UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Plasticidade das fibras amielínicas na
tubulização látero-terminal**

Vânia Tognon Miguel

Ribeirão Preto

2014

Vânia Tognon Miguel

**Plasticidade das fibras amielínicas na
tubulização látero-terminal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Área de concentração: Neurologia

Opção: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tognon-Miguel, Vânia

Plasticidade das fibras amielínicas na tubulização látero-terminal. Ribeirão Preto, 2014.

60 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Barreira, Amilton Antunes.

1. Fibras amielínicas. 2. Plasticidade de nervo.
3. Tubulização látero-terminal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tognon-Miguel, Vânia

Plasticidade das fibras amielínicas na tubulização látero-terminal

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Neurociências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*À minha família tão amada e estimada,
em especial à minha mãe, **Sônia**, a quem
espero poder orgulhar todos os dias!*

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente aos meus pais, **Sônia Regina Tognon Miguel e Sérgio Miguel**, e aos meus familiares, por disporem confiança imensurável em minhas escolhas, acreditando, apoiando-me e esforçando-se junto a mim, para que eu suprisse todas elas.*

*Ao meu companheiro, **Vinicius Meirelles**, por tornar as barreiras menos árduas e os caminhos mais floridos ao longo de nossa jornada, durante todos estes belos anos! Obrigada, principalmente, por escolher caminhar ao meu lado!*

À minha segunda família, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental:

***Adriana Helena do Nascimento Elias**, por todo o aprendizado e auxílio inestimáveis. Espelho-me em você como exemplo de ser humano e profissional dedicado a seguir. Obrigada por partilhar parte de sua sabedoria comigo, e pelo convívio tão gratificante e gracioso ao longo desses anos. Você sempre me confortou nas horas mais árduas, guardarei nossa amizade eternamente!*

***Maria Cristina Lopes Schiavoni**, sua obstinação é admiravelmente inspiradora! Exemplo singular de profissional que permanece em nossas mentes para sempre. Obrigada por toda e qualquer forma de ajuda, incentivo e apoio nas etapas desse trabalho!*

***Aracy Silva Dias**, você irradia luz e alegria onde quer que esteja! São abençoadas as pessoas que tem o prazer de conviver ao seu lado. Muito obrigada por todo o auxílio, dentro ou fora desse trabalho!*

***Renato Meirelles**, não tenho palavras para agradecer pela infinita paciência, ensinamentos valiosos e auxílio indispensável que proporcionou a mim ao longo das etapas finais desse projeto. Muito obrigada!*

Vocês tornam qualquer ambiente de trabalho em um verdadeiro lar!

***Giuliana, Sirlene, Thaísa, Bianca, Claudinha, Daiane, Sandra, Silmara, Silvia e Vivian** pelo auxílio constante e agradável convívio!*

*Aos responsáveis pelo laboratório BIOCEL (FMRP-USP), em especial aos técnicos **Maria Teresa e José Augusto**, pela competência e disposição em participar de partes fundamentais do projeto e das análises essenciais para a realização deste.*

*Aos colegas da pós-graduação, **Rodrigo Conde, Carlos Tostes, Bruno Fresnedas**. Em especial para **Carina Spedo e Tatiana Fusco**, amigas queridas e ouvintes incansáveis!*

*E principalmente ao **Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira**, pelas oportunidades oferecidas, por sua dedicação e disposição inigualáveis, e o mais importante, pela confiança estabelecida.*

À todos muito obrigada!

*“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que melhor
se adapta às mudanças”.*

Charles Darwin

RESUMO

TOGNON-MIGUEL, V. **Plasticidade das fibras amielínicas na tubulização látero-terminal**. 2014. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A tubulização representa uma possível alternativa para reparo de lesões de nervos periféricos, por permitir a aplicação local de fatores de crescimento e neuroregenerativos assim como por facilitar o estudo dos mecanismos de ação relacionados à regeneração das fibras nervosas. O objetivo do presente estudo foi verificar se há crescimento de fibras amielínicas no nervo fibular comum de ratas *Wistar* adultas após a tubulização látero-terminal (TLT) sem a utilização de indutores de crescimento, através de análise morfológica e morfométrica das referidas fibras. Para tanto, o nervo fibular comum direito foi seccionado a 3 mm da sua emergência, o coto proximal sepultado e suturado na musculatura adjacente e um tubo de silicone (6 mm) interposto entre o coto distal do fibular e a lateral do nervo tibial (grupo TLT). O controle usado foi o segmento distal esquerdo do nervo fibular (grupo GN). Setenta dias após, foram realizados cortes semifinos e ultrafinos para análise de aspectos morfológicos e morfométricos através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Houve evidente brotamento axonal de fibras amielínicas, que cresceram a partir do nervo tibial intacto no grupo TLT em comparação ao grupo GN, sendo que o número total de axônios amielínicos foi similar nos dois grupos. Estudo morfométrico evidenciou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação à maior densidade de axônios amielínicos regenerados e em relação ao diâmetro mínimo axonal. No presente estudo os axônios amielínicos no nervo receptor, usando o modelo da TLT, foram quantificados. Esse modelo poderá ser útil e importante para estudo da plasticidade do sistema nervoso periférico.

Palavras-Chave: fibras amielínicas, plasticidade de nervo, tubulização látero-terminal

ABSTRACT

TOGNON-MIGUEL, V. **Plasticity of unmyelinated fibers using side-to-end tubulisation.** 2014. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Side-to-end tubulisation is a model recently developed in our laboratory to study nerve plasticity. In this model, collateral sprouting of fibers grow from intact donor nerve fibers to the distal stump of a receptor nerve. The objective of the present study was to study unmyelinated fibers using this model. Adults female *Wistar* rats were used and morphological and morphometric analysis were done. The fibular common nerve was sectioned 3 mm from its origin. The proximal stump was buried and sutured in the adjacent musculature. A silicone tube (6 mm) was fixed on the adjacent lateral portion of the intact tibial nerve and the fibular common nerve distal stump was sutured in the other extremity of the tube (SET group). The left fibular common nerve distal segment was used as control. Semithin and ultrathin sections were obtained and studied using light and transmission electron microscopy. Seventy days after, there was profuse axonal sprouting of unmyelinated fibers that grew from the nerve tibial, reaching the same number of axons when compared with the controls. In the present study unmyelinated axons in the receptor nerve using SET were quantified. SET is an important tool to study plasticity of peripheral nerve fibers.

Key words: unmyelinated fibers, nerve plasticity, side-to-end tubulisation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcelos SA®). (B) Modelo de tubulização látero-terminal no nervo isquiático direito, imediatamente após a cirurgia. Tubo de silicone de 6 mm de comprimento. (a) segmento proximal do nervo isquiático, (b) nervo fibular comum, (c) nervo tibial, (d) nervo sural.

Figura 2: Segmento de nervo isquiático do grupo TLT com seus ramos fixados.

Figura 3: Exemplo de blocos de resina contendo os fragmentos dos nervos fibulares a ser estudados.

Figura 4: Microscópio eletrônico de transmissão (JEM-100CX II, JEOL Ltda.)

Figura 5: Exemplo de imagem panorâmica da área fascicular do nervo fibular normal (Grupo GN) obtida através de microscopia eletrônica. (A) Fascículo antes do início da captura das imagens. (B) Fascículo após término da captura das imagens.

Figura 6: Exemplo de quadro da utilização da ferramenta ImageJ. (A) Imagem em tamanho total (100%). (B) Porção destacada na imagem anterior com utilização de *zoom* (aumento).

Figura 7: Corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum de rato *Wistar* adulto normal. Detalhe da identificação e caracterização das fibras amielínicas.

Figura 8: Corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum de rato *Wistar* adulto normal. (A, B, C e D)

Figura 9: Área fascicular do segmento distal do nervo fibular comum normal e reconstituído parcialmente 70 dias após a cirurgia. Diferença no tamanho da área do fascículo em relação aos dois grupos estudados.

Figura 10: Corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum reconstituído parcialmente 70 dias após a cirurgia (exceto figura A). (A) Perineuro normal. (B) Perineuro com aumento do número de camadas. (C) Perineuro sem estruturação característica.

Figura 11: Corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum reconstituído parcialmente 70 dias após a cirurgia. (A) Grande número de fibras amielínicas. (B) Predominância de fibras colágenas envolvendo uma unidade de fibras amielínicas.

Figura 12: Média e desvio padrão da área fascicular interna do segmento distal do nervo fibular, 70 dias após a tubulização.

Figura 13: Média e desvio padrão do número de fibras amielínicas do nervo fibular, 70 dias após a tubulização.

Figura 14: Média e desvio padrão da densidade de fibras amielínicas do nervo fibular, 70 dias após a tubulização. (*) Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 15: Média e desvio padrão do diâmetro mínimo axonal das fibras amielínicas do nervo fibular comum.

Figura 16: Representação comparativa da distribuição de frequência média e desvio padrão do diâmetro mínimo axonal das fibras amielínicas do nervo fibular dos animais normais (GN) e 70 dias após a tubulização (TLT).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Celsius
±	mais ou menos
®	Marca registrada
≤	menor ou igual
μm	micrômetro
μm ²	micrômetros ao quadrado
%	porcentagem
CO ₂	gás carbônico
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
g	grama
GN	grupo controle normal
kg	quilogramas
LNAE	Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetros
mm ²	milímetros ao quadrado
n=	número de animais analisados
nm	nanômetro
NIH	National Institutes of Health
NLT	neurorrafia látero-terminal
NTT	neurorrafia término-terminal
pH	potencial hidrogeniônico
PCL	poly(ε-caprolactone)
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
OsO ₄	tetróxido de ósmio
TIFF	Tagged Image File Format
TLT	tubulização látero-terminal
TTT	tubulização término-terminal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Tubulização látero-terminal (TLT)	14
1.2. Fibras amielínicas	18
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Animais	25
3.2. Grupos experimentais	25
3.3. Procedimentos cirúrgicos	25
3.4. Análise macroscópica	27
3.5. Análise morfológica a microscopia óptica	27
3.6. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	29
3.7. Análise morfométrica	30
3.8. Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Aspectos descritivos morfológicos	34
4.1.1. Nervo fibular normal	34
4.1.2. Tubulização látero-terminal e nervo fibular	37
4.2. Parâmetros morfométricos	39
4.2.1. Área fascicular	39
4.2.2. Número total de axônios	40
4.2.3. Densidade axonal	41
4.2.4. Diâmetro mínimo axonal	42
5. DISCUSSÃO	44
5.1. Fibras amielínicas	45
5.1.1. Análise comparativa entre os grupos GN e TLT	45
5.1.2. Análise quantitativa no nervo fibular comum normal de rato	45
5.2. Tubulização látero-terminal	49
5.3. Nervo fibular comum	50
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS	53
8. ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tubulização látero-terminal

Acidentes envolvendo o sistema nervoso periférico possuem incidência relevante. Melhores tratamentos para lesões de nervos são metas contínuas para pesquisadores do mundo. O número de indivíduos feridos em acidentes industriais, acidentes de trânsito e por explosões em guerras tende a aumentar ainda mais essa incidência. Com isso, piora na qualidade de vida devido à perda funcional e alterações comportamentais são comumente apresentadas por indivíduos lesionados (JUNG et al., 2014). No âmbito social, as lesões acarretam profundo impacto no dia-a-dia dos pacientes, gerando altos custos para a sociedade (DAHLIN, 2004).

A neurorrafia término-terminal (NTT) é considerada a técnica mais frequentemente utilizada no reparo de nervos periféricos (ROVAK, CEDERNA, KUZON, 2001). Essa técnica vem sendo utilizada ao longo dos séculos, sendo um dos primeiros registros de neurorrafia datado do século XIII (Revisado por TERZIS, SUN, THANOS, 1997). Entretanto, a técnica apresenta limitações, pois depende da aproximação entre os cotos proximal e distal do nervo lesionado (SEDDON et al., 1975; LUNDBORG et al., 1982). Uma das alternativas, quando ocorre a perda do coto proximal, é a neurorrafia látero-terminal (NLT), técnica na qual o coto distal do nervo lesado pode ser suturado à porção lateral de um nervo doador. Um dos primeiros registros de reparo através dessa técnica data de 1895 em estudo que propôs o procedimento como alternativa de tratamento para um paciente com espasmo facial através da sutura entre a porção distal do nervo facial e a lateral do nervo acessório, porém sem sucesso. Posteriormente, Kennedy em 1899, realizou técnica similar na qual o espasmo facial foi curado (Revisado por BALLANCE C, BALLANCE H, STEWART, 1903 e VITERBO et al., 2009). A partir de então, a técnica passou a ser utilizada por outros autores (KENNEDY, 1901; HARRIS, LOW, 1903; MANASSE, 1922; STOOKEY, 1923; GATTA, 1938). Entretanto, a técnica foi descartada ao verificar-se que poderia resultar em movimentos faciais indesejáveis. O problema era ocasionado pela incisão parcial que era causada no nervo doador no local de sutura do receptor. Essa incisão causava uma abertura que determinava uma conexão término-terminal, havendo assim, um prejuízo ao nervo doador (KRIVOLUTSKAIA et al., 1989).

Viterbo e cols. (1992) reintroduziram a técnica de NLT, interligando o coto distal do nervo fibular seccionado à porção lateral do nervo tibial, mas sem a realização de janela perineural ou epineural no nervo doador. Em 1994, o mesmo grupo realizou a NLT, mas com a realização de janela peri e epineural, havendo brotamento axonal colateral e resultados funcionais satisfatórios (VITERBO et al., 1994a,b). Essa técnica proporciona brotamentos axonais (colaterais) a partir do nervo doador até o segmento distal do receptor sem que haja secção das fibras nervosas do nervo doador. Ocorre reinervação muscular a partir dos brotamentos axonais colaterais, com recuperação funcional. Posteriormente, outros pesquisadores investigaram a eficácia da NLT através de metodologias diversas.

Com a intenção de verificar se a inserção de um tubo de silicone de 6 mm (com diâmetro de 1,5 a 2 mm), na lateral do nervo tibial e tendo a extremidade distal afixada no tecido subcutâneo, associar-se-ia ao crescimento de fibras nervosas, 20 ratos *Sprague-Dawley*, foram divididos em dois grupos de 10, um com janela epineural e outro com janela perineural. Após 50 dias foi encontrado tecido conjuntivo no interior do tubo ligado à lateral do nervo tibial, que foi denominado pelos autores de “segmento de tecido mole anexado” (*Attached Soft Tissue Segment - ASTS*). À microscopia eletrônica, não foi identificada a presença de fibras nervosas ou células de Schwann no *ASTS* (AL-QATTAN, AL-THYNAN, 1998). Em estudo realizado por outro grupo, foi utilizado segmento venoso femoral autógeno como conduto entre os nervos fibular e tibial de ratos, divididos em grupos com e sem janela epineural. A distância entre a lateral do nervo tibial e a porção proximal do nervo fibular previamente seccionado, assim como o comprimento entre a lateral do tibial e o coto distal do fibular, não foram informadas. Após nove meses, houve 92% de crescimento e possível regeneração de fibras mielínicas em relação ao controle, em ambos os grupos (TING et al., 1998). Estudo posterior utilizou veia jugular como conduto e uma lacuna de 20 mm, entre a porção lateral do nervo tibial e o segmento distal do nervo fibular previamente seccionado, após a realização de janela epineural de 1 mm. Vinte e oito semanas (seis meses e meio) após os procedimentos cirúrgicos, a quantificação das fibras na porção distal do nervo fibular evidenciou que o número de fibras nesse grupo foi igual ao do grupo controle com NLT. O estudo demonstrou que o uso de veia jugular como conduto para crescimento e regeneração de fibras na NLT é viável (ULKUR et al., 2003). Em outro estudo o nervo fibular foi seccionado e seu coto distal acoplado a porção lateral do nervo tibial. Outros dois grupos foram investigados com a interposição de um tubo de

silicone entre a lateral do nervo tibial e o segmento distal do nervo fibular, um com tubo vazio e outro preenchido com células de Schwann. Nos três grupos foi realizada janela perineural no nervo doador. Após 90 dias evidenciaram-se prováveis crescimento e regeneração de fibras mielínicas em todos os grupos e a adição de células de Schwann foi tão eficaz quanto a sutura direta. Análise morfométrica indicou haver similaridade de crescimento e regeneração de fibras mielínicas entre os três grupos (GRAVVANIS et al., 2003). Estudo posterior do mesmo grupo, utilizando o mesmo modelo, comparou um grupo de animais com adição de células de Schwann normais aos tubos e outro com a adição do mesmo tipo de células modificadas com retrovírus pREV-HW3. Houve maior regeneração/crescimento de fibras mielínicas e maior funcionalidade no segundo grupo (GRAVVANIS et al., 2005). Outro grupo utilizou um segmento de veia femoral interposto entre a lateral do nervo mediano e o coto distal do nervo ulnar de ratos, previamente seccionados, com janela epineural, para avaliar a migração de células de Schwann e brotamentos axonais colaterais na regeneração. Dezesesseis ratos *Wistar* adultos foram avaliados ao longo de 7, 14, 30, e 60 dias. Os resultados obtidos através de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-neurofilamento 200-kD (um marcador axonal) e anti-S100 (um marcador glial) indicaram que a regeneração do nervo látero-terminalmente ocorreria devido à estimulação de fatores quimiotáticos, exercendo sua ação à distância no interior do tubo (MANASSERI et al., 2007). Já outro estudo investigou a viabilidade da associação de um conduto tubular biodegradável composto de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) e colágeno tipo I com o uso da NLT visando a regeneração do nervo periférico. Foi realizada lacuna de 10 mm no fibular. O tubo foi suturado na porção distal do nervo fibular, e sua outra extremidade foi aderida à porção lateral do nervo tibial, através de uma lacuna de 10 mm. Uma axotomia de 1/3 das fibras do nervo tibial foi realizada, além de uma janela epineural no local de inserção do tubo. Após oito semanas, verificou-se que houve crescimento de fibras e que essas alcançaram o segmento distal. Verificou-se também melhora na função muscular ao longo de 20 semanas. Através de cultura celular *in vitro*, foi demonstrado que tubos de PCL com colágeno tipo I viabilizam a proliferação de células nervosas quando comparados a tubos de PCL sem o colágeno (LEE et al., 2012).

A utilização de um tubo interposto entre o coto distal do nervo lesionado e a porção lateral do nervo doador refere-se à técnica denominada tubulização látero-terminal (TLT) pelo nosso grupo de pesquisa. O coto do nervo distal, denominado “nervo receptor”, é suturado a um conduto tubular, que é coaptado à porção lateral da

parede de um nervo não lesionado, denominado "nervo doador", permitindo a reinervação muscular e preservando a função do nervo doador (NASCIMENTO-ELIAS, 2013). Houve um único estudo anterior que usou essa metodologia, aparentemente visando verificar se a técnica era viável para aplicação no homem (TING et al., 1998). Em todos os outros estudos que utilizaram tubos interpostos, não rígidos (segmentos de veias) ou rígidos (tubos de silicone), foi utilizada janela epineural ou epi-perineural. Os estudos realizados no nosso laboratório até o momento diferem das investigações daqueles autores (TING et al., 1998) sob diversos aspectos. Utilizamos ratos *Wistar* do sexo feminino, adultas e com peso similar. Nosso laboratório tem utilizado tubos rígidos de silicone que permitem, eventualmente, o seguimento macroscópico da regeneração de nervos. Tais tubos são importantes porque mantêm, ao longo de todo o experimento, a mesma distância entre a lateral do nervo doador e o coto distal do nervo receptor. Segmentos de veia são flexíveis e essa flexibilidade pode comprometer a homogeneidade das observações ao longo do experimento, bem como o seu resultado final. Nos estudos do nosso laboratório, houve determinação da distância do tubo suturado no nervo tibial em relação à origem da trifurcação do nervo isquiático, de onde se origina o coto do nervo fibular, sepultado na musculatura adjacente. O comprimento do tubo (6 mm), bem como a distância entre a lateral do nervo tibial e o coto distal do fibular (5 mm) foram determinadas. A não realização de janela perineural ou epineural nos assegura que o crescimento das fibras nervosas será advindo exclusivamente de fibras nervosas intactas do nervo tibial. Para tanto, foi afirmado por um dos experimentadores que utilizaram a TLT com janela perineural que, de acordo com seus achados histológicos, 90 dias depois da operação, efeito prejudicial ao nervo doador foi encontrado devido à realização da janela perineural (GRAVVANIS et al., 2003); a despeito disto nós não podemos excluir a possibilidade de um efeito negativo precoce naquele nervo, causado pela realização de janela no nervo doador. Aquele crescimento (o que ocorre na TLT sem janela epi-perineural), portanto, dá origem exclusivamente a brotamentos axonais. O resultado é que a plasticidade neuronal (e não a regeneração do nervo periférico) é o que leva à reinervação na TLT sem janela (NASCIMENTO-ELIAS, 2013). Utilizamos para fins operacionais, no presente estudo, o entendimento de que a neuroplasticidade do sistema nervoso periférico (SNP) implica na reestruturação morfofuncional a partir de neurônios íntegros em contraposição ao de que neurorregeneração implica na reestruturação morfofuncional do SNP a partir das fibras nervosas de nervos lesionados.

Adicionalmente, em dois estudos prévios do nosso laboratório, ficou demonstrado que substâncias ativas que aceleraram a regeneração axonal também agem a partir de fibras intactas, mesmo estando a barreira peri-epineural intacta (NASCIMENTO-ELIAS, 2013 e FRESNEDAS, 2014). Esses estudos, portanto, desenharam um modelo experimental para estudo da plasticidade do SNP cujos mecanismos, além de poderem ser melhor entendidos, precisam ser comparados no futuro aos da regeneração de fibras nervosas cujos mecanismos são melhor compreendidos. Não fomos capazes de encontrar na literatura referência ao estudo prévio sobre a plasticidade ou regeneração de fibras amielínicas com a utilização de TLT.

1.2. Fibras amielínicas

Em 1838, ao realizar a dissociação de fibras de um nervo autônomo, Remak identificou estruturas referidas como fibrosas e muito finas. Fibras nervosas mielinizadas foram distinguidas de outras, mais finas e delicadas. Por essa razão podemos nos referir ao conjunto entre células de Schwann e axônios amielínicos, como fibras de Remak (ou fibras amielínicas) e aos axônios individuais contidos no citoplasma de uma célula de Schwann, como axônios amielínicos (Revisado por BERTHOLD et al., 2005).

Axônios amielínicos podem apresentar diâmetros variados entre 0,2 a 3 μm , não sendo possível identificá-los adequadamente por microscopia de luz. Com o advento da microscopia eletrônica ficou confirmado não haver bainha de mielina nos axônios das fibras de Remak (HESS, LANSING, 1953). Foi também evidenciado que a presença de bainha de mielina não aumenta a velocidade de condução em fibras de pequeno calibre. A mielina é bastante complexa e delicada, podendo facilmente ser danificada. As fibras amielínicas são estruturalmente mais robustas e menos sensíveis aos danos metabólicos (PAINTAL, 1967).

No homem, os axônios amielínicos diferem consideravelmente dos mielínicos por alcançar o seu diâmetro máximo a partir da 23ª semana de gestação (OCHOA e MAIR, 1969a,b; SHIELD, KING, THOMAS, 1986). O número de axônios em uma fibra de Remak varia entre as espécies, podendo ser em torno de 10 em roedores e,

habitualmente, de um a quatro em nervos humanos adultos (KANDA et al., 1991). Na dependência do nervo em questão, a proporção de fibras mielínicas para amielínicas varia. No nervo sural de seres humanos – o nervo periférico sensitivo mais frequentemente estudado – a proporção é de aproximadamente 1:4 (OCHOA, MAIR, 1969a; SHIELD, KING, THOMAS, 1986).

Durante o desenvolvimento de roedores, a relação entre axônios e células de Schwann modifica-se rapidamente, e eventos sequenciais produzem duas populações distintas de fibras nervosas, sendo classificadas como fibras originalmente amielínicas e as que se tornarão mielinizadas. No momento do nascimento, os feixes axonais do nervo isquiático contêm mais de 60 axônios agrupados, circundados por uma única célula de Schwann. Após três dias, há um aumento no número de axônios e células de Schwann de 50% e 90% respectivamente. Sete dias após, através de mitose, o número de células de Schwann aumenta consideravelmente e os feixes axonais passam a ser cada vez mais numerosos sendo constituídos, inversamente, por poucos axônios. Nesse momento, o aumento do número de células de Schwann não interfere na população axonal, que permanece a mesma. Conforme os feixes se subdividem, os axônios destinados a ser mielinizados adquirem relação de 1:1 com uma célula de Schwann, enquanto as demais células permanecem unidas a axônios originalmente amielínicos. Após estabelecer relação com axônios mielínicos, essas células de Schwann param de se dividir e iniciam a produção de mielina (WEBSTER, MARTIN, O'CONNELL, 1973). Entretanto, no início do processo de desenvolvimento, identificar definitivamente quais axônios desprovidos de mielina serão mielinizados e quais permanecerão amielínicos é praticamente impossível. No início do processo de maturação axonal, se um único axônio estiver junto a uma célula de Schwann, provavelmente, será mielinizado (OCHOA, 1971).

Após secção completa de um nervo, os axônios que estão destinados a permanecer amielínicos rearranjam-se para estar em contato mais íntimo com uma célula de Schwann, mas separados uns dos outros. A disposição dos axônios amielínicos em uma fibra de Remak normal é facilmente distinguível de um aglomerado de brotos amielínicos originários de uma fibra mielínica danificada durante a regeneração após lesão axonal. O revestimento da lâmina basal original da fibra amielínica regenerada pode estar ainda presente, mas mesmo que não esteja, o grupo de fibras de Remak forma um grupo de axônios e processos das células de Schwann, que ainda estão em conformidade com o perfil circular original. No processo de regeneração, o citoplasma

das células de Schwann é, geralmente, menos eletrodenso quando comparado ao de células de Schwann estáveis. Brotamentos axonais também são sugeridos pela presença de mais do que três axônios mielínicos em um processo de célula de Schwann. Fibras amielínicas maiores do que 3 μm são quase certamente fibras desmielinizadas ao invés de amielínicas. Estas são facilmente distinguidas pelas diferenças na relação dos axônios amielínicos e desmielinizados com suas células de Schwann (OCHOA, MAIR, 1969a; MORRIS, HUDSON, WEDDELL, 1972). Define-se por ser desmielinizada uma fibra nervosa desprovida de mielina que tenha relação de 1:1 com uma célula de Schwann, não esteja localizada em meio a aglomerados de fibras amielínicas, apresente membrana basal em configuração de serpentina e o conjunto “célula de Schwann-axônio” ser caracteristicamente circular (KOBAYASHI et al., 1988; MORRIS, HUDSON, WEDDELL, 1972). Se os axônios são completamente circundados por citoplasma da célula de Schwann, possuirão um mesaxônio, e em tais casos a fibra é amielínica. Após esmagamento de nervo em ratos, o número de axônios amielínicos aumenta transitória e consideravelmente na porção distal à lesão, sendo que, subsequentemente, esse número cai e depois volta ao normal (BRAY, AGUAYO, 1974). O mesmo ocorre após axotomia, evidenciando haver brotamento axonal de fibras mielínicas e amielínicas (MORRIS, HUDSON, WEDDELL, 1972). Em diferentes espécies, a relação entre fibras mielinizadas de pequeno calibre e fibras genuinamente amielínicas, comumente vista em nervos periféricos maduros, é distintamente diferente da que prevalece em grupos de fibras regeneradas contendo brotamentos antes e depois da mielinização (OCHOA, 1970a,b). No nervo maduro normal não há compartilhamento de uma célula de Schwann de um axônio mielinizado com outros axônios (OCHOA, 1971). Brotamentos colaterais de axônios sensitivos através de NLT tem completa regeneração e recuperação da nocicepção da pele após cerca de 2 a 4 meses, permanecendo estável até 9 meses de observação (KOVACIC et al., 2007). A finalização prévia da reinervação sensitiva pode ser devida ao fato de que os axônios sensitivos são mais propensos a emitirem brotamentos, quando coaptados látero-terminalmente, se comparados aos motores (BONTIOTI et al, 2005; KANJE et al, 2000; MATSUMOTO et al, 1999) e de que axônios sensitivos brotam mais rapidamente do que axônios motores (HESS et al., 2006; KANJE et al., 2000).

Axônios amielínicos estão presentes em maior número nos nervos periféricos, enquanto em suas raízes correspondentes encontram-se em menor quantidade por estarem compactados. Pequena parte de fibras amielínicas sensitivas adentra nervos

mais profundos para inervar o periósteo, as articulações e o tecido conjuntivo do músculo estriado, assim como vasos sanguíneos também recebem suporte de fibras amielínicas autônomas vasomotoras. A grande proporção de fibras amielínicas sensitivas, derivadas de gânglios da raiz dorsal, promove a inervação da pele através de nervos cutâneos, sendo que alguns reflexos axonais cutâneos envolvendo fibras de dor e autônomas dependem diretamente de ramificações terminais que ocorrem em axônios amielínicos somáticos e autônomos (OCHOA, 1975). O destino das fibras nervosas é definido geneticamente, ou seja, axônios amielínicos serão sempre amielínicos e axônios mielínicos serão sempre mielínicos. A respeito da diferença entre fibras mielínicas e amielínicas não se pode inferir que, em estudos de plasticidade e regeneração de nervos periféricos, o crescimento das fibras amielínicas será sempre igual ou proporcional numericamente ao das fibras mielínicas.

Tendo em vista que as fibras amielínicas ainda não foram objeto de estudo na TLT, a presente dissertação de mestrado investigou a neuroplasticidade das fibras amielínicas do nervo fibular comum de rato *Wistar*, no modelo recém desenvolvido de TLT.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi:

1. Verificar se há crescimento de fibras amielínicas que alcance o nervo fibular comum de ratas *Wistar* adultas submetidas à TLT, sendo doador o nervo tibial, através de:

- Avaliação qualitativa das referidas fibras;
 - Avaliação quantitativa dos axônios amielínicos no nervo fibular de ratos normais e no segmento distal do nervo previamente tubulizado, comparando os resultados entre si;
 - Estudo da distribuição de frequência dos diâmetros dos axônios amielínicos do nervo normal e no segmento distal do nervo tubulizado.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar*, com 7-8 semanas de idade, pesando entre 250g e 300g, provindas do biotério central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Esses animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas por dia, temperatura 20 a 24°C, recebendo dieta padrão de biotério para pequenos roedores e água “*ad libitum*”. O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo experimental nº 024/2010).

3.2. Grupos experimentais

- Grupo controle normal (GN)

Foi analisado o coto distal do nervo fibular comum esquerdo, retirado na mesma data e contralateralmente ao grupo experimental (n=10).

- Grupo experimental (TLT)

Foi analisado o coto distal do nervo fibular comum direito, retirado 70 dias após tubulização no nervo fibular comum (n=10).

3.3. Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (LNAE) na sala de cirurgia e eletrofisiologia. Os animais, após pesagem, foram anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) + xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal. A seguir, foram fixados em decúbito ventral numa placa acrílica com fita adesiva. Em todos os animais realizou-se tricotomia e antisepsia com álcool iodado no local a ser realizada a incisão. Realizou-se incisão na região poplíteia e póstero-lateral da coxa direita e esquerda. A musculatura foi divulsionada com instrumental cirúrgico e o nervo isquiático e suas ramificações (nervos tibial, fibular e sural) foram expostos. O nervo fibular foi separado dos tecidos adjacentes com

o auxílio de um microscópio (D.F.Vasconcelos SA®) com aumento de 16X (Figura 1A) e seccionado 3 mm caudalmente à bifurcação do nervo isquiático. O nervo fibular foi, então, seccionado a 3 mm de sua emergência, sepultado e suturado na musculatura adjacente com ponto em U, utilizando-se fio de nylon 10-0. Um segmento de 5 mm desse nervo, imediatamente distal à sua porção sepultada, foi retirado e descartado. A seguir, um tubo de silicone (Degania Silicone®) medindo 6 mm de comprimento, com diâmetro interno de 1,47 mm e diâmetro externo de 1,96 mm, foi suturado ao coto distal do nervo fibular com dois pontos (epineural) e à lateral do nervo tibial também com dois pontos no epineuro (Figura 1B).

Figura 1 – (A) Microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcelos SA®) utilizado nos experimentos. (B) Modelo de tubulização látero-terminal no nervo fibular direito, imediatamente após a cirurgia. Tubo de silicone de 6 mm de comprimento (T). Segmento retirado entre os cotos (lacuna) de 5 mm. (a) n. isquiático, (b) segmento proximal do n. fibular comum, (c) segmento distal do n. fibular comum, (d) n. tibial, (e) n.sural. Barra de escala – 3 mm.

Após os procedimentos, o músculo isquiotibial e a pele dos animais foram suturados utilizando-se fio mononylon 4.0 (Shalon®). Os animais receberam água com paracetamol diluído (0,75mg/ml) nos primeiros dois dias de pós-operatório. Ao longo dos 70 dias seguintes, tiveram livre acesso à ração e água. No 70º dia, os nervos fibulares de todos os ratos foram retirados para análise. Após a retirada dos nervos os animais foram sacrificados através de dose letal de anestésico intraperitonealmente (cetamina + xilazina) ou câmara de CO₂.

3.4. Análise macroscópica

A formação do cabo de regeneração foi acompanhada ao longo de 70 dias através do desenvolvimento de experimentos paralelos do nosso laboratório. A ligação da porção lateral nervo tibial ao segmento distal do fibular foi observada durante esse período. Foi retirado para análise o segmento distal do nervo reconstituído conjuntamente com suas conexões aos nervos tibial e fibular comum.

3.5. Análise morfológica à microscopia óptica

A preparação das amostras para a microscopia óptica foi realizada na sala de histologia do LNAE. Para análise do grupo TLT, foram preparados fragmentos do segmento distal do nervo fibular comum definido a 3 mm após o final do tubo de silicone (Figura 2).

Figura 2 – Segmento de nervo isquiático do grupo TLT (lado direito) retirado com seus ramos e fixado em glutaraldeído a 2%. Retângulo em azul representa posição do tubo com cabo de regeneração em seu interior. Linha vermelha representa 3 mm de distância do final do tubo de silicone. Seta tracejada em preto representa o segmento do nervo destinado à inclusão. (p) proximal em relação ao bloco de inclusão. Barra – 5 mm.

Os nervos seccionados, imediatamente após sua retirada, foram fixados em glutaraldeído a 2% e tampão cacodilato de sódio (0,025%), durante 48 horas a 4°C. Após esse período foram lavados em tampão cacodilato de sódio isotônico. Tetróxido

de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M foi utilizado como pós-fixador por 8-12 horas. Os nervos foram novamente lavados com tampão cacodilato de sódio isotônico, duas vezes por 10 minutos para início do processo de inclusão em resina plástica Epon 812®. O material foi desidratado com etanol em concentrações crescentes (25%, 30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%), tendo sua desidratação finalizada após imersão dos nervos por uma hora em solução de óxido de propileno. Os fragmentos foram então submersos em duas misturas de resina e óxido de propileno em concentrações diferentes. A primeira na proporção de 1:1, e a segunda na proporção de 3:1, por 1 hora cada. Os espécimes foram então infiltrados em resina pura por mais 1 hora. Cada fragmento de nervo foi então colocado, separadamente, em moldes de silicone específicos para inclusão de tecidos. Os nervos foram corretamente identificados e posicionados para posterior obtenção de cortes transversais (Figura 3). Os poços dos moldes foram preenchidos com resina pura e mantidos em estufa para polimerização (Modelo 216 – FABBE - PRIMAR) por 72 horas a 60°C.

Figura 3 – Exemplo de blocos de resina contendo os fragmentos dos nervos fibulares a ser estudados. Bloco da direita já aparado e pronto para cortes semifinos (microscopia óptica) e ultrafinos (microscopia eletrônica de transmissão).

Após esse período, os blocos de resina contendo o material de interesse foram devidamente aparados e levados à micrótomo convencional (MT 6000XL-RMC) para obtenção dos cortes histológicos utilizando navalhas de vidro em secções transversais semifinas ($0,5\ \mu$ de espessura). Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% por cinco minutos em platina aquecedora a 60°C, lavados em água corrente, secos e montados em Entellan® para análise e observação das estruturas: epineuro, perineuro, região subperineural e espaço endoneural. Análise microscópica foi realizada utilizando um microscópio óptico na sua objetiva panorâmica (100X), e aumentos finais de 400X e 1000X, através de imersão.

3.6. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para o estudo através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), os mesmos blocos de resina contendo os nervos usados para o estudo por cortes semifinos foram utilizados. Os blocos foram reaparados, e secções ultrafinas de 80nm de espessura foram obtidas por meio de navalha de diamante em ultramicrotomo (Carl Zeiss, modelo G/214711). As secções foram colocadas em grades ovais de cobre recobertas com película de Formvar a 0,5% (Formvar Solution in Ethylene Dichloride, E.M.S. Inc), sendo contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 0,5%. As amostras foram examinadas através de microscópio eletrônico de transmissão (JEM-100CXII, JEOL Ltda.) (Figura 4) acoplado com câmara digital de alta resolução (Hamamatsu ORCA-HR, modelo C4742-51-12HR).

Figura 4 – Microscópio eletrônico de transmissão (JEM-100CX II, JEOL Ltda.) acoplado a uma câmara digital de alta resolução (Hamamatsu ORCA-HR, modelo C4742-51-12HR) utilizados no presente estudo.

3.7. Análise morfométrica

As imagens por MET dos nervos foram captadas de modo sequencial, procurando varrer a sua totalidade. Foi preconizada amostragem de 100% da área fascicular ou próximo a isto. A magnificação das imagens foi padronizada para 14.000 vezes. As imagens foram obtidas manualmente com o cuidado de não haver sobreposição dos campos microscópicos (Figura 5). Cada campo microscópio deu origem a uma imagem de 14,0 μm de largura por 14,0 μm de altura, com 1024 x 1024 pixels no formato TIFF (“*Tagged Image File Format*” com tamanho de 1 mega Bytes). Devido à variabilidade do tamanho fascicular, o número médio de imagens obtidas foi em torno de 413 imagens por nervo. A porcentagem da área fascicular amostrada do grupo GN variou de 48,4% a 78,7%, sendo a média 62,4% e desvio padrão 7,6%. A porcentagem da área amostrada do grupo TLT variou de 42,9% a 95,9%, sendo a média 76,2% e desvio padrão 15,2%.

Figura 5 – Exemplo de imagem panorâmica da área fascicular do nervo fibular normal (Grupo GN) obtida através de microscopia eletrônica. (A) Fascículo antes do início da captura das imagens. (B) Fascículo após término da captura das imagens. Notar faixas claras marcadas pela incidência do feixe de elétrons na área escaneada.

Para o processamento das imagens e morfometria de fibras amielínicas foi utilizado o aplicativo *ImageJ* versão 1.47, de acesso livre no sítio dos *NIH* (*National Institutes of Health*). Primeiramente, realiza-se a calibração do sistema permitindo obter as medidas das variáveis definidas (área e diâmetro mínimo) dos axônios amielínicos. A calibração é realizada definindo que cada 1024 pixels da imagem obtida em 14.000

aumentos equivalem a 14 μm . Este valor foi obtido através de uma imagem de grade quadriculada de 1 μm como referência. Para a marcação, utilizou-se a ferramenta “poligonal” contida no *software*, que permite contornar cada axônio amielínico circundando a sua borda (porção endoneural) (Figura 6). Estas seleções foram então armazenadas através da ferramenta “ROI Manager”. Desta forma foi possível salvar a seleção de cada axônio amielínico para posteriormente obter as medidas de área e diâmetro mínimo de cada axônio individualmente. As medidas obtidas são transferidas para uma planilha do *Excel Microsoft®*, para realizar os tratamentos estatísticos pertinentes.

Figura 6 – Exemplo de quadro da utilização da ferramenta ImageJ para realização das medidas e contagem dos axônios amielínicos. (Esquerda) Imagem em tamanho total (100%) apresentando diversas fibras amielínicas em conjunto com mielínicas. Área em vermelho destaca a porção ampliada da imagem seguinte. (Direita) Porção marcada na imagem anterior com utilização de *zoom* (aumento) para melhor identificação da área axonal interna dos axônios amielínicos. Área interna é medida ao ser circundada pela linha em amarelo.

Os critérios para correta identificação das fibras amielínicas foram embasados nos descritos por MORRIS, 1972, a saber: 1. Os axônios amielínicos tinham perfil circular ou oval; 2. Os axônios eram circundados pelos processos citoplasmáticos das células de Schwann formando invaginações (mesaxônios); 3. Usualmente tinham axoplasma mais claro do que os processos das células de Schwann; 4. Encontravam-se agrupados em “unidades” (*clusters*) possuindo relação direta com as células de Schwann; 5. Havia a presença de lâmina basal circundando a unidade de fibras, cercando externamente o grupo (célula de Schwann e axônios).

Inicialmente foram obtidos a área e o diâmetro mínimo de cada axônio amielínico circundando manualmente a superfície externa do axônio. Os axônios que estiveram integralmente aparentes na imagem foram medidos e os que apareciam parcialmente ou cortavam as laterais dos campos microscópicos foram apenas contados, e os dados complementaram-se no final. Através do número total de axônios e da área endoneural pode-se calcular a densidade de axônios amielínicos (fibras/mm²).

Ao final, os dados mensurados para análise dos resultados foram: área total do fascículo (obtida através da imagem do nervo captada em microscopia de luz - μm^2), área amostrada, porcentagem da área amostrada, diâmetro mínimo dos axônios, número de imagens por nervo (*frames*), número de axônios medidos, número de axônios contados, número total de axônios amostrados (axônios medidos + axônios contados), número total estimado de axônios, densidade axonal, diâmetro mínimo dos axônios.

3.8. Análise estatística

Para as variáveis numéricas inicialmente foram testadas as hipóteses de normalidade da distribuição dos dados através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que não rejeitaram a normalidade foram comparadas através do teste t para amostras independentes. As variáveis que rejeitaram a distribuição normal foram avaliadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. As frequências dos diâmetros das fibras amostradas foram comparadas através do teste do Qui-Quadrado. As estatísticas descritivas apresentadas foram média, desvio padrão, a frequência e o percentual dos diâmetros mínimos. Na análise foi utilizado o programa SPSS v. 17.0. Foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos descritivos morfológicos

4.1.1. Nervo fibular normal

As amostras de nervo fibular comum normal eram constituídas por apenas um fascículo, circundado por perineuro bem definido. O perineuro era constituído por uma camada celular consistente que separava o epineuro do endoneuro no mesmo grupo.

Através das imagens obtidas por MET, tanto as fibras mielínicas, quanto as fibras amielínicas foram identificadas. Estas foram facilmente identificadas através das invaginações individuais da membrana plasmática das células de Schwann (mesaxônio) que circundam as fibras (Figura 7) e pela presença de microtúbulos, neurofilamentos e mitocôndrias no espaço axonal. Os axônios amielínicos normais tinham diâmetros variados e seu número era relativamente grande (Figura 8A), podendo haver variabilidade em sua área e circularidade. Pôde-se verificar, no espaço endoneural, núcleos e citoplasma de células de Schwann (Figura 8B), células endoteliais de capilares (Figura 8C), mastócitos (Figura 8D), fibroblastos, além de fibras colágenas cortadas transversal e longitudinalmente. Os núcleos das células de Schwann, quando aparentes, puderam ser facilmente identificados através de sua proximidade aos axônios mielínicos e amielínicos. Mastócitos também puderam ser identificados devido à notável presença de grânulos metacromáticos em seu citoplasma (à microscopia eletrônica, os grânulos mastocitários apresentaram-se contrastados intensamente em preto).

Figura 7 – Corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum de rato *Wistar* adulto do grupo GN. Axônios amielínicos caracterizados através de mesaxônios da membrana plasmática da célula de Schwann (seta preta). Notar lâmina basal circundando o grupo (seta vermelha). Microscopia eletrônica de transmissão. Barra de escala – 1 μ m.

Figura 8 – Corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum de rato *Wistar* adulto do grupo GN. (A) Grande número de axônios amielínicos de diâmetros variados. Nota-se a presença de um núcleo de célula de Schwann (NSc) assim como partes de duas fibras mielínicas (M). (B) Grande número de axônios amielínicos de diâmetros variados, situados em unidades de células de Schwann distintas. Podem-se notar 3 núcleos de células de Schwann (NSc). (C) Capilar endoneurial com hemácias no seu interior (H), células endoteliais (cE) e membrana basal (seta). Uma fibra mielínica (M) e um conjunto de axônios amielínicos (Am) podem ser vistos, assim como fibras colágenas (Col) cortadas transversalmente. (D) Mastócito (Mt) ao lado de fibra amielínica (Am). Microscopia eletrônica de transmissão – 14.000X. Barra de escala – 2 μ m.

4.1.2. Tubulização látero-terminal e nervo fibular

Os animais do grupo TLT, após 70 dias da tubulização, apresentaram formação de “cabo de regeneração” macroscopicamente semelhante ao aspecto do nervo fibular normal em espessura, textura e coloração.

Na microscopia de luz, cinco dos 10 animais do grupo TLT apresentaram área fascicular dos nervos regenerados menor quando comparada à dos nervos normais (Figura 9) e os outros cinco apresentaram área fascicular de tamanho similar à dos nervos normais.

Figura 9 – Fotomicrografia de áreas fasciculares dos segmentos distais do nervo fibular comum normal e do nervo fibular reconstituído parcialmente 70 dias após a cirurgia. Nota-se a diferença no tamanho da área do fascículo em relação aos dois grupos estudados. (A) GN. (B) TLT. Cortes semifinos (0,5µm) corados com azul de toluidina. Barra – 100 µm.

Na observação por MET, diferentemente do perineuro normal (Figura 10A), o perineuro do grupo TLT apresentou desalinhamento das suas camadas celulares (Figura 10B e 10C).

Em todas as amostras foram identificadas fibras amielínicas, núcleos de células de Schwann, células endoteliais de capilares e mastócitos. Mastócitos estavam presentes nos nervos avaliados em maior número, quando comparados ao controle.

Figura 10 – Eletromicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo fibular comum do grupo TLT (exceto figura A). (A) Perineuro normal (grupo GN). (B) Perineuro com parcial desalinhamento de camadas. (C) Perineuro sem estruturação característica. Microscopia eletrônica de transmissão – 14.000X. Barra de escala – 2 μ m.

As fibras amielínicas eram semelhantes às dos nervos normais, com grande variabilidade em sua área e circularidade, geralmente constituídas por poucos axônios. Os axônios amielínicos tinham diâmetros mínimos variados e número total relativamente maior, quando comparado aos dos nervos normais (Figura 11A). Alguns nervos do grupo TLT, apresentaram conteúdo endoneural predominantemente preenchido por colágeno, observando-se apenas algumas fibras mielínicas e amielínicas ou outros tipos de células (Figura 11B).

Figura 11 – Eletromicrografia de cortes transversais de segmentos distais de dois nervos fibulares comuns do grupo TLT. (A) Grande número de fibras amielínicas, mas geralmente as unidades de células de Schwann têm um ou poucos axônios. A maioria dos axônios tem pequenos diâmetros quando comparados ao grupo controle. Ainda assim a variabilidade no diâmetro pode ser grande em uma mesma unidade (seta – axônio amielínico de menor calibre / * – axônio amielínico de maior calibre). (B) Predominância de fibras colágenas (Col) envolvendo uma fibra amielínica com 3 axônios amielínicos de diâmetros muito pequenos (Am). Microscopia eletrônica de transmissão – 14.000X. Barra de escala – 2 μ m.

4.2. Parâmetros morfométricos

4.2.1. Área fascicular

A área fascicular interna do grupo GN variou de $0,10 \text{ mm}^2$ a $0,17 \text{ mm}^2$, sendo a média $0,13 \text{ mm}^2$ e desvio padrão $0,02 \text{ mm}^2$.

A área fascicular interna do grupo TLT variou de $0,05 \text{ mm}^2$ a $0,20 \text{ mm}^2$, sendo a média $0,11 \text{ mm}^2$ e desvio padrão $0,04 \text{ mm}^2$.

Figura 12. Representação da média e desvio padrão da área fascicular do segmento distal do nervo fibular, 70 dias após a tubulização. GN = grupo normal. TLT = tubulização látero-terminal.

Após análise das medidas verificou-se que não houve diferença significativa entre a média das áreas fasciculares entre os grupos GN e TLT ($p=0,07$).

4.2.2. Número total de axônios

O número total de axônios amielínicos do grupo GN variou de 1.327,8 a 2.181,0, sendo a média 1.882,0 e desvio padrão 270,9.

O número total de axônios amielínicos do grupo TLT variou de 848,5 a 4.120,8, sendo a média 2.011,9 e desvio padrão 1060,8.

Figura 13. Representação da média e desvio padrão do número de axônios amielínicos do nervo fibular, 70 dias após a tubulização.

Em relação ao número total de axônios não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,71$).

4.2.3. Densidade axonal

A densidade de axônios amielínicos do grupo GN variou de 10.360,1 a 16.056,8 axônios/mm², sendo a média 13.935,0 e desvio padrão 1.875,8.

A densidade de axônios amielínicos do grupo TLT variou de 11.655,3 a 28.795,9 axônios/mm², sendo a média 18.733,3 e desvio padrão 5.668,6.

Figura 14. Representação da média e desvio padrão da densidade de axônios amielínicos do nervo fibular, 70 dias após a tubulização. (*)Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Ao analisarmos a densidade de axônios amielínicos verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), sendo que o grupo TLT possuía maior densidade axonal em relação ao grupo controle.

4.2.4. Diâmetro mínimo axonal

O diâmetro mínimo do grupo GN variou de $0,801 \pm 0,29 \mu\text{m}$ a $1,133 \pm 0,40 \mu\text{m}$, sendo a média $0,968 \mu\text{m}$ e desvio padrão $0,10 \mu\text{m}$.

O diâmetro mínimo do grupo TLT variou de $0,535 \pm 0,33 \mu\text{m}$ a $0,805 \pm 0,46 \mu\text{m}$, sendo a média $0,648 \mu\text{m}$ e desvio padrão $0,08 \mu\text{m}$.

Figura 15. Representação da média e desvio padrão do diâmetro mínimo axonal das fibras amielínicas do nervo fibular, 70 dias após a tubulização. (*)Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$).

O diâmetro mínimo dos axônios amielínicos dos nervos fibulares foi significativamente maior no grupo controle quando comparado com o grupo TLT ($p < 0,05$).

Nas figuras a seguir (5A e 5B) observa-se o comparativo referente à distribuição de frequência do diâmetro mínimo dos axônios amielínicos entre os grupos analisados. No GN nota-se a incidência de maior número de axônios amielínicos com diâmetro mínimo entre 1 e 1,5 μm . No grupo TLT, há uma maior concentração de axônios com diâmetro mínimo entre 0,5 e 1 μm .

Figura 16. Representação comparativa da distribuição de frequência média e desvio padrão do diâmetro mínimo axonal das axônios amielínicos do nervo fibular dos animais normais e 70 dias após a tubulização. (A) GN. (B) TLT.

5. DISCUSSÃO

5.1. Fibras amielínicas

5.1.1. Análise comparativa entre os grupos GN e TLT

Ao comparar o número de axônios amielínicos entre os grupos normal e experimental na presente dissertação, foi observada quantidade similar entre os grupos. Tal ocorreu, provavelmente, por causa da arborização dos axônios resultantes dos brotamentos axonais colaterais provenientes do nervo doador. Isto se dá no período de desenvolvimento, assim como ocorre após esmagamento e secção de nervo, e não é sabido se em situação na qual a plasticidade neuronal esteja muito ativa, como no presente experimento, possa também ocorrer. De todo modo, o crescimento axonal no grupo experimental é indicativo da viabilidade estrutural do modelo de TLT.

A área fascicular menor no grupo experimental se coaduna com uma diferença estatisticamente significativa dos diâmetros mínimos axonais para menos no mesmo grupo. O diâmetro médio das fibras amielínicas menor no grupo TLT pode ser transitório e é possível que observações realizadas com maior espaço de tempo possam se associar a uma eventual redução do número de brotamentos axonais e que haja equiparação nas medidas da área fascicular interna entre os grupos.

5.1.2. Análise quantitativa no nervo fibular comum normal de rato

Para que fosse obtida uma avaliação comparativa entre o repovoamento de fibras amielínicas do nervo fibular através de brotamentos colaterais oriundos do nervo tibial normal – nervo doador no modelo de TLT que utilizamos – foi realizada quantificação dos axônios amielínicos do nervo fibular comum. Considerando dados do nosso laboratório (NASCIMENTO-ELIAS, 2013), estimamos que a proporção entre fibras mielínicas e axônios amielínicos no nervo fibular comum de ratas *Wistar* adultas é de aproximadamente 1:1. Embora o nervo fibular comum do rato seja principalmente motor, esperava-se encontrar mais axônios amielínicos do que encontramos, tendo em vista que o trabalho de Schmalbruch (1986) evidenciou fibras sensitivas e fibras simpáticas como componentes do nervo isquiático e suas ramificações. Em nossos achados encontramos cerca de duas vezes e um quarto menos axônios amielínicos no

nervo fibular comum normal quando comparado à estimativa do referido trabalho, que foi de 4.171 axônios, com o desvio padrão de 565 axônios (SCHMALBRUCH, 1986). Estudo posterior do mesmo grupo investigou os nervos fibular e sóleo regenerados de ratos *Wistar* após esmagamento de nervo. A estimativa de axônios amielínicos normais do referido trabalho foi de 2.960 axônios na porção distal, sem dados de desvio padrão (TOFT, FUGLEHOLM, SCHMALBRUCH, 1988). Tanto os resultados dos referidos autores, quanto os nossos, são estimativos, havendo grandes diferenças metodológicas que podem explicar, pelo menos em parte, a discrepância entre as medidas. Nosso material foi fixado *in situ* com glutaraldeído a 2% e incluído em Epon 812®, enquanto que, aqueles autores fizeram perfusão das patas posteriores com glutaraldeído a 4 e a 2,5%, injetado na aorta abdominal para fixar o material. Como nós, os referidos autores incluíram o seu material em Epon 812®. Adicionalmente usaram grades convencionais quadriculadas (*Mesh*) para a obtenção das suas micrografias à microscopia eletrônica, enquanto usamos grades ovais com abertura única recoberta por película. As grades convencionais permitem maior margem de erro, pois a malha da grade é sobreposta ao corte, ocultando parte da imagem e limitando o campo de visão do material. Já as grades ovais contêm a imagem do fascículo do nervo fibular integralmente, permitindo uma extensa varredura das fibras. Essa é uma das razões pelas quais Schmalbruch amostrou entre 3 e 70% (esta última proporção para “nervos pequenos”) da área seccional transversa dos nervos. A metodologia para obtenção do cálculo amostral do trabalho de Toft e cols. foi embasada no trabalho anterior de Schmalbruch. O que nos leva a crer que a proporção amostral obtida no estudo de Schmalbruch (informada em proporção inexata) foi então semelhante ao descrito por Toft e cols., que variou entre 6 a 10% da área seccional total do nervo fibular. Nossa quantificação das fibras amielínicas do nervo fibular normal foi em média cerca de 60% da área transversa do nervo, enquanto a estimativa daqueles autores foi feita com base na proporção de axônios amielínicos em relação ao número de fibras mielínicas, das eletromicrografias, proporção esta que não foi informada. Nós, a partir da soma das áreas captadas da varredura do nervo e do número de axônios encontrados nesta área, extrapolamos o total de axônios contados para a área fascicular interna total medida do nervo fibular, obtida através da microscopia de luz. Sendo assim, a área amostral considerada por Schmalbruch e Toft e cols. foi de, no mínimo, seis vezes menor do que o amostrado na presente investigação. Outra discrepância pode ser devida à diferença de idade e sexo dos animais estudados. Destaque-se que, na data do sacrifício, os animais estudados por Schmalbruch eram

machos e a faixa etária era de 5 semanas e meia de vida (39 dias), enquanto os nossos eram fêmeas e tinham aproximadamente 18 semanas e meia (130 dias). Toft e cols. também avaliaram ratos machos, porem, dados a respeito da idade dos animais não foram informados. Essa diferença pode estar relacionada ao período de desenvolvimento, pois a maturidade sexual das ratas dá-se em torno dos 60 dias de vida (HAFEZ, 1970) enquanto os machos atingem a maturação sexual aproximadamente aos 50 dias (LEE et al., 1975), sendo que, em ambos os gêneros, o processo de crescimento esquelético finaliza-se entre 120-140 dias (HUGHES, TANNER, 1970), tornando-se animais adultos acima dessa idade. O processo de crescimento e desenvolvimento em ratos é compreendido em 3 fases distintas: fase inicial, denominada hiperplasia (primeiros 17 dias de vida); fase intermédia, denominada hiperplasia-hipertrofia (17 aos 48 dias) e fase final, denominada armazenagem (48 aos 160 dias) (ENESCO, LEBLOND, 1962). O nervo isquiático de ratos em período de desenvolvimento, por exemplo, tem mais axônios em comparação a ratos adultos, sendo que as ramificações axonais excessivas são eliminadas durante a maturação (JENQ, CHUNG, COGGESHALL, 1986). Nesse âmbito, estudos experimentais comparativos (especialmente ao se tratar de populações ainda em período de desenvolvimento), podem apresentar divergências nos resultados, devido ao processo de maturação somática acompanhado por mudanças morfológicas (BOLAÑOS, ARRUDA, 2009). Assim sendo, os grupos de animais estudados por Schmalbruch e no presente estudo não foram constituídos por ratos de idade similar, sendo os animais do referido autor considerados jovens e os nossos já adultos, o que possivelmente pode explicar a divergência no número de fibras nervosas, as quais ainda estariam em processo de desenvolvimento. Essa possibilidade é reforçada através do diâmetro das fibras encontrado por Schmalbruch que tiveram diâmetro médio 0,78 μm , enquanto nosso estudo apresentou diâmetro das fibras amielínicas do grupo normal com média de 0,96 μm . Fibras nervosas de animais jovens podem ainda estar em processo de maturação axonal, apresentando diâmetro axonal inferior ao diâmetro de animais adultos. Além disso, em ambos os trabalhos, o número de espécimes avaliados não se equiparam ao número de animais da presente dissertação, pois avaliamos 10 animais normais enquanto Schmalbruch e Toft e cols. analisaram 4 e 1 animais, respectivamente, o que também pode explicar a discrepância do número total de axônios amielínicos entre os estudos. Outro estudo, visando avaliar o efeito de laser nas fibras nervosas finas do nervo fibular (ratos *Sprague-Dawley*), encontrou em 6 animais controles cerca de 5.000

axônios amielínicos com desvio padrão de aproximadamente 400 axônios (WESSELMANN, KERNS, RYMER, 1994). A discrepância entre o número de axônios amielínicos encontrado no trabalho agora citado e nossos achados pode, novamente, ser explicada através das divergências metodológicas aplicadas em ambas as investigações. O autor usou ratos de gênero e linhagem distintos dos nossos, cujas idades não foram informadas, mas devido ao curto tempo de análise (sete dias), pressupõe-se que os animais eram relativamente mais novos do que os nossos que foram avaliados 70 dias após a tubulização. O autor realizou fixação do material através de perfusão intracardíaca com glutaraldeído a 5% e incluiu o material em Epon Araldite®, enquanto nosso material foi fixado *in situ* com glutaraldeído a 2% e incluído em Epon 812®. As grades usadas para obtenção das eletromicrografias também diferem, sendo que o autor usou grades *Mesh* e nós usamos grades ovais com película. O método de quantificação usado no trabalho citado também difere consideravelmente do nosso, sendo que o autor realizou estimativa do número total de axônios amielínicos a partir da contagem dos axônios presentes em apenas sete eletromicrografias, equivalentes a 15% da região total do nervo, enquanto nós avaliamos área amostral de, no mínimo, 60%. Chama a atenção que a diferença que encontramos entre os nossos resultados e os dos dois autores já referidos (SCHMALBRUCK, 1986 e WESSELMANN, 1994), usando o teste t de *student* através do programa *Instat*, evidenciou haver diferença significativa entre os nossos resultados e o daqueles autores ($p=0,004$ e $p<0,001$ respectivamente).

De toda a forma, a discrepância dos achados indica a necessidade de mais estudos quantitativos em relação às fibras amielínicas do nervo fibular comum normal do rato. Tais estudos são de grande importância, tendo em vista que esse nervo tem sido mais e mais vezes utilizado em estudos experimentais a respeito da NLT. Não encontramos outros trabalhos, além dos que referimos anteriormente, sobre quantificação de fibras amielínicas no nervo fibular comum. Não deixa de ser intrigante que trabalhos que estudaram a NLT e quantificaram fibras amielínicas, tenham comparado a quantidade dos axônios amielínicos entre grupos experimentais sem qualquer referência ao número de axônios amielínicos do nervo fibular de animais normais (KOVACIC et al., 2007; 2009). A metodologia por nós utilizada assim como a área do nervo amostrada dão suporte a uma maior fidedignidade dos achados da presente dissertação. Estudos futuros deverão confirmar ou não os nossos dados.

5.2. Tubulização látero-terminal

O modelo experimental de reparo do nervo periférico utilizando a TLT com tubos rígidos, como comentado na introdução do presente estudo, foi desenvolvido e estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (NASCIMENTO-ELIAS, 2013 e FRESNEDAS, 2014), tendo parte dos achados comunicada na reunião da *Neuroscience Society* de 2012 (*Neuroscience Meeting*, 2012). A presente investigação é a primeira a avaliar e registrar o crescimento de fibras amielínicas através da TLT. A TLT foi realizada poucas vezes previamente, usando veias. Apenas em três publicações foi referido o uso de tubo rígido. Em duas dessas publicações foi utilizado tubo de silicone (GRAVVANIS et al., 2003; 2005) e a na outra, tubo sintético de PCL (LEE et al., 2012). Tais experimentos foram realizados utilizando janelas epi ou perineurais, eventualmente com a secção intencional das fibras do nervo doador. Não sendo rígido o tubo interposto, não se pode fazer uma observação comparativa adequada entre animais de um mesmo grupo devido à flutuação da distância entre o nervo doador e o receptor, na dependência da postura do animal ao longo das várias semanas do experimento, que pode se associar a flexões, estiramentos, colabamentos ou colapsos (no uso de veias) do conduto tubular. Nos estudos prévios com o uso de segmentos tubulares interposto entre o nervo doador e o receptor, foram investigadas exclusivamente fibras mielínicas (Revisão por VITERBO et al., 2009).

A principal diferença entre os trabalhos anteriormente realizados e a presente dissertação de mestrado, é que não encontramos pesquisas que tenham realizado análise morfológica e/ou morfométrica de fibras amielínicas do nervo fibular no modelo látero-terminal com o uso de condutos tubulares de nenhuma espécie. Os nossos achados evidenciam que há profuso crescimento de fibras amielínicas que alcançam o nervo receptor quando se utiliza a TLT. Tais achados são importantes, tendo em vista que as fibras amielínicas do nervo fibular constituem-se em aferências sensitivas e eferências do sistema simpático (SCHMALBRUCH, 1986). O estudo da sensibilidade dolorosa e das respostas simpáticas da pele, em modelos como o aqui desenvolvido, serão importantes para avaliação das possibilidades de estudo de plasticidade do SNP no modelo TLT.

5.3. *Nervo fibular comum*

O nervo periférico em questão foi escolhido devido sua acessibilidade e maior facilidade relativa às avaliações metodológicas. Estudos quantitativos e morfométricos a respeito do número de fibras amielínicas nos nervos periféricos, em sua grande maioria, são desenvolvidos no nervo sural. Como as fibras amielínicas ou fibras tipo C conduzem sensações térmicas e de dor, os experimentos são realizados no sural por este possuir 92% de axônios sensitivos (SWETT et al., 1991). A técnica de reparo de nervo látero-terminal demanda a escolha de um nervo doador, no qual será implantada lateralmente a porção distal seccionada do nervo lesionado. Nervos sensitivos autólogos, como o sural, são convencionalmente empregados como nervo doador para tais enxertos, devido à facilidade de coleta e ao mínimo ou nenhum comprometimento da função motora. Entretanto, o uso de enxertos de nervos sensitivos tem causado diversas complicações (STANFORTH, FISHER, 1978; ORTIGUELA, WOOD, CAHILL, 1987; RAPPAPORT, VALENTE, HUNTER, 1993). Nervos sensitivos apresentam diferentes proporções de fibras nervosas em comparação com seus homólogos motores. A regeneração de um nervo motor lesionado utilizando enxerto de nervo sensitivo pode resultar em uma deficiência de recuperação da função motora. Estudo prévio comparou a aplicação de enxertos com nervos motores e sensitivos na regeneração de nervo motor em um modelo animal. Os resultados mostraram regeneração significativamente melhor através de enxertos com nervos motores em comparação com enxertos de nervos sensitivos (BRENNER et al., 2006).

Estudo posterior com NLT, que utilizou o nervo sural como nervo doador para o nervo fibular, avaliou, além das mielínicas, as fibras amielínicas. Estas alcançaram o segmento receptor do nervo fibular. O tempo de observação máximo foi de 56 dias. Em tais experimentos não foi lançado mão de controles normais e o número máximo de axônios amielínicos observado 4 mm após o sítio da neurorafia (no nervo fibular receptor) foi de pouco menos de 800 axônios (KOVACIC et al., 2007). Seria esperado que, em decorrência da rafia direta do receptor à lateral do doador (nervo sural) houvesse crescimento mais profuso de axônios amielínicos. Em nosso estudo, encontramos a média de 2.011 axônios amielínicos no segmento distal do nervo fibular tubulizado. Levando em consideração os dados do trabalho acima citado, nossos

achados podem ser demonstrativos de que o nervo tibial é melhor doador de fibras amielínicas do que o nervo sural.

6. CONCLUSÕES

Foi identificada menor quantidade total de axônios amielínicos no nervo fibular normal de ratas *Wistar* adultas, quando tal quantidade foi comparada à da literatura vigente.

O achado sobre número de axônios amielínicos similar ao dos animais normais nos animais submetidos à tubulização látero-terminal (TLT), assim como a densidade axonal estatisticamente maior no grupo experimental, são indicativos da viabilidade estrutural do modelo de TLT.

O diâmetro médio das fibras amielínicas apresentou-se menor no grupo TLT em comparação aos diâmetros axonais dos nervos normais.

O presente estudo dá suporte à ideia de que a TLT é um modelo adequado para estudo da plasticidade das fibras nervosas do nervo periférico, no referente, às fibras amielínicas.

7. REFERÊNCIAS

AL-QATTAN MM, AL-THYNAN A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 51, pg. 238-242, 1998.

BALLANCE CA, BALLANCE HA, STEWART P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. **British medical journal**, v. 2, n. 1, p. 1009-13, 1903.

BARREIRA AA, NASCIMENTO-ELIAS AH, SCHIAVONI MCL, MOTA TS, MARQUES W Jr. **End-to-side tubulisation – new alternative for the study of peripheral nerve regeneration**. In: NEUROSCIENCE MEETING PLANNER. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.

BERTHOLD CH, FRAHER JP, KING RHM, RYDMARK M. Microscopic Anatomy of the Peripheral Nervous System. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. **Peripheral neuropathy**, 4thed, Chapter 3, Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

BOLAÑOS MAC, DE ARRUDA M. Velocidade de crescimento a partir do peso corporal de ratos machos *Wistar*. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.3, n.18, p.478-484, 2009.

BONTIOTI E, DAHLIN LB. Chapter 12: Mechanisms underlying the end-to-side nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**, v. 87, pg. 251-68, 2009.

BRAY GM, AGUAYO AJ. Regeneration of peripheral unmyelinated nerves. Fate of the axonal sprouts which develop after injury. **Journal of Anatomy**, v. 117, n. 3, pg. 517-29, 1974.

BRENNER MJ, HESS JR, MYCKATYN TM, HAYASHI A, HUNTER DA, MACKINNON SE. Repair of motor nerve gaps with sensory nerve inhibits regeneration in rats. **Laryngoscope**, v. 116, pg. 1685-92, 2006.

DAHLIN LB. The biology of nerve injury and repair. **Journal of the American Society for Surgery of the Hand**, v. 4, n. 3, p.143-52, 2004.

ENESCO M, LEBLOND P. Increase in cell number as factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 10, n.4, p. 530-562, 1962.

FRESNEDAS BC. **Incrementando a plasticidade de fibras mielínicas através da tubulização látero-terminal com colágeno tipo I e Matrigel®**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

GATTA R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosi. **Arch. Ital. Chir**, v. 48, p. 155-171, 1938.

GRAVVANIS AI, KARVELAS M, LYKLOUDIS E, LAVDAS A, PAPALOIS A, PATRALEXIS C, MATSAS R, STAMATOPOULOS C, IOANNOVICH J. The use

of silicone tubes in end-to-side nerve grafting. An experimental study. **European Journal of Plastic Surgery**, v. 26, pg. 111-115, 2003.

GRAVVANIS AI, LAVDAS A, PAPALOIS AE, FRANCESCHINI I, TSOUTSOS DA, DUBOIS-DALCQ M, MATSAS R, IOANNOVICH JD. Effect of genetically modified Schwann cells with increased motility in end-to-side nerve grafting. **Microsurgery**, v. 25, pg. 423-432, 2005.

HAFEZ ESE. **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1970.

HARRIS W, LOW WV. On the importance of accurate muscular analysis in lesions of the brachial plexus; and the treatment of Erb's palsy and infantile paralysis of the upper extremity by cross-union of the nerve roots. **British medical journal**, v. 24, p. 1035-38, 1903.

HESS A, LANSING AI. The fine structure of peripheral nerve fibres. **The Anatomical Record**, v. 117, n. 2, pg. 175-199, 1953.

HESS JR, BRENNER MJ, MYCKATYN TM, HUNTER DA, MACKINNON SE. Influence of Aging on Regeneration in End-to-Side Neurorrhaphy. **Annals of Plastic Surgery**, n. 57, p. 217-222, 2006.

HUGHES PCR, TANNER JM. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. **Journal of Anatomy**, v. 106, n. 2, p. 371-402, 1970.

JENQ CB, CHUNG K, COGGESHALL RE. Postnatal loss of axons in normal rat sciatic nerve. **Journal of Comparative Neurology**, v. 244, n. 4, pg. 445-50, 1986.

JUNG Y, NG JH, KEATING CP, SENTHIL-KUMAR P, ZHAO J, RANDOLPHMA, WINOGRAD JM, EVANS CL. Comprehensive evaluation of peripheral nerve regeneration in the acute healing phase using tissue clearing and optical microscopy in a rodent model. **PLoSOne**, vol. 9, n. 4, eCollection e94054, 2014.

KANDA T, TSUKAGOSHI H, ODA M, MIYAMOTO K, TANABE H. Morphological changes in unmyelinated nerve fibres in the sural nerve with age. **Brain**, n. 114, p. 585-99, 1991.

KANJE M, ARAI T, LUNDBORG G. Collateral sprouting from sensory and motor axons into an end to side attached nerve segment. **NeuroReport**, v. 11, pg. 2455-2459, 2000.

KENNEDY R. On the restoration of co-ordinated movements after nerve crossing, with interchange of function of the cerebral cortical centres. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 194B, p. 127-164, 1901.

KOBAYASHI S, KATAYAMA M, SATOH J, SUZUKI K, SUZUKI K. The Twitcher Mouse. An Alteration of the Unmyelinated Fibers in the PNS. **American Journal of Pathology**, v. 131, n. 2, 1988.

KOVACIC U, TOMSIC M, SKETELJ J, BAJROVIĆ FF. Collateral sprouting of sensory axons after end-to-side nerve coaptation-a longitudinal study in the rat. **Experimental Neurology**, v. 20, n. 2, pg. 358-69, 2007.

KOVACIC U, SKETELJ J, BAJROVIĆ FF. Effect of aging on recovery of cutaneous nociception after end-to-side nerve repair in the rat. **Annals of Plastic Surgery**, v.62, n. 4, pg. 439-45, 2009.

KRIVOLUTSKAIA EG, CHUMASOV EI, MATINA VN, MEL'TSOVA GM, KIRILLOV AL. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. **Stomatologiya (Mosk)**, v. 68, n. 6, p. 35-8, 1989.

LEE BK, JU YM, CHO JG, JACKSON JD, LEE SJ, ATALA A AND YOO JJ. End-to-side neurorrhaphy using an electrospun PCL/collagen nerve conduit for complex peripheral motor nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 33, p. 9027-36, 2012.

LEE VWK, DE KRETZER DM, HUDSON B, WANG C. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 42, p. 121-126, 1975.

LUNDBORG G, LONGO FM, VARON S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. **Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 157-61, 1982.

MANASSE P. Uber doppelte nerven pfropfung. **Arch Klin Chir**, v. 120, p. 665-85, 1922.

MANASSERI B, RAIMONDO S, GEUNA S, G RISITANO, STAGNO D'ALCONTRES F. Ulnar nerve repair by end-to-side neurorrhaphy on the median nerve with interposition of vein: an experimental study. **Microsurgery**, v. 27, n. 1, p. 27-31, 2007.

MATSUMOTO M, HIRATA H, NISHIYAMA M, MORITA A, SASAKI H, UCHIDA A. Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 15, pg. 281-286, 1999.

MORRIS JH, HUDSON AR, WEDDELL G. A Study of Degeneration and Regeneration in the Divided Rat Sciatic Nerve Based on Electron Microscopy II. The Development of the "Regenerating Unit". **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v. 124, pg. 103-130, 1972.

NASCIMENTO-ELIAS AH. **Veículos, indutores e tubulização látero-terminal na regeneração do nervo periférico**. Tese (Doutorado em Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

OCHOA J. **The structure of developing and adult sural nerve in man and the changes which occur in some diseases. A light and electron microscopy study**. University of London, PH.D.Thesis, 1970a.

- OCHOA J. Isoniazid neuropathy in man: quantitative electron microscope study. **Brain**, v.93, n. 4, pg. 831-50, 1970b.
- OCHOA J. The sural nerve of the human foetus: electron microscope observations and counts of axons. **Journal of Anatomy**, v. 108, n. 2, pg. 231-245, 1971.
- OCHOA J. Microscopic anatomy of unmyelinated fibres. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, editors. **Peripheral Neuropathy**, 1st Edition, Chapter 7. Philadelphia:Elsevier Saunders, 1975.
- OCHOA J, MAIR WG. The normal sural nerve in man. I. Ultrastructure and numbers of fibres and cells. **Acta Neuropathologica**, v. 13, n. 3, 127-216, 1969a.
- OCHOA J, MAIR WG. The normal sural nerve in man. II. Changes in the axons and Schwann cells due to ageing. **Acta Neuropathologica**, v. 13, n. 3, pg. 217-39, 1969b.
- ORTIGÜELA ME, WOOD MB, CAHILL DR. Anatomy of the sural nerve complex. **Journal of Hand Surgery (American Volume)**, v. 12, n. 6, pg. 1119-23, 1987.
- PAINTAL AS. A comparison of the nerve impulses of mammalian non-medullated nerve fibres with those of the smallest diameter medullated fibres. **The Journal of Physiology**, v. 193, n. 3, pg. 523-33, 1967.
- RAPPAPORT WD, VALENTE J, HUNTER GC. Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. **The American Journal of Surgery**, v. 166, pg. 252-256, 1993.
- ROVAK JM, CEDERNA PS, KUZON WM JR. Termino lateral neurorrhaphy: a review of the literature. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 8, p. 615-24, 2001.
- SCHMALBRUCH H. Fiber Composition of the Rat Sciatic Nerve. **The Anatomical Record**, n. 215, p.71-81, 1986.
- SEDDON HJ. **Surgical disorders of the peripheral nerves**. 2nd ed. Edinburgh: Churchill. Livingstone, 1975.
- SHIELD LK, KING RHM, THOMAS PK. A morphometric study of human fetal sural nerve. **Acta Neuropathologica**, v. 70, n. 1, pg. 60-70, 1986.
- STANIFORTH P, FISHER TR. The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting. **Hand**, v. 10, n. 2, pg. 187-90, 1978.
- STOOKEY B. Artificial nerve branches for innervation of paralyzed muscles. **Archives of Surgery**, v.6, p. 731-8, 1923.
- SWETT JE, TORIGOE Y, ELIEVR, BOURASSA CM, MILLER PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. **Experimental Neurology**, v. 114, pg. 82-103, 1991.
-

TERZIS JK, SUN DD, THANOS PK. Historical and basic science review: past, present and future of nerve repair. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v.13, p. 215-225, 1997.

TING J, HUO G, MARIN V, ROGERS L, GORLICK N, ASCHERMAN J, CHIU DTW. End-to-side neurorrhaphy using autogenous vein nerve conduits. **Plastic Surgery**, v. 49, pg. 637-638, 1998.

TOFT PB, FUGLEHOLM K, SCHMALBRUCH H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. **Muscle Nerve**, v. 11, n. 8, pg. 880-9, 1988.

ULKUR E, YUKSEL F, ACIKEL C, OKAR I, CELIKOZ B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. **Microsurgery**, v. 23, p. 40-48, 2003.

VITERBO F, TRINDADE JC, HOSHINO K, MAZZONI NETO A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. **Revista paulista de medicina**, v. 110, n. 6, p. 267-75, 1992.

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**, v. 47, p.75-80, 1994a.

VITERBO F, TRINDADE F, HOSHINO JC, MAZZONI K, NETO A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 94, p. 1038-1047, 1994b.

VITERBO F, AMR AH, STIPP EJ, REIS FJ. End-to-side neurorrhaphy: past, present, and future. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 6, pg. 351-8, 2009.

WEBSTER HD, MARTIN R, O'CONNELL MF. The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. **Developmental biology**, v. 32, n. 2, pg. 401-16, 1973.

WESSELMANN U, KERNS JM, RYMER WZ. Laser effects on myelinated and nonmyelinated fibers in the rat peroneal nerve: a quantitative ultrastructural analysis. **Experimental Neurology**, v. 129, n. 2, pg. 257-65, 1994.

ANEXOS

Tabela 1. Dados morfométricos I

Grupo	Área fascicular	Nº total de fibras
GN (n=10)	0,13 ± 0,02	1.882± 270,9
TLT (n=10)	0,11 ± 0,04	2.012± 1060,8

(*) Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Valores representados através de média (exceto Nº total de fibras) e desvio padrão.

Tabela 2. Dados morfométricos II

Grupo	Diâmetro mínimo (μm)	Densidade (fibras/mm^2)
GN (n=10)	0,968 ± 0,10*	13.935,0± 1875,8
TLT (n=10)	0,648 ± 0,08	18.733,3± 5668,6*

(*) Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Valores representados através de média e desvio padrão.