resultados positivos, levando-nos a atribuir estes resultados à possível neuroplasticidade cerebral, ou seja, neurônios do sistema nervoso central cumprindo outras funções. Desta forma, aproveitando-se de vias periféricas, manteriam o padrão de contração dos distintos músculos, ou seja, o músculo tibial cranial com padrão extensor e o músculo gastrocnêmio com padrão flexor, apesar da informação neuronal ser transmitida por vias antagônicas.

4.3. Análise eletrofisiológica

A avaliação eletrofisiológica fornece dados de latência e amplitude. Segundo Robinson & Snyder-Mackler (2001), a latência corresponde aos dados relacionados à condução do impulso nervoso, enquanto a amplitude representa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico.

Nos testes eletrofisiológicos, realizados neste trabalho, foram utilizados eletrodos de captação com agulha. Este tipo de eletrodo é preferível para o registro do potencial de ação motor composto de pequenos músculos e músculos atroficos, uma vez que a interferência dos músculos vizinhos é menos visível (Kimura, 1987).

Com relação à latência, não houve diferença significativa entre os grupos G1 (normal), G3, G4, G5 e G7. Entretanto esses grupos apresentaram latência significativamente menor quando comparados com os grupos G2 (desnervado) e G6. Em adição, o grupo G6 apresentou latência significativamente menor que o grupo G2 (desnervação), no qual a latência tendeu ao infinito.

Com relação à amplitude, os grupos G3, G4, G5 e G7 não apresentaram diferenças significativas entre si. Porém, quando comparados com o grupo G1 (normal), apresentaram diminuição significativa da amplitude.

Nos grupos G1 (normal), G3, G4, G5 e G7, foram observados dados de amplitude significativamente maiores que nos grupos G6 e G2 (desnervado). Entretanto, no grupo G6 houve diminuição da amplitude, não diferindo significativamente do grupo G2 (desnervado).

No grupo G2 foi observado aumento da latência, tendendo ao infinito e ausência de resposta referente à amplitude. Esta ausência de resposta referente à amplitude indica que a maioria das fibras não está conduzindo o impulso nervoso (Kimura, 1987), confirmando a secção do nervo fibular comum com conseqüente desnervação do músculo tibial cranial.

Entretanto, o grupo G6 alcançou uma latência média de $2,60 \pm 0,9$ ms, sendo significativamente diferente do grupo G2. Porém, a amplitude de $1,6 \pm 0,3$ mV não diferiu significativamente do grupo G2. Apesar da presença de resposta referente à amplitude, no grupo G6, o teste estatístico não detectou diferença significativa.

Neste trabalho foi observado após seis meses do processo de reparo, amplitude de $13,5 \pm 6,1$ mV no grupo G3 e de $10,6 \pm 3,2$ mV no grupo G7. Estes resultados corroboram os de Yan et al. (2002b). Estes autores realizaram a secção do nervo fibular comum e através de neurorrafia término-lateral, suturaram o coto distal do nervo seccionado à face lateral do nervo tibial, em um ângulo de 90° , obtendo após um período de 11 meses, amplitude de $10,8 \pm 5,3$ mV.

O aumento significativo da amplitude detectada nos grupos G3, G4, G5 e G7, assim como uma latência significativamente menor, quando comparados com

o grupo G2 (desnervado), evidencia reinervação muscular no músculo tibial cranial, após os processos de reparo de nervos, demonstrando a condução nervosa através da neurorrafia término-terminal, como também através dos enxertos com neurorrafia término-lateral e neurotização muscular direta (G7).

Em adição, os enxertos entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial (G4 e G5), não afetaram o processo de regeneração das fibras obtido com a neurorrafia término-terminal (G3).

5.4. Análise do músculo tibial cranial

5.4.1 Massa do músculo tibial cranial

Com relação à massa do músculo tibial cranial direito (MTCD), o maior valor médio foi encontrado no grupo G1 e o menor valor no grupo G2, respectivamente controles de normalidade e desnervação, resultado que era esperado. Os dados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos G3, G4 e G5. Quando comparados com o grupo G1 (normal), apresentaram diminuição significativa da massa do MTCD. Entretanto, a comparação destes grupos (G3, G4 e G5) com o grupo G2 (desnervado), demonstrou aumento significativo da massa do MTCD.

Os grupos G6 e G7 não apresentaram diferença significativa entre si. Comprados com o grupo G2 (desnervado), houve um aumento significativo da massa. Entretanto, os grupos G6 e G7 apresentaram média da massa do MTCD significativamente menor, quando comparados com os grupos G1 (normal), G3, G4 e G5.

Viterbo et al. (1998) compararam a neurorrafia término-lateral com e sem epineuro no nervo doador. Nos animais submetidos à neurorrafia término-lateral com epineuro, a média da massa do MTC foi de 0,45 ($\pm 0,15$) g, enquanto nos animais submetidos à neurorrafia término-lateral sem epineuro foi de 0,47 ($\pm 0,18$) g. No presente trabalho, os grupos G6 ($0,367 \pm 0,03$ g) e G7 ($0,371 \pm 0,03$ g), referentes aos enxertos com neurorrafia término-lateral com epineuro e neurotização muscular direta apresentaram massa muscular inferior àquela encontrada por Viterbo et al. (1998). Provavelmente a neurotização muscular direta com dois enxertos não se equipara à neurorrafia término-lateral, como descrita por estes autores. Talvez a utilização de mais enxertos poderiam aumentar a regeneração axonal e conseqüentemente a massa do músculo desnervado.

Em adição, os grupos G3 ($0,750 \pm 0,03$ g), G4 ($0,753 \pm 0,04$ g) e G5 ($0,752 \pm 0,04$ g) submetidos à neurorrafia término-terminal associada ou não aos enxertos, apresentaram massa superior às encontradas por Viterbo et al. (1998). Porém, em alguns casos não estão presentes o coto proximal e ou distal, impossibilitando a realização da neurorrafia término-terminal.

Papalia et al. (2001), em estudo com ratos, seccionaram o nervo fibular, removendo um segmento deste nervo, o qual foi posteriormente utilizado como enxerto. Desta forma, promoveram a desnervação do músculo tibial cranial. Imediatamente após a remoção do enxerto, o coto proximal deste foi suturado à face lateral do nervo tibial intacto, através de neurorrafia término-lateral sem janela epineural. O coto distal deste enxerto foi inserido no MTCD perfazendo a neurotização muscular direta. Este grupo foi denominado de grupo 1. O grupo 2 foi o controle de desnervação e o grupo 3, controle de normalidade. Segundo

estes autores, o músculo tibial cranial do grupo 1 apresentou média de $0,21 \pm 0,02$ g (35,6%), no grupo 2 a média foi de $0,09 \pm 0,02$ g (15,9%) e no grupo 3 foi de $0,59 \pm 0,02$ g (100%).

Em nosso trabalho, a massa do MTCD do grupo desnervado (G2) foi de $0,16 \pm 0,02$ g (18,1%), do grupo G6 a massa do MTC foi de $0,36 \pm 0,03$ g (40,9%), no grupo G7 foi de $0,37 \pm 0,03$ g (43%) e no grupo G1 (normal) foi de $0,95 \pm 0,02$ g (100%). Na avaliação em porcentagem, os grupos G6 e G7, apresentam massas maiores que as encontradas por Papalia et al. (2001).

Os dados referentes à massa do músculo tibial cranial demonstram que os tratamentos realizados nos grupos G3, G4 e G5, assim como nos grupos G6 e G7, foram eficazes em reduzir atrofia do músculo tibial cranial, como a encontrada no grupo G2 (desnervado).

5.4.2 Análise morfométrica do músculo tibial cranial

Avaliação morfométrica do músculo tibial cranial direito, o grupo G2 (desnervado) apresentou menor área da fibra muscular e menor diâmetro das fibras musculares, quando comparado aos demais grupos, evidenciando assim a atrofia muscular pós-secção do nervo fibular comum e confirmando a desnervação do músculo tibial cranial.

Os grupos G3, G4 e G5 não apresentaram diferenças entre si, nos parâmetros avaliados (área e diâmetro mínimo das fibras musculares) e em adição, apresentaram área e diâmetro mínimo significativamente maior que o grupo G2 (desnervado), confirmando a reinervação muscular pós- tratamentos cirúrgicos e corroborando os resultados encontrados nos testes funcionais (avaliação da marcha e testes eletrofisiológicos) e na massa do músculo tibial

cranial direito. Quando comparados com o grupo G1 (normal), os grupos G3, G4 e G5 não apresentaram diferenças significativas.

O grupo G7, quando comparado com os grupos G1 (normal), G3, G4 e G5, não diferiu significativamente destes. Dado este, extremamente interessante pelo fato da realização de dois enxertos entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial serem suficientes em reduzir a atrofia muscular. Deve-se considerar neste caso a facilidade técnica para a realização de dois enxertos, quando comparados com a realização da neurografia término-terminal.

O grupo G6 apresentou área e diâmetro mínimo das fibras musculares significativamente menores que as dos grupos G1, G3, G4, G5 e G7, entretanto os parâmetros foram significativamente maiores que os do grupo G2 (desnervado). Estes dados demonstram a reinervação em G6, embora tenha ocorrido atrofia, uma vez que se apresentam significativamente menores que os dados do grupo G1 (normal).

Apesar da massa do músculo tibial cranial não ser diferente entre os grupos G6 e G7, a morfometria evidenciou atrofia muscular do grupo G6 quando comparado ao G7, demonstrando melhor regeneração com a associação de dois enxertos quando comparados com apenas um enxerto.

Em estudo experimental, Viterbo et al. (1994a) avaliaram o músculo tibial cranial após neurografia término-lateral e encontraram na análise morfométrica diâmetro mínimo das fibras musculares de 37,45 ($\pm 5,92$) μm quando o lado contralateral era normal e de 36,34 ($\pm 8,00$) μm quando o lado contralateral era desnervado.

Neste estudo, encontramos diâmetro mínimo de 37,15 ($\pm 2,1$) μm no grupo G6, o qual foi submetido à apenas um enxerto, corroborando os dados de Viterbo

et al. (1994a). No grupo G7, o qual foi submetido a dois enxertos, encontramos diâmetro mínimo de 45,29 ($\pm 2,4$) μm , sendo observado aumento no diâmetro mínimo das fibras musculares, demonstrando melhor regeneração quando da utilização de dois enxertos.

Os resultados da análise morfométrica das fibras musculares foram semelhantes com relação à área da fibra muscular e ao diâmetro da fibra muscular, mostrando que provavelmente não houve inclinação no momento dos cortes das peças histológicas.

5.4.3 Análise morfológica do músculo tibial cranial

A avaliação morfológica dos músculos referentes ao grupo G1 (normal) demonstrou aspecto histológico com características de normalidade (Junqueira & Carneiro, 1999), enquanto no grupo G2, os achados morfológicos apresentaram-se com características de músculo desnervado (Viterbo, 1992a).

Estes achados demonstraram que os grupos foram adequados como controles de normalidade (G1) e de desnervação (G2).

A morfologia das fibras do músculo tibial cranial mostrou semelhanças entre os grupos G1, G3, G4, G5 e G7, com relação à forma e tamanho das fibras musculares, comprovando os resultados obtidos na morfometria das fibras musculares. Nestes grupos, G3, G4, G5 e G7, os resultados de morfometria e morfologia demonstraram ausência de atrofia muscular, sugerindo que os tratamentos realizados foram eficazes em manter o trofismo muscular.

O grupo G6 apresentou fibras musculares com menor diâmetro e um aumento na quantidade de tecido conjuntivo, demonstrando atrofia muscular. Porém, o grupo G2 apresentou as menores fibras musculares, alto grau de

polimorfismo e desorganização, assim como elevada quantidade de tecido conjuntivo, confirmando a severa atrofia muscular.

Estes dados demonstraram atrofia muscular discreta no grupo G6, porém a reinervação via enxerto não permitiu atrofia severa, como observado no grupo G2.

Papalia et al. (2001), realizaram a avaliação da circunferência do músculo tibial cranial inteiro, apresentando os dados como aspectos morfológicos. Com relação a estes aspectos do músculo tibial cranial, relataram terem encontrado no grupo submetido ao enxerto, músculos com o dobro da largura dos músculos do grupo desnervado. Quando na comparação com o controle de normalidade, relataram que os músculos apresentaram-se com dois terços da largura dos músculos do grupo normal. Estes autores não realizaram estudos histológicos de morfometria.

5.5. Análise dos segmentos de nervos N1, N3, N5 e N7

Os segmentos de nervos N1 (nervo fibular proximal à NTT), N3 (nervo fibular distal à NTT), N5 (enxerto de nervo distal à 1ª NTL) e N7 (enxerto de nervo distal à 2ª NTL) foram coletados e após a preparação das lâminas histológicas, foram analisados os seguintes parâmetros: densidade axonal, área dos axônios, diâmetro mínimo dos axônios e área da bainha de mielina.

As fibras de segmentos de nervos foram alvo de análise por alguns autores, através de estudos morfométricos relacionados ao diâmetro das fibras e contagem ou densidade das fibras (Viterbo et al., 1994b; Noah et al., 1997a; Viterbo et al., 1998; Giovanoli et al., 2000; Hayashi et al., 2004).

A avaliação morfométrica de nervos e enxertos em regeneração fornece informações relevantes sobre o estado funcional dos neurônios e das células

associadas a eles (McCallister et al, 1999; Schultes et al., 2001). Segundo Dellon & Mackinnon (1989), os dados referentes à densidade axonal e ao diâmetro da fibra de nervo são parâmetros apropriados para a avaliação dos brotamentos e da maturação axonal, sendo essas informações relevantes na avaliação dos processos degenerativos e regenerativos do sistema nervoso periférico (Fields et al., 1989).

Segundo De Sá et al. (2004), a medida do diâmetro mínimo é o parâmetro mais confiável para avaliação da regeneração de nervos periféricos. Estes dados são corroborados por Romão et al. (2007), uma vez que estes autores relatam que a avaliação do diâmetro mínimo oferece maior confiabilidade dos dados do que a medida de área ou de diâmetro máximo, pois o diâmetro mínimo não sofre alteração com a inclinação da lâmina durante o corte histológico. A inclinação da lâmina, no momento do corte, pode promover inclinação nas fibras induzindo aumento no diâmetro máximo ou na área.

5.5.1 Análise do segmento de nervo N1

O segmento de nervo N1 corresponde à região do nervo fibular proximal a NTT (G3, G4 e G5) ou proximal a secção do nervo fibular (G2, G6 e G7). No grupo G1 (normal) o segmento foi retirado na altura que seria feita a secção deste nervo, servindo como controle de normalidade de um nervo íntegro.

A densidade axonal foi significativamente menor no grupo G1, quando comparado aos demais grupos. Os grupos G2, G6 e G7 não apresentaram diferenças significativas entre si. Porém apresentaram uma densidade significativamente menor quando comparados com os grupos G3, G4 e G5.

Na literatura não há relatos comparando, histologicamente, a região de nervo periférico proximal à neurorrafia término-terminal, com a região do mesmo nervo sem secção e ou procedimento de reparo (neurorrafia e/ou enxerto). Deste modo, as diferenças encontradas neste estudo, demonstram alterações retrógradas no segmento proximal do nervo submetido à neurorrafia término-terminal.

Assim o aumento da densidade axonal, visto nos grupos G3, G4 e G5, pode ter ocorrido devido ao brotamento axonal, após a secção e reparo cirúrgico por NTT no nervo fibular.

Após a lesão do nervo, inicia-se um processo de degradação axonal, destruição da bainha de mielina, diferenciação e proliferação das células de Schwann e invasão do sítio da injúria por macrófagos, com conseqüente produção de fatores neurotróficos, os quais exercem papel importante na regeneração de nervos, estimulando e guiando o brotamento axonal (Martini R, 1994; Brück W, 1997; Hall S, 2001). Segundo Junqueira & Carneiro (1999), após a lesão ocorre no corpo celular do neurônio o início da cromatólise, o que leva o neurônio a interromper a função de transmissão de impulsos nervosos, passando a desenvolver a função de crescimento (Fu & Gordon, 1997).

De acordo com Weiss & Taylor (1994) e Yuksel et al. (1999) o órgão alvo exerce significativa influência sobre os axônios em regeneração. Esta condição, chamada de especificidade tecidual (Lundborg et al., 1986; Mackinnon et al., 1986) pode ter contribuído para a maior densidade axonal encontrada nos grupos G3, G4 e G5 quando comparados com os grupos G2, G6 e G7. Nestes últimos grupos (G2, G6 e G7) a formação do neuroma pós-secção do nervo pode ter

estabilizado o brotamento dos axônios, o que não ocorreu nos grupos G3, G4 e G5.

Com relação à área axonal, bainha de mielina e diâmetro mínimo dos axônios, o grupo G1 apresentou dados significativamente maiores que os demais grupos, exceto para o grupo G4. Estes dados não evidenciaram diferenças significativas entre o grupo G1 e G4.

Os achados morfométricos podem ser confirmados pela análise morfológica. As imagens representativas dos segmentos N1 mostram aumento na densidade axonal e diminuição do diâmetro das fibras nos demais grupos, quando comparados com o grupo G1 (normal).

5.5.2 Análise do segmento de nervo N3

O segmento de nervo N3 corresponde à região do nervo fibular distal à NTT (G3, G4 e G5) ou distal à secção do nervo fibular (G2, G6 e G7). No grupo G1 (normal) não foi coletado o segmento N3, uma vez que não foi realizada a secção do nervo fibular.

Com relação à densidade axonal, área e diâmetro mínimo do axônio e bainha de mielina, não houve diferença entre os grupos G2 (desnervado), G6 e G7, como esperado. Entretanto, quando comparados com os demais grupos, os dados demonstraram diminuição significativa em todos os parâmetros, confirmando assim a secção do nervo fibular e a ausência de reinervação espontânea do segmento distal.

Deste modo, o aumento na área e diâmetro mínimo do axônio e da área da bainha de mielina, vistos nos grupos G3, G4 e G5, demonstrou que o brotamento

axonal ultrapassou a neurografia término-terminal, promovendo a reinervação do músculo tibial cranial.

Estes resultados morfométricos podem ser observados e comprovados com a análise morfológica. As imagens representativas dos segmentos de nervo N3, nos grupos G2, G6 e G7, demonstram severa atrofia na região pós-secção no nervo fibular, com conseqüente ausência de reinervação do coto distal. Nos grupos G3, G4 e G5, observa-se a invasão do coto distal por fibras de nervos regeneradas, comprovando a reinervação do coto distal e corroborando a recuperação funcional observada no músculo tibial cranial. As imagens do segmento N3 em G3, G4 e G5 se assemelham às obtidas nos segmentos N1 destes mesmos grupos, novamente evidenciando a passagem das fibras de nervos regeneradas através da NTT.

Nos parâmetros morfométricos avaliados, o grupo G3 mostrou-se sempre superior ou igual aos grupos G4 e G5, demonstrando que os enxertos entre o nervo tibial (NTL) e o músculo tibial cranial (NMD), associados à NTT no nervo fibular, não prejudicaram o processo de regeneração através da NTT do grupo G3.

5.5.3 Análise do segmento de nervo N5

O segmento de nervo N5 corresponde à região distal à neurografia término-lateral do primeiro enxerto nos grupos G4, G5, G6 e G7. Os grupos G1 (normal), G2 e G3 não apresentam o segmento N5, uma vez que não foram realizados enxertos nestes grupos.

Com relação à densidade axonal, os grupos G4 e G6 não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Entre os grupos G5 e G7, também não foi

detectada diferença estatística. Entretanto, os grupos G4 e G6, submetidos à apenas um enxerto, apresentaram densidade axonal significativamente superior àquela dos grupos G5 e G7, submetidos aos dois enxertos. Estes dados demonstraram maior brotamento nos grupos G4 e G6, submetidos à apenas um enxerto. Nos grupos G5 e G7, o segundo sítio de coaptação, ou seja, a segunda NTL do segundo enxerto, distal à primeira NTL, realizada na mesma face do nervo tibial, seqüencialmente com apenas 10 mm de distância entre elas, pode ter sido responsável pela diminuição da oferta de axônios no segmento N5 nestes grupos. Isto pode ter ocorrido devido à presença de fatores neurotróficos, no segundo sítio de coaptação, os quais também recrutaram axônios para o brotamento na segunda NTL, axônios estes oriundos da mesma face do nervo doador.

Com relação ao diâmetro mínimo, não foi detectada diferença significativa entre os grupos G4, G5 e G6. Entretanto esses grupos apresentaram diâmetro axonal menor que o grupo G7.

A análise morfológica das imagens representativas dos segmentos N5 demonstra maior densidade axonal para os grupos G5 e G7, quando comparados aos grupos G4 e G6, porém os demais parâmetros apresentam-se semelhantes.

5.5.4 Análise do segmento de nervo N7

O segmento de nervo N7 corresponde à região distal a neurografia término-lateral do segundo enxerto nos grupos G5 e G7. Os demais grupos não apresentam os segmentos N7.

Os grupos G5 e G7 não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros densidade axonal, área e diâmetro mínimo dos axônios,

demonstrando que a regeneração axonal ocorreu nos dois enxertos, e o brotamento colateral do nervo tibial ultrapassou a região da segunda neurorrafia término-lateral, de modo semelhante.

Com base nestes dados, pode-se dizer que a realização da neurorrafia término-terminal no grupo G5 não alterou o brotamento e a regeneração axonal encontrada no segundo enxerto, quando comparado com o grupo G7, o qual foi não foi submetido à NTT.

Na análise morfológica, a semelhança das imagens representativas dos segmentos N7 nos grupos G5 e G7 confirmam os dados referentes à morfometria.

5.6 Considerações sobre os resultados

A coletânea dos resultados, obtidos nos testes funcionais e nas análises histomorfométricas, está representada na tabela 18.

Nos testes funcionais, pode-se observar que os grupos G3, G4 e G5 demonstraram a ocorrência de regeneração e recuperação funcional após os procedimentos cirúrgicos de reparo. No teste de avaliação da marcha, esses grupos apresentam o melhor índice de recuperação funcional. Segundo De Medinaceli et al. (1982), um critério de suma importância para a avaliação do sucesso de técnicas de reparo de nervos é a avaliação funcional. Bain et al. (1988) e Hare et al. (1992) também consideram a avaliação funcional um teste relevante em trabalhos experimentais de regeneração de nervos. Segundo estes autores, a quantificação da regeneração de nervos periféricos através de estudos histológicos, morfológicos e eletrofisiológicos, não necessariamente se correlacionam com a função muscular normal.

Tabela 18: Coletânea dos resultados de todas as análises.

Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
MI	184±16 ^a	189±22 ^a	186±09 ^a	190±18 ^a	187±13 ^a	201±20 ^a	210±11 ^a
MF	504 ± 51 ^b	513 ± 46 ^b	522 ± 32 ^b	512 ± 43 ^b	490 ± 49 ^b	516 ± 37 ^b	519 ± 65 ^b
IFC	0,5±6,2 ^a	-118,3±2,2 ^a	10,4±8,2 ^a	7,5±6,4 ^a	-7,3±7,6 ^a	-122,3±2,6 ^c	-89,3±12 ^b
LAT	1,75±0,2 ^a	∞ ^b	1,89±0,7 ^a	1,84±0,7 ^a	1,85±0,8 ^a	2,60±0,9 ^c	2,18±0,3 ^a
AMP	25,8±6,1 ^b	0 ^b	13,5±6,1 ^c	12,9±2,9 ^c	13,8±4,6 ^c	1,6±0,3 ^b	10,6±3,2 ^c
MMTC	0,954 ±0,02 ^a	0,164 ±0,02 ^b	0,750 ±0,03 ^c	0,753 ±0,04 ^c	0,752 ±0,04	0,367 ±0,03 ^d	0,371 ±0,03 ^d
AFM	1666,84 ±148,5 ^a	559,61 ±54,8 ^b	1567,09 ±135,1 ^a	1760,63 ±175,6 ^a	1692,98 ±162,3 ^a	1219,84 ±137,9 ^c	1609,46 ±179,2 ^a
DMFM	46,09 ±2,7 ^a	26,71 ±1,1 ^b	44,68 ±2,9 ^a	47,36 ±2,3 ^a	46,45 ±2,5 ^a	37,15 ±2,1 ^c	45,29 ±2,4 ^a
DA-N1	0,009 ±0,0006 ^a	0,011 ±0,001 ^b	0,014 ±0,003 ^c	0,013 ±0,002 ^c	0,017 ±0,004 ^d	0,011 ±0,003 ^b	0,011 ±0,002 ^b
AF-N1	40,46 ±1,8 ^a	31,95 ±2,1 ^b	32,75 ±1,9 ^b	39,12 ±2,4 ^a	30,95 ±2,0 ^b	31,55 ±2,6 ^b	32,96 ±2,3 ^b
DMF-N1	7,19±0,4 ^a	6,34±0,2 ^b	6,47±0,7 ^b	7,06±0,3 ^a	6,29±0,9 ^b	6,34±0,4 ^b	6,48±0,9 ^b
ABM-N1	2,87±0,6 ^a	2,05±0,3 ^b	2,02±0,5 ^b	2,66±0,7 ^a	1,95±0,2 ^b	2,05±0,4 ^b	1,49±0,7 ^c
DA-N3	-	0,001 ±0,001 ^a	0,013 ±0,004 ^b	0,019 ±0,007 ^c	0,017 ±0,005 ^c	0,001 ±0,001 ^a	0,001 ±0,002 ^a
AF-N3	-	1,95±1,2 ^a	25,50 ±2,1 ^b	26,58 ±2,4 ^b	15,01 ±2,2 ^c	1,62±,8 ^a	2,01±1,2 ^a
DMF-N3	-	0,26±0,1 ^a	5,71±0,3 ^b	5,83±0,5 ^b	4,78±0,2 ^c	0,21±0,2 ^a	0,22±0,1 ^a
ABM-N3	-	0,11±0,2 ^a	1,99±0,7 ^b	1,91±0,3 ^b	1,70±0,6 ^c	0,13±0,3 ^a	0,12±0,2 ^a
DA-N5	-	-	-	0,032 ±0,005 ^a	0,020 ±0,007 ^b	0,029 ±0,002 ^a	0,022 ±0,008 ^b
AF-N5	-	-	-	8,45 ±0,7 ^a	10,40 ±1,2 ^a	10,06 ±1,4 ^b	13,19 ±1,2 ^c
DMF-N5	-	-	-	3,29±0,2 ^a	3,65±0,7 ^a	3,58±0,7 ^a	4,11±0,5 ^b
ABM-N5	-	-	-	1,37±0,7 ^a	1,50±0,3 ^b	1,52±0,4 ^b	1,52±0,7 ^b
DA-N7	-	-	-	-	0,030 ±0,003 ^a	-	0,029 ±0,005 ^a
AF-N7	-	-	-	-	10,06 ±1,4 ^a	-	8,76 ±1,1 ^a
DMF-N7	-	-	-	-	3,58 ±0,6 ^a	-	3,33 ±0,4 ^a
ABM-N7	-	-	-	-	1,14±0,7 ^a	-	1,49±0,5 ^b

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p≤0,05). MI - massa inicial (g); MF – massa final (g); IFC – índice funcional do ciático (%); LAT – latência (ms); AMP –

amplitude (mV); MMTC – massa do músculo tibial cranial (g); AFM – área da fibra muscular (μm^2); DMFM – diâmetro mínimo da fibra muscular (μm); DA N1– densidade axonal em N1 (axônio/ μm^2); AF N1 – área da fibra de nervo em N1 (μm^2); DMF N1 – diâmetro mínimo da fibra em N1 (μm); ABM N1 – área da bainha de mielina em N1 (μm^2); DA N3– densidade axonal em N3 (axônio/ μm^2); AF N3 – área da fibra de nervo em N3 (μm^2); DMF N3 – diâmetro mínimo da fibra em N3 (μm); ABM N3 – área da bainha de mielina em N3 (μm^2); DA N5– densidade axonal em N5 (axônio/ μm^2); AF N5 – área da fibra de nervo em N5 (μm^2); DMF N5 – diâmetro mínimo da fibra em N5 (μm); ABM N5 – área da bainha de mielina em N5 (μm^2); DA N7– densidade axonal em N7 (axônio/ μm^2); AF N7 – área da fibra de nervo em N7 (μm^2); DMF N7 – diâmetro mínimo da fibra em N7 (μm); ABM N7 – área da bainha de mielina em N7 (μm^2).

No teste da marcha o grupo G7 também alcançou a recuperação funcional, ainda que menor que o observado nos grupos G3, G4 e G5, porém maior que os grupos G6 e G2 (desnervado).

Nos testes eletrofisiológicos, os grupos G3, G4, G5 e G7 apresentaram respostas positivas, indicando recuperação funcional e regeneração de nervos, mesmo que aquém do grupo G1 (normal), porém acima do grupo G2 (desnervado). O resultado positivo neste teste comprova a presença de fibras ultrapassando a NTT no nervo fibular (G3) e também ultrapassando a NTL e a neurotização muscular direta dos enxertos, nos grupos G4, G5 e G7.

Na avaliação da massa do músculo tibial cranial, os grupos G3, G4 e G5 apresentaram menor atrofia muscular, quando comparados aos grupos G6 e G7, sugerindo melhor regeneração. No entanto, nestes grupos as massas do MTCD foram significativamente maiores que do grupo G2 (desnervado) e menores que do grupo G1 (normal), mostrando a eficácia dos enxertos em interromper a atrofia muscular e manter o trofismo do músculo tibial cranial direito.

A morfometria do MTCD confirma os resultados de massa do MTCD, nos grupos G3, G4, G5 e G7.

Deve-se observar que os grupos G3, G4, G5 e G7 não apresentaram diferenças significativas nas análises da latência, amplitude, área da fibra muscular e diâmetro mínimo da fibra muscular. Com relação à latência e ao diâmetro mínimo da fibra muscular, todos os sete grupos apresentaram homogeneidade com relação às diferenças estatísticas.

Apesar do grupo G6 apresentar resultados significativamente menores que os grupos G3, G4, G5 e G7, há diferença significativa entre G6 e G2 (desnervado), sendo que G6 apresentou menor latência, assim como maior área e diâmetro mínimo das fibras musculares quando comparado com G2.

Deste modo, a massa do MTCD, a latência do teste eletrofisiológico e a morfometria do MTCD no grupo G6 demonstraram a tendência de reinervação do músculo tibial cranial direito, com a utilização de apenas um enxerto entre o nervo tibial intacto e o MTCD, sem a realização da NTT no nervo fibular, previamente seccionado. Em adição, a utilização de dois enxertos entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial (G7) demonstrou melhores resultados.

Com relação à análise morfométrica dos segmentos de nervos, a presença de axônios no segmento N3 dos grupos G3, G4 e G5 demonstrou a reinervação do coto distal do nervo fibular seccionado e a passagem dos axônios através da NTT no nervo fibular.

A ausência de axônios em N3 nos grupos G2, G6 e G7 confirma a ausência de reinervação espontânea no MTCD, via coto distal do nervo fibular seccionado.

Terzis em 1984 (Terzis, 1988), descreve a técnica de reinervação muscular denominada de “baby sitter”. Nesta técnica, a autora realiza a coaptação entre o nervo hipoglosso e o nervo facial do mesmo lado, durante o primeiro estágio do

procedimento de enxerto transfacial. Esta técnica teve como objetivo promover a reinervação rápida dos músculos paralisados, mantendo o trofismo muscular, até a completa regeneração através do enxerto transfacial, um enxerto longo, que necessita de maior tempo para sua completa regeneração. Nesta técnica a autora associou dois procedimentos de reparo de nervo, porém teve como objetivo apenas manter o trofismo do músculo desnervado, através da coaptação entre o nervo hipoglosso e o nervo facial. Esta manutenção do trofismo muscular baseia-se no fato de que, com o aumento do tempo de desnervação muscular, menor é a taxa de recuperação funcional do músculo desnervado.

Neste trabalho, os grupos G4 e G5 se assemelham à técnica “baby sitter”. Entretanto a distância entre a neurografia término-terminal e o músculo a ser reinervado é semelhante ao comprimento dos enxertos, nestes grupos. Esta semelhança no comprimento pode também contribuir para tempos semelhantes no processo de reinervação.

Porém, na técnica “baby sitter” o enxerto transfacial apresenta comprimento maior que o dos enxertos entre o nervo hipoglosso e o nervo facial. Desta forma, o tempo necessário para a reinervação seria menor com os enxertos entre o nervo hipoglosso e o nervo facial.

Assim, o grupo G7 mostrou que os enxertos entre o nervo tibial e o músculo tibial cranial, podem levar a reinervação do músculo desnervado, sustentando a realização da técnica “baby sitter”, no sentido de impedir a atrofia muscular até que ocorra a regeneração via enxerto transfacial.

Da mesma forma, tanto a avaliação funcional como a histológica, nos grupos G3, G4 e G5, demonstraram que a associação dos enxertos, entre o nervo tibial (NTL) e o músculo tibial cranial (G4 e G5), não foi capaz de aumentar a taxa

de recuperação funcional e regeneração axonal alcançada quando se realiza apenas um procedimento de reparo, a NTT no nervo fibular (G3).

Entretanto, demonstrou-se que os enxertos entre o nervo tibial (NTL) e o músculo tibial cranial (G4 e G5), associados à NTT no nervo fibular, também não prejudicaram a recuperação funcional e regeneração axonal alcançada com o procedimento de NTT, no nervo fibular (G3). Assim infere-se que a técnica “baby sitter” não prejudicaria o processo de regeneração do enxerto transfacial.

Nos casos que possibilitam a coaptação direta dos cotos (NTT) de um nevo seccionado, a associação de técnicas cirúrgicas distintas, fornecendo novas vias de regeneração de nervos ao músculo desnervado, não aumenta a taxa de recuperação e ou regeneração de nervos, obtida na coaptação direta (NTT).

Como visto neste trabalho, nos casos onde não há possibilidade de coaptação direta dos cotos (proximal e distal) de um nervo seccionado, a utilização de duas pontes entre o nervo intacto e o músculo desnervado podem aumentar a taxa de recuperação funcional e ou regeneração de nervos, alcançada com apenas uma ponte, porém permanecendo ainda aquém dos níveis normais.

Nos casos que em que há possibilidade de coaptação direta dos cotos (NTT) de um nervo seccionado, a associação de técnicas cirúrgicas distintas, fornecendo novas vias de regeneração de nervos ao músculo desnervado, não aumenta a taxa de recuperação e ou regeneração de nervos, quando a distância entre o nervo doador e o músculo desnervado apresentarem-se semelhantes.

Apesar da neurorrafia término-lateral, assim como a neurotização muscular direta, serem ferramentas indispensáveis à resolução de casos complicados, a habilidade dos fatores neurotróficos em suportar a sobrevivência dos neurônios e

possibilitar a regeneração axonal é de suma importância. Confirmando as conclusões de Viterbo et al. (2009), o estudo e entendimento do papel destes fatores neurotróficos podem ser a via adequada para melhorar as taxas de recuperação funcional, alcançada com as distintas técnicas de reparo de nervos.

CONCLUSÕES

Com o modelo experimental utilizado pudemos concluir que:

1. Enxertos de nervo adicionais com neurorrafias término-laterais e neurotizações musculares diretas associadas à neurorafia término-terminal, não aumentaram a recuperação morfométrica, morfológica e funcional muscular.
2. Enxertos de nervo adicionais, criando novas vias de regeneração, associados à neurorafia término-terminal, não prejudicaram a regeneração e ou recuperação funcional alcançada por esta última (NTT).
3. A utilização de apenas um enxerto de nervo com neurorafia término-lateral e neurotização muscular direta permitiu a reinervação muscular.
4. A utilização de dois enxertos de nervo com neurorrafias término-laterais e neurotizações musculares diretas foram superiores, quando comparados à apenas um enxerto, na reinervação muscular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Quatan MM. Terminal neurorrhaphy: review of experimental and clinical studies.

J Reconstr Microsurg., New York, 2001; 17:99-107.

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

Armitge MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. British Journal of Plastic Surgery, Edinburg, 1998;51:238-42.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plastic and Reconstructive Surgery, 1989; 83(1):129-38.

Balance CA, Balance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of cronic facial palsy of peripheral origin. British Medical Journal, London, 1903;2:1009-1013.

Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. Clinical Results Microsurgery, New York, 2000;20(1):32-6.

Berkuo ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística 2 ed. São Paulo: EPU, 1981. 350p.

Bertelli JA, Santos ARS, Calixto JB. Is axonal sprouting able to transverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J Reconstr Microsurg.*, New York, 1996;12:559-563.

Bertelli JA, Taleb M, Mira JC, Ghizoni MF. Funcional recovery improvement is related to aberrant reinnervation trimming. A comparative study using fresh or predegenerated nerve grafts. *Acta Neuropathol.* 2006; 111:601-9.

Boorman JG, Sykes PJ. Vascularized versus conventional nerve grafting: a case report. *J. Hand Surg. [Am]*, St. Louis, 1987;12:218-220.

Bora Junior FW. A comparison of epineural, perineural and epineural methods of nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.*, Philadelphia, 1978;133:91-94.

Braun RM. Epineural nerve suture. *Clin Orthop.*, Philadelphia, 1982;163:50-56.

Breidenbach WB. Vascularized nerve grafts. A practical approach. *Orthop Clin North Am.*, Philadelphia, 1988;11:65-68.

Bunnell S. Surgery of the nerves of the hand. *Surg Gynecol Obstet.*, Chicago, 1927;44:145-152.

Brück, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 1997; 7, 741-752.

Brunelli GR. Direct neurotization of severely damaged muscles. *J Hand Surg.*, 1982;7(6):572-9.

Brunelli GA, Brunelli GR. Direct muscle neurotization. *J Reconstr Microsurg.*, 1993;9(2):81-90.

Bunge R.P Contribution of tissue culture studies to our understanding of basic processes in peripheral nerve regeneration. In: GORIO, A.; MILLESI, H.; MIGRINO, S. (Eds). *Posttraumatic peripheral nerve regeneration; experimental basis and clinical implications.* New York: Raven Press, 1981. p.105-113.

Burt, A.V. *Neuroanatomia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 412 p.

Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammasco F, De Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiol.* 1989; 16(4):353-63.

Cederna PS. Kalliainen LK, Urbanek MG, Rovak JM, Kuzon WM. Donor muscle structure and function after end-to-side neurotization. *Plast Reconstr Surg.*, Baltimore, 2001;107:789-796.

Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW: Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin.* 1992; 10:613-627.

Daniel RK, Terzis JK. *Reconstrutive Microsurgery*, Boston: Little, Brown, 1997;491.

Cramer KS, Essen DCV. Maturation of fast and slow motor units during synapse elimination in the rabbit soleus muscle. *Develop Biol.* 1995;171:16-26.

Da-Silva CF. Fatores neurotróficos: estrutura, função e aplicações clínicas. *Atual Neurociênc.* 1995a; 1:1-20

Da-Silva CF. Biologia celular e molecular da regeneração do sistema nervoso periférico. *Atual Neurosciênc.* 1995b; 1-16

Dellon ES, Dellon AL. The first nerve graft, Vulpian and the nineteenth century neural regeneration controversy. *J Hand Surg. [Am.]*, St. Louis, 1993;18:396-372.

Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg.* 1989;23:197-202.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.*, 1982;77:634-643.

De Medinaceli, L, Merle, M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by "cell surgery". J Hand Surg. [Br.], Edimburgh, 1991;16 (5) 495-498.

De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. J Neurosc Meth. 2004;136 (1): 45-53.

Doi K, Kuwata N, Sakai K, Tamaru K, Kawai S. A Reliable technique of free vascularized sural nerve grafting and preliminary results of clinical applications. J Hand Surg. [Am.], 1987;12(5Pt1):677-684.

Edshage S. Peripheral nerve suture. A technique for improved intraneural topography. Acta Chir Scand Suppl, Stockholm, 1964;331:1-104.

Erhart EA. Elementos de Anatomia Humana. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1992.

Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. Annu Rev Neurosci., 1990;13:43-60.

Fawcett JW. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. Trends Neurosci., Barking, 1992;15(1):5-8.

Ferreira AS. Lesões nervosas periféricas. Santos: Livraria Editorial Santos, 1999. 253p.

Ferreira MC, Erhart EA, Marchese AT. Microcirurgia de nervo periférico. Novas técnicas. Rev Paul Méd., 1974; 84:52-53.

Fields RD, La Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. Prog Neurobiol. 1989;33:87-134.

Frey M, Gruber H, Holle J, Freilinger G. An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization. Plast Reconstr Surg., 1982, 69:656-669.

Frostick SP, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurg. 1998; 18:397-405.

Frisén J. Determinants of axonal regeneration. Histol Histopathol., 1997;12:857-868.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. Mol Neurobiol., 1997;14:67-116.

Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosa. Arch Ital Chir. 1938; 48:155-171.

Giovanoli P, Koller R, Meuli-Simmern C, Rab M, Haslik W, Mittlböck M, Meyer V, Frey M. Functional and morphometric evaluation of end-to-side neurotization for muscle reinnervation. Plast Reconstr Surg. 2000;106(2):383-92.

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

Gold BG, Griffin JW, Price DL. Somatofugal axonal atrophy precedes development of axonal degeneration in acrylamide neuropathy. *Arch Toxicol*. 1992; 66:57-66.

Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat*. 1997;193:57-71.

Hall S. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J Hand Surg. [Br]*. 26:129-136, 2001.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plastic Reconst Surg*. 1992; 89(2):251-58.

Hollinshead WH, Rose S. *Anatomia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991.

Hopkins WG, Slack JR. The sequential development of nodal sprouts in mouse muscles in response to nerve degeneration. *J Neurocytol*. 1981; 10:537-56.

Ide, C. Degeneration of mouse digital corpuscle. *Am J Anat*. 1982, 163:59-72.

Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc. Res* 1996;25:101-21.

- Ide C, Kato S. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res.* 1990; 13:S157-S164
- Jenq CB, Coggeshall RE. Sciatic nerve regeneration after autologous sural nerve transplantation in the rat. *Brain Res.* 1987;406:52-61.
- Junqueira LC; Carneiro C. *Histologia Básica.* 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- Kalliainen LK, Cedema PS, Kuzon WM. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103:1919-27.
- Kalliainen LK, Kuzon WM. Reinnervating skeletal muscle using end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997;13:136-47.
- Kanje, M. Survival and regeneration of the adult rat vagus nerve en culture. *Brain Res.* 1991;550:350-342.
- Kanje, M. Regeneration of an adult peripheral nerve preparation in culture. *Mol. Neurobiol.* 1992;6(2-3):217-223.
- Kessler HH. *Accidental Injuries.* Philadelphia, Ed. Lea & Febiger, 1932.
- Kimura J. *Eletrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice.* F. A. Davis Company, 1987.

Kiotani T, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Endo K. Nerve regenerations across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.* 1996;740:66-74.

Koeppen AH, Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Scienc.* 2004; 220:115-7.

Krivolutskaia EG, Chumasov EL, Martina VN, Mel'tsova GM, Kirillov AL. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. *Stomatol. (Mosk)*, 1989;68:635-638.

Liu K, Chen LE, Seaber AV. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. *J. Orthop. Res., New York*, 1999;17:293-300.

Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Reprod Prog Horm Res.* 1980; 36:1-52.

Lohman R, Bullock F, McNaughton T, Siemionow M. End-to-end vs end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997;13:135-136.

Lubinska L: On axoplasmic flow. *Int Rev Neurobiol.* 1975; 17:241-296.

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

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo F, Powell HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and distal stump components. *Exp. Neurol.* 1982; 76:361-375.

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1986;20(3):279-283.

Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kems JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis?. *J. Hand Surg. (Brit Europ Vol), Edimburg,* 1994a, 19B, 277-82.

Lutz BS, Chuang DC, Hsu JC, Ma SF, Wei FC. Selection of donor nerve - an important factor in end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg.* 2000;53(2):149-154.

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;15:597-604.

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

Mackinnon SE, Dellon AL. A study of nerve regeneration across syntetic (maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up 5cm in the primate. *J Reconstr Microsurg.* 1990;6:117-121.

Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1985b, 75:384-388.

Mackinnon SE, Dellon AL, Lundborg G. A study of neurotropism in primate model. *J Hand Surg.* 1986;11:888-892.

Mackinnon SE, Dellon AL, Hudson AR, Hunter DA. Nerve regeneration through a pseudosinovial sheath in primate model. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75:833-839.

Mackinnon SE, Mc Lean JA, Hunter, GA. Direct muscle neurotization recovers gastrocnemius muscle function. *J Reconstr Microsurg.*, 1993;9(2):77-80.

McNamara MJ, Garrett WE, Seaber AV, Goldner JL. Neurorrhaphy, nerve grafting, and neurotization: A functional comparison of nerve reconstruction techniques. *J Hand Surg.*, 1987;12A(3):354-360.

Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S. Effects of tension at site of coaptation on recovery of sciatic nerve function after neurorrhaphy: evaluation by walking-track measurement. *Microsurgery*, 1999; 19(4):200-7.

Martinez AM, Canavarro S: Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33:1477-82

Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.* 1994;23:1-28.

Matson DD, Alexander E, Weiss P. Experiments on the bridging of gaps in severed peripheral nerves of monkeys. *J. Neurosurg.* 1948; 5:230-248.

Matsumoto M, Hirata H, nishiyama M, Morita A, Sasaki H, Uchida A. Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: a experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. *J Reconstr Microsurg.*, 1999;15:281-286.

May M, Sobol SM, Mester SJ. Hipoglossal-facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 1991;104:818-825.

Mendes R. *Patologia do Trabalho*. 2ª ed. Ed. Atheneu, São Paulo, 2003.

Mennen U. End-to-side nerve suture in primate (Chacma Baboon). *Hand Surgery*, 1998; 21:1-6.

Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr. Surg. Suppl.*, 1982; 19:25-37.

Millesi H. The nerve gap. Theory and clinical practice. *Hand Clin*, 1986; 2:651-663.

Millesi H. Peripheral nerve surgery today: turning point or continuous development? (Review article). *J Hand Surg [Am.]*. 1990; 15:281-287.

Moldovan M, Sorensen J, Krarup C. Comparison of the fastest regenerating motor and sensory myelinated axons in the same peripheral nerve. *Brain*. 2006; 129:2471-83.

Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosc Meth*. 2008; 170:255-61.

Muller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Invest*. 2003; 83:175-85.

Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadonian A. A novel model for the study of peripheral nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg*. 2004; 20(7):533-44.

Nakatsuka H, Takamatsu K, Koshimune M, Imai Y, Enomoto M. Experimental study of polarity in reversing cable nerve grafts. *J Reconstr Microsurg.*, 2002. 18(6):509-515.

Nahas FX, Ferreira LM. Análise dos itens de um trabalho científico. *Acta Cir Bras*. 2005; 20(Supl.):13-6.

Noah EM, Williams A, Fortes W, Terzis JK. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.*, 1997, 13(5); 317-325.

Oliveira, A.L.R. Capacidade regenerativa axonal em diferentes linhagens de camundongos isogênicos. Botucatu, 1996. 128p. Dissertação. (Mestre em Biologia Celular), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Olsson Y, Kristensson K. The perineurium as a diffusion barrier to protein traces following trauma to nerves. *Acta Neuropathol.* 1973; 23:105-11.

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH. Use of a skeletal muscle basal membrane graft to treat segmentary nerve lesions experimental study in the sciatic nerve of rats. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MICROCIRURGIA E CIRURGIA DE MÃO, 5., 2000, Botucatu. Anais... Botucatu, 2000. p.6.

Papalia I, Lacroix C, Brunelli F, d'Alcontres FS. Direct muscle neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.*, 2001;17, 237-246.

Perrin FE, Lacroix S, Aviles-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian Degeneration. *Brain*, 2005; 128:854-66.

Rab M, Koller R, Haslik W, Kamolz LP, Beck H, Meggeneder J, Frey M. The influence of timing on the functional and morphological result after nerve grafting: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg.* 2002; 55:628-34.

Rappeti JCS, Pippi NL. Reações de diferentes fios de sutura em músculo homólogo conservado em glicerina a 98% implantado em tecido sadio de gatos: resultados parciais. Rio Grande do Sul: Centro de Ciências Rurais, 2000. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/lace/artigos/josaine.pdf>>. Acesso em: 25 junho de 2009.

Reis FA, Rodrigues A C, Vicente EJD, Eleutério OML, Dal Pai Silva M. Study of collateral sprouting from intact vagus nerve into a autologous nerve graft by using two different techniques: neuroraphy and coaptation with fibrin glue derivated of the snake venom. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE ANATOMIA, 12, 1998, Anais... São Paulo: SBA, 1998. n.130.

Reis FA, Rodrigues AC. Comparative study of axonal sprouting from the vagus nerve in autologous nerve graft. *J Venom Anim Toxins.* 2000; 6(1):120-120.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as na electronoapaque staining in electron microscopy. *J Cell Biol,* 1963; 17:208-212.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Eletrofisiologia Clínica: Eletroterapia e teste eletrofisiológico. 2 ed – Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

Romão AM, Viterbo F, Stipp EJ, Garbino JÁ, Rodrigues JÁ. Muscle electro stimulation of the cranial tibial muscle after crushing of the common fibular nerve: neurophysiologic and morfometric study in rats. Rev. Bras. Ortop. 2007; 42(3):41-46.

Ross DN, Matsuda H, Zuker R. End-to-side nerve coaptation for muscle reinnervation. In: CONGRESS RF INTERNATIONAL CONFEDERATION OF PLASTIC, RECONSTRUCTIVE AND ESTHETIC SURGERY, 11., 1995, Yokohama. Anais...Yokohama, 1995. p.104-105.

Rouleau M. et.al. Facial nerve sutures: epineural versus perineural sutures. Otolaryngology., 1981;10,338-342.

Salter RB. Distúrbios e Lesões do Sistema Musculoesquelético. 2ª ed. MEDSI – ed. Médica e Científica Ltda, 1985.

Schlaepfer WW, Micko, S. Chemical and structural changes of neurofilaments in transected rat sciatic nerve. J Cell Biol.1978; 78:369-378.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain, Oxon, 1943; 66:237-288.

Seddon HJ. Use of autogenous grafts for repair of large nerve gaps in peripheral nerves. Br J surg. 1947;35:151-167.

Seddon HJ. Nerve grafting. J Bone Joint Surg. 1963; 45:447-467.

Schaumburg HH. Disorders of peripheral nerve. Philadelphia: FA Davis, 1993. 248p.

Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. Ver Bras. Anesthesiol. 2003; 53(2): 278-85.

Schultes G, Gaggl A, Kleinert R, Karcher H. Vascularized vs non-vascularized nerve transfers: histologic study in rats. J Reconstr Microsurg. 2001;17(8):99-107.

Sébille A. Experimental methods for the evaluation of axonal regeneration of axotomised peripheral nerves. Int. J Microsurg. 1981;3:147-151.

Sherren J. Some points in the surgery of the peripheral nerves. Edinburgh Medical Journal. 1906;20,297-332.

Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. Plast. Reconstr. Surg. 1964; 33:317.

Sotereanos DG, Seaber AV, Urbanaik JR, Spiegel DA, Sotereanos D, Anthony DC. Reversing nerve graft polarity in a rat model: the effect on function. J Reconstr Microsurg. 1992; 8:303-309.

Steindler A. The method of direct neurotization of paralyzed muscles. Am J Orthop Surg. 13:33-36,1915

Stipp Brambilla EJ. Dupla inervação muscular com neurografia término-lateral: estudo em ratos. (Tese), Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Stopiglia AJ, Erhart EA. Utilização de técnicas microcirúrgicas na neurografia de animais domésticos. Estudo experimental da reparação fascicular no nervo ulnar do cão (*Canis Familiaris*). Rev. Fac. Méd. Vet. Zoot. Univ. São Paulo, São Paulo, 1987;24:193-208.

Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain, 1951; 74: 491-516.

Sunderland, S. Nerves and nerves injuries. Edinburg: Churchill Livingstone, 1978. p.483-650.

Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, Harralson TG, Gossman MD, Maldonado CJ, Barker JH. The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. Plast Reconstr Surg. 2003; 111(7):2255-64.

Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. Exp Neurol. 1991; 114:82-103.

Tarasidis G. et al. End-to-side neurography results in limited sensory axonal regeneration in a rat model. J Reconstr Microsurg. 1997; 13:134-135.

Terzis J. Clinical microsurgery of the peripheral nerve: the state of the art. Clin Plast Surg. 1979; 6:247-67.

Terzis JK, Sun DD, Tahnos PK. Histological and basic science review; past, present, and future of nerve repair. J. Reconstr. Microsurg., New York, 1997; 13:215-225.

Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JÁ, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neurosci Methods. 2001; 1081: 1-9.

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

Verdú, E.; Butí, M.; Navarro, X. The effect of aging on efferent nerve fibers regenerations in mice. Brain Res., Amsterdam, 1995; 696: 76-82.

Vicente EJD. Estudo comparativo entre as técnicas de coaptação através da cola de fibrina derivada de veneno de serpente e da neurografia término-terminal no reparo do nervo ciático. 1999. 110p. Dissertação (Mestrado) – instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Vicente EJD, Rodrigues AC, Gallacci M. Avaliação funcional da regeneração de nervo periférico induzida pela cola de fibrina derivada do veneno de serpente e pela neurografia. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES

DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 13, 1998, CAXAMBU. Anais. Caxambu, 1998. p.190-191.

Vieira S, Hossne WS. Metodologia científica para a área de saúde. Rio de Janeiro: Campus, 2001. 192p.

Viterbo F. Neurorrafia látero-terminal, estudo experimental no rato. (Tese). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 1992a.

Viterbo F, Trindade J C, Hoshino K, Neto A M. Látero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. Rev. Paul. Med., São Paulo, 1992b. 110:267-275.

Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve – a new application of lateral-terminal Neurorrhaphy (case report). Rev Soc Bras Cir Plast. 1993; 8(1-3):85-87.

Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve. A new application of látero-terminal neurorrhaphy. São Paulo Med J. 1994a; 112(4):658-659.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of epineural sheath; an experimental study in rats. Plast Reconstr Surg. 1994b; 94:1038-1047.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni A. Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *British Journal of Plastic Surgery*. 1994c;47:75-80.

Viterbo F, Franciosi LF, Palhares A. Nerve grafting and end-to-side neurorrhaphies connecting the phrenic nerve to the brachial plexus. *Plast Reconstruct Surg*. 1995;96(2):494-495

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, Arm AH, Stipp EJ, Reis FJ. End-to-side neurorrhaphy: past, present and future. *Plast Reconstr Surg. (Micros. Suppl.)*. 2009; 124 (6), 351-358.

Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain*. 2005;128:1897-1910.

Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advances in peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg*. 1997; 24:63-73.

Watson ML. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metal. *J Biophys Biochem Cytol*. 1958; 4:727-730.

Weiss P, Taylor AC. Further experimental evidence against "neurotropism" in nerve regeneration. *J Exp Zool.* 1944;95:233-237.

Weiss P, Taylor AC. Guides for nerve regeneration across gaps. *J. Neurosurg.* 1946;3:375-389.

Yan JG, Matloub HS, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Jaradeh SS, Milwaukee. A modified end-to-side method for peripheral nerve repair: large epineurial window helicoids technique versus small epineurial window standard end-to-side technique. *J Hand Surg.* 2002b, 27A(3):484-92.

Yuksel F, Karakoglu ME, Guler M. Nerve regeneration through side-to-side neurorrhaphy sites in rat model: a new concept in peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104:2029-99.

Zhao J, Cheng Z, Chen T. Nerve regeneration after terminolateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg.* 1997;13:31-37.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 407 sobre o projeto de pesquisa intitulado "Neurorrafia término-terminal associada à neurorrafia término lateral: recuperação funcional do órgão alvo" sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, com a colaboração de Fábio José Reis, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Projeto de pesquisa aprovado em 11 de agosto de 2.004

Profª Drª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA