UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU (FOB-USP)

**ENXERTO VENOSO PREENCHIDO COM GORDURA NO REPARO DE NERVO
PERIFÉRICO: UMA NOVA PROPOSTA**

GERALDO MARCO ROSA JUNIOR

BAURU 2010

GERALDO MARCO ROSA JUNIOR

**ENXERTO VENOSO PREENCHIDO COM GORDURA NO REPARO DE NERVO
PERIFÉRICO: UMA NOVA PROPOSTA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

BAURU 2010

R71e Rosa - Junior, Geraldo Marco

Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: uma nova proposta/ Geraldo Marco Rosa Junior. – Bauru, 2009. (nº de paginas)p.: il.; 30cm.

Tese. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado em 17 de setembro de 2007 pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP.

Protocolo nº: 19/2007

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 19/2007

Bauru 17 de setembro de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado “**Interação mioneural: aspectos degenerativos e regenerativos**”, de sua autoria foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito em reunião desta Comissão realizada no dia 13 de setembro de 2007.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of. CEEPA-FOB/USP Nº 02/2009

Proc. Nº 019/2007

Bauru, 27 de fevereiro de 2009.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para desmembramento do projeto de pesquisa **"Interação Mioneural: aspectos degenerativos e regenerativos"**, de sua autoria, aprovou-se *ad referendum*, o que segue:

"O tecido adiposo usado na técnica de tubulização teria influência na reinervação de músculos de contração rápida de ratos?", de autoria de **Luiz Henrique Rapucci Moraes**;

"Enxerto nervoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: uma nova proposta", de autoria de **Geraldo Marco Rosa Júnior**;

"Expressão e localização de fatores de regulação miogênica (Myod e Miogenina) em músculos somáticos de ratos reinervados pela técnica de tubulização", de autoria de **Erivan Schneider Ramos Júnior**.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Geraldo e Salete, razão da minha existência, a quem sempre serei grato e a quem devo todas as minhas realizações.

A minha irmã, Vivian, pelos momentos que passamos juntos, incentivo e apoio.

A minha namorada, Natália, pela atenção, pelo companheirismo e compreensão.

Aos tios, Pedro e Maria, pelo respeito, humildade, interesse e apoio que dispensaram durante a minha caminhada.

Meu carinho e gratidão

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, e ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, pelos anos de aprendizado profissional e pessoal, desde a época de estagiário, pelos ensinamentos na nobre arte de lecionar, pela sabedoria e exemplo de vida, pelo profissionalismo, apoio e incentivo, pelo companheirismo e amizade.

Ao amigo e companheiro de mestrado, **Luis Henrique Rapucci Moraes**, pelos vários anos de parceria, pela colaboração, pelo companheirismo em várias horas de cirurgia e tamanha colaboração para realização deste projeto.

Ao amigo e companheiro de mestrado, **Daniel Ventura Dias**, pelos anos de amizade dando total apoio e incentivo, pelo companheirismo e irmandade.

A amiga e estagiária, **Letícia Rossi Daré**, pela ajuda e auxílio nas cirurgias e morfometrias, pela presença e participação no projeto, pela amizade, apoio e dedicação.

Aos estagiários, **Eduardo, Tatiane, Melina e Tatiana** pelo apoio e colaboração.

Ao **Prof. Dr. João Lopes de Toledo Filho**, aos funcionários da disciplina de anatomia, **Romário, Orivaldo e Cisira**, pelo companheirismo e compreensão, pelas conversas, risadas e histórias no café.

Aos colegas de pós-graduação de mestrado e doutorado, **Isabel, Aline, Mileni, Carlos, Erivan, Bruno, Melaine, Karen, Patrícia, Karine, Carol, André, Aroldo** (*in memorian*) pela convivência, e participação.

A **Tânia, Daniela e Patrícia** do laboratório de histologia, a **Telma e Ovídio** do laboratório de bioquímica, a **Fatiminha e Cris** do laboratório de Patologia, ao **Thiago** do Laboratório de Farmacologia, e a **Márcia** do CIP, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Aos Professores, **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso** e **Prof. Dra. Marília Buzalaf** do laboratório de bioquímica, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** da Fisiologia e Farmacologia, **Prof. Dr. Luis Taveira**, e **Profa. Dra. Vanessa Lara**, do laboratório de Patologia, por possibilitarem a utilização de seus respectivos laboratórios para o desenvolvimento prático do trabalho.

A minha prima, **Fabiane Bortolucci**, pelo incentivo, conversas, orientações, e apoio, sempre disposta a ajudar.

Aos Professores, **Profa. Dra. Maricê Heubel**, **Profa. Dra. Dulce Constantino**, **Profa. Dra. Elza Torres**, **Profa. Dra. Rosângela Martinez**, **Profa. Dra. Adriana Franco**, **Prof. Dr. Paulo Weckwerth**, **Prof. Dr. João Cleber de Andrade**, **Profa. Dra. Silvana Coradi**, **Profa. Ms. Valéria Romero**, e **Prof. Ms. José Antônio Rodrigues**, pelos ensinamentos, e incentivos desde a graduação.

A, **Profa. Dra. Leila Maria Vieira**, diretora do Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde pelo empréstimo do aparelho de Laser de baixa potência para utilização no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus avós, **Ismar Bortolucci** (*in memorian*), **Luiza Portella Bortolucci**, **Vicente Rosa** (*in memorian*) e **Maria José Prudente Rosa**, pelo exemplo de vida e dedicação, pelo carinho, orações e sabedoria.

Ao **Sr. Vítório Orti**, **Sra. Eunice de Lima Orti**, e ao **Vítor Orti** pela atenção e vivência durante este período, pelas palavras de apoio e conselhos, carinho e incentivo.

Aos amigos, **Lucas**, **Matheus**, **Raquel**, **Paulo**, **Kali**, **Leire**, **Richard**, **Marcelo**, **Luciana**, **Breno**, **Bia**, **Carol**, **Allan**, **Vivian**, **Márcio**, **Raquel**, **Álvaro**, **Patrícia**, **Vinícius**, **Ana Lúcia**, **Ana Simon** e **Edmílson**, pelo carinho, paciência e incentivo.

A todos os familiares, amigos, colegas e conhecidos que participam, vibram e acreditam no meu potencial, agradeço de coração, pois sempre aumentam a minha vontade de vencer.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu eterno agradecimento

"Não existe esta coisa de Homem feito por si mesmo. Somos formados por milhares de outros; cada pessoa que tenha feito um gesto bom por nós ou dito uma palavra de encorajamento, entrou na formação do nosso caráter e nos nossos pensamentos, tanto quanto no nosso sucesso."

George Matthew Adams

RESUMO

Com o avanço da tecnologia e a conseqüente produção de equipamentos mais sofisticados, a microcirurgia vem ganhando cada vez mais espaço no campo da investigação experimental referente a recuperação de nervos periféricos. É sabido que no caso de uma simples secção do nervo, sem perda tecidual, a neurorrafia término-terminal é a técnica mais aconselhável. Porém, em uma situação onde ocorre perda de tecido nervoso ou, quando não se têm mais o coto distal do nervo, outras técnicas devem ser empregadas, mesmo porque, não se pode de forma alguma tracionar o nervo numa tentativa de coaptá-lo novamente.

Assim várias técnicas de tubulização utilizando-se de materiais biológicos (vasos, nervos, músculos, pericárdio, veia e músculo combinado, moléculas de adesão, etc) ou não biológicos (tubos de polietileno, silicone, etc) estão sendo testados com resultados ainda insatisfatórios, principalmente sob o ponto de vista funcional.

É sabido que em um trauma sem perda tecidual, numa neuropraxia, por exemplo, o nervo recupera espontaneamente de forma satisfatória. É sabido também que em um feixe vâsculo-nervoso, o nervo periférico encontra-se em íntimo contato com a adventícia de artérias e veias. A adventícia dos vasos é constituída por tecido conjuntivo frouxo, rico em adipócitos. Assim, em um trauma, os neuritos oriundos do coto proximal do nervo lesado, ficam diretamente em contato com esses adipócitos.

Seguindo este raciocínio, e com base em trabalhos anteriores onde foi usada veia preenchida com músculo esquelético a fresco como enxerto, decidimos testar a possibilidade de crescimento axonal por meio de enxerto venoso preenchido por tecido adiposo autólogo. Para tanto foi utilizada a veia jugular externa do rato preenchido com tecido adiposo *in natura* retirado das adjacências da referida veia, na tentativa de se recuperar o nervo ciático e um de seus ramos, o nervo fibular comum.

A certificação do sucesso da recuperação do nervo foi feita por meio da análise dos nervos (Ciático e Fibular Comum), e dos músculos Extensor Longo

dos Dedos (EDL) e Tibial Cranial (TC), sempre comparando com os respectivos grupos controles. Técnicas de microcirurgia, microscopia, morfometria, e análise fisiológica (foot print), além da utilização do Laser de Baixa Potência (LBP), foram empregadas nesta investigação.

Palavras-chaves: Neurorrafia, Tubulização, Enxerto, Regeneração.

ABSTRACT

VEIN GRAFT FULFILLED WITH FAT IN PERIPHERAL NERVE REPAIR: A NEW PROPOSAL

With technology advance and the resultant production of more sophisticated equipment, microsurgery has been obtaining more attention in the experimental investigation field referred to peripheral nerves repair. It is known that in case of simple nerve section, without tissue loss, the end-to-side-neurorrhaphy is the most recommended technique. However, in each situation where nerve tissue loss occurs or, when there is no nerve distal stump anymore, other techniques should be used, precisely because the nerve cannot be put on traction to try nerve coaptation.

Thus, many tubulization techniques which use biological materials (veins, nerves, muscles, pericardium, veins and muscles combined, adherence molecule) or non-biological materials (polyethylene tubes, silicon, among others) are being tested and the results have been unsatisfactory yet, especially concerning functional point of view.

It is known that in trauma without tissue loss, like neuropraxy, for example, the nerve recovers spontaneously in a satisfactory way. It is also known that in a vascular-nervous bundle, the peripheral nerve is very closed to arteries and veins adventitious layer. The vein adventitious is built by weak conjunctive tissue, which is rich in fat cells. Thus, in a trauma, the neurites, derived from proximal stump of injured nerve, have direct contact with the fat cells.

Following this argumentation and based on previous works that used vein fulfilled with fresh skeleton muscle as graft, we have decided to test the possibility of axon growth through vein graft fulfilled with autologous fat tissue. To achieve this, it was used rat's external jugular vein fulfilled with *in natura* fat tissue removed from the adjacencies of the referred vein, in a trial to recover the sciatic nerve and one of its branches, the common peroneal nerve.

The certification of successful nerve recovering was done through the analysis of nerves (Sciatic and Common Peroneal Nerve) and muscles (Extensor Digitorum Longus - EDL and Tibial Cranial Muscle – TC), always comparing them with the respective control groups. Techniques of microsurgery, microscopy, morphometry and physiological analysis (foot print) were employed, besides the use of Low-Power Laser (LPL).

Key-words: Neurorrhaphy, Tubulization, Graft, Regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 01. - Foto da tricotomia na face ventral do pescoço do animal realizada nos grupos experimentais.....	45
Figura 02. – Foto da tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito realizada em todos os grupos.....	45
Figura 03. – Foto durante procedimento cirúrgico de exposição do nervo ciático para realização as cirurgias experimentais.....	46
Figura 04. – Foto do procedimento cirúrgico durante a retirada da veia jugular externa.....	47
Figura 05. - Foto do término do procedimento cirúrgico no N. Ciático com a colocação da veia Jugular.....	48
Figura 06. - Fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm, utilizado para realizar a retirada da veia jugular externa.....	48
Figura 07. – Aparelho de Laser AsGa (PHISIO LUX dual – BIOSET).....	50
Figura 08. - Canaleta de madeira utilizada para realização do teste de avaliação funcional do N. Ciático.....	51
Figura 09. - Impresão da região plantar das patas posteriores na fita de papel utilizada posteriormente avaliação funcional do ciático.....	51
Figura 10. – Foto durante etapa de congelamento dos músculos EDL e TC onde passam pelo talco neutro.....	52
Figura 11. – Foto durante etapa de congelamento dos músculos EDL e TC onde passam pelo nitrogênio líquido utilizando blister.....	52
Figura 12. – Microscópio, micro computadores e monitores para análise de imagens e morfometria.....	53
Figura 13. – Pata direita de um animal do GEEVcg150. Observe a paralisia dos dedos da referida pata.....	56
Figura 14. – Pata esquerda do mesmo animal do GEEVcg150. Observe a posição normal dos dedos do animal.....	56

Figura 15. – Foto do sítio cirúrgico e do lipoma encontrado em 2 animais....	57
Figura 16. – Lipoma retirado da região onde foi realizada a cirurgia experimental.....	58
Figura 17. – Fotos por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	60
Figura 18. – Pata direita de um animal do grupo GCD150 que realizou autofagia onde podemos observar a ausência dos dedos.....	62
Figura 19. – Pata direita do animal do grupo GEEVsg150L que realizou autofagia.....	62
Figura 20. – Representação Gráfica da média das áreas das fibras nervosas do nervo ciático.....	65
Figura 21. – Representação Gráfica da média das áreas das fibras nervosas do nervo fibular comum.....	65
Figura 22. - Representação Gráfica da média das áreas dos axônios do nervo ciático.....	66
Figura 23. - Representação Gráfica da média das áreas dos axônios do nervo fibular comum.....	66
Figura 24. – Representação Gráfica da média dos diâmetros das fibras do nervo ciático.....	67
Figura 25. – Representação Gráfica da média dos diâmetros das fibras do nervo fibular comum.....	67
Figura 26. – Representação Gráfica da média dos diâmetros dos axônios das fibras do nervo ciático.....	68
Figura 27. – Representação Gráfica da média dos diâmetros dos axônios das fibras do nervo fibular comum.....	69
Figura 28.– Representação Gráfica da média da área da bainha de mielina das fibras do nervo ciático.....	70
Figura 29.– Representação Gráfica da média da área da bainha de mielina das fibras do nervo fibular comum.....	70
Figura 30. – Representação Gráfica da média da espessura da bainha de mielina das fibras do nervo ciático.....	71

Figura 31. – Representação Gráfica da média da espessura da bainha de mielina das fibras do nervo ciático.....	71
Figura 32. – Representação Gráfica das fibras nervosas do N. Ciático dos grupos considerando todas as variáveis estudadas.....	72
Figura 33. – Gráfico representativo das médias das áreas em μm^2 do m. EDL.....	74
Figura 34. – Gráfico representativo das médias das áreas em μm^2 do m. TC.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. - Pesos médios, inicial e final, e ganho de peso em porcentagem.....	67
Tabela 02. - Análise funcional do nervo ciático.....	69
Tabela 03. - Dados morfométricos referente ao Nervo Ciático.....	70
Tabela 04. - Dados morfométricos referente ao Nervo Fibular.....	70
Tabela 05. – Dados estatísticos do m. EDL. Teste Tukey $P \geq 0,05$	79
Tabela 06. – Estatística do m. EDL. Células com xxxx na mesma coluna representam grupos estatisticamente semelhantes.....	79
Tabela 07. – Dados estatísticos do m. TC. Teste Tukey $P \geq 0,05$	79
Tabela 08. – Estatística do m. TC. Células com xxxx na mesma coluna representam grupos estatisticamente semelhantes.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsGa: Arsenieto de Gálio
ATP: Adenosina tri-fosfato
Cm: Centímetro
EDL: Extensor Longo dos Dedos
G: Gramas
GCI: Grupo Controle Inicial
GCF: Grupo Controle Final
GCD: Grupo Controle Desnervado
GEEVsg150: Grupo Experimental Enxerto de Veia sem gordura cento e cinquenta dias
GEEVsg150L: Grupo Experimental Enxerto de Veia sem gordura cento e cinquenta dias com Laser
GEEVcg150: Grupo Experimental Enxerto de Veia com gordura cento e cinquenta dias
GEEVcg150L: Grupo Experimental Enxerto de Veia com gordura cento e cinquenta dias com Laser
Kg: Kilogramas
LBP: Laser de baixa potência
M: músculo
MET: Microscopia Electrónica de Transmissão
Mg: Miligramas
Mm: Músculos
N: Nervo
Nm: Nanômetro
Nn: Nervos
TC: Tibial Cranial
Um: Micrômetros
Um²: Micrômetros ao quadrado

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
A- O TECIDO ADIPOSEO.....	28
B- O MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.....	29
C- O LASER.....	33
D- ANÁLISE FUNCIONAL DE NERVOS PERIFÉRICOS.....	38
PROPOSIÇÃO.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	46
GRUPOS CONTROLES.....	46
GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	47
PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	49
APLICAÇÃO DO LASER.....	54
AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO NERVO CIÁTICO.....	55
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS MÚSCULOS.....	57
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS NERVOS.....	58
PROCESSAMENTO PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	58
PROCESSAMENTO PARA (MET) / FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	59
RESULTADOS.....	60
OBSERVAÇÕES EXTERNAS.....	62
PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	63
OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	64
PESO DOS ANIMAIS.....	67
ANÁLISE FUNCIONAL DO N. CIÁTICO.....	68
ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DOS NERVOS.....	69
ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DOS MÚSCULOS.....	78
DISCUSSÃO.....	82
CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

Introdução

Lesões nervosas periféricas seguidas de axoniotmesis, geralmente são reparadas através de sutura das duas extremidades. Esta técnica, porém, só é possível se o segmento nervoso lesado for de pequena extensão. Nas lesões mais extensas, tais suturas criam situações de tensão, prejudicando a irrigação local (Terzis et al., 1975; Sunderland, 1978).

Vários pesquisadores afirmam que, em geral, secções nervosas transversais que provoquem perda de tecido superior a 3cm de comprimento são inadequadas para simples conexões, como as suturas epineurais, sendo mais indicado o enxerto autólogo de um nervo sensitivo, como o nervo sural, do próprio paciente (Sunderland, 1978; Hudson et al., 1979; Millesi, 1982). Limitações, como o calibre do nervo lesado, levam à utilização dos chamados “cable graft”, em que diversos segmentos do nervo doador são utilizados. A grande desvantagem desta técnica é a necessidade de um grande número de suturas que, via de regra, resulta na formação de cicatriz com conseqüente isquemia na região do implante. Além disso, o emprego de grande quantidade de “nervo doador” leva a uma perda de sensibilidade na região previamente inervada pelo mesmo (Fawcett & Keynes, 1986; MAGILL et al., 2007).

Diante dessas situações adversas, numerosos laboratórios têm voltado suas atenções na busca de soluções no reparo de nervos periféricos. Tais pesquisas envolvem materiais biológicos e não biológicos como: colágeno, artérias, veias, moléculas de adesão celular, tubos de silicone e polietileno (Fields et al., 1989).

Guda et al. (1993) estudaram a regeneração do nervo safeno em coelhos utilizando enxerto venoso e não obtiveram resultados satisfatórios. Estes autores consideraram a hipótese de que o contato entre as células endoteliais do segmento venoso transplantado e o tecido nervoso tenha estimulado o desenvolvimento de fibrose na parede do vaso, o que culminou com a constrição periférica do nervo antes deste iniciar sua regeneração.

Itoh et al. (1996) estudaram a regeneração do nervo ciático em ratos utilizando enxerto arterial e também não obtiveram resultados satisfatórios devido,

segundo eles, à deficiência de laminina na membrana basal para acelerar a neurotização.

Outros autores concordam que a utilização de enxertos venosos pode ser útil apenas em secções nervosas de reduzido tamanho e em nervos monofasciculados (Walton et al., 1989). Entretanto, ao utilizar enxertos venosos ao avesso em nervos mistos, como o nervo ciático, foi observada grande melhora na capacidade regenerativa das fibras nervosas (Wang et al., 1993; Ferrari et al., 1999).

O colágeno e a laminina têm um efeito benéfico na regeneração nervosa periférica (Lander et al., 1985; Valentini et al., 1987). Ferrari et al. (1999) demonstraram que o enxerto venoso ao avesso, expondo a túnica adventícia ao contato direto com axônios seccionados, constitui num bom conduto para a regeneração de nervos com característica sensitiva, como o nervo safeno. Segundo estes autores, tal conduto, além de permeável a fatores externos, encontram-se “carregados” com fatores tróficos - tais como colágeno, laminina e fibronectina - em proporções ideais, propiciando um micromeio altamente favorável à regeneração axonal.

Verifica-se, portanto, a relação entre a túnica adventícia (rica em adipócitos na sua parte mais externa) do vaso sanguíneo enxertado exposta ao axônio lesado e a eficácia da regeneração nervosa.

Considerando-se que (1) ao longo da vida o indivíduo está sujeito a traumas (esmagamentos) que se recuperam bem na ausência de perda tecidual nervosa, (2) num feixe vículo-nervoso, o nervo encontra-se em contato direto com a adventícia de artérias e veias e (3) que nesta túnica encontramos quantidade significativa de gordura que deve atuar como fator trófico na regeneração axonal, decidimos comparar os resultados obtidos na regeneração nervosa utilizando-se enxerto venoso preenchido com tecido adiposo na tentativa de se estabelecer um melhor micromeio para tal processo.

Revisão de Literatura

A-) O TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo, uma variedade de conjuntivo, localiza-se principalmente no subcutâneo, como coxins absorventes de choques na palma das mãos e planta dos pés e preenchendo espaços entre outros tecidos, além de manter vários órgãos em posição. No feixe vâsculo-nervoso está presente na superfície mais externa da túnica adventícia, assim, em contato íntimo com o epineuro dos nervos periféricos. Existem basicamente dois tipos de tecido adiposo: unilocular e multilocular. A diferença principal está no fato que no tipo unilocular (amarelo) encontramos apenas uma gotícula de gordura em seu interior. Praticamente todo tecido adiposo presente em mamíferos adultos é do tipo unilocular.

Os adipócitos uniloculares são bastante grandes, medindo em geral mais de 100 µm de diâmetro, sendo que cada adipócito está envolto por uma camada de glicoproteína (glicocálix). Sua membrana plasmática apresenta inúmeras vesículas de pinocitose.

Castañeda e Kinne (2002) utilizaram enxerto preparado a partir do omento maior, rico em tecido adiposo, para recuperar nervo ciático de ratos transeccionado experimentalmente. Eles observaram uma recuperação funcional significativa nos animais submetidos a essa técnica.

Yoshitani et al. (2007) estudaram a recuperação do nervo frênico de cães através de enxertos feitos de tubos de colágeno preenchidos com ácido poliglicólico. Em um dos grupos experimentais os autores cobriram o enxerto com um retalho de pericárdio rico em adipócitos. Os resultados apontaram para uma melhor recuperação dos animais deste grupo, muito provavelmente pela ação benéfica do tecido adiposo justaposto.

Muitos laboratórios em todo o mundo estão utilizando células tronco adultas extraída de lipoaspiração. É sabido que tais células extraídas do tecido adiposo não precisam ser cultivadas por três semanas como outros tipos de células tronco. Assim, em apenas 2 horas milhares de células podem estar capazes para implantes. Por conta da facilidade em se obter o tecido adiposo, mínimo prejuízo para o organismo e principalmente pela característica em relação às células tronco descritas acima, resolvemos utilizar o tecido adiposo no reparo de nervo

seccionado experimentalmente objetivando contribuir com nova técnica no reparo de nervo lesionado com perda tecidual.

B) O MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O músculo estriado esquelético é constituído por fibras musculares associadas a tecido conjuntivo, que agrupa um conjunto de células musculares em um determinado local do músculo, formando os fascículos musculares.

Embora os músculos desenvolvam-se inicialmente sem influência neural, o início da atividade do sistema nervoso e a força mecânica interferem no estágio pós-maturação das fibras musculares (Kingham et al., 2005).

As características que distinguem os músculos desnervados dos músculos innervados normalmente são as mudanças de cor e uma redução de volume e peso. Estas alterações têm sido tema de várias investigações que abrangem diversos tipos de músculos e animais. A atrofia é detectada a partir do terceiro dia e estabilizada a partir do segundo mês mantendo apenas 20% a 40% da massa muscular original (Sunderland & Ray, 1950).

Após o músculo ter cessado a perda de peso, admite-se que cerca de 10 a 25% do músculo normal é tecido conjuntivo, o que sugere uma considerável destruição e eliminação dos elementos constitutivos contráteis (Knowlton & Hines, 1936).

As fibras musculares atrofiam rapidamente nos períodos iniciais de desnervação, de forma que nos primeiros 60 dias a área de secção transversal média de uma fibra está reduzida em até 70%. O processo se faz mais lento após este período, avançando apenas mais 10% em 120 dias, e a partir deste momento a atrofia varia de 80 a 90%. Em todo o estágio de desnervação, a porcentagem de diminuição do diâmetro da fibra muscular supera a porcentagem da perda de peso de todo músculo. Esta diferença entre redução de peso e de calibre se explica por um aumento relativo no volume de tecido conjuntivo, que compensa de alguma forma a maior atrofia das fibras (Sunderland & Ray, 1950).

Nas fibras dos músculos desnervados os núcleos se apresentam maiores e mais ovais a partir do 9º ao 16º dia, e persistem assim até que a atrofia das fibras

esteja estabelecida, quando eles passam a apresentar sua forma alongada original (Tower, 1935, 1939; Bowden & Gutman, 1944; Altschul, 1948; Adams et al., 1962; Gutmann & Zelená, 1962). Devido a atrofia muscular, vários núcleos se movem para o centro das fibras. Esta movimentação do núcleo é imposta para sua preservação (Bowden & Gutmann, 1944).

A atrofia se inicia na periferia das miofibras, mas após o primeiro mês de degeneração se torna visível em seu interior. Durante a primeira semana, a mitocôndria de ambas as fibras, vermelhas e brancas, aumentam em um eixo longitudinal. Conseqüentemente, as organelas agrupam; algumas mitocôndrias sofrem diminuição de número e tamanho e são digeridas por vacúolos autofágicos. Simultaneamente, o retículo sarcoplasmático a princípio aumenta e depois diminui, embora menor do que a própria fibra. Na microscopia eletrônica observa-se também anormalidades na banda Z, e um aumento do número de ribossomos pode ser encontrado entre as miofibrilas e a superfície da membrana (McComas 1996).

As mudanças não incluem todas as fibras musculares de maneira uniforme. A mudança mais precoce e característica na morfologia das fibras desnervadas é a perda do sarcoplasma e a redução de seu calibre e desorganização ultraestrutural das fibras (Sunderland & Ray, 1950; Pellegrino & Franzini, 1963; Tomanek & Lund, 1973; Lu et al., 1997). Outra característica notável encontrada em um quadro de desnervação é a proliferação de tecido conjuntivo, que aparece em primeiro lugar no perimísio e que logo afeta o endomísio, no qual o depósito de novo material fibroso em ambas as regiões são sempre precedidas de um importante aumento no número de fibroblasto (Sunderland, 1950). Em nenhum estágio é observado a substituição de tecido muscular por tecido fibroso, mas é encontrado tecido adiposo em alguns músculos desnervados (Bowden & Gutmann, 1944).

Schamalbruch, Lewis (2000) afirmam que, uma completa destruição das fibras musculares podem eventualmente ocorrer, e que durante um longo tempo de desnervação, são realizados repetidos ciclos de regeneração e necrose, com a

fase de necrose durando apenas 2 dias, conseqüentemente ocorrendo a ocupação de células de gordura entre os espaços das fibras.

Durante muito tempo pensou-se que as fibras musculares fossem todas semelhantes entre si, até quando se observou que o tecido muscular dos vertebrados revelava diferentes intensidades de coloração, inter e intramuscular (Ranvier, 1874). Esta característica macroscópica mereceu uma atenção especial, e a partir desta observação os músculos passaram a ser classificados como vermelhos e brancos.

No início as fibras musculares eram consideradas unidades totalmente fixas, mas hoje é sabido que elas são células dinâmicas com um extraordinário poder de adaptação. Seus perfis fenotípicos são afetados pela inervação, treinamentos com carga, hormônios e envelhecimento (Pette & Staron, 2001; Hyatt et al., 2003; Ishido et al., 2004).

A diversidade funcional das fibras musculares de um músculo, está diretamente ligado ao seu padrão de inervação (Pette & Staron, 1990; Pette & Vrbová, 1992). A perda da inervação, não apenas pela desnervação experimental, mas também por acidentes, leva à deterioração fisiológica e funcional das fibras afetadas (Sunderland & Ray, 1950; Gutmann & Zelena, 1962; Borisov et al., 2001; Germinario et al., 2002), redução no peso e área em secção transversal das miofibras (Deschenes et al., 1997; LU et al., 1997).

A área em secção transversal é uma das aferições mais importantes dos músculos estriados, porque é usada como um dos parâmetros para se determinar a força máxima que um músculo pode produzir sob condições isométricas (Woledge et al., 1985; Caiozzo, 2002). A área em secção transversal de uma fibra muscular é regulada por várias vias e/ou mecanismos. Estudos têm mostrado uma relação direta entre a área em secção transversal de uma fibra muscular e o número de mionúcleos (Allen et al., 1976; Rosser et al., 2002). Assim, a condição de hipertrofia está associada a um aumento de mionúcleos enquanto que a atrofia das fibras musculares está associada com a perda de mionúcleos (Allen et al., 1976; Schmalbru & Lewis, 2000).

Hoje se sabe que a redução na área em secção transversal das miofibras é maior nas fibras de contração rápida do que nas de contração lenta (Bjusz, 1964; Lu et al., 1997; Dupont-Versteegden et al. 1998; Walters et al., 2000).

Se a desnervação ocorrer por um período mais longo, pode induzir as miofibras à apoptose (Davatz, 2007; Yoshimura & Harii, 1999) e ativação e proliferação das células satélites, que são células miogênicas precursoras do músculo esquelético adulto (Murray & Robbins, 1982; Snow, 1983; Viguie et al., 1997).

Apesar de alguns pesquisadores dizerem, que a atividade neural aumentada induz a hipertrofia muscular (Roy et al., 1982; Ishihara et al., 1998), enquanto que sua ausência, tais como desnervação, resulta em atrofia muscular (Viguie et al., 1997; Hyatt et al., 2003), outros afirmam que após a desnervação de um músculo ocorre um aumento na proliferação e diferenciação de células satélites (Murray & Robbins, 1982; Snow 1983; Anzil & Wernig, 1989; McGeachie, 1989; Dedkov et al., 2001), mas que o tecido muscular não pode ser mantido após um longo período de desnervação (Irintchev et al., 1990).

Apesar de um tanto paradoxal, o que se encontra na literatura é que o músculo estriado desnervado conduz a um acelerado nível de ativação de células satélites (Hess & Rosner, 1970; Viguie, et al., 1997), e que a desnervação por longo período leva a uma diminuição destas células, e subseqüentemente morte das fibras musculares devido uma inabilidade para manter o número apropriado de mionúcleos (Rodrigues & Schmalbruch, 1995). A desnervação de um músculo esquelético leva a um aumento da atividade das células satélites (Hyatt et al., 2003).

Baseado no exposto acima se pode afirma que os efeitos da desnervação, sobre os músculos estriados, são reversíveis, desde que um novo nervo seja “introduzido” dentro de um período de tempo razoável, restabelecendo um contato entre nervo e músculo (Pette E Staron, 2001; McComas, 1996).

C-) O LASER

O laser foi idealizado por Albert Einstein em 1917, quando então expôs os princípios físicos da emissão estimulada (Veçoso, 1993). Lehman & Lateur (1994) relatam que o laser é uma onda eletromagnética, constituída por um feixe de fótons de mesma frequência em coluna, com o comprimento de onda em fase.

A partir de 1960, houve um grande avanço nos equipamentos de laser possibilitando cirurgias oftálmicas com sucesso. Mais tarde, em 1962 foi desenvolvido o laser semiconductor (Veçoso, 1993). Colls (1984) afirma que a adaptação do laser terapêutico ocorreu após 1965.

Desde a sua concepção, os lasers encontraram uma aplicação imediata na medicina, e particularmente na cirurgia, porem em estudos mais recentes, os pesquisadores voltaram-se para as possíveis aplicações clinicas das interações atômicas da luz do laser com os tecidos (Baxter, 1994).

Genovese (2000) classifica o laser em dois tipos: laser de alta intensidade (potencial destrutivo) e laser de baixa intensidade (sem potencial destrutivo), ambos formados por ondas eletromagnéticas. As principais características das ondas eletromagnéticas são: Frequência, amplitude e comprimento de onda. De acordo com Veçoso (1993), onda é uma perturbação ou distúrbio, transmitido através do vácuo ou de um meio gasoso, líquido ou sólido.

Segundo Baxter (1994) o laser terapêutico possui algumas características que diferem da radiação gerada por outras fontes (por exemplo, lâmpadas infravermelhas) são elas: 1) Monocromaticidade: quer dizer uma cor só; a maior parte da radiação emitida pelo aparelho de uso terapêutico, agrupa-se em torno de um único comprimento de onda, com uma amplitude limitada. O comprimento de onda determina os efeitos terapêuticos específicos da laserterapia, portanto esse parâmetro determina, quais as biomoléculas específicas que absorverão a radiação, ocasionando uma interação fotobiológica subjacente, a qualquer efeito terapêutico específico. 2) Colimação: os raios de luz ou fótons produzidos pelo laser, não promovem nenhuma ou quase nenhuma divergência da radiação emitida, ao longo da distancia percorrida, mesmo através dos tecidos. 3) Coerência: ocorre o sincronismo entre tempo e o espaço dos fótons emitidos pelo

laser. Estas 3 características produzem uma quarta, que é o “alto brilho”, sendo esta a propriedade básica da utilização do laser, como instrumento terapêutico e cirúrgico. Esclarece ainda que a grande quantidade de energia produzida é focalizada em uma superfície reduzida, permitindo obter das emissões a laser, uma elevada densidade de potência e intensidade.

Segundo Genovese (2000), o laser de arsenieto de gálio (AsGa) é uma radiação obtida através da estimulação de um diodo semiconductor, formado por cristais de arsenieto de gálio, que é também conhecido como laser semiconductor ou laser diodo. A passagem da corrente elétrica nesse diodo resultará na obtenção de energia que amplificadas pelas extremidades do diodo, escapam e formam a radiação laser.

Ainda, de acordo com esse autor, tem-se as características básicas do laser AsGa, que são: 1) Regime de emissão pulsado ou contínuo; 2) Comprimento de onda próximo a 904nm; 3) Cor infravermelha.

Veçoso (1993) assegura que este tipo de laser apresenta um potencial terapêutico em lesões profundas dos tipos: articular, muscular, ligamentar, nervosas, entre outras. Kolari (1985) confirmou que além de possuir um maior poder de penetração, outras vantagens do laser AsGa, são: tamanho do aparelho reduzido, o custo é menor, segurança e simples aplicação.

Colls (1984) descreve os efeitos terapêuticos da seguinte maneira:

A-) Analgésico, explica-se por fatores anti-inflamatório em nível local, reduzindo a inflamação, provocando reabsorção de substratos e favorecendo a eliminação de substâncias alógenas, através do estímulo da microcirculação, e Interferência da mensagem elétrica através da manutenção do potencial de membrana, com isso proporcionaria uma menor sensação dolorosa, estimulando liberação de beta endorfinas e evitando a redução do limiar de excitabilidade dos receptores dolorosos, provocando assim a normalização e o equilíbrio da energia no local da lesão, primeiramente com a liberação de histaminas e bradicinina, ocorrendo a sensibilização dos receptores dolorosos, que é corrigido através do aumento da permeabilidade de vênulas e das dilatações de arteríola. Colls (1984) ainda afirma que este efeito justifica-se por dois fatores: Primeiramente pela

interferência na síntese de prostaglandinas e posteriormente pelo estímulo a microcirculação: garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para a região lesada.

B-) Antiedematoso, também justificado por dois fatores:

Estímulo a microcirculação, favorecendo melhores condições de drenagem do plasma que forma o edema e ação fibrinolítica, proporcionando a resolução efetiva do isolamento causado pela coagulação do plasma, que determina o edema duro.

C-) Cicatrizante, para os autores Colls (1984), Veçoso (1993) este é o efeito que mais se destaca, e é caracterizado como incremento a produção de ATP. O laser eleva a produção de ATP (Karu et al, 1995) proporcionando um aumento de atividade mitótica e aumento da síntese protéica, por intermédio da mitocôndria (Greco et al, 1989) tem-se como consequência, o aumento da regeneração tecidual em um processo de reparação. Com o estímulo da microcirculação, aumenta o aporte nutricional associado ao aumento da velocidade mitótica, facilitando a multiplicação das células (Colls, 1984) e facilitando assim a formação de novos vasos a partir dos pré-existentes. Bibikova et al, (1994), Reddy et al., (1998) demonstra experimentalmente, que o laser terapêutico possui um efeito cicatrizante através do aumento da estimulação da matriz colagenosa.

Na laserterapia de baixa intensidade ocorre interação não térmica da luz no tecido, de duas formas:

A-) Espalhamento da luz incidente, mudando a direção de propagação da luz enquanto essa transita nos tecidos, devendo-se à variabilidade nos índices refrativos dos componentes dos tecidos com relação à água. Este espalhamento irá provocar um certo alargamento do feixe, durante sua passagem no tecido irradiado.

B-) Absorção da luz por um cromóforo, que consiste em uma biomolécula onde através de sua configuração atômica, pode ser excitada por um fóton ou fótons incidentes (Veçoso, 1993).

Dentre as duas, a segunda é considerada a mais importante e é mais bem explicada por Brugnera Junior, (2003). Segundo ele, esta é chamada de absorção seletiva. O tecido dos organismos animais tem uma função fotoreguladora a partir

de certos fotorreceptores, capazes de absorver o fóton de um determinado comprimento de onda, levando a provocar uma transformação da atividade funcional e metabólica da célula.

O laser começou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década de 80, havendo vários relatos sobre resultados obtidos.

Olson et al.,(1981), utilizaram a irradiação laser, comprimento de onda variando entre 490 e 685nm, sobre células do cérebro de ratos para observar alterações nos limiares de excitabilidade celular. Segundo os resultados obtidos, houve uma diminuição da excitabilidade elétrica das células nervosas, sugerindo que ocorre uma absorção de energia irradiada capaz de provocar alterações com a liberação de cálcio no citoplasma.

Walker (1985) relatou que a aplicação bilateral do laser nos nervos safenos de paraplégicos, durante 40 segundos, foi capaz de suprimir o clônus do tornozelo. Tal efeito não foi observado nos pacientes não irradiados, o autor sugeriu que os efeitos obtidos poderiam ser decorrentes de uma fotossensibilidade dos nervos periféricos.

Rochkind (1986), através da irradiação transcutânea de nervos ciáticos de ratos, observou um aumento significativo no potencial de ação, efeito que poderia perdurar por até 8 meses após a última aplicação.

Rochkind et al (1990) estudaram o potencial de uso terapêutico da irradiação de laser de baixa potência na prevenção da degeneração ou na estimulação da regeneração nervosa periférica. Após lesões de nervo ciático de ratos, durante 20 dias consecutivos, realizaram o tratamento com laser de baixa potência, observando um aumento significativo da amplitude do potencial de ação nervosa no lado lesado, que alcançou níveis semelhantes aos valores do lado não lesado. Esta manifestação eletrofisiológica do efeito do laser foi acompanhada por uma diminuição do volume de tecido cicatricial nos nervos lesados.

Rochkind et al (1990), conduziram uma série de experimentos para investigar os efeitos da irradiação com laser sobre feridas cutâneas, queimaduras e lesões de nervos periféricos, mais especificamente no nervo ciático. Os animais

eram submetidos a altas doses de irradiação diariamente, e os parâmetros de medição eram eletro fisiológicos. Concluíram que a quantidade de irradiação que alcançava o nervo ciático, de ordem de 2% a 10%, era pequena em relação àquela que atingia a pele, de modo que os resultados de um eventual tratamento poderiam não ser satisfatório.

Assia et al (1989), observaram uma diminuição do processo de degeneração após lesão de nervo ciático de ratos utilizando o laser aplicado sobre a região lesada. Os resultados foram obtidos por meio de uma análise do registro da atividade eletrofisiológica desses nervos.

Jarvis (1990) investigou o efeito da irradiação do laser sobre fibras sensoriais aferentes A-delta e C na córnea de coelhos. Os potenciais de ação foram analisados quanto ao período de latência, amplitude, tempo de subida, duração e frequência, não sendo observadas alterações.

Hamilton e Ray, (1992), conduziram um estudo para determinar se a irradiação com laser poderia alterar o processo de regeneração de um nervo. Foram utilizados 12 coelhos divididos em dois grupos (tratado e não tratado), que tiveram os nervos fibulares lesados. Os resultados mostraram que o grupo tratado, a recuperação após 15 dias da lesão foi em média 67% do nível de amplitude de condução pré-lesão, enquanto que no grupo pré-tratado, a recuperação foi em média de 52%.

Walsh et al., (1995), Gigo-Benato et al., (2004), investigaram os efeitos da irradiação direta com laser no nervo ciático de sapos. Sob condições monitoradas e cuidadosamente controladas, demonstraram um aumento da latência de condução nervosa em resposta a irradiação com baixas dosagens. Com laser, as doses mais altas provocaram um aumento no tempo de latência.

Todos os estudos que investigaram a ação do laser de baixa potencia, indicam até o presente momento, que este agente físico pode ser apresentado como auxiliar na regeneração de lesões nervosas, embora os resultados apresentados até agora sejam contraditórios, particularmente no que se diz respeito aos mecanismos envolvidos no processo de regeneração e recuperação.

D-) Análise funcional de nervos periféricos.

Inúmeros são os métodos para se obter dados funcionais de experimento de nervo periférico, mas poucos são de baixo custo e benefício para o pesquisador. Aparelhos modernos são caros, e o estudo da recuperação de lesões nervosas periféricas do isquiático, com base nos métodos de (DE MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982) obtidos por meio da análise motora, é considerado um bom critério de avaliação para a quantificação do grau de avaliação nervosa, e não tem um custo elevado.

Em 1989, Bain, Mackinnon e Hunter elaboraram um método com o objetivo de desenvolver e testar equações independentes e confiáveis para avaliações funcionais da regeneração dos nervos isquiático, tibial e fibular. Utilizaram em seus experimentos ratos Wistar, e em cada grupo experimental o nervo alvo seccionado, foram postos seus cotos em direção oposta intramuscular. Eles obedeceram às seguintes regras: a lesão seria produzida experimentalmente num dos ramos do nervo, mas os demais seriam preservados; e o lado experimental seria escolhido ao acaso, em cada animal.

Os autores obtiveram as impressões da marcha das patas dos animais em tiras de filme de raios X, seguindo o método de De Medinaceli; Derenzo; Hunter (1982). De posse das impressões foram efetuadas as seguintes medições: distância ao pé oposto (TOF); comprimento da pegada (PL); distância entre a pegada e a linha média da marcha (PA); distância do primeiro ao quinto dedos (TS); distância entre o segundo e quarto dedos (IT). Estas medidas foram feitas para as pegadas das patas dos membros pélvicos direito e esquerdo do mesmo animal.

Em seguida, os autores geraram um fator, a partir de cada uma das medidas de marcha por meio da subtração de valores das patas normais e patas experimentais, e dividindo-se esta diferença pela medida normal (equação (1), (2)):

$$FatorGerado = \frac{ValorExperimental - ValorNormal}{ValorNormal} \quad (1)$$

Obtendo assim:

<i>Fatores</i>		
Distância ao pé oposto	TOF	(ETOF-NTOF)/NTOF
Comprimento da pegada	PFL	(EPL-NPL)/NPL
Ângulo da pegada	PAF	(EPA -NPA)/NPA
Espalhamento dos dedos	TSF	(ETS-NTS)/NTS

(2)

Fonte: YAMASITA (2007). Fatores.

Na análise, os autores utilizaram a regressão como o déficit do nervo; índice funcional do isquiático, com o valor de -100 (cem) em animais com o nervo isquiático seccionado e de zero em animais do grupo controle. E em 1989, pela primeira vez, Bain, Mackinnon e Hunter empregaram análises da variância significativa das variáveis nas trilhas e dos fatores criados, e após medições e seleção das variáveis a serem usadas, e de posse da matriz de constante de peso resultante da análise de regressão linear múltipla, foram determinada uma equação para o índice funcional independente do nervo isquiático (YAMASITA, 2007).

Proposição

a) Objetivo geral

Baseado no exposto os objetivos gerais deste projeto foram centrados na possível eficácia do enxerto venoso preenchido com gordura, na recuperação de nervo periférico transeccionado experimentalmente. Para tanto, através de análise comparativa dos grupos experimentais com grupos controle, inferimos suas vantagens e desvantagens em relação às outras técnicas hoje utilizadas.

b) Objetivos específicos

- pesquisar o uso do enxerto venoso preenchido com gordura na regeneração nervosa;
- pesquisar o uso da combinação do enxerto venoso preenchido com gordura e aplicação de laser de baixa potência na regeneração nervosa;
- comparar a técnica do enxerto venoso preenchido com gordura e a técnica do enxerto venoso sem preenchimento na regeneração nervosa;
- comparar as técnicas supracitadas com e sem aplicação de laser

Materiais e Métodos

Animais de Experimentação

Foram utilizados 47 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, jovens, machos, com 80 dias de idade, pesando em média 250g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB – USP) – Campus de Bauru – SP.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas recebendo água e ração “*ad libitum*”, sem restrições na movimentação, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C. O rato foi escolhido para este estudo devido ao fato que essa espécie, e especialmente o macho, é uma das mais freqüentemente usadas na investigação de reparo de nervos periféricos.

Os 47 animais foram distribuídos em sete grupos, sendo, três controles e quatro experimentais.

Grupos Controle:

1. Grupo Controle Inicial (GCI): Constituído de 5 animais. Nesse grupo, os animais foram sacrificados com oitenta dias de vida. O nervo ciático e o terço inferior do nervo Fibular Comum direito foram coletados, para realizarmos a morfometria das fibras nervosas mielínicas e obtermos dados da área, do diâmetro das fibras e espessura da bainha de mielina. Os músculos EDL e TC, também foram coletados para realizarmos a morfometria das fibras musculares. Através desse grupo, foi obtido dados morfométricos no início do experimento.

2. Grupo Controle Final (GCF150): Constituído de 5 animais. Nesse grupo, os animais foram sacrificados com cento e cinquenta dias após início do experimento. O nervo ciático e o terço inferior do nervo Fibular Comum direito foram coletados, para realizarmos a morfometria das fibras nervosas mielínicas e obtermos dados da área, do diâmetro das fibras e espessura da bainha de mielina. Os músculos EDL e TC, também foram coletados para realizarmos a morfometria das fibras musculares. Através deste grupo, foi obtido dados no final do experimento.

3. Grupo Controle Desnervado (GCD150): Constituído de 5 animais. Nesse grupo foi realizada uma incisão unilateral posterior de dois centímetros na coxa direita dos animais, foi feita a divulsão da musculatura suprajacente, para exposição e secção do nervo ciático com oitenta dias de idade. A extremidade proximal foi suturada no músculo adjacente, enquanto a extremidade distal foi suturada no tecido subcutâneo. Após setenta e cinco dias da primeira cirurgia de desnervação, os animais foram re-operados para evitar a reinervação espontânea passando pelo mesmo procedimento cirúrgico. Os animais foram sacrificados após cento e cinquenta dias e posteriormente foi coletada a parte distal do nervo ciático, e o terço inferior do nervo Fibular Comum direito para que fosse realizada a morfometria das fibras nervosas mielínicas, e obtidos dados da área, do diâmetro das fibras nervosas e espessura da bainha de mielina. Os músculos EDL e TC, também foram coletados para que fossem feitas a morfometria das fibras musculares. Através desse grupo, foi obtido os dados das fibras nervosas e músculos dos animais com cento e cinqüenta dias de desnervação.

Grupos Experimentais:

4. Grupo Experimental Enxerto Venoso sem preenchimento (GEEVsg150): Constituído de 08 animais, sacrificados cento e cinquenta dias após inicio do experimento. Nesse grupo, foi realizada uma incisão paramediana unilateral de aproximadamente 2,5 centímetros no pescoço, onde foi retirado 1,8 cm da veia Jugular Externa. Num segundo tempo cirúrgico, foi realizada a exposição do nervo ciático do lado direito e com o auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm de comprimento do referido nervo em questão. Após a secção, o nervo ciático direito recebeu o enxerto da veia jugular externa sem preenchimento restabelecendo a comunicação entre o coto proximal e distal. O espaço da lesão entre os cotos foi de 1,2 cm. Nesse grupo, obtivemos dados dos nervos em nível de enxerto, e terço inferior do nervo Fibular Comum e músculos EDL e TC, utilizando a técnica de tubulização usando a veia como tubo, sem preenchimento.

5. Grupo Experimental Enxerto Venoso preenchido com gordura (GEEVcg150): Constituído de 08 animais, sacrificados cento e cinquenta dias após início do experimento. Nesse grupo, foi realizada uma incisão paramediana unilateral de aproximadamente 2,5 centímetros no pescoço, onde foi retirado 1,8 cm da veia Jugular Externa. Num segundo tempo cirúrgico foi realizada a exposição do nervo ciático do lado direito e com o auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm de comprimento do nervo em questão. Após a secção, o nervo ciático direito recebeu o enxerto da veia jugular externa preenchida com gordura, restabelecendo a comunicação entre o coto proximal e distal. O espaço da lesão entre os cotos foi de 1,2 cm. Nesse grupo, foram obtidos dados dos nervos em nível de enxerto, e terço inferior do nervo Fibular Comum e músculos EDL e TC, utilizando a técnica de tubulização usando a veia como tubo, preenchida com gordura. A gordura foi obtida junto à área de obtenção do enxerto.

6. Grupo Experimental Enxerto Venoso sem preenchimento com Laser (GEEVsg150L): Constituído de 08 animais, que foram sacrificados cento e cinquenta dias após início do experimento. Nesse grupo, os animais receberam uma incisão paramediana unilateral de aproximadamente 2,5 centímetros no pescoço, onde foi retirado 1,8 cm da veia Jugular Externa. Numa segunda fase foi realizada a exposição do nervo ciático do lado direito e com o auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm de comprimento do nervo em questão. Após a secção, o nervo ciático direito recebeu o enxerto da veia jugular externa sem preenchimento, restabelecendo a comunicação entre o coto proximal e distal. O espaço da lesão entre os cotos foi de 1,2 cm. Nesse grupo, obtivemos dados dos nervos em nível de enxerto, e terço inferior do nervo Fibular Comum e músculos EDL e TC, utilizando a técnica de tubulização usando a veia como tubo, sem preenchimento, tratados com Laser pós-cirurgia.

7. Grupo Experimental Enxerto Venoso com gordura e Laser (GEEVcg150L): Constituído de 08 animais, que foram sacrificados cento e cinquenta dias após início do experimento. Nesse grupo, os animais receberam

uma incisão paramediana unilateral de aproximadamente 2,5 centímetros no pescoço, onde foi retirado 1,8 cm da veia Jugular Externa. Numa segunda fase foi realizada a exposição do nervo ciático do lado direito e com o auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm de comprimento do nervo em questão. Após a secção, o nervo ciático direito recebeu o enxerto da veia jugular externa preenchida com gordura, restabelecendo a comunicação entre o coto proximal e distal. O espaço da lesão entre os cotos foi de 1,2 cm. Nesse grupo, obtivemos dados dos nervos em nível de enxerto, coto distal, e terço inferior do nervo Fibular Comum e músculos EDL e TC, utilizando a técnica de tubulização usando a veia como tubo, preenchida com gordura, tratados com Laser pós-cirurgia. A gordura foi obtida junto à área de obtenção do enxerto.

Procedimentos Cirúrgicos:

Os animais foram pesados e submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de Cloridrato de Tiletamina, associado com Cloridrato de Zolazepam (50 mg / Kg) na região dorso lateral da coxa esquerda. Foram adotadas técnicas assépticas em todos os procedimentos cirúrgicos.

Foi realizada a tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito em todos os grupos e da face ventral do pescoço nos grupos experimentais.

Figura 01. – Foto da tricotomia realiza na face ventral do pescoço do animal realizada nos grupos experimentais.

Figura 02. – Foto da tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito realizada em todos os grupos.

Nos grupos GCI, GCF150 e GCD150 os animais foram posicionados em decúbito ventral na placa de cortiça, fixadas as patas com fita adesiva, e posteriormente foi efetuada uma incisão longitudinal na face dorso-lateral da coxa direita, com aproximadamente dois centímetros e meio de comprimento. A pele e

a tela subcutânea foram rebatidas e os músculos subjacentes divulsionados para exposição e dissecação do nervo ciático. Após a coleta de um segmento médio do nervo ciático de aproximadamente 1,5 cm de comprimento dos grupos Inicial e Final (GCI e GCF150), e do segmento do coto distal do nervo ciático do Grupo Controle Desnervado (GCD150), de aproximadamente um centímetro e meio, as amostras foram fixadas em Formol e Karnovsky, e posteriormente foram incluídas em historesina e parafina. Para a coleta dos músculos EDL e TC, a pele do membro inferior direito direita foi rebatida para a exposição e dissecação dos respectivos músculos, após a retirada dos músculos iniciamos o protocolo de congelamento das amostras, logo após destinamos as amostras de nervos e músculos para o processamento histológico.

Figura 03. – Foto durante procedimento cirúrgico de exposição do nervo ciático para realização as cirurgias experimentais.

Nos grupos experimentais (GEEVsg150, GEEVsg150L, GEEVcg150, GEEVcg150L), no primeiro momento da cirurgia, foi efetuada uma incisão paramediana na face ventral da metade esquerda do pescoço de aproximadamente dois centímetros e meio de comprimento. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas, e foi efetuada a divulsão dos músculos subjacentes

para exposição e dissecação da veia jugular externa, promovendo seu isolamento e ligadura de suas tributárias, posteriormente introduzimos uma cânula de fio ortodôntico inoxidável na veia e, seccionamos as duas extremidades retirando um segmento medindo cerca de 1,8 cm de comprimento, esse segmento foi mantido em solução fisiológica, a temperatura ambiente, até sua utilização final. Nos grupos GEEVcg150 e GEEVcg150L foi coletada gordura da região do pescoço para preenchimento dos referidos enxertos, e posteriormente a pele foi suturada com fio de sutura de nylon 4-0.

Figura 04. – Foto do procedimento cirúrgico durante a retirada da veia jugular externa.

Após ser retirado o segmento da Veia Jugular Externa, os animais foram posicionados em decúbito ventral numa placa de cortiça, fixados as patas com fita adesiva, e uma incisão longitudinal na face dorso lateral da coxa direita foi efetuada com aproximadamente dois centímetros e meio de comprimento, rebatemos a pele, a tela subcutânea e realizamos a divulsão do músculo adjacente para exposição e dissecação do nervo ciático. Após a remoção de um segmento medindo cerca de meio centímetro, colocamos a veia jugular externa como enxerto, suturamos seus cotos proximal e distal com fio de sutura mononylon 10-0, sendo que para os grupos GEEVsg150, e GEEVsg150L o

enxerto não foi preenchido, e para os grupos GEEVcg150, e GEEVcg150L o enxerto foi preenchido com gordura.

Figura 05. - Foto do término do procedimento cirúrgico no N. Ciático com a colocação da veia Jugular.

Figura 06. - Fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm, utilizado para realizar a retirada da veia jugular externa.

Os animais dos Grupos Experimentais GEEVsg150L, e GEEVcg150L, receberam tratamento pós-cirúrgico com Laser GaAs de pulso contínuo, durante

90 segundos com comprimento de onda de 820-830nm, três vezes por semana, durante as primeiras seis semanas posteriores a cirurgia experimental.

Após a cirurgia, até os animais retornarem da anestesia, foram colocados em caixas aquecidas por luz incandescente a fim de evitar a hipotermia.

No período de 150 dias pós-operatório, os animais dos grupos experimentais (GEEVsg150, GEEVsg150L, GEEVcg150, GEEVcg150L), foram submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular na região dorso lateral da coxa esquerda de Cloridrato de Tiletamina associado com Cloridrato de Zolazepam (50 mg / Kg), após a coleta dos referidos nervos e músculos, os animais foram sacrificados através de suplementação da dose do anestésico.

Aplicação do Laser

Os animais que receberam o tratamento de Laser AsGa de pulso contínuo, durante a aplicação do mesmo eles foram imobilizados e cobertos com pano, expondo-se apenas o local da cirurgia no membro pélvico direito. A aplicação foi efetuada em diferentes pontos da cirurgia durante 90 segundos, com comprimento de onda de 820-830 nm. As aplicações foram realizadas no pós-cirúrgico e três vezes por semana, durante seis semanas (GIGO-BENATO et al. 2005). E em todas as aplicações, as emissões do feixe de laser foram calibradas no próprio aparelho (PHISIOLUX dual – BIOSET)

Figura 07. – Aparelho de Laser AsGa (PHISOLUX dual – BIOSET)

Avaliação Funcional do nervo ciático.

Antes dos animais serem sacrificados para coleta do material, três deles, de cada grupo, foram selecionados aleatoriamente, para serem submetidos à avaliação funcional do nervo ciático. Para esta avaliação os animais foram imobilizados, e a região plantar de suas patas posteriores foram pintadas com tinta de carimbo. No assoalho de uma canaleta de madeira, foi colocada uma faixa de papel para que os animais de todos os grupos caminhasse e conseqüentemente deixasse as impressões de sua marcha. Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal. A distância entre as impressões dos membros posteriores foram avaliadas segundo a equação descrita por Bain, Mackinnon e Hunter (1989), com base nos estudos de De Medinaceli, Fred e Wyatt (1982). As impressões com dificuldades de serem avaliadas foram descartadas, e as demais foram escaneadas e digitalizadas, obedecendo um padrão de calibração para cada imagem. As medições foram feitas com auxílio do programa Image Pro-plus 4.6.2, e os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $P < 0,05$ para todas as amostras.

Figura 08. - Canaleta de madeira utilizada para realização do teste de avaliação funcional do N. Ciático.

Figura 09. - Impresão da região plantar das patas posteriores na fita de papel utilizada posteriormente avaliação funcional do ciático.

Processamento Histológico dos Músculos:

Para o tratamento histológico, a amostra dos músculos EDL e Tibial Cranial, passaram por um protocolo de congelamento em nitrogênio líquido do Laboratório de Histoenzimologia da disciplina de Anatomia da FOB-USP, para posteriormente obter os cortes histológicos que passaram pela coloração em Hematoxilina e Eosina (HE).

Figura 10. – Foto durante etapa de congelamento dos músculos EDL e TC onde passam pelo talco neutro.

Figura 11. – Foto durante etapa de congelamento dos músculos EDL e TC onde passam pelo nitrogênio líquido utilizando blister.

Processamento Histológico dos Nervos (Ciático e Fibular Comum):

Para o tratamento histológico, as amostras de todos os grupos dos nervos Ciáticos e Fibular Comum, passaram por um protocolo de inclusão em parafina e historesina, onde foram confeccionados os blocos, para posteriormente obter os cortes histológicos para coloração com ósmio, reações de imunohistoquímica marcando células de Schwann e neurofilamentos, e análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Processamento para análise morfométrica:

Foi realizada a morfometria dos músculos EDL e TC, e dos nervos Ciático e Fibular Comum com mensuração de 220 fibras de cada músculo e nervo por animal de cada grupo, utilizando um micro computador com o software de captura e análise de imagem Image Pro-Plus 6.0, acoplado ao microscópio óptico Olympus BX-50.

Figura 12. – Microscópio, micro computadores e monitores para análise de imagens e morfometria.

Processamento para técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):

Foi utilizada técnica de MET para análise ultraestrutural das fibras nervosas em regeneração. Após a fixação com glutaraldeído, as amostras foram incluídas em historesina e cortes histológicos semi-finos foram obtidos para verificarmos a melhor região de observação no microscópio eletrônico de transmissão. Após esse procedimento, foi confeccionado um novo corte, que foi utilizado para o estudo e posteriormente essa região foi fotografada.

Forma de Análise dos Resultados / Tratamento Estatístico

Análises entre os grupos, como os dados relativos à morfometria, e Análise funcional da marcha dos grupos de animais, foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Análises entre apenas dois grupos ou amostras, foram realizadas através do teste “t”. Possíveis correlações foram analisadas por meio de regressão linear e do teste de Pearson. Para todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados

A-) Observações Externas

Em todos os animais dos grupos experimentais pode ser observado uma paralisia da pata do lado onde o n. ciático foi seccionado semelhante a chamada “Waiters tip hand” (mão de garçom), como nas lesões altas do plexo braquial (C5; C6).

Figura 13. – Pata direita de um animal do GEEVcg150. Observe a paralisia dos dedos da referida pata.

Figura 14. – Pata esquerda do mesmo animal do GEEVcg150. Observe a posição normal dos dedos do animal.

B-) Procedimentos Cirúrgicos

Observações macroscópicas durante a dissecação do nervo ciático para a realização da técnica de tubulização evocaram a atenção para a variação anatômica apresentada na trifurcação do nervo em questão. Alguns animais apresentaram o nervo fibular comum já isolado desde a sua origem no plexo sacral.

Em alguns animais do grupo Experimental foi observada uma fibrose justaposta ao tecido adjacente à região onde foi realizada a cirurgia, e em dois animais foi observado a formação de um lipoma na mesma região.

Figura 15. – Foto do sítio cirúrgico e do lipoma encontrado em 2 animais. (*)

Figura 16. – Lipoma retirado da região onde foi realizada a cirurgia experimental.

Não foi possível observar macroscopicamente alteração no comprimento do nervo ciático nos grupos experimentais quando comparados com o controle, todavia, nos músculos, essa diferença foi bastante evidente e visível macroscopicamente.

C-) Observações Histológicas

Em todos os animais dos grupos experimentais foi observado nos cortes histológicos dos nervos uma grande quantidade de tecido conjuntivo denso substituindo o tecido nervoso. Essa característica foi mais acentuada no grupo que não obteve tratamento com laser e nem preenchimento com gordura (GEVV).

Através da microscopia foi possível observar uma maior irregularidade das fibras nervosas do grupo GEEVsg150 seguido pelo GEEVcg150 e GEEVcg150L respectivamente. De modo geral, em nível de enxerto o cabo de regeneração mostrou-se constituído por fibras nervosas mielínicas e amielínicas de diâmetros heterogêneos. No GEEVcg150L observamos uma maior homogeneidade de suas fibras nervosas.

Foram encontrados mastócitos nos cortes histológicos na região do enxerto de 4 animais sendo 2 do GEEVcg150, 1 no GEEVsg150L e 1 no GEEVcg150L.

Em nenhum corte histológico, em nível de enxerto, pode ser observado a presença da parede do vaso da veia jugular externa, e não foi constatada em nenhum grupo a presença de fibras nervosas fora do epineuro.

Em nível muscular podemos observar macroscopicamente uma leve atrofia das fibras musculares dos grupos experimentais quando comparado com o grupo controle final. No GEEVcg150L observamos menor espaçamento entre as fibras musculares e fascículos mais justapostos. Essas características nos músculos dos grupos GEEVsg150 GEEVcg150 e GEEVsg150L foram distintas apresentando um maior espaçamento provocado pela presença aumentada de tecido conjuntivo na região do perimísio e endomísio.

Nas lâminas histológicas dos nervos impregnados com tetróxido de ósmio observamos que não foi obtida uma boa fixação no centro do mesmo, provavelmente pela dificuldade de penetração do ósmio e/ou pelo tempo de permanência do material na solução.

Figura 17. - Em **A**: GEEVcg150 (4600x), em **B**: GEEVsg150 (2600x), em **C**: GEEVcg150L (3400x), em **D**: GEEVsg150L (2600x), em **E**: GCF (1900x). Note as fibras nervosas mielínicas (seta branca), fibras nervosas amielínicas (seta preta), mastócitos com suas granulações (estrela de cinco pontas) e um núcleo de célula de schwann (estrela quatro pontas).

D-) Peso dos animais

Tabela 01. - Pesos médios, inicial e final, e ganho de peso em porcentagem.

GRUPOS	peso inicial (g)	peso final (g)	percentual de ganho (%)
GCF150	266,6	514,4	92,95
GCD150	276,4	495,2	79,16
GEEVsg150	276,6	452	63,41
GEEVsg150L	308	445	44,48
GEEVcg150	279,1	414,2	48,41
GEEVcg150L	304	481	58,22

Os animais de todos os grupos tiveram aumento de peso conforme observado na tabela acima.

Três animais do GCD150, um do GEEVcg150L, um do GEEVsg150L, realizaram autofagia de dedos nas patas dos membros pélvicos que foram realizadas as cirurgias (Fig). Estes animais não foram escolhidos para a realização da Análise funcional da Marcha, entretanto seus músculos se encontravam intactos, e por isso foram utilizados nas análises dos demais parâmetros. Esse comportamento pode ser atribuído a falta de sensibilidade na pata do animal causada pelo seccionamento do N. Ciático no momento da cirurgia. A interrupção deste processo pode ser devido ao fato de uma nova reinervação ter se estabelecido, transmitindo novamente sensibilidade a região lesada.

Figura 18. – Pata direita de um animal do grupo GCD150 que realizou autofagia onde podemos observar a ausência dos dedos.

Figura 19. – Pata direita do animal do grupo GEEVsg150L que realizou autofagia.

E-) Análise funcional do n. ciático.

Lembrando que, os valores próximos a -100 (cem) se referem a secção do nervo ciático, e valores próximos a 0 (zero) se referem a animais do grupo controle, como já descrito anteriormente. Os dados sobre a análise funcional do nervo periférico se encontram na tabela abaixo

Tabela 02. - Análise funcional do nervo ciático, utilizando a equação de BAIN et al.,(1989), postas em ordem decrescente. (a,b,c,d) – comparação entre os grupos, para cada tipo de fibra (vertical). Letras iguais não apresentam diferença significativa estatisticamente.

Grupos	Valores das marchas	
	Média	S.D.
GCD150	-79,03 ^{abcd}	23,61
GCF150	-29,74 ^{ab}	10,95
GEEVcg150	-71,14 ^{abcd}	5,45
GEEVsg150	-61,26 ^{abcd}	30,03
GEEVcg150L	-54,67 ^{bcd}	23,44
GEEVsg150L	-86,75 ^{abcd}	19,52

A análise estatística realizada pelo teste “t student” dessas variáveis mostrou que os valores médios foram diferentes, havendo diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo GEEVsg150L e GCF150.

O grupo que mais se aproximou do GCF150 foi o GEEVcg150L.

F-) Aspectos Morfométricos dos Nervos

Para a análise dos dados morfométricos, foi utilizado Análise de Variância e Teste de Tukey para a comparação entre os 6 grupos, sendo adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Grupos com a mesma letra não possuem diferença estatisticamente significativa entre si.

Tabela 03. - Dados morfométricos referente ao Nervo Ciático. AF= Área de Fibra, AA= Área do Axônio, DF= Diâmetro da Fibra, DA= Diâmetro do Axônio, AB= Área da Bainha e EB= Espessura da Bainha.

Grupo	AF		AA		DF		DA		AB		EB	
	média	Dp	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
GCI	28,06 ^b	7,77	8,89 ^{ab}	3,14	5,10 ^{bc}	0,74	2,64 ^b	0,48	19,16 ^b	4,84	2,46 ^b	0,30
GCF	55,65 ^d	6,31	17,33 ^c	2,71	7,81 ^e	0,47	4,24 ^c	0,53	38,32 ^d	4,05	3,57 ^{cd}	0,26
GEEVsg150	14,14 ^a	2,61	5,43 ^a	1,01	3,43 ^a	0,37	1,98 ^a	0,20	8,71 ^a	1,77	1,45 ^a	0,22
GEEVcg150	31,05 ^{bc}	5,22	7,58 ^a	1,94	5,48 ^c	0,29	2,39 ^{ab}	0,27	23,47 ^{bc}	3,75	3,10 ^c	0,17
GEEVsg150L	27,89 ^b	2,19	8,30 ^{ab}	1,01	4,70 ^b	0,28	2,45 ^{ab}	0,30	19,58 ^b	1,63	2,24 ^b	0,24
GEEVcg150L	38,43 ^c	2,55	10,69 ^b	0,45	6,94 ^d	0,43	2,90 ^b	0,09	27,74 ^c	2,17	4,04 ^d	0,37

Tabela 04. - Dados morfométricos referente ao Nervo Fibular. AF= Área de Fibra, AA= Área do Axônio, DF= Diâmetro da Fibra, DA= Diâmetro do Axônio, AB= Área da Bainha e EB= Espessura da Bainha.

Grupo	AF		AA		DF		DA		AB		EB	
	média	Dp	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp	Média	dp
GCI	22,94 ^{ab}	4,87	8,16 ^a	2,74	4,54 ^{ab}	0,45	2,46 ^{ab}	0,37	14,79 ^{ab}	2,39	2,08 ^a	0,17
GCF	50,11 ^c	6,95	14,77 ^c	0,99	7,05 ^c	0,65	3,55 ^c	0,12	35,34 ^c	6,76	3,50 ^b	0,60
GEEVsg150	16,37 ^a	5,16	5,92 ^a	2,20	3,70 ^a	0,55	2,00 ^a	0,35	10,46 ^a	2,98	1,70 ^a	0,21
GEEVcg150	25,07 ^b	4,95	7,65 ^{ab}	1,34	4,63 ^b	0,52	2,65 ^b	0,27	17,42 ^b	4,14	1,97 ^a	0,37
GEEVsg150L	24,50 ^b	3,60	7,86 ^{ab}	0,61	4,36 ^{ab}	0,54	2,55 ^b	0,26	16,64 ^b	3,13	1,81 ^a	0,30
GEEVcg150L	31,30 ^b	1,55	10,14 ^b	0,42	5,07 ^b	0,63	2,77 ^b	0,11	21,16 ^b	1,30	2,30 ^a	0,55

Figura 20. – Representação Gráfica da média das áreas das fibras nervosas do nervo ciático.

Figura 21. – Representação Gráfica da média das áreas das fibras nervosas do nervo fibular comum.

O resultado da morfometria referente a variável área das fibras nervosas dos nn. Ciático e Fibular Comum está representados nas figuras _ e _ respectivamente. Podemos observar nos dados do n. Ciático que nenhum grupo experimental obteve valor estatisticamente não significativo quando comparados com o GCF150, entretanto, quando comparamos os grupos experimentais entre si, observamos que os grupos GEEVcg150 e GEEVsg150L não possuem valores estatisticamente significantes, assim como os grupos GEEVcg150 e GEEVcg150L.

Porém quando comparamos os grupos GEEVsg150L e GEEVcg150L observamos que possuem diferença estatisticamente significativa.

A análise estatística relacionada ao n. Fibular Comum apresenta uma correlação diferente a apresentada nos dados do n. Ciático. Os dados dos Grupos Experimentais quando comparados com o GCF150 apresentam diferença significativa assim como os do N. Ciático, entretanto, quando realizamos a mesma análise entre os grupos experimentais, podemos observar que embora o GEEVcg150L obteve uma média de 31,30 μm^2 contra 25,07 μm^2 e 24,50 μm^2 dos grupos GEEVcg150 e GEEVsg150L respectivamente, esses valores não apresentaram significância.

Figura 22. - Representação Gráfica da média das áreas dos axônios do nervo ciático.

Figura 23. - Representação Gráfica da média das áreas dos axônios do nervo fibular comum.

Os resultados da morfometria referente a variável área dos axônios dos nn. Ciático e Fibular Comum estão representados nas figuras _ e _ respectivamente. Podemos observar nos dados dos Nervos que nenhum grupo experimental obteve valor estatisticamente não significativo quando comparado com o GCF150. Quando comparamos os dados dos grupos experimentais do N. Ciático observamos que os grupos GEEVsg150, GEEVcg150 e GEEVsg150L não possuem diferença estatisticamente significativa, assim como os grupos GEEVsg150L e GEEVcg150L, embora o grupo GEEVcg150L atingiu uma média de 10,69 μm^2 de área dos axônios contra 8,30 μm^2 do grupo GEEVsg150L.

Figura 24. – Representação Gráfica da média dos diâmetros das fibras do nervo ciático.

Figura 25. – Representação Gráfica da média dos diâmetros das fibras do nervo fibular comum.

O resultados da morfometria referente a variável diâmetro das fibras dos nn. Ciático e Fibular Comum estão representados nas figuras _ e _ respectivamente. Podemos observar pelos valores aferidos que todos os grupos experimentais apresentaram resultados estatisticamente diferentes quando comparados com o GCF150. Quando comparamos os dados dos grupos experimentais do N. Ciático, observamos que possuem diferença significativa entre todos os grupos, portanto podemos considerar que o grupo GEEVcg150L, embora tendo valor significativamente diferente quando comparado ao grupo GCF150, obteve a melhor média, atingindo 6,94 μm^2 , contra 7,81 μm^2 do grupo GCF150.

No N. Fibular Comum, observamos valor estatisticamente não significantes entre os grupos GEEVsg150 e GEEVsg150L, assim como nos grupos GEEVcg, GEEVsg150 e GEEVcg150L, embora o GEEVcg150L tenha alcançado a média de 5,07 μm^2 contra 4,63 μm^2 , 4,36 μm^2 e 3,70 μm^2 dos grupos GEEVcg150, GEEVsg150L e GEEVsgL respectivamente.

Figura 26. – Representação Gráfica da média dos diâmetros dos axônios das fibras do nervo ciático.

Figura 27.— Representação Gráfica da média dos diâmetros dos axônios das fibras do nervo fibular comum.

Os resultado morfométrico da variável diâmetros dos axônios dos nn. Ciático e Fibular Comum estão representados nas figuras ___ e ___ respectivamente. Podemos observar nos dados da tabela ___ e ___ que todos os grupos experimentais obtiveram valores estatisticamente significantes quando comparados com o grupo GCF. Quando comparamos os dados entre os grupos experimentais do N. Ciático, encontramos valores sem diferença estatisticamente significantes entre os grupos GEEVsg150, GEEVcg150 e GEEVsg150L e ainda entre os grupos GEEVcg150, GEEVsg150L e GEEVcg150L, embora o GEEVcg150L ter atingido o valor de 2,90 μm contra 2,45, 2,39 e 1,98 dos grupos GEEVsg150L, GEEVcg150 e GEEVsg150 respectivamente. Já no n. Fibular, não encontramos difereça estatisticamente significantes entre os grupos GEEVcg150, GEEVsg150L e GEEVcg150L, assim como no n. Ciático, embora esses valores não possuem diferença estatisticamente significantes. Novamente, o GEEVcg150L obteve a maior média, atingindo 2,77 μm^2 , contra 2,55 μm^2 e 2,65 μm^2 dos grupos GEEVsg150L e GEEVcg150 respectivamente.

Figura 28.— Representação Gráfica da média da área da bainha de mielina das fibras do nervo ciático.

Figura 29.— Representação Gráfica da média da área da bainha de mielina das fibras do nervo fibular comum.

Para a obtenção dos dados da área da bainha de mielina, foi subtraído da área da fibra, o valor da área do axônio. Os dados referentes a esta variável mostraram que todos os grupos experimentais, no N. Ciático e no N. Fibular Comum, quando comparados com o grupo GCF150, apresentaram diferença estatisticamente significativa. Quando passamos a análise para ser realizada entre os grupos experimentais do N. Ciático, observamos que os grupos GEEVcg150 e GEEVsg150L não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, assim como os grupos GEEVcg150 e GEEVcg150L. Novamente o grupo

GEEVcg150L obteve maior média, atingindo 27,74 μm^2 contra 19,58 μm^2 e 23,47 μm^2 dos grupos GEEVsg150L e GEEVcg150 respectivamente. Na análise dos grupos experimentais do N. Fibular Comum, os grupos GEEVcg150, GEEVsg150L e GEEVcg150L não possuem diferença estatisticamente significativa, entretanto novamente apresentou o maior valor, 21,16 μm^2 contra 16,64 μm^2 e 17,42 μm^2 dos grupos GEEVsg150L e GEEVcg150.

Figura 30. – Representação Gráfica da média da espessura da bainha de mielina das fibras do nervo ciático.

Figura 31. – Representação Gráfica da média da espessura da bainha de mielina das fibras do nervo ciático.

Na análise estatística da variável Espessura da bainha de mielina, pode ser observado no N. Ciático, que tivemos dois grupos experimentais que não

demonstraram diferença significativa quando comparados com o grupo GCF, são os grupos GEEVcg150L e GEEVcg150, que apresentaram os valores de 4,04µm e 3,10µm respectivamente contra 3,57µm do grupo GCF. Quando realizamos esta análise entre os grupos experimentais, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos, onde o grupo GEEVcg150L obteve a maior média, atingindo o valor de 4,04µm². Quando passamos a análise ao N. Fibular Comum, encontramos resultados diferentes do N. Ciático. Todos os grupos experimentais possuem diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo GCF. E quando passamos esta análise para ser realizada entre os grupos experimentais, todos os grupos não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si, entretanto, novamente o GEEVcg150L apresentou o maior valor, atingindo 2,30µm.

Figura 32. – Representação Gráfica das fibras nervosas do N. Ciático dos grupos considerando todas as variáveis estudadas.

G-) Aspectos Morfométricos dos Músculos

Tabela 05. – Dados estatísticos do m. EDL. Teste Tukey $P < 0,05$.

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
	160,8426	1516,528	2758,558	2298,260	1960,174	2613,416	2069,685
GCD {1}		0,000145	0,000145	0,000145	0,000144839	0,00014484	0,000145
GCI {2}	0,000145		0,000145	0,00018	0,033870697	0,00014484	0,004508
GCF {3}	0,000145	0,000145		0,025252	0,000169158	0,92470694	0,000431
GECG150 {4}	0,000145	0,00018	0,025252		0,180931926	0,24605614	0,60734
GESP150 {5}	0,000145	0,033871	0,000169	0,180932		0,00073057	0,98019
GECG150L {6}	0,000145	0,000145	0,924707	0,246056	0,000730574		0,005405
GESP150L {7}	0,000145	0,004508	0,000431	0,60734	0,980189919	0,00540453	

Tabela 06. – Estatística do m. EDL. Células com xxxx na mesma coluna representam grupos estatisticamente semelhantes.

	Mean	1	2	3	4	5
GCD {1}	160,8426	xxxx				
GCI {2}	1516,528		xxxx			
GESP150 {5}	1960,174			xxxx		
GESP150L {7}	2069,685			xxxx		
GECG150 {4}	2298,26			xxxx	Xxxx	
GECG150L {6}	2613,416				Xxxx	xxxx
GCF {3}	2758,558					xxxx

Tabela 07. – Dados estatísticos do m. TC. Teste Tukey $P < 0,05$.

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
	189,9876	2475,316	4249,562	3013,417	1468,412	3360,323	2980,009
GCD {1}		0,000145	0,000145	0,000145	0,000144839	0,00014484	0,000145
GCI {2}	0,000145		0,000145	0,002311	0,000144839	0,00014526	0,004597
GCF {3}	0,000145	0,000145		0,000145	0,000144839	0,00014514	0,000145
GECG150 {4}	0,000145	0,002311	0,000145		0,000144839	0,09807062	0,999959
GESP150 {5}	0,000145	0,000145	0,000145	0,000145		0,00014484	0,000145
GECG150L {6}	0,000145	0,000145	0,000145	0,098071	0,000144839		0,054292
GESP150L {7}	0,000145	0,004597	0,000145	0,999959	0,000144839	0,05429167	

Tabela 08. – Estatística do m. TC. Células com xxxx na mesma coluna representam grupos estatisticamente semelhantes.

	Mean	1	2	3	4	5
GCD {1}	189,9876	xxxx				
GESP150 {5}	1468,412		xxxx			
GCI {2}	2475,316			xxxx		
GESP150L {7}	2980,009				Xxxx	
GECG150 {4}	3013,417				Xxxx	
GECG150L {6}	3360,323				Xxxx	
GCF {3}	4249,562					xxxx

Figura 33. – Gráfico representativo das médias das áreas em μm^2 do m. EDL.

A média das áreas das fibras musculares dos diferentes grupos, foi obtida pela aferição de duzentas fibras musculares de cada animal. Os grupos GEEVcg150L e GCF não apresentaram diferença significativa. Da mesma forma, não apresentaram diferença significativa entre si os grupos GEEVcg150, GEEVcg150L e os grupos GEEVcg150, GEEVsg150L e GEEVsg150L. O grupo GEEVcg150L obteve maior média, atingindo 2613 μm^2 contra 2298 μm^2 , 2069 μm^2 , e 1516 μm^2 dos grupos GEEVcg150, GEEVsg150L, e GEEVsg150 respectivamente.

Figura 34. – Gráfico representativo das médias das áreas em μm^2 do m. TC.

Os dados referentes a esta variável mostraram que todos os grupos experimentais quando comparados com o grupo GCF, apresentaram diferença estatisticamente significativa. Quando passamos a análise para ser realizada entre os grupos experimentais, observamos que os grupos GEEVcg150L, GEEVcg150 e GEEVsg150L não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. O grupo GEEVcg150L obteve novamente a maior média, atingindo 3360 μm^2 contra 3013 μm^2 , 2980 μm^2 , e 1468 μm^2 dos grupos GEEVcg150, GEEVsg150L, e GEEVsg150 respectivamente. Observando o GEEVsg150, podemos notar que as médias das fibras musculares foram menores quando compradas com o GCI.

Discussão

Com a intenção de obtenção de resultados mais confiáveis, algumas variáveis durante o delineamento do projeto mereceram atenção especial, pois são fundamentais para a padronização dos procedimentos. Os processamentos de todas as amostras seguiram protocolos específicos de acordo com a finalidade do material. Para o processamento dos músculos e nervos com finalidades morfométricas, foi seguido o protocolo do Laboratório de Histoenzimologia da FOB/USP. Para o processamento dos nervos com finalidade de estudo por microscopia eletrônica, foi seguido o protocolo do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP-Botucatu. Além disso, a experiência prévia obtida de trabalhos anteriormente desenvolvidos, bem como a infra-estrutura do biotério e dos laboratórios onde foram realizadas as técnicas empregadas contribuíram para obtenção de resultados confiáveis.

Para este experimento, foi utilizado ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, normalmente empregados por vários pesquisadores nesta mesma linha de investigação, envolvendo lesão, reparação e regeneração de nervos periféricos e músculos estriados esqueléticos (ITOH et al., 1996; MACKINNON et al. 1985; SCHMALBRUCH & LEWIS, 2000). Além disso, são de fácil manejo e baixo custo de manutenção (FERREIRA et al., 2005).

Hems & Glasby (1992) optaram pela utilização de coelhos como modelo experimental, e a justificativa apresentada foi a capacidade regenerativa ser menor se comparado com o rato, fazendo com que esse modelo se aproxime mais dos humanos. Entretanto, estudos mais recentes mostram que o processo de degeneração e regeneração dos ratos se assemelham com o dos humanos (Ferreira & Ferreira, 2003).

Com relação ao sexo, foram utilizados apenas machos, com o intuito de anular as variáveis de ritmos hormonais e circadianas, decorrentes do ciclo estral e ação dos hormônios adenohipofisários (LH e FSH) (Lincoln, 1980; Carandente et al., 1989 e Fraher et al., 1990).

Os animais utilizados nesta pesquisa eram jovens, essa padronização é importante, pois em animais adultos a velocidade de regeneração é menor (Lundborg, 1987; Fawcett, 1992; Vaughan, 1992; Midroni et al, 1995; Verdú et al.,

1995; Battiston et al., 2000; Tos et al., 2007; Rodrigues & Silva, 2001; Barcelos et. Al., 2003; Ferreira et al., 2005).

Os animais, embora de mesma idade, apresentaram variações no peso antes do início do experimento. No dia da cirurgia, os animais com pesos semelhantes foram separados e divididos entre os grupos controles e experimentais permitindo uma distribuição mais homogênea da amostra entre os grupos (Vieira & Hossne, 2002).

Em todos os procedimentos cirúrgicos foi utilizado o microscópio cirúrgico DF Vasconcelos, pois neste tipo de lesão, propicia uma maior precisão cirúrgica na sua reparação (Millesi, 1990; Noah et al., 1997).

Os sacrifícios aconteceram 150 dias pós-operatório. Este tempo foi padronizado, pois alguns autores acreditam que as maiores respostas funcionais e histomorfométricas acontecem até a 12ª semana pós-cirurgia, em períodos superiores não é encontrado alterações significantes que justifiquem um período superior a este (Fraher et al., 1990; Wang et al., 1993 e 1995, Foidart-Dessalle et al., 1997; Canpolat et al., 1999; Battiston et al. 2000; Tos et al. 2007; Karacaoglu et al., 2001; Rodrigues & Silva, 2001; Barcelos et al., 2003; Walker et al. 2004; Farrag et al. 2007). Com o período de 150 dias, o equivalente a 20 semanas acreditamos que as respostas funcionais e histomorfométricas já estão estabelecidas, portanto, podemos obter valores reais da resposta neuromuscular mediante a nova inervação.

Quanto ao anestésico, foi utilizado Cloridrato de Tiletamina, associado com Cloridrato de Zolazepam, administrado por via intramuscular conforme descrito por Tos et al., (2007). Foi observado inúmeras vantagens com este anestésico se comparado ao anteriormente utilizado por nosso grupo, o Hypnol por via intraperitoneal. A perda de animais foi mínima e não houve necessidade de complementação anestésica.

A utilização da veia como enxerto se deve ao fato segundo a literatura consultada, apresentarem resultados superiores a materiais não biológicos (BATTISTON et al., 2005; LEE et al., 2006; Geuna et al., 2007). Para a retirada da veia jugular externa do animal, foi utilizado um fio ortodôntico inoxidável de

0,06mm de diâmetro dobrado, de modo que sua ponta ficasse “romba”. Alguns pesquisadores (Roque, 2007) e (Roque, 2008), utilizaram outra técnica para retirada da veia, por meio de instrumental odontológico. Em nosso trabalho utilizamos o fio ortodôntico que possibilitou um melhor manuseio do enxerto. Foi utilizada a veia jugular externa pelo fácil acesso e manipulação, pelo seu calibre e pouca morbidade (Ulkur et al., 2003; Kelleher et al., 2001).

O nervo ciático foi escolhido também por ser de fácil acesso, ser o maior nervo do corpo, ricamente vascularizado, e ainda possuir vasos intraneurais semelhantes aos nervos periféricos humanos (Paassen et al., 2005).

Quanto ao tipo de lesão realizada, optou-se pela neurotmesa com perda tecidual, por ser a lesão mais grave e mais difícil recuperação. Neste tipo de lesão é necessário a utilização de um tubo ou da técnica de tubulização para guiar os brotamentos axonais do coto proximal até o coto distal (Hall, 1997). Na tentativa de padronização da lesão por outros trabalhos consultados, verificamos uma variação muito grande entre 5mm e 15mm. Como na maioria dos trabalhos as lesões ficavam entre 10mm e 15 mm, optou-se pela lesão de 12mm entre o coto proximal e distal (Viterbo et al. 1993; Karacaoglu et al., 2001; Costa et al., 2006; Fernandes et al., 2007).

É sabido que a tensão gerada no sítio da sutura do enxerto com o nervo é prejudicial a regeneração, pois o tecido cicatricial acaba obstruindo a passagem da nova inervação (Zhao et al., 1997; Millesi & Millesi, 1981). Neste trabalho utilizamos a veia jugular de 18 mm de comprimento, os cotos proximal e distal foram suturados cerca de 2,7mm dentro do enxerto, provocando um espaço de lesão de 12mm de comprimento, conforme descrito na metodologia, retiramos apenas 5mm do nervo para provocar a lesão, pois quando realizamos o seccionamento do nervo, automaticamente acontece uma retração, portanto, retirando um segmento de nervo menor anulamos a possibilidade do enxerto permanecer tensionado no sítio da sutura.

Para permitir melhor adaptação da veia enxertada com os cotos dos nervos, foi utilizado fio de sutura monofilamentar de nylon 10-0. Outros pesquisadores usaram fio monofilamentar 11-0 ou até 12-0 como Schultes et al (2001).

Acreditamos que o fio 10-0 desempenha a função assim como os outros fios, além de ser economicamente mais viável que os fios 11-0 e 12-0.

Tang (1995) observou que procedimentos cirúrgicos com veias maiores que cinco centímetros de comprimento seriam pouco viáveis devido a possibilidade de colapamento. Geuna et al., (2000), Ristano et al., (2002) preencheram os enxertos venosos para evitar o colapamento das veias, e observaram uma melhor regeneração. Neste trabalho também verificamos uma melhor regeneração nos grupos que tiveram os enxertos preenchidos.

Quando observado os aspectos macroscópicos, como por exemplo, a marcha dos animais, verifica-se dificuldade de locomoção. Na primeira semana pós-cirúrgica, observa-se maior dificuldade em posicionar a planta da pata pois o animal apenas arrasta o membro operado. Após a terceira semana, ele deixa de arrastar e começa a apoiar novamente a planta da pata na superfície de caminhada. Esse fenômeno causado pela desnervação do animal foi estudado por Ulkur (2003), que também observou uma melhora após a terceira semana, devida a uma nova comunicação entre o nervo e o músculo restabelecida.

A utilização da gordura como fator de preenchimento dos enxertos foi baseada em estudos recentes onde pode-se observar facilidade de acesso, a abundância de tecido adiposo, e ainda a possibilidade de extração de células-tronco mesenquimais através de procedimentos menos invasivos (MARTINS et al., 2005; GENDEBIEN et al., 2005; CHEN et al., 2006; LIN et al., 2007). Além disso, podemos comprovar a eficácia do preenchimento com gordura, pois em nosso trabalho, os grupos GEEVcg150L e GEEVcg150 obtiveram melhores resultados funcionais e morfológicos.

Quando comparamos a proporção de desenvolvimento da fibra nervosa mielinizada, levando em consideração a área do axônio e fazendo uma relação com a área e/ou espessura da bainha de mielina, observamos uma irregularidade no desenvolvimento das fibras dos grupos GEEVcg150L e GEEVcg150.

O pós tratamento com Laser de Arsenieto de Gálio, se deveu ao fato de suas propriedades antiedamatosas, cicatrizante e analgésica ser facilmente comprovadas na literatura (Posten et. al., 2005).

Os resultados apresentados relacionados a autofagia, pode ser atribuído a falta de sensibilidade na pata do animal causada pelo seccionamento do n. Ciático no momento da cirurgia (Barcelos et al., 2003). Nos cinco animais que desenvolveram essa automutilação, observamos o cessar desse processo em torno de quatro semanas pós-cirurgia. Embora não tenhamos feito nenhum teste sensitivo, provavelmente uma nova reinervação pode ter se estabelecido, transmitindo novamente sensibilidade a região lesada.

No dia do sacrifício, foi observado que os ratos dos grupos experimentais não apresentavam alterações na marcha, estando em conformidade com estudos realizados por Reina et al., (2000). Entretanto quando verificamos a pata onde foi realizado o procedimento cirúrgico verificamos uma característica como nas lesões altas do plexo braquial, denominada "Waiters tip hand" (mão de garçom). Esta alteração, acredita-se permanecer, pois conforme descrito anteriormente as alterações morfofuncionais ocorrem até a décima segunda semana pós-operatório (Reis et al., 1998; Reis, 1999; Reis et al., 2000).

A coleta das amostras do nervo na região do enxerto correspondeu ao terço médio, estando em conformidade com outros estudos desenvolvidos por Rodrigues & Silva (2001) e Barcelos et al., (2003). Para avaliação do coto distal, optou-se por coletar fragmento do n. fibular comum, que se ramifica do n. ciático.

As lâminas dos nervos foram pós fixadas com tetróxido de ósmio, metodologia utilizado por outros autores (Mackinnon et al., 1985; Vicente,1999; Wang, 1999; Oliveira et al. 2000; Vicente et al., 2001). Quanto a análise morfométrica, foram aferidas área da fibra nervosa, a área do axônio, o diâmetro menor da fibra nervosa, o diâmetro do axônio. A partir desses resultados obtivemos a área da bainha de mielina e a espessura da bainha de mielina assim como desenvolvido por Kellher et al., (2001), Barcelos et al., (2003).

Em nossas observações histológicas, encontramos a presença de neovascularização na região dos enxertos de todos os grupos experimentais. A presença de vasos nessa região é importante pois facilita a regeneração do nervo (Ferrari et al., 1999; Rodrigues e Silva, 2001).

Alguns pesquisadores como, por exemplo, McCallister et al., (1999) constataram presença de axônios mielinizados fora do epineuro. Em nosso trabalho não observamos a presença de axônios fora do epineuro. Acreditamos que esse arranjo dos axônios internamente ao epineuro seja devido a boa fixação dos cotos e a introdução de 2,7mm de comprimento dos cotos dentro do enxerto.

Em nossas observações histológicas do n. ciático e n. fibular comum, constatamos a presença de fibras nervosas mielínicas e amielínicas de tamanhos heterogêneos. A organização intraneural de fascículos com tamanhos e números variados, também foi encontrado como característica em resultados semelhantes como exemplo, Paassen et al., (2005).

Um dado interessante para ser discutido, é em relação a proporção (área do axônio e espessura da bainha) das fibras nervosas mielinizadas. No decorrer do período pós cirúrgico, por intermédio dos grupos controles GCI e GCF verificamos que o crescimento da fibra nervosa normal é homogênea e proporcional. Em relação ao melhor desenvolvimento proporcional levando em consideração as variáveis área do axônio e área / espessura da bainha de mielina, observamos uma similaridade maior entre os grupos sem preenchimento (GEEVsg150 e GEEVsg150L) com o grupo controle Final (GCF).

O GEEVcg150L obteve o melhor resultado funcional quando comparado com os outros grupos experimentais. Se utilizarmos o critério de melhor desenvolvimento proporcional da área do axônio em relação a espessura da bainha de mielina das fibras nervosas, ele possuiria a segunda pior proporção. Isso nos mostra que uma melhor proporção apresentada em um nervo regenerado não é relevante, pois não expressa um real benefício a funcionalidade.

Alguns trabalhos apresentam com grande grau de importância o índice de mielinização, entretanto, em nenhum deles foi calculado um índice, apenas utilizado a área ou espessura da bainha de mielina e esse valor foi denominado como um índice de mielinização como por exemplo, Roque (2007), Roque (2008), OH (2008).

Quando comparamos as variáveis do n. ciático isoladamente, observamos que o grupo GEEVcg150L obteve maior desempenho em todas elas. Em duas

variáveis (área do axônio e diâmetro do axônio) os resultados foram estatisticamente semelhantes com os grupos GEEVsg150L e GEEVcg150. Na variável espessura da bainha, o GEEVcg150L obteve igualdade estatisticamente com o grupo GCF.

Utilizando o n. fibular como base observamos que apesar do grupo GEEVcg150L apresentar maior valor em todas as variáveis, elas não apresentam diferença estatisticamente significantes.

Comprovando a ineficiência de uma regeneração nervosa com desenvolvimento proporcional utilizando o teste funcional, podemos considerar que o GEEVcg150L mesmo não obtendo um desenvolvimento proporcional próximo ao normal, foi o grupo que mais se destacou tanto nas variáveis isoladamente quanto nos testes funcionais.

Analisando os dados obtidos, podemos sugerir que o enxerto preenchido com gordura, promoveu uma melhor resposta principalmente quando analisamos a variável área da fibra nervosa como parâmetro. Ainda podemos estabelecer uma relação benéfica entre a área do axônio e a aplicação do laser, tendo em vista que os grupos experimentais que foram submetidos ao laser tiveram uma resposta melhor. Por sua vez, a variável diâmetro da fibra trouxe uma correlação positiva quando utilizado a associação da gordura e laser AsGa no tratamento pós cirúrgico.

Diante das informações referentes as variáveis área e espessura da bainha de mielina, podemos notar uma correlação positiva entre a utilização da gordura e o desenvolvimento da bainha. Provavelmente a utilização da gordura como preenchimento do enxerto auxiliou no desenvolvimento dessas variáveis.

Nos músculos EDL e TC, encontramos dados semelhantes ao dos nervos. O grupo GEEVcg150L obteve o melhor desenvolvimento levando em consideração a área da fibra muscular.

Nas observações histológicas, confirmamos alterações morfológicas como fibras musculares com núcleo central, maior espaçamento entre os fascículos e fibras. Resultados semelhantes foram encontrados por Lutz et al., (2005); Lankamp et al., (2005); ZHOU (2006) e CEBASEK (2006).

No m. EDL o grupo GEEVcg150L além de ter obtido o melhor desempenho quando comparados com os outros grupos experimentais, ainda não encontramos diferença estatisticamente significativa em relação ao GCF. Essas informações nos levam a sugerir que a associação da gordura e do Laser AsGa apresentou benefícios à regeneração nervosa e resposta muscular na nova reinervação.

No m. TC, o grupo GEEVcg150L também apresentou o melhor resultado, entretanto não obteve semelhança estatisticamente ao GCF, apenas com os grupos GEEVcg150 e GEEVsg150L.

O objetivo principal das pesquisas que seguem a linha de reparação de lesões nervosas é proporcionar ao indivíduo a melhor recuperação funcional possível. Encontramos na maioria dos trabalhos desta linha, avaliações morfológicas baseadas em área da fibra nervosa, do axônio e da bainha de mielina, porém, a exigência de algum método para avaliação funcional é cada vez mais exigido.

Estudos futuros estão sendo desenvolvidos por nosso grupo no sentido de pesquisar qual variável (área da fibra, área do axônio, área da bainha de mielina, etc.) é realmente fundamental para que possa ser atingida uma regeneração com melhora funcional significativa, ou ainda, qual variável morfológica representaria melhor a resposta funcional, para que possamos utilizá-la como parâmetro morfológico de uma boa recuperação funcional. Nesta pesquisa observa-se que a regeneração proporcional das fibras nervosas, levando em consideração a área do axônio e a bainha de mielina, não trouxe bons resultados funcionais.

A utilização de células-tronco extraídas do tecido adiposo representa uma nova possibilidade de projetos futuros, tendo em vista os resultados que obtivemos no emprego do tecido adiposo *in natura*.

Conclusão

- O enxerto venoso preenchido com gordura é benéfico para regeneração nervosa;

- A associação do enxerto preenchido com gordura e a aplicação de laser de baixa potência (AsGa) potencializa ainda mais a capacidade de regeneração nervosa;

- A regeneração nervosa nos grupos que foram submetidos a técnica do enxerto preenchido com gordura foi melhor quando comparada a regeneração nervosa alcançada nos grupos sem preenchimento.

- Os grupos que foram utilizados o Laser de baixa potência no pós-operatório obtiveram resultados superiores aos grupos que não foram empregados esse tratamento.

Referências

ADAMS, R.D; DENNY-BROWN, D; PEARSON, C. M. *Diseases of Muscle*. London: Kimpton, 1962.

ALLEN DL; MONKE S. R.; TALMADGE R.J; ROY R. R ; EDGERTON V. R. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol**. 1995;78:1969-1976.

ALTSCHUL, R. On nuclear proliferation and nuclear size. **Anaty. Rec.**, 100,517, 1948.

ANZIL AP; WERNIG A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. **J Neurocytol** 18: 833–845, 1989.

ASSIA E; ROSNER M; BELKIN M; SOLOMON A, SCHWARTZ M. Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve. **Brain Res**. 9;476(2):205-12, 1989.

BAIN J.R.; MACKINNON S.E.; HUNTER D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconst. Surg*. 83: 129-138, 1989.

BARCELOS, A.S.; RODRIGUES, A.C.; DAL PAI SILVA, M.; PADOVANI, C.R. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. **Microsurgery**, 23: 66 – 71, 2003.

BATTISTON, B.; GEUNA, S.; FERRERO, M.; TOS, P. Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. **Microsurgery**, 25:258-267, 2005.

BATTISTON, B.; TOS, P.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECHI, M. G.; GUGLIEMONE, R. Nerve repair by means of vein filled with muscle graftsII. Morphological Analysis of Regeneration. **Microsurgery**. v. 20(6), p. 37-41, 2000.

BAXTER GD; WALSH DM; ALLEN JM; LOWE AS; BELL AJ. Effects of low intensity infrared laser irradiation upon conduction in the human median nerve in vivo. **Exp Physiol**. 79(2):227-34, 1994.

BIBIKOVA A; BELKIN V; ORON U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol** (Berl). 190(6):597-602, 1994.

BJUSZ E. "Red" skeletal muscle fibers: relative independence of neural control. **Science** 145: 938–939, 1964.

BORISOV AB; DEDKOV E; CARLSON BM. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. **Anat Rec.**; 264: 203–18, 2001.

BOWDEN REM; GUTMANN E. Denervation and re-innervation of human voluntary muscle. **Brain**, 67,273, 1944.

BRUGNERA AJR; ZANIN F; BARBIN EL; SPANO JC; SANTANA R; PECORA JD. Effects of Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on radicular dentine permeability using different irrigating solutions. **Lasers Surg Med**.33(4):256-9, 2003.

CAIOZZO V. J. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. **Muscle Nerve**.,26: 740-768, 2002.

CANPOLAT, L.; KÜKNER, A.; CANPOLAT, I.; OZAN, E. Ultrastructural and Morphometric Analysis of Peripheral Nerve Repair Regeneration Within Silicone Tubes. **Tr. J. of Medical Sciences**. v. 29, p. 203-209, 1999.

CARANDENTE, F.; ANGELI, A.; CANDIANI, G. B.; CROSIGNANI, P. G.; DAMACO, F. Rhythms in the ovulatory cycle. LH, FSH, estradiol and progesterone. **Chronobiologia**. Milano, v. 16, p.353-363, 1989.

CASTANEDA F; KINNE RK. Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. **Muscle Nerve**., Oct;26(4):527-32, 2002.

CEBASEK, V.; RADOCHOVÁ, B.; RIBARIE, S.; KUBINOVA, L.; ERZEN, I. Nerve injury affects the capillary supply in rat slow and fast muscle differently. **Cell Tissue Res**. 323:305-312, 2006.

CHEN, Y.; TENG, F. Y. H.; TANG, B. L. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neural differentiation: Progress and uncertainties. **Cell. Mol. Life Sci**, 63:1649-1657, 2006.

COLLS J. C. La Terapia Laser hoy. Barcelona, 1984.

COSTA, M. P; CUNHA, A. S.; DA-SILVA, C. F.; BARROS FILHO, T. E. P.; FERREIRA, M. C. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortop. Bras**. v.11(1), p.25-29, 2006.

DAVATZ, C. G.; ANDREO, J. C.; RODRIGUES, A. C.; ROSA-JÚNIOR, G. M. & MORAES, L. H. R. Apoptosis in denervated skeletal muscle. **Int. J. Morphol.**, 25(3):529-536, 2007.

DE MEDINACELI L.; FREED W.J.; WYATT R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking. *Tracks. Exp. Neural.* 77: 634-643, 1982.

DEDKOV E.I; KOSTROMINOVA TY; BORISOV AB; CARLSON BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal population. *Anat Rec* 263: 139–154, 2001.

DESCHENES M. R; MARESH C. M; & KRAEMER W. J. Exercise training of moderate intensity does not abate the effects of denervation on muscle morphology. *Int J Sports Med* 18: 426–430, 1997.

DUPONT-VERSTEEGDEN EE; HOULE JD; GURLEY CM; & PETERSON CA. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C1124–C1133, 1998.

FARRAG, T. Y.; LEHAR, M.; VERHAEGEN, P.; CARSON, K. A.; BYRNE, P. J. Effect of Platelet Rich Plasma and Fibrin Sealant on Facial Nerve Regeneration in a Rat Model. *Laryngoscope* v. 117, p. 157-165, 2007.

FAWCETT J. W; KEYNES R. J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.*, 65: 354-63, 1986.

FERNANDES, M.; VALENTE, S. G.; AMADO, D.; FERNANDES, M. J. S.; MAZZACORATTI, M. G. N.; SANTOS, J. B. G.; FALLOPA, F.; LEITE, V. M. Estudo comparativo entre enxerto autógeno e enxerto muscular coberto com tubo de veia autógeno em nervos tibiais de ratos wistar, utilizando o fluoro-gold como marcador neuronal. *Acta Ortop Brás*, 15 (2):97-100, 2007.

FERRARI F; RODRIGUES A. C.; MALVEZZI C. K.; SILVA M. D. P.; PADOVANI C. R. Inside-out vs. Standard Vein Graft to Repair a Sensory Nerve in Rats. **The Anatomical Record**. 256:227-232, 1999.

FERREIRA, L. M. & FERREIRA, L. R. K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cir. Bras.** V.18, p.1-3, 2003

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirurg. Bras.** V.20 (Supl.), p. 28-34 2005.

FIELDS, R. D.; LE BEAU J. M.; LONGO F. M.; ELLISMAN M. H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progr. Neurobiol.**, 33: 87-137, 1989.

FOIDART-DESSALE, M.; DUBUISSON, A.; LEJEUNE, A.; SEVERYNS, A.; MANASSIS, Y.; DELREE, P.; CRIELAARD, J. M.; BASSLEER, R. AND LEJEUNE, G. Sciatic Nerve Regeneration through Venous or Nervous Grafts in the Rat. **Experimental Neurology**, v. 148, p.236-246, 1997.

FRAHER, J.P.; O'LEARY, D.; MORAN, M. A.; COLE, M.; KING, R. H.; THOMAS, P.K. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. I. Normal animals. **Acta Neuropathol.** v. 79, p.364-374, 1990.

GENDEBIEN, S. W.; WAUTIER, F.; LEPRINCE, P.; ROGISTER, B. Astrocytic and neural fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. **Brain Research**, 68 95-102, 2005.

GENOVESE W. J. Laser de baixa intensidade: Aplicações terapêuticas em Odontologia. São Paulo: Louise, 2000.

GERMINARIO E; ESPOSITO A; MEGIGHIAN A; MIDRIO M; BIRAL D; BETTO R; DANIELI-BETTO D. Early changes of type 2B fibers after denervation of rat EDL skeletal muscle. **J Appl Physiol.**; 92: 2045–52, 2002.

GEUNA, S.; NICOLINO, S.; RAIMONDO, S. GAMBAROTA, G.; BATTISTON, B. Nerve regeneration along bioengineered scaffolds. **Microsurgery**, 27:429-438, 2007.

GEUNA, S.; TOS, P.; BATTISTON, B.; GUGLIELMONE, R.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. G. Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. **Anat Embryol.**, Heidelberg v.201, p.475-482, 2000.

GIGO-BENATO, D., GEUNA, S., RODRIGUES, A.C., TOS, P., FORNARO, M., BOUX, E., BATTISTON AND GIACOBINI-ROBECCHI, M. G. Low power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. **Laser in Medical Science**; 19:57-65, 2004.

GRECO M; GUIDA G; PERLINO E; MARRA E; QUAGLIARIELLO E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun.**29;163(3):1428-34, 1989.

GUIDA C. M. H.; PIETER J. K. ; RICHARD PD. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. **Microsurgery**, 14: 584-588, 1993.

GUTMANN E; ZELENKA J. Morphological changes in the denervated muscle. **In The denervated muscle**. GUTMANN E, ed, pp 341–71. Prague Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. 1962.

HALL, S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. **J. Anat.**, London, v.190, p.57-71, 1997.

HAMILTON G. F.; ROBISON T. K.; RAY R. H. The effect of helium-neon laser upon regeneration of the crushed peroneal nerve. **JOSP**, 15(5): 209-214, 1992.

HEMS, T. E. J.; GLASBY M. A. Comparison of different methods of repair of long peripheral nerve defects: an experimental study. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v.45, p. 497-502, 1992.

HESS A; ROSNER S. The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers. **Am J Anat.**, 129: 21-39, 1970.

HUDSON A. R.; HUNTER D. ; KLINE D. G. et al. Histological studies of experimental interfascicular graft repair. **J. Neurosurg.**, 51: 333-340, 1979.

HYATT J. P.; ROY R. R.; BALDWIN K. M.; & EDGERTON V. R. Nerve activity independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. **Am J Physiol Cell Physiol** 285: C1161–C1173, 2003.

IRINTCHEV A; DRAGUHN A; WERNIG A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. **Neuroscience** 39 (1): 231- 243, 1990.

ISHIDO M; KAMI K ; MASUHARA M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol** 287: C484–C493, 2004.

ISHIHARA A.; ROY R. R.; OHIRA Y.; IBATA Y.; EDGERTON V.R. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. **J Appl Physiol** 84: 2183–2189, 1998.

ITOH S.; SHINOMIYA K.; SAMEJIMA H.; OHTA T.; ISHIZUKI M.; ICHINOSE S. Experimental study on nerve regeneration through the basement Membrane tubes of the nerve, muscle, and artery. **Microsurgery**. 17: 525-534, 1996.

JARVIS D; MACIVER MB; TANELIAN DL. Electrophysiologic recording and thermodynamic modeling demonstrate that helium-neon laser irradiation does not affect peripheral Delta- or C-fiber nociceptors. **Pain**. 43(2):235-42, 1990.

KARACAOGLU, E.; YÜKSEL, F.; PEKER, F.; GÜLER, M. Nerve regeneration through an epineural sheath: its functional aspect compared with nerve an vein grafts. **Microsurgery**, v. 21(5), p. 196-201, 2001.

KARU T.; PYATIBRAT L.; KALENDI G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B**. Mar;27(3):219-23, 1995.

KELLEHER, M.O.; AL-ABRI, R.K.; ELEUTÉRIO, M.L.; MYLES, L.M.; LENIHAN, D.V.; GLASBY, M.A. The use of conventional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. **Brit. J. of Plast. Surgery**, v.54, p.53-57, 2001.

KINGHAM PJ; BIRCHALL MA; RACHEL BURT R; JONES A; TERENCE G. Reinnervation of laryngeal muscles: a study of changes in myosin heavy chain expression. **Muscle Nerve** 32: 761–766, 2005.

KNOWLTON G. C.; HINES H. M. Kinetics of muscles atrophy in different species. **Proc. Soc.exp. Biol. Med.**; 35,394, 1936.

KOLARI P. J. Penetration of unfocused laser light into the skin. **Arch Dermatol Res**, 277(4):342-4, 1985.

LANDER A. D.; FUJII D. K.; REICHARDT L. F. Laminin is associated with the “neurite outgrowth-promoting factors” found in conditioned media. **Proc. Natl. Sci. USA**. 82: 2183-2187, 1985.

LANKAMP, C. L. A. M.; RUITER, G. C. W.; WOLFS, J. F. C.; PÊGO, A. P.; FEIRABEND, H. K. P.; LAKKE, E. A. J. F.; MALESSY, M. J. A. Type grouping in skeletal muscle after experimental reinnervation: another explanation. **European J. Neuroscience**, Vol. 21, pp. 1249 – 1256, 2005.

LEE, D. Y.; CHOI, B. H.; PARK, J. H.; ZHU, S. J.; KIM, B. Y.; HUH, J. Y.; LEE, S. H.; JUNG, J.H.; KIM, S.H. Nerve regeneration with the use of a poly (L-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel. **Journal of cranio-maxillofacial surgery**, 34, 50-56, 2006.

LEHMAN J. F.; LATEUR B. J. Diatermia e calor superficial, laser e crioterapia. **Tratado de medicina física e reabilitação de krusen**. Rio de janeiro, Manoele. Cap 13, p277-356: 1994.

LIN, T. M.; CHANG, H. W.; WANG, K. H.; KAO, A. P.; CHANG, C. C.; WEN, C.H.; LAI, C. S.; LIN, S. D. Isolation and identification os mesenchymal steam cells from human lipoma tissue. **BBRC**, 07:116-123, 2007.

LINCOLN, G. A.; SHORT, R. V. Seasonal breeding nature’s contraceptive. **Rent. Prog. Horm. Res.**, New York, v.36, p. 1-52, 1980.

LU D.X.; HUANG S. K.; CARLSON B. M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. **Anat Rec** 248: 355–365, 1997.

LUNDBORG G. Nerve regeneration and repair – A review. **Acta Orthop. Scand. OIso**, 58: 145-169, 1987.

LUTZ, B. S.; LIDMAN, D. Morphological and functional evaluation of leg-muscle reinnervation after coupler coaptation of the divided rat sciatic nerve. **Microsurgery**, 25:235-240, 2005.

MACKINNON S.E.; DELLON A.L.; HUDSON A.R.; HUNTER D.A. Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model. **Plast. Reconstr. Surg. Baltimore**, 75(6): 833-841, 1985.

MAGILL, C. K.; TONG, A.; KAWAMURA, D.; HAYASHI, A.; HUNTER, A. P.; MACKINNON, S. E.; MYCKATYN, T. M. Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: A confocal microscopic study in transgenic mice. **J. Exp Neurol**, 207 64-74, 2007.

MARTINS, R. S.; SIQUEIRA, M. G. Utilização das células-tronco no tratamento das lesões traumáticas de nervos. **Arq. Brás. Neurocir.** 24(2): 67-72, 2005.

MCCOMAS A. J. Skeletal muscle: form and function. Champaign, IL. 1996.

MCGEACHIE J. K. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. **Cell Tissue Res** 257: 455–457, 1989.

McCALLISTER, W.; TANG, P.; TUMBLE, T. E. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v.15, n.8, p. 598-604, 1999.

MIDRONI, G.; BILBAO, J. M.; COHEN, S. M. **Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy**. Washington: Butterworth-Heinemann, 1995, p.477.

MILLES, H.; MILLES, G. Consequences of tension at the suture line. In: MILLES, H.; GORIO, A.; MINGRINO, S., Postraumatic peripheral nerve regeneration

experimental basis and clinical implications. New York: **Raven Press**, 1981, p. 277-279.

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

MILLESSE, H. Peripheral nerve surgery today: turning point or continuous development. **J. Hand Surg. [Am]**, Washington, v.15, p. 281, 1990.

MURRAY M. A; ROBBINS N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. **Neuroscience** 7: 1823–1833, 1982.

NOAH, E. M.; WILLIAMS, A.; FORTES, W; TERZIS, J. K. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side neurorrhaphy. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 13, p. 317-325, 1997.

OH, S. H.; KIM, J. H.; SONG, K. S.; JEON, B. H.; YOON, T. B. S.; NAMGUNG, U.; LEE, W.; LEE, J. H. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, 29:1601-1609, 2008.

OLIVEIRA, E. F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H. 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, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 2000, p.6.

OLSON J. E.; SCHIMMERLING W.; TOBIAS C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. **Brain Res.** 12;204(2):436-40, 1981.

PAASSEN, J. I.; MEEK, M. F.; GRAMSBERGEN, A. Long-term reinnervation effects after sciatic nerve lesions in adult rats. **Ann Anat.** 187 p.113-120, 2005.

PELLEGRINO C.; FRANZINI C. An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibres. **F. Cell Biol.**, 17, 327, 1963.

PETTE D; VRBOVÁ G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** 120: 116-202, 1992.

PETTE D; STARON RS. Transitions of muscle fiber phenotypics profiles. **Histochem Cell Biol.** 115: (5)359-372, 2001.

PETTE D.; STARON R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fiber. **Rev Physio Biochem Pharmacol.** 116: 1-76, 1990.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S. ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and Efficacy. **Dermatol Surg**, 31:334-340, 2005.

RANVIER L. Note sur les vaisseaus sanguins et la circulation dans les muscles rouge. **C.R. Soc. Biol.** 26:28-31, 1874.

REDDY G. K.; GUM S.; STEHNO-BITTEL L.; ENWEMEKA C. S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. **Med Sci Sports Exerc.** Jun;30(6):794-800, 1998.

REDDY G. K.; STEHNO-BITTEL L.; ENWEMEKA C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg Med.** 22(5):281-7, 1998.

REINA, M. A.; VILLANUEVA, M. C.; DE ANDRES, J. A.; LEON, G. L. Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization. **Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.** v. 47, p.464-475, 2000.

REIS, F. A.; RODRIGUES, A. C.; VICENTE, E. J. D.; ELEUTÉRIO, M. L.; DAL PAI SILVA, M. Study of collateral sprouting from intact vagus nerve into an autologous nerve graft by using two different techniques: neuroraphy and coaptation with fibrin glue derived from the snake venom. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE ANATOMIA, 12, 1998, **Anais**. São Paulo: SBA, 1998. n.130.

REIS, F. A. **Estudo Comparativo do brotamento Axonal do nervo Vago em enxerto nervoso Autólogo**. 1999. 110f. Dissertação (Mestrado em Anatomia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

REIS, F. A.; RODRIGUES, A. C. Comparative Study of Axonal Sprouting from the Vagus Nerve in Autologous Nerve Graft. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.6, p.120, 2000.

RISTANO, G.; CAVALLARO, G.; MERRINO, T.; COPPOLINO, S.; RUGGERI, F. Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein graft in emergency hand construction. **Chir. Main**, Paris, v.21, p.194-197, 2002.

ROCHKIND S; NISSAN M; RAZON N; SCHWARTZ M; BARTAL A. Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. **Acta Neurochir** (Wien).83(3-4):125-30, 1986.

ROCHKIND S; VOGLER I; BARR-NEA L. Spinal cord response to laser treatment of injured peripheral nerve. **Spine**. Jan;15(1):6-10, 1990.

RODRIGUES A. C.; SCHMALBRUCH H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. **Anat Rec**,243:430-437, 1995.

RODRIGUES, A.C.; SILVA, M.D.P. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. **Microsurgery**, New York, v.21, p.102- 107, 2001.

ROQUE D.D. **Enxerto venoso ao avesso e normal, com ou sem preenchimento de músculo, em regeneração nervosa de ratos.** 2008. 129f. Tese (Doutorado em bases gerais de cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROQUE J.S. **Enxertos venosos ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas em nervo misto de rato.** 2007. 138f. Tese (Doutorado em bases gerais de cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROSSER B. W.; DEAN M.S.; BANDMAN E. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. *Int J Dev Biol.*, 46:747-754, 2002.

ROY R. R.; MEADOWS I. D.; BALDWIN K. M.; EDGERTON V. R. Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. *J Appl Physiol.*, 52: 473–478, 1982.

SCHMALBRUCH H.; LEWIS D. M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 23:617-626, 2000.

SCHULTES, G.; GAGGL, A.; KLEINERT, R.; KÄRCHER, H. Vascularized vs non-vascularized nerve transfers : histologic study in rats. *J. Reconstr. Microsurg.*, Baltimore, v. 17, p. 637-642, 2001.

SNOW M. H. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat Rec* 207: 593–604, 1983.

SUNDERLAND S.; RAY L. J. Denervation changes in mammalian striated muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 13: 159–77, 1950.

SUNDERLAND S. Capacity of reinnervated muscle to function efficiently after prolonged denervation. **Archs Neurol. Psychiat.**, Chicago, 64, 755, 1950.

SUNDERLAND S. Nerves and nerves injuries. **Edinburg, Churchill Livingstone.** p. 483-650, 1978.

TANG, J. B. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v.11, n.1, p.21-26, 1995.

TERZIS, J.; FAIBISOFF, B.; WILLIAMS, H. B. The nerve gap, suture under tension versus graft. **Plastic. Reconstr. Surg.**, 56: 166-70, 1975.

TOMANEK R.J.; LUND D. D. Degeneration of different types of skeletal muscle fibres. **J. Denervation. F. Anat.**, 116,395, 1973.

TOS, P.; BATTISTON, M. D.; NICOLINO, S.; RAIMONDO, S.; FORNARO, M.; LEE, J. M.; CHIRILA, M. D.; GEUNA, S.; PERROTEAU, I. Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. **Microsurgery.** v.27(jan), p. 48-55, 2007.

TOWER, S. S. Atrophy and degeneration in skeletal muscle. **Am. F. Anat.**, 56,1, 1935.

ÜLKÜR, E.; YÜKSEL, F.; ACIKEL,C.; OKAR, I.; CELİKÖZ, B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. **Microsurgery**, New York, v.23, p.40-48, 2003.

VALENTINI R. F.; AEBISCHER P.; WINN S.R.; GALLETI P.M. Collagen-and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. **Exp. Neurol.**, 98: 350-356, 1987.

VAUGHAN, D. W. Effects of advancing age on peripheral nerve regeneration. **J. Comp. Neurol.**, New York, v.323, p.219-237, 1992.

VEÇOSO M. C. Laser em fisioterapia. São Paulo: **Lovise Científica**, 1993.

VERDÚ, E.; BUTI, M.; NAVARRO, X. The effect of aging on efferent nerve regeneration in mice. **Brain Res.**, Amsterdam, v.696, p.76-82, 1995.

VICENTE, E. J. D. **Estudo comparativo entre as técnicas de coaptação através da cola de fibrina derivada de veneno de serpente e da neurorrafia término-terminal no reparo do nervo ciático**. 1999. 110f. Dissertação (Mestrado em Anatomia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VICENTE, E. J. D. Nerve regeneration by using end-to-side neurorrhaphy technique: a comparative study. In : 6 WORKSHOP INTERNACIONAL DE MICROCIRURGIA 6., 2001, Avaré, **Anais...** Avaré, 2001, p. 13.

VIEIRA, S. & HOSSNE, W.S. Metodologia Científica para a Área de Saúde. Rio de Janeiro: Campus, p. 27-48, 2002.

VIGUIE C. A.; LU D. X.; HUANG S. K.; RENGEL H.; CARLSON B. M. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. **Anat Rec.**, 248: 346–354, 1997.

VITERBO, F.; TRINDADE, J. C.; HOSHINO, K.; NETO, A. M. Latero-terminal neurorrhaphy with and without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. In : ANNUAL SCIENTIFIC MEETING PLASTIC SURGICAL FORUM, 62., 1993, New Orleans. **Anais...** New Orleans : American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons, 1993b. p. 256-258.

WALKER J. B.; AKHANJEE L. K. Laser-induced somatosensory evoked potentials: evidence of photosensitivity in peripheral nerves. **Brain Res.** Oct 7;344(2):281-5, 1985.

WALKER, J. C.; BRENNER, M. J.; MACKINON, S. E.; WINOGRAD, J. M.; HUNTER, D. A. Effect of peripheral Window Size on Nerve Regeneration, Blood-Nerve Barrier Integrity, and Functional Recovery. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, p. 217-227, 2004.

WALSH D. M., LOWE A. S.; BAXTER G. D. An investigation on the effect of 820nm laser irradiation upon nerve conduction in the frog. Sciatic nerve victor, **Irish Journal of Medical Science.** 24: 23-24, 1995.

WALTERS E. H.; STICKLAND N. C.; LOUGHNA P. T. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. **J Muscle Res Cell Motil.**, 21: 647–653, 2000.

WALTON R. L.; BROWN R. E.; MATORY W. E. J. R.; BORAH G. L.; DOLPH J. L. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Plast. Reconstr. Surg.**, 84: 944-952, 1989.

WANG, K.K.; COSTAS, P.D.; BRYAN, D.J.; JONES, D.S.; SECKEL, B.R. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 14, p. 608-618, 1993.

WANG, K.K.; COSTAS, P.D.; BRYAN, D.J.; EBY, P. L.; SECKEL, B.R. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 16, p. 65-70, 1995.

WANG, K. K.; CERTRULO JR, C. L.; SECKEL, B. R. Tubulation repair of peripheral nerves in the rat using an inside-out intestine sleeve. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v.15, n.7, p.547-554, 1999.

WOLEDGE RC; CURTIN NA; HOMSHER E. Energetic aspects of muscle contraction. **Monogr Physiol Soc.**,41:1-357, 1985.

YAMASITA A.C. **AFNP- Análise funcional dos nervos periféricos. Desenvolvimento de um software flexível no estudo de regeneração periférica.** 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da USP.

YOSHIMURA K; HARII K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. **J Surg Res.**, 81: 139–146, 1999.

YOSHITANI, M.; FUKUDA, S.; ITOI, S.; MORINO, S.; TAO, H.; NAKADA, A. et al. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 133(3):726-32, 2007.

ZHAO, J.; CHEN, Z.; CHEN, T. Nerve regeneration after termino-lateral neurorrhaphy. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v.13, p.31-37, 1997.

ZHOU, Z.; CORNELIUS, C. P.; EICHNER, M.; BORNEMANN, A. Reinnervation-induced alterations in rat skeletal muscle. **Neurobiology**, 23:595-602, 2006.