Guataçara Schenfelder Salles Junior

**Estudo da regeneração nervosa em modelo experimental de ratos
diabéticos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. José Carlos
Marques de Faria

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Salles Junior, Guataçara Schenfelder

Estudo da regeneração nervosa em modelo experimental de ratos diabéticos /
Guataçara Schenfelder Salles Junior. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: José Carlos Marques de Faria.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Diabetes 3.Nervo ciático 4.Regeneração nervosa

USP/FM/DBD-043/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado
para as pessoas mais
importantes da minha vida,
meus pais **GUATAÇARA e ELIANE**,
minha esposa **GABRIELE**,
meu irmão **MURILO**.
Sem o estímulo e apoio deles eu
jamais conseguiria realizar
feitos tão importantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcus Castro Ferreira, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, admirável na luta pela seriedade e reconhecimento de nossa especialidade, e a quem devo a oportunidade no aprendizado da Microcirurgia Reconstructiva e no desenvolvimento das atividades científicas na USP.

Ao Professor Dr. José Carlos Marques de Faria, exímio Cirurgião Plástico e Microcirurgião, que muito me ajudou e estimulou no aperfeiçoamento em microcirurgia e por quem tenho grande admiração, pela oportunidade do aprendizado e a orientação dessa tese.

Ao Professor Dr. Fernando Hintz Greca, profissional e professor exemplar, com quem muito aprendi e continuo aprendendo, pelo incentivo e apoio na execução deste trabalho e pela chance de ingressar na vida acadêmica.

Aos Professores Drs. Gilvani Azor de Oliveira e Cruz e Renato da Silva Freitas, incansáveis incentivadores do aprimoramento científico, pela valorização de minha formação e oportunidade profissional na minha volta a Curitiba.

Aos Drs. Luiz Carlos Ishida, Paulo Tuma Jr. e Fábio Busnardo, médicos assistentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, que muito contribuíram na minha formação como Cirurgião Plástico e Microcirurgião, pelos ensinamentos profissionais e também morais.

Às minhas queridas e amáveis avós, Lile Salles e Ruth Antunes (*“in memoriam”*), por todo carinho que me concederam em diversas fases da minha vida.

Aos meus queridos sogros, Seu Daniel e Dona Vilma, por todo apoio e ajuda que sempre me deram e pelo exemplo de profissionais e pessoas que são.

À professora Dra. Dorly de Freitas Buchi, do Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas do Departamento de Biologia Celular da UFPR, e ao técnico histológico Herculano Salviano dos Reis Filho, pela ajuda no árduo e difícil trabalho de confecção das lâminas histológicas.

À professora Dra. Lúcia de Noronha, do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, pela contribuição na análise das lâminas histológicas e histomorfometria dos nervos.

À professora Márcia Olandoski, pela grande contribuição nas diversas análises estatísticas do trabalho.

Ao Prof. Dr João Carlos Domingues Repka, estimulador incansável do aperfeiçoamento acadêmico, pela oportunidade da iniciação científica quando ainda era acadêmico, e pela contribuição no modelo experimental de indução de diabetes.

À colega Emmanuella Oliveira, de Maceió-AL, pelo apoio e troca de informações importantes na execução deste trabalho.

Aos amigos, Bruno Cintra, de Aracajú-SE, Milton Rocha, de Recife-PE, Macus Barroso, de Salvador-BA, Hugo Nakamoto, Dimas Milcheski, Hélio Alves, José Augusto Brasil, Gean Scopel e Sandro Lemos, de São Paulo-SP, pelo apoio e aprendizado durante o período que estive em São Paulo.

Ao acadêmico Arthur Danila, da FMUSP, pela contribuição na fase de levantamento bibliográfico e na execução do experimento.

Ao acadêmico Seigo Nagashima, do curso de biologia da PUC-PR, pela ajuda nas árduas e trabalhosas análises histomorfométricas dos nervos.

Aos funcionários do Laboratório de Microcirurgia (LIM 4) da FMUSP, Maria Aparecida Moreira (*"in memorian"*), que muito me ajudou na execução da fase experimental do trabalho, e também Edna Maria Rodrigues dos Santos e Silvana Aparecida Biagione.

Aos funcionários e amigos Misael Gomes Barbosa, Álvaro Roberto Machado e Rosana Nunes Ferreira, pela ajuda no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUC-PR.

*Pouco conhecimento faz
com que as pessoas se
sintam orgulhosas. Muito
conhecimento, que se
sintam humildes.*

LEONARDO DA VINCI

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de quadros

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Anatomia, histologia e fisiopatologia das lesões nervosas.....	7
2.2 Regeneração nervosa.....	12
2.3 Neuropatia diabética.....	24
2.4 Tratamento cirúrgico das lesões nervosas.....	36
3. MÉTODOS.....	48
3.1 Normatizações.....	49
3.1.1 Manejo dos animais.....	49
3.1.2 Comissão de Ética.....	49
3.2 Animais.....	50
3.2.1 Caracterização da amostra.....	50
3.2.2 Ambiente de experimentação.....	50
3.3 Delineamento experimental.....	50
3.4 Indução do diabetes mellitus.....	51
3.5 Procedimento cirúrgico.....	53
3.6 Aferições I (ponderais, laboratoriais e funcionais).....	60
3.6.1 Massa corporal.....	60
3.6.2 Dosagens de glicemia.....	60
3.6.3 Teste da marcha (“Walking Track”)	62
3.6.4 Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados (eletroneurografia - ENG)	65
3.7 Sacrifício e coleta das peças.....	66
3.8 Processamento histológico dos nervos.....	67

3.9 Aferições II (anátomo-patológicas).....	68
3.9.1 Peso do músculo tríceps sural.....	68
3.9.2 Análise histomorfométrica.....	69
3.9.3 Análise histológica pela hematoxilina-eosina (HE).....	71
3.10 Análise estatística.....	72
4. RESULTADOS.....	74
4.1 Massa corporal.....	75
4.2 Glicemias.....	77
4.3 Teste da marcha (“ <i>Walking Track</i> ”)	81
4.4 Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados (eletroneurografia - ENG)	88
4.5 Peso do músculo tríceps sural.....	89
4.6 Análise histomorfométrica.....	92
4.6.1 Densidade axonal dos nervos ciáticos.....	92
4.6.2 Áreas das secções transversas das fibras nervosas, dos axônios e das células de Schwann.....	97
4.7 Análise histológica pela hematoxilina-eosina (HE).....	104
5. DISCUSSÃO.....	109
5.1 Animais.....	112
5.2 Nervo ciático.....	115
5.3 Indução do DM.....	116
5.4 Avaliações.....	121
5.4.1 Massa corporal.....	121
5.4.2 Glicemias.....	123
5.4.3 Teste da marcha (“ <i>Walking Track</i> ”)	125
5.4.4 Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados (eletroneurografia - ENG)	130
5.4.5 Peso do músculo tríceps sural.....	132
5.4.6 Análise histomorfométrica.....	134
5.5 Considerações finais e perspectivas futuras.....	143
6. CONCLUSÕES.....	146
7. REFERÊNCIAS	149

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Organização dos grupos e subgrupos do estudo.....	51
Quadro 2 – Fórmula de cálculo do índice de função ciática (IFC).....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indução do DM pela injeção intra-peritoneal de estreptozotocina no abdome dos ratos.....	52
Figura 2 – Rato fixado sobre a tábua operatória e com antissepsia da pata traseira direita com PVPI tópico.....	53
Figura 3 – Incisão longitudinal na pele da pata traseira direita do rato, extendendo-se até o plano muscular subjacente.....	54
Figura 4 – Divulsão da musculatura posterior da pata e exposição do nervo ciático.....	55
Figura 5 – Colocação de campo de borracha para maior contraste e visualização do nervo ciático.....	55
Figura 6 – Neurotomia do nervo ciático.....	56
Figura 7 – Neurorrafia primária término-terminal do nervo ciático.....	57
Figura 8 – Vista com maior ampliação da neurorrafia término-terminal..	57
Figura 9 – Ressecção de segmento de 1cm do nervo ciático.....	58
Figura 10 – Auto-enxerto ortotópico de segmento de 1cm do nervo ciático.....	58
Figura 11 – Sutura de pele com chuleio simples com náilon 4-0.....	59
Figura 12 – Dosagem de glicemia capilar por punção da cauda do rato. Monitor com tiras específicas mostrando nível glicêmico do animal.....	61
Figura 13 – Impressão da pegada do rato durante o teste da marcha. As linhas representam as distâncias mensuradas necessárias na fórmula para cálculo do IFC.....	63
Figura 14 – Teste da marcha do rato e impressões das pegadas deixadas.....	64
Figura 15 – Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais de ação musculares evocados. Estimulador deflagrando estímulos elétricos diretamente sobre o nervo ciático operado previamente e eletrodos de agulha ativo e de referência implantados na musculatura para captar o sinal.....	66
Figura 16 – Músculo tríceps sural da pata operada de rato do	

subgrupo diabético com neurorrafia, sendo pesado em balança de precisão.....	69
Figura 17– Lâmina histológica de segmento de nervo ciático de rato corado pelo método Tricrômico de Masson. As estrelas apontam a contagem dos axônios mielinizados regenerados.....	71
Figura 18 – Automutilação da pata operada de animal do subgrupo diabético com enxerto observada no pós-operatório.....	81
Figura 19 – Impressões de pegadas no teste da marcha com 60 dias. Padrão semelhante entre ratos do subgrupo controle com neurorrafia (A), do subgrupo controle com enxerto (B) e do subgrupo diabético com neurorrafia (C).....	84
Figura 20 – Músculo tríceps sural da pata operada de rato do subgrupo diabético com neurorrafia.....	92
Figura 21 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios (destacados nos círculos pontilhados amarelos) no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	94
Figura 22 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	94
Figura 23 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	95
Figura 24 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	95
Figura 25 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios	

no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	96
Figura 26 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	96
Figura 27 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. As linhas verdes pontilhadas correspondem ao menor diâmetro das secções transversas das fibras nervosas. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	100
Figura 28 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. As linhas vermelhas pontilhadas correspondem ao menor diâmetro das secções transversas dos axônios. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	100
Figura 29 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	101
Figura 30 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	101
Figura 31 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	102
Figura 32 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	102
Figura 33 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	103
Figura 34 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de corte	

transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X.....	103
Figura 35 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal trifasciculado do nervo ciático, com epineuro parcialmente íntegro (seta verde) e perineuro contínuo e bem delimitado (setas amarelas), estroma neural com axônios remielinizados (setas laranjas). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X.....	105
Figura 36 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, evidenciando axônios remielinizados (estruturas circulares com ponto central mais escuro), com diâmetros regulares e homoganeamente distribuídos no estroma neural, vaso sanguíneo neoformado (seta vermelha). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 200X.....	105
Figura 37 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal monofasciculado do nervo ciático, com contorno externo regular, perineuro (setas amarelas) bem delimitado e axônios remielinizados no estroma (seta laranja). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X.....	106
Figura 38 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, com axônios remielinizados (seta laranja) com diâmetros razoavelmente regulares e distribuídos homoganeamente no estroma neural, perineuro bem delimitado (seta amarela) e com vasos sanguíneos (seta vermelha). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 100x...	106
Figura 39 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal trifasciculado do nervo ciático, mostrando formação exuberante de tecido conjuntivo (setas vermelhas) entre os fascículos, estroma neural com axônios remielinizados (setas laranjas). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X.....	107
Figura 40 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de	

segmento distal tetrafasciculado do nervo ciático, com contorno irregular, mostrando falta de continuidade do perineuro (setas amarelas) em algumas áreas e estroma neural com axônios remielinizados (seta laranja). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X.....	107
Figura 41 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal bifasciculado do nervo ciático, com grande formação de neovasos (setas vermelhas), reação tecidual no perineuro (seta amarela), estroma neural preenchido por axônios remielinizados (setas laranjas) com distribuição razoavelmente heterogênea e diâmetros irregulares. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 100X.....	108
Figura 42 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, com a formação exuberante de tecido conjuntivo e neovasos (setas vermelhas) no perineuro e no estroma neural, axônios remielinizados (setas laranjas) heterogeneamente distribuídos no estroma e com diâmetros irregulares. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 200X.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvios padrões dos pesos corporais de cada subgrupo nos diferentes momentos de avaliação. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos.....	75
Tabela 2 – Médias (M) e desvios padrões (DP) das medidas de glicemias (mg/dl) dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos.....	78
Tabela 3 – Valores de p das comparações das glicemias nos diferentes momentos de avaliação dentro de cada subgrupo.....	80
Tabela 4 – Médias e desvios padrões do Índice de Função Ciática (IFC) dos subgrupos nos diferentes momentos. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos.....	82
Tabela 5 – Valores de p da comparação dos valores de IFC de cada subgrupo nos diferentes momentos.....	87
Tabela 6 – Médias e desvios padrões do peso (g) da musculatura tríceps sural do lado operado, do lado não operado e do índice de peso entre os lados. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos.....	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Variação de peso (g) dos subgrupos, nos diferentes momentos de avaliação.....	76
Gráfico 2 – Variação das medidas de glicemias(mg/dL) nos diferentes momentos de avaliação.....	79
Gráfico 3 – Evolução do IFC (% de perda da função normal) dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação.....	85
Gráfico 4 – Variação do IFC (% de perda da função normal) dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação.....	86
Gráfico 5 – Amplitude do potencial evocado na ENG. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos e os respectivos desvios padrões, assim como o valor de p da comparação dos 4 subgrupos.....	89
Gráfico 6 – Densidade axonal do nervo ciático (axônios/11869.33 μm^2). No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos, os respectivos desvios padrões e o valor de p da comparação entre os 4 subgrupos.....	93
Gráfico 7 – Áreas médias (μm^2) das secções transversas das fibras nervosas dos diferentes subgrupos. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos com os respectivos desvios padrões e o valor de p das comparações.....	97
Gráfico 8 – Áreas médias (μm^2) das secções transversas dos axônios dos diferentes subgrupos. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos com os respectivos desvios padrões e o valor de p das comparações.....	98
Gráfico 9 – Áreas médias (μm^2) das das secções transversas das células de Schwann dos diferentes subgrupos. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos com os respectivos desvios padrões e o valor de p das comparações.....	98

RESUMO

Salles Jr GS. Estudo da regeneração nervosa em modelo experimental de ratos diabéticos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: Embora a população diabética seja extremamente significativa e crescente nos últimos anos, os estudos envolvendo regeneração nervosa e diabetes mellitus (DM) não são muitos e, frequentemente, mostram resultados conflitantes e pouco conclusivos. O objetivo deste trabalho foi estudar a regeneração nervosa em ratos diabéticos. **MÉTODOS:** O trabalho foi realizado no Laboratório de Microcirurgia Experimental (LIM 4) do HC-FMUSP. Utilizaram-se 40 ratos machos, que foram separados em 2 grupos principais, cada um com 20 animais: grupo controle e grupo diabetes. Cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos de 10 animais: controle com neurorrafia término-terminal (CN), controle com enxerto de nervo (CE), diabético com neurorrafia término-terminal (DN) e diabético com enxerto de nervo (DE). A indução do DM foi feita pela inoculação de estreptozotocina na dose de 60mg/Kg, por via intraperitoneal e após 8 semanas os animais foram submetidos à cirurgia. Diversas avaliações foram feitas: massa corporal, glicemias, testes da marcha e eletrofisiológico, índice de peso do músculo tríceps sural (pata operada/não operada) e análises histomorfométricas. **RESULTADOS:** Ocorreram 3 óbitos, 1 no CN, 1 no DN e 1 no DE. Nas avaliações pós-operatórias o peso dos animais do grupo controle foi maior que o do grupo diabetes ($p<0,05$). Todos os ratos do grupo diabetes mostraram níveis glicêmicos bem superiores aos do grupo controle ($p<0,05$), mantendo-se sempre maiores que 200mg/dL. No 20º PO o teste da marcha foi mais próximo do normal nos animais do grupo controle do que no grupo diabetes ($p<0,05$), sendo melhor nos subgrupos com neurorrafia do que com enxerto de nervo ($p<0,05$). No 40º PO o panorama se manteve, exceto pela comparação do DN com o DE ($p>0,05$). Já no 60º PO o teste foi semelhante entre os animais do grupo controle (CN e CE) e o DN ($p>0,05$), se mostrando pior no DE ($p<0,05$). No teste eletrofisiológico com 60 dias de evolução, as amplitudes do potencial evocado foram semelhantes entre os subgrupos controles e diabéticos ($p>0,05$). O índice de peso do músculo tríceps sural foi maior no CN em comparação com os outros 3 subgrupos ($p<0,05$), não se verificando o mesmo nas demais comparações ($p>0,05$). No 60º PO não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na comparação dos subgrupos controles e diabéticos em relação à densidade axonal, medidas das áreas das secções transversas das fibras nervosas, dos axônios e das células de Schwann. **CONCLUSÕES:** O teste da marcha mostrou que a recuperação funcional foi mais rápida nos animais do grupo controle, porém, com 60 dias, o DN apresentava uma recuperação semelhante aos animais controles, ao passo que o DE ainda não. A resposta da musculatura tríceps sural ao estímulo do nervo ciático com 60 dias de evolução, verificada no teste eletrofisiológico, se mostrou parecida nos

animais controles e diabéticos, não havendo diferença estatística. A atrofia muscular, vista pelo índice de peso do músculo tríceps sural, foi menor em CN, porém sem diferença estatística entre CE, DN e DE. A densidade de axônios, assim como os calibres das fibras nervosas e dos axônios não foram estatisticamente diferentes nos animais diabéticos no 60º PO.

Descritores: ratos wistar, diabetes, nervo ciático, regeneração nervosa

ABSTRACT

Salles Jr GS. Nerve regeneration in an experimental diabetic rat model [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

INTRODUCTION: Although the diabetic population is highly significant and has been growing during the past few years, studies involving nerve regeneration and diabetes mellitus (DM) are rather uncommon, frequently demonstrating divergent results and few conclusions. The objective of this study is to evaluate nerve regeneration in diabetic rats. **METHODS:** The study was accomplished in the Experimental Microsurgery Laboratory (LIM 4) of the HC-FMUSP. The study included 40 male rats, separated into two main groups: 20 controls and 20 diabetic animals. Each group was then further subdivided into two subgroups with 10 animals in each: control with end-to-end neurorrhaphy (CN); control with nerve graft (CE); diabetic with end-to-end neurorrhaphy (DN); and diabetic with nerve graft (DE). DM was accomplished by intraperitoneal inoculation of 60mg/Kg of streptozocin and the animals underwent surgery eight weeks later. Various evaluations were performed: body mass, glycemias, walking and electrophysiology tests, triceps surae muscle weight index (operated/non-operated paw) and histomorphometric analysis. **RESULTS:** Three deaths occurred; one in CN, one in DN, and one in DE. In the postoperative evaluations the weight of the control animals was greater than that of the diabetic group ($p < 0.05$). All the rats in the diabetic group demonstrated glycemic levels very superior to those of the control group ($p < 0.05$), always remaining over 200mg/dL. On the 20th PO day, the walking test was closer to normal in the control group than in the diabetic one ($p < 0.05$), better in the neurorrhaphy subgroups than in the nerve graft ones ($p < 0.05$). On the 40th PO day the range was maintained, except for comparison of DN with DE ($p > 0.05$). Already on the 60th PO day, the test was similar among the animals of control group (CN and CE) and DN ($p > 0.05$), seeming worse on DE ($p < 0.05$). At 60 days the potential amplitudes of the electrophysiological test were similar among the control and diabetic subgroups ($p > 0.05$). Triceps surae muscle weight index was greater in the CN compared with the other three subgroups ($p < 0.05$), which was not seen in the other comparisons ($p > 0.05$). On the 60th PO day no statistically significant differences were observed when comparing the control and the diabetic subgroups regarding the axonal density, measure of the areas of the transverse sections of the nerve fibers, axons and Schwann cells. **CONCLUSIONS:** The walking test showed that the functional recovery was swifter in the control group animals. At 60 days, however, DN presented a recovery similar to that of the control animals, whereas DE still did not. Triceps surae muscle response upon stimulation of the sciatic nerve at 60 days, verified by the electrophysiological test, showed it to be similar in the control and diabetic animals, without a statistical difference. The muscular atrophy observed by the triceps surae muscle weight index was less in CN, however, without a statistical difference among CE, DN and DE. The axon

densities as well as the calibers of the nerve fibers and axons were not statistically different in the diabetic animals at 60 days PO.

Descriptors: rats, wistar, diabetes, sciatic nerve, nerve regeneration

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O manejo cirúrgico das lesões nervosas é procedimento usual na cirurgia plástica reconstrutiva, e faz parte do dia a dia do cirurgião plástico nas mais diversas situações, como trauma, compressões crônicas, lesões iatrogênicas, paralisia facial e lesões do plexo braquial. As técnicas cirúrgicas mais empregadas são as coaptações primárias e os enxertos nervosos autólogos (SPYROPOULOU et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2007; BRENNER et al., 2007; PAPALIA et al., 2007; BERIS et al., 2007).

Grandes avanços foram conseguidos no tratamento das lesões nervosas, devido ao maior conhecimento sobre sua fisiologia e pelo desenvolvimento de técnicas microcirúrgicas. Muitos casos ainda hoje não evoluem satisfatoriamente, estimulando assim, novas pesquisas nesta área.

O Diabetes Mellitus (DM) é problema de importância crescente na saúde pública em vários países do mundo, levando ao comprometimento tanto da produtividade, quanto da qualidade de vida e sobrevida do indivíduo. Em estudo global sobre a prevalência do DM, observou-se que os valores de glicemia média da população mundial subiram nos últimos anos. A prevalência do distúrbio endócrino em adultos foi de 9.8% em homens e 9.2% em mulheres em 2008, quando comparada às taxas de 8.3% e 7.5% respectivamente, em 1980. O número global de pessoas com DM aumentou de 153 milhões na década de 80, para 347 milhões nos últimos anos (DANAIEI et al., 2011). Nos EUA, os Centros de Controle e Prevenção de

Doenças reconhecem o DM como uma verdadeira epidemia, que tem afetado aproximadamente 8% da população americana, ou seja, mais de 23.6 milhões de pessoas. Se as tendências de crescimento se mantiverem estima-se que a prevalência alcançará um em cada três americanos (Centers for Disease Control and Prevention, 2008). Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA), em 2007 o DM foi responsável, como causa principal ou fator contribuinte, por mais de 231 mil mortes nos EUA*. O distúrbio endocrinológico já é responsável por cerca de 3.6% das mortes dentre as demais causas nos EUA (MAINARDES et al., 2007). No Brasil, o último censo do Ministério da Saúde sobre o diabetes mostrou uma prevalência de 7.6% na população entre 30 e 69 anos, o que equivale a algo em torno de 11 milhões de pessoas, sendo que 50% não conhecem o seu diagnóstico**. Os gastos com o seu tratamento, se relacionados às suas complicações cardiovasculares, renais, do sistema nervoso, visuais e de feridas, giram em torno de 174 bilhões de dólares anualmente nos EUA, além de ter um impacto incalculável na qualidade de vida dos pacientes (Centers for Disease Control and Prevention, 2008).

Embora a população diabética seja crescente nos últimos anos, os estudos envolvendo regeneração nervosa e diabetes não são muitos e, frequentemente, mostram resultados conflitantes e pouco conclusivos. A maioria dos trabalhos experimentais encontrados na literatura, lança mão de uma ou outra variável isolada para avaliação da regeneração nervosa, não reunindo, em um mesmo estudo, as mais diversas formas de avaliações

* Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/>

** Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/imprensa/estatisticas/numerosbrasil.php>

possíveis, tais como: análises funcionais, como o teste da marcha e o teste eletrofisiológico; mensuração do peso da musculatura inervada pelo nervo em estudo; histomorfometria; entre outras. Desta forma, muitas vezes não se consegue uma visão global da recuperação da função nervosa, avaliada por todas as suas vertentes, o que leva a conclusões muitas vezes incompletas.

O diabetes em fase crônica provoca alterações microvasculares, que reduzem o aporte sanguíneo aos tecidos. Diminui-se, assim, a perfusão de oxigênio tecidual, ocasionando complicações crônicas como neuropatias, nefropatias, retinopatias, osteopenias, úlceras plantares e amputações, entre outras.

A neuropatia periférica é uma das complicações observadas com frequência entre os pacientes diabéticos (DYCK et al., 1987; KRÓLEWSKI e WARRAM, 1985; POWELL et al., 1985). A sua gênese e evolução, no entanto, precisam ser bem caracterizadas, para que a eficácia dos diversos esquemas terapêuticos utilizados para o seu controle sejam melhor testados (MACHADO et al., 2000).

Alguns autores acreditam que há prejuízo na regeneração nervosa no DM, já que é possível que ocorra comprometimento microangiopático da *vasa nervorum*, o suprimento vascular dos nervos periféricos, acarretando ambiente local não favorável à regeneração do nervo (KENNEDY e ZOCHODNE, 2002). Apesar dessa hipótese ser tomada como certa por muitos, existe um frágil suporte científico na literatura para essa constatação (ELIASSON, 1965; SHARMA e THOMAS, 1975; BISBY, 1980; SHARMA et al., 1981; LONGO et al., 1986). Estudos clínicos, ao contrário, sugerem que

diabéticos podem ter adequada, ou até mesmo excelente recuperação funcional depois da descompressão de nervos periféricos nos membros superiores e inferiores (DELLON, 1992). Ensaio experimentais, na mesma linha, sugerem que adequada função pode ser conseguida seguindo a descompressão de nervos em ratos diabéticos com síndromes compressivas crônicas (DELLON et al., 1994).

As consequências da neuropatia diabética já são reconhecidas há muito tempo, sendo a úlcera plantar crítica na preservação dos membros inferiores nos pacientes com o distúrbio endocrinológico. No entanto, os resultados animadores de diversos trabalhos predizem que possa haver uma mudança na evolução natural da doença. Assim sendo, buscou-se estudar de maneira mais aprofundada a regeneração nervosa e, indagou-se sobre a real capacidade de se restaurar a função nervosa em ratos diabéticos.

Para testar tal hipótese o presente estudo teve como objetivos avaliar a regeneração nervosa em modelo experimental de ratos diabéticos, submetidos à neurorrafia término-terminal ou enxerto autólogo de nervo, utilizando para tanto diversas variáveis, tais como: a avaliação funcional, por meio do teste da marcha e o teste eletrofisiológico; avaliação da atrofia muscular, pela pesagem da musculatura; e avaliação histomorfométrica dos nervos.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISAO DA LITERATURA

2.1 Anatomia, histologia e fisiopatologia das lesões nervosas

Hipócrates, o “pai da medicina”, em meados do século IV a.C. foi o primeiro a descrever o tecido nervoso periférico, porém foi Galeno, no século II d.C., quem estabeleceu uma correlação entre lesão nervosa e alterações motoras e sensitivas (MAJNO, 1975 apud TERZIS e SMITH, 1990).

Novas descobertas sobre a anatomia e fisiologia dos nervos ocorreram após um longo período. Schwann, em 1839, descreveu uma célula presente nos tecidos neurais, hoje conhecida como célula de Schwann (CAUSAY, 1960 apud TERZIS e SMITH, 1990).

Atualmente já se conhece bastante sobre a anatomia e fisiologia do sistema nervoso periférico, entretanto muita informação ainda precisa ser buscada. Sabe-se que os axônios provenientes dos neurônios formam as fibras nervosas, e estas são envoltas por diferentes tecidos com a função de proteção e nutrição, constituindo assim os nervos (DA-SILVA, 1995a, 1995b). O nervo periférico é composto por fibras motoras, sensitivas e simpáticas, sendo que as motoras terminam nas junções neuromusculares e as sensitivas na pele, como terminações livres ou como receptores especializados.

Envolvendo a fibra nervosa estão as células de Schwann, que podem ser formadoras ou não de bainha de mielina (FROSTICK et al., 1998),

constituindo as fibras mielínicas e amielínicas, respectivamente (DA-SILVA, 1995a). As fibras nervosas são envoltas por um tecido conjuntivo frouxo conhecido como endoneuro (LUNDBORG, 1987), rico em colágeno tipo III e também fibroblastos sem membrana basal, mastócitos e células endoteliais (DA-SILVA, 1995a, 1995b). As fibrilas de colágeno endoneurais ficam distribuídas ao redor de cada fibra nervosa formando uma parede de sustentação conhecida como tubos endoneurais (LUNDBORG, 1987).

O agrupamento das fibras nervosas constituem os fascículos, que são formados por um tecido conjuntivo mais forte denominado perineuro (LUNDBORG, 1987). O perineuro é abundante em colágeno dos tipos I e III (MONTES et al., 1984), mostra-se denso e é o principal responsável pela resistência estrutural dos nervos periféricos. Tem fibroblastos dispostos em lamelas que atuam como uma barreira difusora e mecânica ao trauma externo, ajudando a preservar o microambiente intrafascicular (OLSSON et al., 1971, 1973).

Todos os fascículos são envolvidos em um único feixe, conhecido como epineuro, que tem como função basicamente servir como uma barreira protetora. O tecido conjuntivo areolar frouxo do epineuro é formado principalmente por fibras elásticas e colágenas, dispostas longitudinalmente, e células como fibroblastos, macrófagos e mastócitos (LUNDBORG, 1987).

O suprimento sanguíneo do nervo periférico é feito por meio de uma rica rede vascular formada por vasos provenientes do mesoneuro, que formam 2 plexos principais: um externo, constituído principalmente por vasos dispostos longitudinalmente no epineuro, e um interno, que fica entre

as lamelas do perineuro e emite ramos oblíquos que nutrem o endoneuro (LUNDBORG, 1971). A ruptura do plexo externo com manutenção da integridade do epineuro pode ocasionar hipertensão venosa intraneural e exudação protéica, que por período prolongado leva a invasão de fibroblastos e fibrose constritiva epineural (LUNDBORG, 1970). Já a ruptura da barreira hemato-nervosa do plexo interno pode levar ao edema endoneural e à “síndrome compartimental em miniatura”, que se desencadeia pela manutenção do quadro de hipertensão intraneural e evolução para hipóxia e necrose tecidual (LUNDBORG, 1975; LUNDBORG et al., 1983). A fibrose intraneural, que pode ser desencadeada pela presença de sangue no espaço intrafascicular e consequente proliferação de fibroblastos no endoneuro (GENTILI et al., 1980), compromete substancialmente a função do nervo periférico, levando à redução mecânica do transporte axoplasmático por constrição e gerando uma interface imprópria para que as trocas entre capilares e axônios ocorram de forma adequada (CURTIS et al., 1973). A isquemia do tecido nervoso, que pode resultar do aumento da pressão intraneural, acarreta o mal funcionamento das bombas de sódio-potássio (Na^+/K^+) e do sistema de transporte axoplasmático, dependentes de ATP para o funcionamento normal. É imprescindível a integridade desses sistemas para que a condução do impulso nervoso e a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas possa ocorrer adequadamente (RYDEVIK e LUNDBORG, 1981; EVERSMANN, 1993).

Há duas classificações de lesões nervosas que são as mais

consagradas da literatura. Ambas fazem uma correlação entre alterações microscópicas encontradas no nervo lesado e a sintomatologia desenvolvida pelo paciente.

A classificação de Seddon, de 1943, propõe três graus de lesão do nervo: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. Neuropraxia é a forma mais branda de lesão, não envolvendo perda da continuidade do nervo e cursando somente com alguma perda funcional, usualmente temporária, decorrente de um bloqueio da condução iônica no local da lesão. A axoniotmese é caracterizada por uma completa transecção do axônio e da bainha de mielina ao seu redor, porém, tanto o perineuro quanto o epineuro permanecem intactos. Observa-se normalmente denervação completa das estruturas inervadas distalmente ao ponto da lesão do nervo. Na neuropraxia e na axoniotmese o panorama de recuperação funcional após a lesão é muito bom, uma vez que as estruturas mesenquimais que envolvem as fibras nervosas são poupadas, e assim sendo, elas promovem um meio bastante propício para o brotamento axonal e reinervação do órgão alvo. O tipo mais grave de lesão é a neurotmese, que envolve uma descontinuidade total da estrutura neural, podendo até mesmo haver perda de substância, usualmente com perda funcional completa. A intervenção cirúrgica, por meio de sutura microcirúrgica para coaptação das extremidades do nervo seccionado, normalmente é mandatória para que a regeneração aconteça (SEDDON, 1943), haja vista que há formação cicatricial exuberante no local e perda das estruturas mesenquimais que têm grande importância em guiar os brotos axonais (LEMOS, 2008).

Sunderland, em 1968, propôs algumas modificações na classificação anterior, dividindo as lesões nervosas em graus de I a V. O grau I, equivalente à neuropraxia, é caracterizado pela perda de condução sem alterações estruturais no axônio. A lesão acomete exclusivamente a camada de bainha de mielina do nervo (FERREIRA, 1999) e a recuperação funcional normalmente é plena (LUNDBORG, 1987). O grau II, ou axoniotmese, consiste na perda da continuidade axonal resultando em degeneração Walleriana do segmento distal, porém os tubos endoneurais ficam intactos, tornando o prognóstico relativamente bom (LUNDBORG, 1987). Os graus III, IV e V têm em comum a neurotmese, que é a lesão com secção completa do nervo. No grau III isto se dá de maneira mais leve, sendo que o perineuro e a arquitetura da bainha de mielina são preservados, mas o axônio e o endoneuro são danificados. A regeneração e recuperação funcional pode se dar, entretanto se mostra bem menos efetiva que na axoniotmese, e vai ser tanto melhor ou pior dependendo da extensão da lesão do endoneuro. No grau IV a lesão atinge o perineuro, sendo que o nervo ainda mantém sua continuidade somente pela preservação do epineuro. A intervenção cirúrgica passa a ser muito importante nesse tipo de lesão, uma vez que pode ocorrer regeneração, contudo ela quase sempre é mal orientada e sem bons resultados funcionais. O grau V consiste na completa separação dos cotos nervosos, com perda total da sua continuidade. Obviamente o nervo deve ser suturado ou um enxerto interposto para refazer a continuidade (KIMURA, 1987).

A forma mais comum de lesão de nervos periféricos é a por

estiramento, que ocorre após uma tração que excede a capacidade de estiramento do nervo, apesar de sua elasticidade (BURNETT e ZAGER, 2004). O tipo de lesão que vem na sequência é a laceração do nervo, como nas lesões por ferimento de arma branca, respondendo por aproximadamente um terço das lesões mais graves (JACQUES e KLINE, 2000). O terceiro tipo mais comum é a compressão, caracterizada pela compressão mecânica local e pelo processo isquêmico associado ao nervo (LEMOS, 2008). O prognóstico de retorno da função nervosa depende do tipo e localização da lesão neural, idade do paciente e intervalo entre o diagnóstico e o tratamento (SCOPEL, 2007).

2.2 Regeneração nervosa

Nos primórdios da medicina havia uma certa incredulidade na regeneração de nervos, sendo o primeiro relato de regeneração nervosa feito por Galeno (131-201 d.C). A degeneração Walleriana foi descrita por Waller em 1850, demonstrando sua natureza e subsequente regeneração do tecido nervoso, e destacando a importância do corpo celular na manutenção da fibra nervosa do nervo periférico (WALLER, 1850 apud TERZIS e SMITH, 1990; BOYES, 1976).

O processo regenerativo neural pode ser dividido em zonas anatômicas, sendo elas: corpo celular do neurônio; segmento entre o corpo celular e o local da lesão; local da lesão; segmento distal entre local da lesão e órgão alvo e finalmente órgão alvo.

Uma série de processos degenerativos ocorrem no local da lesão nervosa e precedem a regeneração, sendo considerados de grande importância para o “preparo” das condições locais para o início do processo regenerativo. A regeneração nervosa se traduz como uma cascata de eventos que se seguem à lesão do nervo, caracterizando-se, inicialmente, pela remoção do tecido desvitalizado e pelo surgimento de brotamentos de crescimento axonais, até completar-se novamente toda a unidade neural que propiciará a recondução dos estímulos nervosos. O êxito do processo de regeneração nervosa é diretamente dependente da gravidade da lesão e do processo degenerativo que se segue, além é claro, de um microambiente propício à regeneração, composto por um substrato neural fundamental formado por: células de Schwann, fibroblastos perineurais, componentes da matriz extra-celular (laminina, fibronectina, moléculas de adesão) e fatores neurotróficos (BARDE, 1989; FIELDS et al., 1989).

Poucas horas após uma lesão nervosa, os axônios distais à lesão, assim como os proximais, até normalmente o nível do primeiro internodo, sofrem um processo degenerativo de desintegração. A degeneração do segmento proximal do axônio é idêntica à degeneração Walleriana vista no segmento distal, normalmente estendendo-se até o nódulo de Ranvier mais próximo, mas em alguns casos podem atingir até o corpo do neurônio e resultar em morte celular (HORCH, 1978). Os restos de axônio e de mielina resultantes são degradados parcialmente pelas células de Schwann em divisão e posteriormente transferidos para macrófagos endoneurais para serem fagocitados (THOMAS, 1964; WILLIAMS e HALL, 1971). As células

de Schwann formam um novo arcabouço, onde há condições favoráveis para o crescimento de novos brotos de axônios (MILLES, 1977). O processo regenerativo e degenerativo tem início praticamente ao mesmo tempo em lesões nervosas moderadas, diferentemente de lesões mais graves, em que a degeneração Walleriana já deve estar em curso para que a regeneração se inicie.

Após a fragmentação do axônio e da bainha de mielina, observa-se pela ultramicroscopia um desarranjo de neurotúbulos e neurofilamentos, com edema e deformação axonal, havendo perda da sua continuidade. As células de Schwann são imprescindíveis na degeneração Walleriana, demonstrando uma atividade celular aumentada já nas primeiras 24 horas da lesão, evidenciando-se à microscopia por um crescimento nuclear, citoplasmático, e aumento significativo do índice mitótico, levando à formação de células diferenciadas e adaptadas para conduzir o processo de degeneração e reparo da lesão. As células de Schwann ainda não diferenciadas têm função de remover os axônios e a mielina em degeneração. O processo de remielinização, com o alinhamento de células de Schwann de maneira a formar uma envoltura multilamelar sobre o axônio, resulta em axônios mielinizados parecidos com os originais não lesados, porém as distâncias internodais são menores, característica esta marcante dos nervos em regeneração (COSTA, 2001).

Juntamente com a proliferação das células de Schwann no segmento distal do nervo lesado, há uma migração de células provenientes de fora do nervo, como macrófagos (BEUCHE e FRIEDE, 1984), com importante

contribuição para fagocitose juntamente com as células de Schwann, e outras células menos abundantes, como linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (GRIFFIN e GEORGE, 1993; MUELLER et al., 2003). Tais células se destacam por seu papel na resposta imunológica que facilita a remoção de axônios e debris de mielina (PERRIN et al., 2005) e produção de citocinas e fatores neurotróficos importantes para a regeneração axonal (DAHLIN, 1995). Os macrófagos fagocitam debris celulares e são também responsáveis pela degeneração do axônio distal (PERRY e BROWN, 1992; WONG e CRUMLEY, 1995), mas tem outras funções, como secretar no local da lesão nervosa substâncias que estimulam a proliferação de células de Schwann e também fatores do crescimento, com destaque para NGF (fator de crescimento do nervo), IGF (insulin-like growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) e apolipoproteína-E. Assim sendo, os macrófagos auxiliam na remielinização (BOYLES et al., 1989) e no alongamento dos axônios (IGNATIUS et al., 1987). A fagocitose realizada pelos macrófagos engloba a mielina das células de Schwann, porém poupa o corpo celular, que permanece absolutamente intacto (MENGS e STOTZEM, 1987). As células satélites endoneurais liberam histamina e serotonina nas primeiras 2 semanas da lesão e geram aumento da permeabilidade capilar, facilitando a migração de macrófagos. A fagocitose e consequente “limpeza” do sítio da lesão demora entre uma semana e vários meses, embora já com 2 semanas se observe uma perda da estrutura anatômica e presença de debris de mielina e células de Schwann em proliferação. Entre 5 e 8 semanas são necessárias para que o processo degenerativo se complete e novas fibras

nervosas envolvidas por células de Schwann apareçam, podendo haver algum grau inicial de neurotização e mielinização após 4 semanas, assim como reestruturação de fascículos das unidades de regeneração (COSTA, 2001; LEMOS, 2008)

Terminado o processo degenerativo dos constituintes neurais, permanecem somente alguns microtúbulos dentro da estrutura do nervo, formados por células de Schwann e colágeno, também conhecidos como bandas de Büngner, e então se dá o reinício do processo de remielinização com brotamentos axoniais (KOEPPEN, 2004). O panorama favorável formado pela proliferação das células de Schwann dentro do nervo é fundamental para que haja a regeneração axonal (MILLESÍ et al., 1972; MILLESÍ, 1990), tendo em vista suas propriedades de fagocitose e produção de substâncias neurotróficas. Tais células funcionam como condutores físicos que guiam os axônios em crescimento até seus órgãos-alvo (COSTA, 2001). Pode ocorrer interrupção do crescimento axonal caso, ao invés da coluna de células de Schwann, os axônios entrem em contato com tecido conjuntivo (IDE, 1996).

Os sinais mais precoces da regeneração nervosa, já observados nas primeiras horas da lesão neural, são mudanças microscópicas no núcleo e corpo celular do neurônio, como: cromatólise, migração do núcleo para periferia e degeneração da substância de Nissl. Tais mudanças evidenciam uma alteração fundamental da função celular, que passa a priorizar o reparo, em detrimento da transmissão sináptica, podendo produzir grande quantidade de proteínas e lipídios para ajudar o crescimento axonal. As

atividades metabólicas dos neurônios ocorrem no corpo celular e seus produtos são transportados ao longo dos axônios, suprimindo as necessidades dos nervos (MACKINNON et al., 1988). Diversas funções metabólicas dos neurônios são alteradas após sua lesão, especialmente a síntese de RNA, que aumenta para maior produção de componentes protéicos do citoesqueleto, como tubulina, actina e neurofilamentos, necessários na regeneração. Diferentemente, a produção de neurotransmissores diminui, tendo em vista que a prioridade nesse momento é a reparação do citoesqueleto (MACKINNON et al., 1988).

O transporte axonal é mantido durante a regeneração do nervo, tendo papel fundamental na transferência de componentes do citoesqueleto do corpo celular até o axônio distal em crescimento (WONG e CRUMLEY, 1995). Esse transporte pode ser anterógrado ou retrógrado (SMITH e KORNBLIT, 1982). O anterógrado rápido tem função no deslocamento de materiais com papel funcional nas terminações nervosas (p. ex., neurotransmissores) ou na reconstituição da membrana plasmática (lípidos ou glicoproteínas), numa velocidade de 410 milímetros ao dia (DROZ et al., 1975). Já o anterógrado lento auxilia no movimento de componentes do citoesqueleto, num ritmo de 1 a 6 milímetros ao dia (LASEK et al., 1981), e consequentemente tem correlação direta com a velocidade da regeneração neural (MAIER e MCQUARRIE, 1990). O transporte retrógrado é feito numa velocidade constante de aproximadamente 240 milímetros ao dia, por meio de vesículas recicladas, e provavelmente serve para controlar o nível de atividade do corpo celular por mecanismo de retroalimentação negativa

(LUBISKA e NIEMIERKO, 1971). A interrupção da continuidade do axônio impede o transporte axonal e determina a perda da transmissão sináptica, de maneira mais rápida se a lesão for mais distal no axônio e próxima da sinapse, e mais lenta se o contrário (WONG e CRUMLEY, 1995).

As mudanças dos neurônios e dos axônios proximais à lesão, acontecem conforme sua gravidade e proximidade do segmento envolvido com o corpo celular. Este, por sua vez, pode até mesmo sofrer um processo degenerativo se o trauma for muito severo, levando a uma degeneração de todo o segmento proximal do nervo e conseqüentemente a uma redução da velocidade de condução. Muitos autores convergem na idéia de que o corpo do neurônio tem papel principal na regulação do processo regenerativo (GRAFSTEIN e MCQUARRIE, 1978), embora outros sugiram que o axônio possa regenerar independentemente do corpo celular (SEEDS et al., 1970; SHAW e BRAY, 1977). Tal interação complexa ainda é mal elucidada, porém o corpo do neurônio não se recupera de maneira completa se o axônio não restabelecer suas conexões com os órgãos alvo, e o calibre deste é dependente da recuperação daquele.

Inúmeros brotamentos de axônios do coto proximal de um nervo lesado avançam em direção ao coto distal (LUNDBORG, 1987), podendo ser terminais ou colaterais, estes últimos tendo origem nos nodos de Ranvier próximos à extremidade do coto proximal do nervo (MCQUARRIE, 1985). Um único axônio pode se multiplicar em vários, limitados pelo perineuro, e este fenômeno é conhecido como *sprouting*. Formam-se assim as unidades funcionais mínimas de regeneração (MORRIS et al., 1972; WONG e

CRUMLEY, 1995), que no início contém somente fibras amielínicas, mas que no decorrer do processo de regeneração se tornam mielínicas (SANDERS e YOLTNG, 1946). Os brotos axonais se regeneram ao longo do segmento distal na velocidade de 1 a 4 milímetros de comprimento por dia (BASSET et al., 1959). Nas extremidades de cada brotamento há a formação de projeções da membrana celular em forma de dedos, ou filopódios, que têm movimentos constantes e constituem o cone de crescimento. Este tem afinidade por substratos que tenham adesividade, como a laminina e a fibronectina da lâmina basal da célula de Schwann, sendo as propriedades químicas e físicas do substrato essenciais para o seu desenvolvimento (LUNDBORG, 1987). Quanto mais apropriado o substrato for, maior será o número de axônios que surgirá de uma mesma fibra nervosa (LETOURNEAU, 1975), fenômeno conhecido como neurotropismo (POLITIS et al., 1982; MACKINNON et al., 1986; LUNDBORG et al., 1988). Os brotos axonais formados seguem as células de Schwann até alcançarem as placas motoras e refazerem as conexões sinápticas mioneurais (SECKEL, 1990). Assim sendo, a taxa de crescimento axonal é decorrente da atividade do cone de crescimento na extremidade do broto axonal e da resistência oferecida pelos tecidos interpostos entre o corpo do neurônio e o órgão alvo a ser atingido. O cone produz uma protease que pode ajudar a dissolver o tecido que está bloqueando o seu caminho (KRYSTOSEK e SEEDS, 1981), entretanto, quando há uma lesão bastante severa com grande falha entre os cotos de um nervo, são formados obstáculos quase intransponíveis para os axônios em regeneração, que podem crescer em

direções erráticas e atingir tecidos circunvizinhos, ao invés dos órgãos alvos. Assim, apesar de muitos estudos demonstrarem que axônios em regeneração podem transpor longas distâncias com êxito, não existem garantias que eles vão seguir a direção original do fascículo (LEMOS, 2008).

Após o processo regenerativo atingir o seu ápice, o número de axônios do coto distal do nervo lesado pode ser consideravelmente maior que o do coto proximal, tendo em vista o enorme número de brotamentos que invadem as colunas de células de Schwann. Todavia, essa quantidade aumentada de axônios tende a regredir com o tempo, à medida que muitos brotamentos não realizam conexão com o órgão alvo e posteriormente desaparecem (LUNDBORG, 1987) ou, formam um neuroma, que representa a perda da função do nervo e muitas vezes cursa com dor. Sobrevivem apenas as fibras nervosas que estabelecem conexão com o coto distal do nervo e finalmente com o receptor final, levando à recuperação funcional (SANDERS e YOLTNG, 1946). Os diâmetros axonais também aumentam progressivamente na regeneração, na dependência do estabelecimento ou não de conexões funcionais com os órgãos alvo, não obstante, jamais vão atingir os mesmos tamanhos que tinham antes da lesão. Nas lesões nervosas muito proximais, em que há demora considerável até o axônio atingir o segmento mais distal, o endoneuro da porção terminal do nervo pode ter seu calibre consideravelmente reduzido, decorrente de ficar vazio por período prolongado de tempo, dificultando a velocidade de crescimento do axônio nesta região. Isto é observado se a entrada no segmento distal dos axônios em regeneração demorar mais do que algo em torno de 4

meses. Se os axônios alcançam com sucesso o endoneuro do segmento distal, mesmo que com calibre reduzido, há uma chance significativa de atingirem também o órgão alvo, decorrente das propriedades elásticas do endoneuro. Em contrapartida, se os tubos do endoneuro estiverem rompidos essa chance será menor.

Até em torno de no mínimo 12 meses após uma lesão nervosa a capacidade regenerativa do neurônio de um nervo periférico humano persiste e as junções sinápticas das placas motoras ficam preservadas sem nenhuma alteração na parte pós-sináptica da placa muscular, com os receptores de acetilcolina se tornando mais sensíveis (GORIO et al., 1983). Esta característica explica o fato de um músculo poder ser reinervado simplesmente ao implantar sobre ele um nervo motor, fenômeno conhecido como neurotização, contudo, o resultado funcional atingido não se compara com o obtido com o reparo do nervo motor original (MCNAMARA et al., 1987). Se a denervação do órgão alvo persistir após 12 a 24 meses, podem haver mudanças degenerativas nele, com o processo regenerativo axonal interrompido e o restabelecimento da função do nervo não alcançado (LEVI-MONTALCINI e HAMBURGER, 1951). Algumas alterações histológicas de órgãos alvos são bastante características na denervação prolongada, como a atrofia das fibras musculares, que em média reduzem em torno de 70% seu diâmetro no período de 2 meses, o posicionamento central, ao invés do habitual periférico, que os núcleos celulares assumem, dando o aspecto de células em alvo, e a proliferação exuberante de fibroblastos e consequente depósito de colágeno no endomísio e perimísio. A fibrose intramuscular que

pode se desenvolver limita a eficiência da contratilidade produzida pelo impulso nervoso. Eventualmente fibras musculares podem até serem reabsorvidas parcialmente, o que ocorre ao redor de 6 a 12 meses após a denervação. Outro fenômeno que pode prejudicar a recuperação funcional motora é a reinervação cruzada, em que um músculo originalmente com fibras de contração mais “rápidas” pode ser reinervado por axônios que innervavam fibras de músculos “lentos”, resultando em uma forma mista de reinervação e consequentemente uma contração ineficiente. Pode ocorrer a recuperação da parte motora, porém com déficit sensitivo, especialmente na propriocepção, o que resulta em um prejuízo funcional. Não obstante, os receptores sensoriais que ficam denervados podem retomar suas funções praticamente plenas mesmo que permaneçam por vários anos inativados (DAVIS, 1934), não havendo ainda consenso em relação ao período exato de sua sobrevivência. Alguns estudos mostram que a sensação protetora se recuperaria anos após a denervação, porém sendo captada por receptores sensoriais menos elaborados. Pode ocorrer também degeneração dos receptores sensoriais em lesões nervosas altamente graves, contudo, provavelmente não se atingirá uma recuperação sensorial plena.

A fisioterapia motora adequadamente empregada pode ter importante papel para ajudar a manter a musculatura denervada em boas condições até receber a reinervação pelos axônios em regeneração (LEMOS, 2008).

No dia-dia das mais diversas situações clínicas confrontadas, considera-se que a taxa de regeneração axonal é constante, sendo de 1 milímetro por dia, onde o avanço do crescimento do nervo envolvido pode

ser acompanhado pelo sinal de Tinel. Na literatura são encontradas diversas taxas de crescimento do nervo, indo desde 0,5 milímetro até 9 milímetros ao dia, sendo a variação relacionada a diversos fatores envolvidos. A taxa é inversamente proporcional à distância da lesão axonal até o núcleo do neurônio, idade do paciente, severidade da lesão (comprometimento do endoneuro, perineuro e epineuro) e duração da denervação. Observa-se também variações em diferentes espécies animais estudadas, técnicas de avaliação da regeneração, natureza da lesão e situação dos tecidos adjacentes ao nervo.

A degeneração e a regeneração nervosa devem ser absolutamente ordenadas para que o processo tenha êxito, e sendo assim, um mecanismo de retroalimentação entre as células é primordial. Isso ainda não está absolutamente claro, mas diversas pesquisas mostraram a provável existência de fatores tróficos, como o NGF (fator de crescimento do nervo), fator neurotrófico derivado de células cerebrais, fator neurotrófico ciliar, e outras moléculas semelhantes à cascata da resposta inflamatória, relacionados ao processo de reparação de lesões nervosas. (LEVI-MONTALCINI e HAMBURGER, 1951; BARBIN et al., 1984; YAN et al., 1992; YIN et al., 1998). O NGF é o fator mais estudado e conhecido até o momento, estando relacionado à sobrevivência e a manutenção da homeostase do neurônio, e provavelmente tem papel importante no processo de regeneração nervosa. Ele é constantemente liberado pelo axônio aos órgãos alvo e recaptado pelo cone de crescimento e transportado retrogradamente até atingir o corpo do neurônio (SLACK et al., 1983), se

ligando então a receptores específicos e transmitindo um sinal que controla a ativação de genes. A retroalimentação negativa, ou seja, quando o corpo celular não recebe o fator de crescimento, sinalizaria o início do processo de regeneração neural, consequente ao rompimento axonal ocorrido na lesão nervosa. Alguns trabalhos mostram que os macrófagos presentes no sítio da lesão também estimulariam a produção do NGF por meio da síntese de interleucina beta-1, assim como as células de Schwann.

2.3 Neuropatia diabética

Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome clínica caracterizada pela elevação da concentração da glicose plasmática que leva a complicações sistêmicas diversas a longo prazo (RODGER, 1991; NATHAN,1993). A doença pode ser classificada em subtipos, sendo que os dois principais são o diabetes tipo 1 e o tipo 2. Estas desordens diferem nas suas características genéticas, incidência e na fisiopatologia. No tipo 1 ocorre uma destruição da célula beta, normalmente por mecanismo autoimune, e com consequente diminuição na liberação de insulina. Já no tipo 2, a habilidade da célula beta em responder à glicose, com liberação de insulina, está prejudicada. Além disto a sensibilidade à insulina também está reduzida (insulino resistência) em relação aos tecidos periféricos, principalmente tecido muscular e adiposo.

A neuropatia diabética é a forma mais comum de neuropatia periférica nos países ocidentais (YASUDA et al., 2003). Usualmente se caracteriza por

ser bilateral, de distribuição difusa, distal, simétrica, principalmente sensorial, mas podendo ser sensitiva-motora (DELLON, 1988a, 2007; DELLON e MACKINNON, 1991; SAID, 2007). Ao menos metade dos pacientes com DM irão ser afetados por este tipo de polineuropatia (PIRAT, 1978; RATHER e BOULTON, 2005; WITZKE e VINIK 2005). Estima-se que, de alguma forma, a neuropatia diabética já afete entre 10 a 25% dos pacientes diabéticos dos EUA (DELLON, 1988a), sendo que 15% desenvolvem úlceras de pé. Outro dado alarmante é o fato de que mais de 80.000 amputações, não relacionadas à oclusão vascular, ocorrem todo ano, gerando desta forma custos enormes ligados aos cuidados de saúde (BOULTON et al., 2005).

Sempre foi aceito que a neuropatia diabética era progressiva e irreversível (MULDER et al., 1961; GREGERSON, 1967; NOEL, 1973; JAKOBSEN, 1976^a; PIRAT, 1978; THOMAS e ELLIASSON, 1984; KOZAK et al., 1984; DAVIDSON, 1986; WALKER, 1986; DYCK et al., 1986; DYCK et al., 1987; RATHER e BOULTON, 2005), sendo a evolução natural da doença a perda da sensibilidade, em seguida ulceração e infecção, e finalmente amputação do membro acometido (PIRAT, 1978; RATHER e BOULTON, 2005). O tratamento basicamente é voltado para o controle da hiperglicemia, manutenção do estado euglicêmico, prevenção de lesões tegumentares, especialmente onde a perda sensorial é maior, como nos pés, e ajuda no controle da dor por meio de medicações (gabapentina, amitriptilina, carbamazepina, fenitoína, etc), cujos efeitos colaterais muitas vezes são limitantes. Frequentemente este tipo de abordagem não obtém êxito, já que mesmo em pacientes que mantêm um controle glicêmico estrito,

com monitoramento diário do nível sérico de glicose, pode haver o desenvolvimento dos sintomas da neuropatia diabética (DELLON, 2002; 2004). O cirurgião praticamente fica resignado ao tratamento de infecções secundárias, ulcerações, deformidades do pé de Charcot, gangrena e amputações (DELLON et al., 1992; DELLON, 2004).

Particularmente relevante, no que concerne a preservação dos membros no paciente diabético, é a ocorrência de ulcerações nos membros inferiores, com uma incidência estimada de 2% (variando de 1 a 4,1%) ao ano entre todos os diabéticos (RAMSEY et al., 1999), uma prevalência de 4 a 10% e um risco estimado de 15% ao longo da vida (SINGH et al., 2005). Úlceras de pé constituem um verdadeiro desafio para pacientes e cirurgiões, sendo que o sucesso no seu tratamento depende de disciplina por parte do paciente, cuidados locais intensivos, minimização de fatores contribuintes, debridamentos e cirurgias reconstrutivas. Mesmo assim, as úlceras de pé de pacientes com DM tem alta propensão à recorrência e sua simples presença já é um preditor independente de aumento de mortalidade (RAMSEY et al., 1999), haja vista que indicam um controle deficitário da doença sistêmica crônica (DUCIC et al., 2011). A complicação mais devastadora do paciente diabético com úlcera de pé é a amputação do membro, cuja frequência é de 10 a 30 vezes maior que na população geral (SINGH et al., 2005), sendo a úlcera o principal fator de risco (RAMSEY et al., 1999; Centers for Disease Control and Prevention, 2008). A taxa de mortalidade de uma amputação varia de 39 a 89% em 5 anos, mostrando-se pior inclusive do que a maioria das doenças malignas (SINGH et al., 2005).

Assim sendo, o conhecimento da real etiologia da úlcera do pé diabético é de extrema relevância para os especialistas envolvidos com o tratamento desta doença. A neuropatia periférica vem sendo claramente demonstrada como o fator contribuinte mais comum, entre todos os já bem reconhecidos para formação de ulcerações, estando presente em 80% dos casos (DUCIC et al., 2011). Só a sua presença aumenta em 7 vezes o risco de ulceração de pé (YOUNG et al., 1994). A tríade composta por neuropatia periférica, deformidade biomecânica e microtraumas sobrepostos, é atribuída como sendo a causadora da maioria das úlceras de pé em pacientes com DM (REIBER et al., 1999).

Não há consenso sobre o exato mecanismo fisiopatológico do desenvolvimento da neuropatia diabética (ASBURY, 1988), embora muitos fatores são aventados (YASUDA, 1999). A etiologia vascular, que sempre foi tida como crítica na etiologia do pé diabético, pode ser menos relevante do que se acreditava previamente (LOGGERFO e COFFMAN, 1984).

Nos últimos anos têm sido demonstrado clinicamente e experimentalmente que anormalidades metabólicas do DM tornam o nervo periférico mais susceptível à compressão crônica (PERKINS et al., 2002; VINIK et al., 2004; DELLON et al., 1988b; DELLON, 2007). A possibilidade de que os sintomas da neuropatia diabética poderiam ser devidos ao aprisionamento subclínico de nervos periféricos foi sugerida primeiramente por Upton e McComas (1973) na hipótese do “duplo-esmagamento”. Tal hipótese dizia que “um nervo com uma compressão proximal estará mais susceptível à uma compressão distal”, e, “restrições múltiplas ao fluxo

axoplasmático dos axônios, isoladamente não sendo suficientes para causar sintomas clínicos, poderiam levar a uma disfunção neurológica quando associadas umas às outras”. Jakobsen e Sidenius (1980) demonstraram um fluxo axoplasmático diminuído em modelo experimental de DM, e outros autores também confirmaram tal observação (TOMLINSON e MAHER, 1984; DAHLIN et al., 1986; FINK et al., 1987; DELLON e MACKINNON, 1991). As mudanças patológicas promovidas pelo DM nos nervos periféricos agem como um “primeiro” esmagamento no nervo, e assim o predispõem a síndromes compressivas mais distais, especialmente em locais anatômicos de estreitamentos naturais (DELLON et al., 1988b; DELLON e MACKINNON, 1991). A teoria do duplo esmagamento foi extremamente importante na mudança do conceito tradicional de que a neuropatia diabética é progressiva, degenerativa e supostamente de tratamento não cirúrgico.

Dellon (1988a) ressaltou que os sintomas da neuropatia diabética poderiam ser decorrentes de compressões de múltiplos nervos, tendo como fisiopatologia o fato de que a hiperglicemia levaria a um aumento do volume dos nervos, decorrente do acúmulo de água por mecanismo osmótico, e conseqüentemente haveria uma maior susceptibilidade à sua compressão em áreas anatômicas fixas. Tais regiões normalmente são bastante estreitas e com baixa tolerância para variações de tamanho da estrutura nervosa (ASZMANN et al., 1997, ROSSON et al., 2009). Os maiores exemplos são os túneis do carpo no pulso, do tarso no tornozelo (MACKINNON, 1987), cubital no cotovelo (DELLON, 1988c) e fibular no joelho (DELLON, 2004). Todos levantamentos sobre a população com DM evidenciam uma grande

incidência de síndrome do túnel do carpo, alguns mostrando uma ocorrência 3 vezes maior que na população sem o distúrbio endócrino (PERKINS et al., 2002). Há também uma porcentagem significativa, de cerca de 7 a 14%, de DM entre os portadores de síndrome do carpo, diferente da incidência significativamente menor da população normal. No entanto, essa maior susceptibilidade à compressão nervosa também pode ser observada em pacientes alcoolistas, com desordens de tireóide, uremia ou deficiências vitamínicas (DELLON, 1988a).

Modelos experimentais de DM em ratos e primatas mostram que o achado histopatológico mais precocemente encontrado é o edema subperineural e endoneural. A fisiopatologia está na conversão aumentada, mediada pela enzima aldose-redutase, da glicose intraneural em sorbitol, que é hidrofílico e osmoticamente puxa água para o interior do nervo levando ao seu edema (JAKOBSEN, 1978; GRIFFEY et al., 1988; SHEETZ e KING, 2002). Outra alteração também evidenciada em pacientes diabéticos, é a diminuição no componente anterógrado lento do fluxo axoplasmático dos axônios, responsável pelo transporte de lipoproteínas necessárias para manutenção e reparo estrutural do nervo (JAKOBSEN e SIDENIUS, 1980). Adicionalmente, há um processo de glicosilação do colágeno do endoneuro em nervos periféricos de pacientes com o distúrbio endócrino, e isto acarreta uma redução do deslizamento do perineuro (DELLON, 2007). Este acúmulo de produtos finais de glicosilação intraneurais pode causar um retardo no transporte de proteínas axoplasmáticas para o reparo e a transdução de sinal (SUGIMOTO et al.,

2008). Por fim, tais produtos podem ainda criar um meio-ambiente inflamatório, que é prejudicial à função do nervo devido à produção de citocinas e formação de radicais livres por parte de monócitos e células endoteliais. Esse meio inflamatório contribui para a microangiopatia diabética, piorando desta forma a isquemia local (SAID, 2007), e pode também cooperar com o aprisionamento do nervo, alterando a normalidade do perineuro e dificultando o seu deslizamento (DUCIC et al., 2011). Essa tríade de alterações metabólicas verificadas nos pacientes com DM tornam o nervo susceptível à compressão (DELLON, 2004; 2007; SIEMIONOW e DEMIR, 2004), sendo que o acúmulo de água no interior do nervo é o fator mais crítico (JAKOBSEN, 1978). O edema colocará o nervo em risco de compressão dentro dos túneis anatômicos, causando aprisionamento que pode levar à isquemia distal por compressão da *vasa nervorum* (DYCK et al., 1985). O paciente com sinais e sintomas avançados de neuropatia diabética provavelmente apresentará à histopatologia uma compressão nervosa crônica associada à axoniopatia, com fibrose interfascicular.

Dellon et al. (1988b) demonstraram, em modelo experimental de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, uma maior susceptibilidade à compressão crônica de nervos periféricos na presença de hiperglicemia, detectada por exames eletrofisiológicos. Dellon E. e Dellon A. (1991), em modelo semelhante, evidenciaram pela primeira vez as anormalidades funcionais progressivas associadas com o DM, por meio do padrão característico neuropático de alteração da marcha dos ratos. Trabalhos subsequentes também evidenciaram a neuropatia progressiva de ratos

diabéticos, por meio de alterações dos testes de análise do padrão da marcha (KALE et al., 2003) e por avaliação da força muscular (SIEMIONOW et al., 2007).

Conti et al. (2002), em modelo experimental de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, observaram nas fases iniciais do distúrbio endócrino uma infiltração com morte de monócitos e macrófagos nos nervos ciáticos dos animais. Concomitantemente verificou-se o aumento da expressão endoneural de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina beta-1, e receptores de neurotrofinas (p75NTR). Os achados parecem indicar que tanto os macrófagos quanto a interleucina beta-1 podem estar envolvidos na patogênese da neuropatia diabética.

Yasuda (1999) testou experimentalmente a influência da deficiência na produção de óxido nítrico e disfunção dos canais iônicos na patogênese da neuropatia diabética. Sugeriu que a falta do óxido nítrico pode estar envolvida na hiperalgesia, e a disfunção dos canais iônicos pode levar ao influxo de cálcio e elevação do potássio circulante, podendo contribuir com a degeneração nervosa e a diminuição da condução nervosa respectivamente.

Quando o nervo periférico do paciente com DM, usualmente com volume aumentado, cruza áreas anatômicas normais de estreitamento, ele sofre um aumento das pressões externas. O paciente com neuropatia diabética tem sintomas que incluem queixas sensoriais (dormência, formigamento, dor, anestesia), queixas motoras (fraqueza muscular) e alterações do sistema nervoso autonômico (pele seca e mais grossa) (DELLON, 2002; 2004). A neuropatia considerada “assintomática” pode

apresentar-se de outras formas, como a osteoartropatia neuropática (artropatia de Charcot) e por meio de quedas frequentes, decorrentes da dificuldade de equilíbrio pelas perdas proprioceptivas (DELLON e MACKINNON, 1991; SAID, 2007).

Os sinais clínicos mais confiáveis para identificação de uma compressão nervosa são a sensibilidade do nervo no local de sua passagem por um estreitamento anatômico natural, ou, mais frequentemente, a irradiação distal da parestesia na sua distribuição específica, quando realizada a percussão sobre o nervo específico (DELLON, 2002; DUCIC et al., 2011), referida como um sinal de Tinel positivo (DELLON, 1984). A presença do sinal vai variar dependendo da progressão da anormalidade neurológica, podendo inicialmente ser positivo e posteriormente se tornar negativo, uma vez que a degeneração nervosa piore (DUCIC et al., 2011).

A neuropatia periférica diabética se apresenta em uma distribuição anatômica característica (DUCIC et al., 2011), classicamente em luva ou meia, dependendo dos nervos acometidos, sendo os sintomas normalmente piores nos membros inferiores que nos superiores (DELLON, 2004). Em contraste, quando há compressão crônica somente de um nervo específico, como por exemplo na síndrome do túnel do carpo, haverá sintomas semelhantes, porém abrangendo somente a região inervada pelo nervo em particular (MACKINNON e DELLON, 1988; DELLON, 2002; 2004). Na forma em luva pode haver compressão do nervo mediano no punho, nervo ulnar no cotovelo ou nervo radial sensitivo no antebraço (DELLON et al., 1986). Normalmente tais compressões nervosas dos membros superiores não

tendem à formação de úlceras como nos membros inferiores, porém podem causar prejuízos funcionais severos, dor e atrofia muscular, se não tratadas. Assim o objetivo do tratamento nos membros superiores é a preservação da função, enquanto nos membros inferiores a preservação do membro (DUCIC et al., 2011). Na distribuição em meia, o nervo fibular comum pode estar comprimido na cabeça da fíbula (MACKINNON e DELLON, 1988), o nervo tibial no túnel do tarso, assim como outros nervos importantes para a sensibilidade do pé, como o sural lateral, o cutâneo lateral da perna e o fibular profundo. A síndrome do túnel do tarso nos membros inferiores é análoga à síndrome do túnel do carpo nos membros superiores (KECK, 1962; LAM, 1962). As distribuições clássicas em luva e meia são mais claras somente quando múltiplos nervos estão envolvidos, caso contrário o quadro clínico não é tão evidente. A desordem metabólica provocada pelo DM pode levar ao aumento do nervo e à sua compressão em qualquer parte do seu trajeto, desde o forame neural, como provavelmente o ponto mais proximal, até pontos anatômicos mais distais, podendo haver mais de um único ponto de estreitamento contribuindo para uma disfunção nervosa progressiva (DELLON, 2002; 2004). Quando as áreas de parestesias ou dormências refletidas na pele do paciente diabético não coincidem com a distribuição conhecida de um nervo periférico, o envolvimento de múltiplos territórios nervosos sobrepostos pode estar ocorrendo, ou uma outra causa deve ser investigada, diferente da neuropatia periférica cirurgicamente tratável pela descompressão (DUCIC et al., 2011).

A compressão do nervo por tempo prolongado pode ocasionar aumento da pressão intraneural, diminuição do fluxo sanguíneo (LUNDBORG e RYDEVIK, 1973) e isquemia relativa (LUNDBORG, 1970; 1971; DELLON, 2004), clinicamente se manifestando por queixa de parestesias como dormência e formigamento (DELLON, 2002; DELLON, 2004). O acúmulo de produtos finais de glicosilação no interior do nervo tornam-o mais enrijecido, e a ligação não-enzimática da glicose ao colágeno dentro do nervo e no epineuro diminuem a sua elasticidade (DELLON, 2004). Consequentemente a capacidade de deslizamento e elasticidade do nervo periférico ficam prejudicadas, o que gera uma maior tensão e stress do nervo quando ele passa pelas articulações ou cruza áreas anatômicas de estreitamento, podendo também acarretar uma diminuição no fluxo sanguíneo (RYDEVIK e LUNDBORG, 1981). No paciente diabético, o fluxo axoplasmático reduzido dos axônios faz com que o nervo não possa transportar estruturas protéicas necessárias para reparar ele mesmo (DELLON, 2002). Quando o paciente com neuropatia diabética demonstra sintomas como perda de massa muscular, disfunção sensorial persistente e perda da discriminação de 2 pontos, mudanças estruturais importantes como desmielinização segmentar e degeneração Walleriana já ocorreram no nervo, de modo a causar a perda da sua função (DELLON, 1988a).

Normalmente a polineuropatia diabética se mostra com alterações funcionais e estruturais mais severas no DM tipo I do que no tipo II e no DM experimental (PIERSON et al., 2003).

Tradicionalmente os testes eletrodiagnósticos são usados para diagnosticar a compressão de um nervo periférico, neuropatia ou compressão da raiz nervosa. Entretanto, frequentemente a neuropatia diabética é tão avançada que nenhuma condução é evidenciada no exame, e às vezes a velocidade de condução e a amplitude estão tão diminuídas, que tecnicamente é impossível de se diagnosticar uma compressão nervosa sobreposta à neuropatia (KIMURA et al., 1979), situações em que o exame físico do paciente é imprescindível para se fazer a distinção (DELLON, 2004). Existem outras formas de examinar a neuropatia diabética: testes sensitivos-motores computadorizados, vibrometria, monofilamentos de Semmes-Weinstein, entre outros. A vibrometria tem valor limitado já que não tem a capacidade de mostrar ao cirurgião qual nervo específico pode estar sendo comprimido (DELLON, 2002). Os monofilamentos de Semmes-Weinstein (número 5.07) podem ser úteis em identificar um indivíduo diabético que perdeu a sensibilidade protetora, por exemplo do pé, e conseqüentemente se encontra com grande risco de desenvolvimento de ulceração (HOLEWSKI et al., 1988; SOSENKO et al., 1990; KUMAR et al., 1991; MUELLER, 1996; RONNEMAA et al., 1997; ARMSTRONG et al., 1998). Diferentemente, o PSSD (*Pressure-Specified Sensory Device*, Sensory Mangement Services, LLC, Baltimore, Maryland) é capaz de identificar o grau mais precoce de compressão nervosa crônica, por meio da mensuração da pressão necessária para o indivíduo fazer a discriminação de um e dois pontos tocando sua pele (MACKINNON et al., 1985; DELLON et al., 1992; DELLON, 2002). O PSSD é no mínimo tão sensível e específico

quanto os tradicionais estudos eletrodiagnósticos na detecção de neuropatias compressivas, não obstante, ele não é invasivo e doloroso, e choques elétricos não são necessários para sua realização (TASSLER et al., 1995; WEBER et al., 2000). Em termos de prognóstico, se o limiar de pressão é anormal mas a discriminação de dois pontos ainda está presente, a recuperação deve ser relativamente rápida. Entretanto, se a discriminação de dois pontos já não está mais presente, a recuperação ocorrerá de forma mais lenta, haja vista que a taxa de regeneração nervosa é de 1 polegada (2,54cm) ao mês, presumindo-se que o nervo da pessoa com DM se regenera na mesma velocidade que em uma pessoa sem o distúrbio metabólico (DELLON, 2004). A Associação Americana de Diabetes (ADA) recomenda que mesmo os pacientes diabéticos com baixo risco de ulceração devem fazer um teste quantitativo sensorial do pé, anualmente (ASBURY e PORTE, 1995a; 1995b).

2.4 Tratamento cirúrgico das lesões nervosas

A primeira neurorrafia documentada data de 600 d.C., realizada por Paulo de Argina. Outros diversos relatos de reparo de lesões nervosas ocorreram no século IX e X, com Rhazes (850-932) e Avicenna (980-1037) (BRUSHART e SEILER, 1987; SUNDERLAND, 1991; ZHAO et al., 1992). Galvani, no fim do século XVIII, utilizou o microscópio óptico em experimentos animais, demonstrando uma relação importante entre nervos, contração muscular e estímulo elétrico.

O entendimento mais aprofundado e a evolução no tratamento das lesões nervosas só se deu nos séculos XIX e XX, com destaque para Paget, que em 1847 realizou com sucesso uma neurorrafia do nervo mediano em uma criança de 11 anos de idade, e também para os experimentos com enxertos de nervo de Vulpian em 1870 (WILGIS, 1982). A 1ª Guerra Mundial (1914-1918) trouxe grande contribuição para o tratamento de lesões graves de nervos, com grande desenvolvimento das técnicas de enxertos nervosos autólogos. Nesse período se destacaram Mayo-Robson (1917), Wyeth-Taylor (1920), Delangeniere (1924), Bunnell (1927). A 2ª Guerra Mundial (1939-1945) também trouxe grande avanço nesse campo, destacando-se Seddon, que estudou diversos tipos de lesões nervosas periféricas conduzidas com reparo primário ou enxertos autólogos, e Strange, que relatou a primeira transferência de nervo com pedículo vascular para reparo de grandes defeitos em 1947.

Um grande passo para que os resultados dos reparos de lesões nervosas fossem melhores e mais previsíveis foi a introdução da magnificação da visão por meio de lupas e microscópios na década de 60, fundamentados com o advento da microcirurgia reconstrutiva. Foram figuras proeminentes nesse período Jacobson (JACOBSON et. al., 1963), Gabrielson e Stenstrom (GABRIELSON e STENSTROM, 1966), Wise (WISE et al., 1969). Millesi (1977) aperfeiçoou a aplicação dos princípios da microcirurgia, obtendo melhores resultados no tratamento de lesões nervosas.

Basicamente a conduta cirúrgica indicada para cada caso baseia-se principalmente no tipo de trauma, aberto ou fechado, e no grau da lesão nervosa. Em casos de lesões nervosas com neurotmele a neurografia término-terminal é o método escolhido sempre que for possível (SUEMATSU, 1989; TERRIS et al., 1993). Traumas e grandes ressecções tumorais podem resultar em extensas perdas de segmentos de nervos, de modo que a reparação primária pode não ser possível. Os efeitos deletérios da tensão no nível da sutura dos nervos e a extrema utilidade do emprego de enxertos nervosos autólogos, em casos de perda segmentar, foram demonstrados e depois popularizados por Millesi (MILLESI et al., 1972). O uso de enxertos nervosos autólogos foi desenvolvido com o intuito de seguir a regeneração axonal, preenchendo-se o espaço que ficava entre os cotos proximal e distal do nervo e consequentemente reduzindo-se a tensão das linhas de sutura, que sabidamente inibe de maneira drástica a regeneração neural (TERZIS et al., 1975).

O uso de enxertos de nervo possibilitou grandes avanços no manejo de lesões com grande perda de tecido neural, sem no entanto evitar sequelas e déficits funcionais em muitos casos. Diversos trabalhos estudaram condutores de crescimento axonal como alternativa para o uso de enxertos nervosos autólogos, tendo como intuito se evitar morbidade na área doadora, disponibilizar material para defeitos que demandariam retiradas extensas de tecido autólogo, às vezes não disponíveis, e poupar tempo da retirada do enxerto (BRUNELLI et al., 1994; KEELEY et al., 1991). Em modelo experimental de ratos, utilizando-se tubo de ácido poliglicólico e

FK506 no reparo de perdas segmentares de nervos periféricos, verificou-se que o grau de recuperação funcional obtido com a interposição do condutor tubular, como ponte entre os cotos do nervo, associado à droga imunossupressora ou ao enxerto autólogo de nervo, não foi significativamente diferente do obtido com o grupo tratado somente com o autoenxerto de nervo (COSTA, 2001).

Já em casos de lesões sem a perda de continuidade do nervo, somente com sinais de compressão, contusão ou hematoma, não estão ainda estabelecidos os possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão e, sendo assim, a opção por conduta expectante ou cirúrgica não é bem definida. Alguns casos podem evoluir com completa recuperação embora sem intervenção cirúrgica e, em outros, a recuperação é lenta e somente parcial. Em um modelo experimental de hematoma intraneural associado à compressão extrínseca do nervo ciático de ratos, a descompressão cirúrgica associada à epineurotomia mostrou uma redução na perda de fibras mielínicas e uma recuperação funcional mais rápida (SCOPEL, 2007). Em síndromes compressivas crônicas, com importante sintomatologia e refratariedade a tratamentos clínicos e posturais adequados, a realização de neurólise interna, ou seja, exploração do nervo e neurólise intrafascicular, pode ser capaz de determinar melhora adicional quando comparada à simples descompressão nervosa (MACKINNON et al., 1988). Entretanto não é procedimento sem risco de complicações significativas, podendo causar danos adicionais à estrutura nervosa, como a fibrose de todas as camadas do nervo (RYDEVIK et al., 1976).

Diversos estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos da descompressão de nervos periféricos na população com DM. A seleção dos pacientes com neuropatia diabética, candidatos ao procedimento de descompressão nervosa, começa pela medida da função do nervo periférico e estadiamento do seu grau de disfunção (DELLON, 2001).

Dellon (1988a) levantou a hipótese de que a grande maioria dos sintomas da neuropatia diabética fossem devidos à compressão de nervos periféricos em locais de estreitamento naturais. Segundo o autor, haveria assim uma razão de otimismo no tratamento da patologia, uma vez que se o cirurgião não pode atuar diretamente sobre a “neuropatia metabólica” em si própria, seria capaz de intervir cirurgicamente e fazer a liberação da compressão nervosa. A hipótese apresentada explicava ainda o porquê dos diversos tratamentos bioquímicos testados experimentalmente para neuropatia diabética, como suplementos alimentares de mioinositol e inibidores da aldose-redutase, não apresentarem a melhora esperada na sintomatologia em estudos clínicos (MARTYN et al., 1987; DYCK et al., 1988; SIMA et al., 1988; ASBURY, 1988). As alterações bioquímicas precoces observadas na neuropatia metabólica podem não ter correlação com a sintomatologia clínica, e somente com o tempo vão tornar o nervo propenso à compressão e assim os sintomas se manifestarão (DELLON, 1988a).

Dellon (1992^a) realizou um estudo prospectivo com pacientes diabéticos tipo I e II submetidos à descompressão nervosa cirúrgica dos túneis do carpo, cubital e do tarso, respectivamente para liberação cirúrgica

dos nervos mediano, ulnar e tibial. A recuperação de uma excelente discriminação de dois pontos após a cirurgia foi vista em 96% dos casos de descompressão do túnel do carpo e, em 82% de descompressão do nervo ulnar, resultados similares aos obtidos para pacientes não diabéticos que apresentavam as respectivas síndromes compressivas dos nervos (MACKINNON e DELLON, 1988). Em 31 nervos tibiais submetidos à descompressão do túnel do tarso, totalizando 22 pacientes, nenhum deles apresentando ulceração ou amputação no pré-operatório, obteve-se uma melhora da dor em 85% dos pacientes e melhora da discriminação de dois pontos em 72%, com 0% de aparecimento de úlceras no pós-operatório. Wieman e Patel (1995), em 33 nervos tibiais descomprimidos do túnel do tarso, em 26 pacientes, 13 dos quais apresentando úlceras de pé no pré-operatório, demonstraram 92% de melhora da dor, 72% da discriminação de dois pontos e 83% de melhora das úlceras, com 7% de recorrência de ulcerações. Chafee (2000) descomprimiu 58 nervos tibiais, liberando o túnel do tarso de 36 pacientes, sendo que 11 já tinham úlceras e 6 algum grau de amputação prévios ao procedimento cirúrgico. A melhora da dor foi observada em 86%, melhora da sensibilidade protetora (ao toque) em 50%, e não houve recorrências das úlceras. Aszmann et al. (2000), analisando estudos prospectivos, cegos, de pacientes diabéticos submetidos às descompressões nervosas cirúrgicas, mostraram uma melhora de 88% na sensibilidade dos membros superiores e 60% dos inferiores. Os resultados dos trabalhos mostraram que os sintomas da neuropatia diabética sensitiva-motora podem ser devidos, pelo menos parcialmente, à compressão de

múltiplos nervos periféricos, sugerindo que a descompressão cirúrgica de tais nervos pode levar a melhora da sintomatologia.

Dellon et al. (1994) testaram os efeitos da descompressão do túnel do tarso em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, constatando que, se a descompressão nervosa fosse feita antes do início da desordem metabólica, os ratos não evoluíam com o padrão característico de alteração da marcha visto nos animais diabéticos, pelo contrário, mostravam um padrão de marcha semelhante ao de ratos normais. Até mesmo em ratos com controle glicêmico totalmente insuficiente não foram observados sintomas de neuropatia diabética, sugerindo que mesmo se a neuropatia “metabólica” subjacente não pudesse ser corrigida por meio do uso de medicamentos, os sintomas relacionados com a compressão nervosa crônica sobreposta, poderiam ser tratados pela descompressão do nervo periférico. Outros estudos com modelo experimental semelhante foram conduzidos e também mostraram que a função do nervo periférico obtinha uma melhora em ratos diabéticos quando a compressão do túnel do tarso não estava presente. Havia também uma melhora adicional da parte funcional, determinada pelos testes de marcha do rato, que resultava da abertura do epineuro (KALE et al., 2003; SIEMIONOW et. al., 2007).

Dellon (1996, 2002, 2004) observou que o alívio de parestesias e dor no pé do paciente com DM, e frequentemente até a correção da fraqueza da musculatura intrínseca, podiam ser conseguidos pela descompressão, um a um separadamente, dos 4 túneis mediais do tornozelo, ou seja, o túnel do tarso, os túneis próprios separados dos ramos plantar medial e lateral, além

do ramo calcâneo do nervo tibial. Desta forma consegue-se restabelecer a sensibilidade de todos os artelhos e da planta do pé (DELLON, 2004). Outros estudos têm demonstrado que a descompressão do túnel do tarso reduz a instabilidade do equilíbrio do paciente, decorrente da perda da sensibilidade plantar observada na neuropatia diabética tibial (DUCIC et al., 2006).

A capacidade de restaurar a sensibilidade do pé do paciente com DM prediz que possa haver uma prevenção da formação de úlceras e consequente necessidade de amputações. Essa constatação pôde ser melhor evidenciada em um grupo de 49 pacientes acompanhados por alguns anos (média de 4.5 anos), que foi submetido à descompressão nervosa da perna e pé somente de um lado do corpo, e do outro não. Nenhum destes pacientes tiveram o desenvolvimento de úlcera do pé ou necessitaram de amputação no lado em que foi realizada a cirurgia de descompressão nervosa, diferentemente do lado oposto não operado, onde foram constatados 10 casos de úlceras e 4 amputações, sendo a diferença estatisticamente significativa (DELLON, 2002; 2004). Em outra revisão retrospectiva de 50 pacientes com DM submetidos à descompressão dos nervos tibial e fibular em somente uma das pernas, foi observado que nenhuma úlcera ou amputação ocorreu no lado operado, ao passo que foram constatados 15 pacientes com úlceras no lado não operado. O tempo de acompanhamento médio foi de 4 anos e meio, observando-se diferença estatisticamente significante entre os 2 lados (ASZMANN et al., 2004).

Quanto mais precocemente o paciente com sintomas de neuropatia diabética for submetido ao tratamento cirúrgico, melhores as chances do alívio sintomático. Se o indivíduo se encontra em um estado mais avançado da doença, com a discriminação de dois pontos já não mais possível, é provável que a intervenção cirúrgica de descompressão nervosa já tenha passado do seu melhor momento de indicação e não traga os mesmos benefícios esperados, caso fosse realizada mais precocemente. Uma quantidade significativa de axônios sensitivos geralmente se encontra degenerada quando há ulceração de pé. Neste estágio, somente a restauração da sensibilidade protetora é possível pela descompressão do nervo periférico. Se testes de sensibilidade puderem ser feitos mais precocemente nos pacientes com sintomas de neuropatia, a capacidade para restaurar a sensação mais apurada (dois pontos de discriminação) pode ser oferecida em um estágio mais precoce da doença, resultando em recuperação o mais próximo da normalidade (DELLON, 2000; 2002, 2004).

O melhor indicador prognóstico para se obter um bom resultado com a descompressão cirúrgica de um nervo periférico, em um paciente com DM e sintomas de neuropatia, é o sinal de Tinel positivo (DELLON, 2002; 2004; LEE et al., 2004; DUCIC et al., 2011). Na presença do sinal, a chance de se alcançar um resultado bom ou excelente, com alívio da dor e restabelecimento da sensibilidade do pé, gira em torno de 80% nas descompressões do nervo tibial e seus ramos (WIEMAN e PATEL, 1995; CHAFEE, 2000; DELLON, 2002; DELLON et al., 2003). Wood W. e Wood M. (2003), em uma série de 33 pacientes com sintomas de neuropatia diabética

e sinal de Tinel positivo, observaram que 76% tiveram uma boa ou excelente recuperação na sensibilidade do pé, e 90% conseguiram um alívio na dor, de bom a excelente, após a descompressão nervosa. Estudos prospectivos têm mostrado que o sinal de Tinel positivo tem um valor preditivo positivo de 92% para bons ou excelentes resultados após a descompressão cirúrgica do nervo tibial, em pacientes diabéticos (LEE et al., 2004).

As indicações básicas para descompressão cirúrgica de nervos periféricos dos membros inferiores, de pacientes com neuropatia diabética são: presença de dor intratável com medicações em paciente com bom controle glicêmico, mesmo que o sinal de Tinel seja negativo; presença de dormência, parestesias e perda de sensibilidade em paciente com bom controle glicêmico e sinal de Tinel positivo. O sucesso do procedimento depende de uma boa condição vascular do membro, situação clínica aceitável para um procedimento anestésico, peso menor que 136kg, e concordância por parte do paciente com os cuidados pós-operatórios (DELLON, 2004). Os critérios específicos de exclusão para encaminhamento cirúrgico incluem a presença de artropatia de Charcot, úlceras de pé ativas ou infectadas, edema de membros inferiores, insuficiência vascular, e falta de adesão por parte do paciente ao tratamento recomendado. Qualquer um desses fatores pode expor o paciente a riscos cirúrgicos elevados e insucesso no tratamento (DUCIC et al., 2011).

Em meta-análise de 15 artigos a respeito do alívio dos sintomas da neuropatia diabética por meio da descompressão de nervos periféricos nos membros inferiores, tendo como parâmetros de inclusão: neuropatia

sintomática, sinal de Tinel positivo sobre o túnel do tarso, nenhuma história prévia de úlceras ou amputação, uso da técnica de descompressão nervosa tripla de Dellon (neurólise do nervo fibular em nível do joelho e dorso do pé, neurólise do nervo tibial nos 4 túneis mediais do tornozelo), observou-se uma uniformidade no sucesso do alívio da dor (88% de 515 pacientes) e da restauração da sensibilidade (79% de 464 pacientes) (DELLON, 1992; WIEMAN e PATEL, 1995; CHAFEE, 2000; ASZMANN et al., 2000; TAMBWEKAR, 2001; WOOD W. e WOOD M., 2003; LEE et al., 2004; BIDDINGER e AMEN, 2004; VALDIVIA et al., 2005; RADER, 2005; YAO et al., 2005; DELLON, 2007). Não se observou nenhuma nova ulceração naqueles estudos que não incluíram pacientes com história prévia de úlcera. Em 2 estudos, que incluíram 30 pacientes com história prévia de úlceras e/ou amputações, houve somente 1 caso (3%) com recidiva da úlcera (WIEMAN e PATEL, 1995; CHAFEE, 2000). Um estudo multicêntrico, prospectivo, com os mesmos critérios de inclusão acima mencionados, incluindo mais de 737 cirurgias em mais de 430 pacientes com neuropatia, comprovou a capacidade da descompressão nervosa tripla de Dellon em prevenir ulcerações. Observou-se somente 0.6% de formação de novas úlceras em 2 anos e meio de acompanhamento pós-operatório em 665 pernas descomprimidas, sabendo-se que a incidência esperada é de 15%. Nos pacientes com história prévia de ulceração, em que a taxa de recorrência esperada é de 50%, houve recorrência em 2.25% de 44 pacientes em 2 anos e meio (DELLON, 2007).

Nickerson et al. (2009) apresentaram 2 casos de síndrome de pé diabético de Charcot em estágio inicial, submetidos às descompressões nervosas múltiplas dos túneis ósteo-fibrosos dos membros inferiores. Após o procedimento cirúrgico os sintomas clínicos se resolveram, assim como as anormalidades radiográficas da doença, sugerindo que o aprisionamento do nervo pode ser postulado como um dos pontos desencadeadores do pé de Charcot no paciente diabético.

Ducic et al. (2011) relataram que o tratamento cirúrgico de descompressão, no contexto de um manejo clínico adequado e controle da glicose sérica, oferecerá a solução para a doença sintomática no paciente diabético. Os sintomas terminais da neuropatia periférica diabética podem resultar na perda da funcionalidade do membro e aumentar drasticamente as taxas de amputação. No entanto, o reconhecimento em tempo oportuno dos sinais e sintomas da neuropatia podem interromper a progressão da doença. A cirurgia de descompressão nervosa pode ajudar os pacientes diabéticos a minimizar as chances de seus sintomas se tornarem irreversíveis, já que vai se direcionar à raiz de todo problema e, sendo assim, impedir a progressão e morbidade da neuropatia.

Horowitz (2006), em artigo sobre recentes avanços clínicos na polineuropatia diabética, relatou que a disfunção neuropática pode ser observada mesmo em pacientes com pré-diabetes ou intolerância à glicose, demonstrando assim a susceptibilidade das fibras nervosas periféricas à hiperglicemia, mesmo que leve e de curta duração.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Normatizações

3.1.1 Manejo dos animais

Em todas as fases experimentais do trabalho foram obedecidos os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e cujos artigos englobam três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência (SCHNAIDER e SOUZA, 2003).

Seguiram-se também as determinações da Lei Federal nº 6638, de 8 de Maio de 1979, que estabelece normas para prática didático-científica da vivisseção de animais, e o Projeto de Lei nº 1.153/95, de 20 de maio de 2008, conhecido como Lei Arouca, que regulamentou o uso de cobaias em pesquisas científicas no Brasil (Agência Câmara da Folha Online).

3.1.2 Comissão de Ética

O projeto de pesquisa do estudo foi avaliado e devidamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2 Animais

3.2.1 Caracterização da amostra

Todos os animais necessários para o experimento procederam do Biotério Central da FMUSP. Utilizaram-se 40 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades ao redor de 10 semanas e pesos variando de 200 a 300 gramas.

3.2.2 Ambiente de experimentação

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno adequadas para a espécie e de dimensões padronizadas, um animal por caixa, sendo estas devidamente identificadas e trocadas a cada 48 horas. Foi mantido ambiente específico climatizado entre 19 a 22°C, com temperatura e umidade controladas, e também sob ciclos de iluminação (claro/escuro) regulados a cada 12 horas, recebendo ração específica para a espécie (NUVILAB, NUVITAL[®]) e água *ad libitum* durante todo o experimento.

3.3 Delineamento experimental

Realizou-se sorteio para determinar a qual grupo o animal pertenceria, evitando-se assim a tendenciosidade, conforme sugerido por Berkuo et al. (1981). Os 40 ratos foram separados em 2 grupos principais:

grupo controle e grupo diabetes, cada um com 20 animais. Estes, por sua vez, foram subdivididos em 2 subgrupos, de acordo com a técnica de reparação nervosa: subgrupo neurorrafia primária término-terminal do nervo ciático após neurotomia (n=10) e subgrupo enxertia autóloga término-terminal do nervo ciático (n=10), conforme o quadro abaixo:

Quadro 1 – Organização dos grupos e subgrupos do estudo

Grupos	Subgrupos		n
Controle	CN	Neurorrafia primária término-terminal do nervo ciático direito após neurotomia	10
	CE	Enxertia autóloga término-terminal do nervo ciático direito	10
Diabetes	DN	Neurorrafia primária término-terminal do nervo ciático direito após neurotomia	10
	DE	Enxertia autóloga término-terminal do nervo ciático direito	10

3.4 Indução do diabetes mellitus

A indução do diabetes mellitus (DM) foi realizada após respeitar-se o período de 12 horas de jejum e manutenção dos animais em ambiente calmo e escuro, para não causar nenhum tipo de estresse. Foi realizada pela inoculação de estreptozotocina (Streptozotocin, N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine, SIGMA® S-0130), solubilizada

em solução tampão citrato (pH 4.0) e injetada com seringas descartáveis de 1 ml e agulha 13x4.5 mm (BD – CREMER®), na dose de 60mg/Kg, em nível do quadrante inferior direito do abdome dos animais, por via intraperitoneal, de acordo com metodologia descrita por Boner et al. (1981).

Os animais do grupo controle foram submetidos à inoculação somente da solução tampão citrato (pH 4.0), ao passo que os do grupo diabetes à inoculação de estreptozotocina para indução do distúrbio. Observou-se que as dosagens fossem idênticas em ambos os grupos, assim como a via de inoculação.

Figura 1 - Indução do DM pela injeção intra-peritoneal de estreptozotocina no abdome dos ratos

3.5 Procedimento cirúrgico

Com o intuito de evitar vieses e padronizar o método, o próprio pesquisador realizou todos os procedimentos cirúrgicos, avaliações e coletas de peças.

Após o período de 8 semanas da indução do DM, no grupo diabetes, ou só a inoculação de solução tampão citrato, no grupo controle, os animais foram pesados, induzidos à anestesia geral pela administração intraperitoneal de pentobarbital sódico (30mg/kg) e colocados com as patas presas a uma tábua em decúbito ventral. Foi então realizada tosquia da pata traseira direita dos ratos e antissepsia com PVPI (solução tópica de polivinilperrolidona-iodo a 10%).

Figura 2 – Rato fixado sobre a tábua operatória e com antissepsia da pata traseira direita com PVPI tópico

Foi realizada incisão longitudinal de aproximadamente 2.5 centímetros, iniciando-se na raiz do membro posterior direito do rato. Em seguida, procedeu-se dissecação roma entre os músculos glúteos e bíceps femoral, até exposição do nervo ciático, e seus ramos fibular comum e tibial, atentando-se para não lesar a artéria femoral profunda. Utilizando-se de técnica microcirúrgica e com materiais cirúrgicos apropriados, foi feita a dissecação de todo nervo ciático do animal.

Figura 3 – Incisão longitudinal na pele da pata traseira direita do rato, extendendo-se até o plano muscular subjacente

Figura 4 – Divulsão da musculatura posterior da pata e exposição do nervo ciático

Figura 5 – Colocação de campo de borracha para maior contraste e visualização do nervo ciático

Nos subgrupos CN e DN foi realizada neurotomia a 1 cm da bifurcação do nervo ciático, em fibular comum e tibial. Procedeu-se, em

seguida, a neurorrafia primária término-terminal, com 4 pontos epineurais separados, distantes 90 graus um do outro, utilizando-se fio de mononáilon 10-0, agulha BV 100-3, de 3.9 milímetros, 3/8 de círculo (Ethilon, Ethicon®). A cirurgia foi realizada com o auxílio de microscópio cirúrgico (Carl Zeiss®), com magnificação da imagem de 16 vezes.

Figura 6 – Neurotomia do nervo ciático

Figura 7 – Neurografia primária término-terminal do nervo ciático

Figura 8 – Vista com maior ampliação da neurografia término-terminal

Nos subgrupos CE e DE foi realizada ressecção de segmento de 1cm do nervo ciático direito, iniciando-se a 2 cm e estendendo-se distalmente até 1 cm de sua bifurcação. Posteriormente, realizou-se a auto-enxertia

ortotópica do mesmo segmento de nervo, por meio de neurorrafia término-terminal nos cotos proximais e distais do nervo ciático remanescente, com a mesma padronização anteriormente descrita.

Figura 9 – Ressecção de segmento de 1 cm do nervo ciático

Figura 10 – Auto-enxerto ortotópico de segmento de 1 cm do nervo ciático

Após a confecção das microanastomoses nervosas, seja só a neurorrafia primária ou o enxerto de nervo, a hemostasia era revisada, e se houvesse algum vaso sangrante, este era cauterizado. Irrigava-se então a ferida com solução salina isotônica, a musculatura da região era reaproximada e a incisão de pele era fechada, empregando-se sutura contínua com fio mononáilon 4-0 (Ethicon®).

Figura 11 – Sutura de pele com chuleio simples com náilon 4-0

Tendo em vista que o nervo ciático é responsável pela inervação sensitiva da pata do animal, e inevitavelmente haveria insensibilidade no pós-operatório, pelo menos transitória, foi utilizado medicamento à base de clorexidina, em forma de *spray* (Merthiolate®), aplicado diretamente na pata operada, com o objetivo de evitar a automutilação.

Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas individuais, mantidas em ambiente controladamente aquecido para evitar

hipotermia, ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água “*ad libitum*”, acrescida de dipirona sódica para analgesia nas primeiras 48 horas de pós-operatório, e ração a vontade. Permaneceram sob este regime até a data prevista para as aferições do experimento e o sacrifício.

3.6 Aferições I (ponderais, laboratoriais e funcionais)

3.6.1 Massa corporal

Os ratos foram pesados em balança analítica (Ohaus MB 35 Mettler®), no pré-operatório, e com 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. O intuito da pesagem foi para avaliação de possíveis alterações ponderais durante a vigência do período hiperglicêmico nos ratos do grupo diabetes, ou normoglicêmico nos do grupo controle.

3.6.2 Dosagens de glicemia

Previamente à inoculação de estreptozotocina para indução do DM, nos ratos do grupo diabetes, ou de solução tampão citrato, nos do grupo controle, as glicemias dos animais foram medidas.

Após a indução do DM ou inoculação do tampão, ambos os grupos, controle e diabetes, foram mantidos por período de 8 semanas antes da realização do procedimento cirúrgico, sendo que novas medidas dos níveis

glicêmicos foram feitas no momento pré-operatório e com 30 e 60 dias de pós-operatório.

As dosagens de glicemia foram feitas pelo método capilar através de punção na cauda dos animais, sendo os animais mantidos em jejum na noite anterior ao exame. A dosagem, por método da glicose-oxidase, era procedida em monitor de glicemia capilar Advantage (Boehringer Mannheim®), com tiras específicas, previamente calibrado frente à solução estandardizada de glicose.

Figura 12 – Dosagem de glicemia capilar por punção da cauda do rato. Monitor com tiras específicas mostrando nível glicêmico do animal

Para padronização, foi considerado diabético aquele animal que apresentasse nível glicêmico maior ou igual 200mg/dl, sem restrição dietética (MACHADO et al., 2000).

3.6.3 Teste da marcha (*Walking Track*)

Uma das avaliações funcionais da regeneração do nervo ciático dos ratos foi feita aplicando-se o teste da marcha, também conhecido como *Walking Track*. O teste avalia alterações de marcha conseqüentes à lesão neural que causa claudicação na pata operada, por meio da impressão de pegadas do animal.

Tal método permite o cálculo do Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter (BROWN et al., 1989, 1991; DASH et al., 1996; HARE et al., 1992, 1993), e assim possibilita análise objetiva da recuperação funcional. O IFC toma como base as seguintes variáveis: extensão da pegada (distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), largura da pegada (distância entre o 1º e 5º dedos) e a distância entre os dedos intermediários (2º e 4º dedos), todos considerados a partir da pata traseira do rato (Figura 13).

Figura 13 – Impressão da pegada do rato durante o teste da marcha. As linhas representam as distâncias mensuradas necessárias na fórmula para cálculo do IFC

O teste da marcha foi realizado previamente a qualquer procedimento cirúrgico em todos os subgrupos do estudo, para cálculo de valores basais do IFC, e posteriormente no pós-operatório com 20, 40 e 60 dias.

Quadro 2 – Fórmula de cálculo do índice de função ciática (IFC)

$\text{IFC} = -38,3 \left(\frac{\text{EPE}-\text{EPN}}{\text{EPN}} \right) + 109,5 \left(\frac{\text{LPE}-\text{LPN}}{\text{LPN}} \right) + 13,3 \left(\frac{\text{DDIE}-\text{DDIN}}{\text{DDIN}} \right) - 8,9$
<p>IFC: índice de função ciática</p> <p>EPE/EPN: extensão da pegada experimental (EPE) e normal (EPN)</p> <p>LPE/LPN: largura da pegada experimental (LPE) e normal (LPN)</p> <p>DDIE/DDIN: distância entre os dedos intermediários experimental (DDIE) e normal (DDIN)</p>

Valores obtidos pela fórmula (IFC) são considerados indicativos da condição funcional do nervo ciático do rato, expressos como percentagem

de perda da função normal, sendo que zero representa a normalidade, -100 a perda total da função, e variações de 0 ± 10 estão nos desvios da normalidade para a fórmula. Valores intermediários a esses indicam déficits parciais de função.

Um corredor com medidas padronizadas de 8.2x42cm e com as extremidades abertas foi usado para o teste da marcha (Figura 14). Os animais tiveram suas patas traseiras, tanto a operada quanto a não operada, impregnadas com tinta nanquim preta e foram liberados para deambular sobre folha de papel branco nas dimensões do corredor. Previamente a qualquer procedimento cirúrgico os ratos eram treinados a andar no corredor.

Figura 14 – Teste da marcha do rato e impressões das pegadas deixadas

Por norma, as aferições eram realizadas pelo mesmo examinador, que desconhecia o subgrupo do animal que estava sendo avaliado.

3.6.4 Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados (eletroneurografia - ENG)

O teste eletrofisiológico intraoperatório foi realizado na re-exploração cirúrgica dos nervos ciáticos operados, aos 60 dias do pós-operatório, imediatamente antes do sacrifício dos animais. Após anestesia, tosquia, imobilização em decúbito ventral e antissepsia, os animais eram submetidos à uma ampla incisão no membro posterior direito, permitindo acesso ao nervo ciático até sua bifurcação em fibular comum e tibial, e a toda musculatura da região. Com a temperatura ambiente mantida em torno de 25°C, foi aferida a amplitude dos potenciais de ação musculares evocados.

O equipamento utilizado foi o NIM (Monitor de Integridade de Nervo Motor, RICHARDS®). O potencial de ação evocado foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência, sendo o ativo implantado no centro do músculo tríceps sural e o de referência próximo ao tendão de inserção do mesmo músculo. Um estimulador monopolar foi empregado para maior abrangência do estímulo, de modo a deflagrar os estímulos elétricos diretamente sobre o nervo ciático, proximal à neurorafia primária término-terminal ou ao enxerto de nervo, de acordo com o subgrupo estudado, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através da(s) sutura(s) nervosa(s) até o músculo correspondente. Foram padronizados os

seguintes parâmetros para a realização do teste eletrofisiológico: estímulo de 0.30mA (miliampere) de corrente elétrica e latência constante de 2.0ms (milisegundos). A resposta captada pelo eletrodo colocado no músculo inervado pelo nervo estimulado foi dada em μ V (micro volts) e os dados de amplitude foram comparados entre os subgrupos.

Figura 15 – Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais de ação musculares evocados. Estimulador deflagrando estímulos elétricos diretamente sobre o nervo ciático operado previamente e eletrodos de agulha ativo e de referência implantados na musculatura para captar o sinal

3.7 Sacrifício e coleta das peças

Após a realização do teste eletrofisiológico foi colhido fragmento do nervo ciático, de aproximadamente 3 a 5 milímetros, para análise histológica. Foi padronizado que o segmento do nervo fosse colhido 5 milímetros distal à neurorrafia término-terminal ou ao enxerto de nervo, de

acordo com cada subgrupo. Também procedeu-se à coleta dos músculos tríceps surais direito e esquerdo de cada rato, abrangendo 100% do corpo muscular, desde sua origem até sua inserção, somente sem o tendão.

Posteriormente à coleta das peças histológicas, os animais foram sacrificados ao receberem dose letal de anestésico (pentobarbital sódico), por via intraperitoneal e foram desprezados em lixo biológico do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.8 Processamento histológico dos nervos

Os segmentos de nervo ciático coletados foram fixados em solução de glutaraldeído a 3% e, após esse processo, as peças foram desidratadas passando por múltiplos banhos. Primeiramente em concentrações crescentes de álcool etílico (70°, 80°, 90°, 95° e absoluto 1, 2, 3, 4), depois mistura de álcool etílico absoluto e xilol a 50%. Finalmente as peças foram diafanizadas com xilol 1, 2, 3, e incluídas em parafina. Após a inclusão, foi realizada a microtomia do material, obtendo-se cortes transversais com a espessura de 2 micrômetros (μm), sendo corados pelos métodos de Hematoxilina de Harris e Eosina e, Tricrômico de Masson. Foram realizados 6 cortes de um mesmo segmento de nervo, possibilitando a escolha de um corte com menos artefatos histológicos. Em seguida as lâminas, contendo os cortes histológicos, foram montadas com resina plástica.

Identificaram-se as lâminas somente com um número de registro, para que não se soubesse a que subgrupo o animal pertencia. A numeração

real foi revelada apenas para a análise estatística.

3.9 Aferições II (anátomo-patológicas)

3.9.1 Peso do músculo tríceps sural

Após o sacrifício dos animais aos 60 dias do pós-operatório, os seus músculos tríceps surais, do lado operado (direito) e não operado (esquerdo), foram dissecados, separados de outros músculos da região e cuidadosamente liberados de suas origens e inserções, de maneira a se obter o corpo muscular inteiramente. Após a coleta do músculo, primeiramente tomou-se o cuidado de enxugá-lo, para remoção de sangue e quaisquer outros fluidos, só então ele foi pesado em balança analítica de alta precisão (Ohaus MB 35 Mettler®), sem o seu tendão, seguindo orientações do estudo de Yan et al. (2002) e Stipp Brambilla (2009). Chegou-se à média das massas musculares do lado operado e não operado, e também foi possível o cálculo do índice de peso, dividindo-se o peso do lado operado pelo lado não operado, permitindo desta forma comparação entre os subgrupos em relação ao grau de atrofia muscular que a denervação, embora transitória, gerou.

Figura 16 – Músculo tríceps sural da pata operada de rato do subgrupo diabético com neurorrafia, sendo pesado em balança de precisão

3.9.2 Análise histomorfométrica

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico com aumento de 100 vezes, para escolha de 3 cortes histológicos com menos artefatos, e aumento de 400 vezes para análise das fibras nervosas, axônios e células de Schwann.

Dividia-se os cortes em 4 quadrantes, e selecionava-se aleatoriamente 1 campo de maior aumento por quadrante, totalizando 4 por corte e 12 por lâmina. As imagens eram então capturadas por uma câmera *DinoEye* AM422X (*DinoLite*®) e digitalizadas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 2 GB DDR, HD 160 GB. Por meio do software *Image-Pro-Plus*, versão 4.5 (*Media Cybernetics*®), foram possíveis as avaliações da densidade axonal, medida do menor diâmetro e da área de secção

transversa das fibras nervosas, dos axônios, e das células de Schwann.

Após abrir a imagem a ser analisada, era realizada a medida da área correspondente ao campo, obtendo-se o valor de $11.869,33\mu\text{m}^2$, que seria constante para todas as imagens. Os axônios mielinizados regenerados eram identificados por um mesmo observador, e contados em cada um dos 12 campos selecionados por lâmina. Após esta contagem calculou-se a densidade axonal, medida em axônios/ μm^2 , por meio da fórmula: número de axônios/ $11.869,33\mu\text{m}^2$.

Seguindo-se o cálculo das densidades axonais, foram realizadas as medidas do diâmetro mínimo e da área da fibra nervosa e do axônio. As medidas da área da célula de Schwann foram obtidas subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa. Os resultados obtidos foram organizados em uma tabela e, a partir das médias foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos.

Figura 17– Lâmina histológica de segmento de nervo ciático de rato corado pelo método Tricrômico de Masson. As estrelas apontam a contagem dos axônios mielinizados regenerados

3.9.3 Análise histológica pela hematoxilina-eosina (HE)

Utilizou-se a coloração histológica de HE com o objetivo de serem avaliadas também as características da arquitetura geral do nervo regenerado, como: o padrão geral de organização do tecido neural dentro dos tubos, reorganização axonal em fascículos, a disposição dos fibroblastos e do tecido conjuntivo epi-perineurais, a presença de escape de fibras axonais para fora dos limites do epineuro e a reação tecidual.

3.10 Análise estatística

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias e desvios padrões.

Para a comparação dos subgrupos definidos pela presença de diabetes ou enxerto, foi considerado o modelo de Análise de Variância (ANOVA) com um fator e o teste LSD (least significant difference) para as comparações múltiplas. Para a comparação de dois momentos de avaliação dentro de cada subgrupo foi usado o Teste t de Student para amostras pareadas. A comparação de mais de dois momentos foi feita considerando-se o modelo de Análise da Variância com medidas repetidas. A avaliação da condição de normalidade das variáveis foi feita pelo teste de Shapiro-Wilks.

Todos os dados foram organizados em planilha do software Microsoft Excel e analisados com o programa *Statistica* (versão 8.0). Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

A fase experimental do trabalho (cirurgias, testes da marcha e eletrofisiológicos, sacrifício dos animais, coleta das peças para histologia e pesagem dos músculos) foi realizada no Laboratório de Microcirurgia Experimental, do Instituto dos Laboratórios de Investigação Médica (LIM 4) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Disciplina de Cirurgia Plástica, Departamento de Cirurgia. Já o processamento histológico das peças e a leitura das lâminas para avaliação da regeneração nervosa foram realizados no Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Molecular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal do Paraná e no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Patologia Experimental, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, respectivamente.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Houve 3 óbitos de ratos durante o estudo, sendo 1 no subgrupo controle com neurraxia, no 15º dia de pós-operatório, 1 no subgrupo diabético com neurraxia e 1 no subgrupo diabético com enxerto, ambos após a indução de DM. O restante dos 37 animais se mantiveram saudáveis, sendo possível a realização de todas as aferições que o estudo se propôs a fazer.

4.1 Massa corporal

Os animais foram pesados no pré-operatório e com 15, 30 e 60 dias de pós-operatório, conforme ilustra a tabela abaixo.

Tabela 1 – Médias e desvios padrões dos pesos corporais de cada subgrupo nos diferentes momentos de avaliação. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos

SUBGRUPO	pré-operatório		15 PO		30 PO		60 PO	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
CN	277,4 ^a	10,5	260,3 ^a	8,8	304,8 ^a	19,0	352,7 ^a	22,6
CE	279,3 ^a	17,8	265,4 ^a	19,7	309,7 ^a	16,9	355,6 ^a	22,2
DN	281,2 ^a	12,3	225,1 ^b	19,9	257,8 ^b	19,5	301,9 ^b	14,9
DE	279,1 ^a	11,9	223,0 ^b	13,7	258,4 ^b	19,1	305,1 ^b	14,2
valor de p	0,939		<0,001		<0,001		<0,001	

Letras diferentes indicam diferença estatística na comparação.

Os pesos dos animais foram semelhantes no pré-operatório, não se observando diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos e subgrupos.

Na avaliação pós-operatória com 15, 30 e 60 dias, observou-se que o peso dos animais do grupo controle foi maior que o do grupo diabetes, e tal diferença foi estatisticamente significativa. Não se verificou o mesmo na comparação do peso dos animais do mesmo grupo, seja controle ou diabetes.

A variação ponderal dos animais, ou seja, os ganhos ou perdas de peso nas avaliações de 15, 30 e 60 dias de pós-operatório, em relação ao momento pré-operatório, são apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1 – Variação de peso (g) dos subgrupos, nos diferentes momentos de avaliação

Na avaliação da diferença de peso de 15 dias com relação ao momento pré-operatório, foi observado um emagrecimento dos animais de todos os subgrupos, porém mais acentuado no grupo diabetes, observando-se diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo controle. Não se verificou a mesma diferença na comparação da perda de peso entre os animais do mesmo grupo.

Com 30 dias de pós-operatório, os animais do grupo controle ganharam peso em comparação à medida do pré-operatório. Em contraste, os do grupo diabetes ainda mantinham peso abaixo do verificado no pré-operatório. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas comparações das variações ponderais dos ratos do grupo controle e do grupo diabetes. Na comparação dos animais do mesmo grupo não se encontrou diferença.

Na avaliação da variação de peso com 60 dias, foi verificado que todos os ratos ganharam peso em relação ao que tinham no pré-operatório. O ganho de peso dos animais do grupo controle foi superior ao do grupo diabetes, e foi observada diferença estatística significativa nesta comparação. Não se detectou o mesmo na comparação dos ganhos de peso dos animais do mesmo grupo.

4.2 Glicemias

As glicemias dos animais foram medidas previamente à indução do DM ou à inoculação de solução tampão citrato, dependendo do grupo, e

também no pré-operatório (com 8 semanas de indução do DM ou inoculação do tampão), e com 30 e 60 dias de pós-operatório. A tabela abaixo apresenta as médias e desvios padrões das avaliações de glicemia, e também o valor de p da comparação dos 4 subgrupos entre si.

Tabela 2 – Médias (M) e desvios padrões (DP) das medidas de glicemias (mg/dl) dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos

SUBGRUPO	pré-indução DM ou inoculação tampão		pré-op. (8 semanas após indução ou inoculação)		30° PO		60° PO	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
CN	94,6 ^a	5,7	92,4 ^a	4,8	92,5 ^a	3,6	92,2 ^a	4,2
CE	93,5 ^a	7,4	91,7 ^a	6,2	91,8 ^a	3,2	92,5 ^a	3,7
DN	94,9 ^a	4,1	427,7 ^b	107,8	334,4 ^b	67,6	327,8 ^b	60,8
DE	93,6 ^a	5,6	439,2 ^b	61,4	326,5 ^b	36,8	321,5 ^b	48,4
valor de p	0,931		<0,001		<0,001		<0,001	

Letras diferentes indicam diferença estatística na comparação.

Os resultados mostraram que as glicemias foram semelhantes entre todos os animais no momento pré-indução do DM ou inoculação da solução tampão, não se observando diferenças estatísticas significativas na comparação entre os grupos e subgrupos. No entanto, no pré-operatório (8 semanas após a indução do DM ou inoculação do tampão) e com 30 e 60 dias de pós-operatório, os níveis glicêmicos foram maiores nos ratos do grupo diabetes, observando-se diferença estatisticamente significativa na comparação com os do grupo controle. Não se obteve a mesma diferença

na comparação das glicemias dos animais dentro do mesmo grupo, controle ou diabetes.

Gráfico 2 – Variação das medidas de glicemias(mg/dL) nos diferentes momentos de avaliação

Adicionalmente, foram comparadas as glicemias dentro de cada subgrupo, nos diferentes momentos de avaliação (pré-indução do DM ou inoculação do tampão, pré-operatório, 30 e 60 dias de pós-operatório). A tabela 3 mostra as diferenças estatísticas na comparação dos diferentes momentos de medida da glicemia, dentro de cada subgrupo específico.

Tabela 3 – Valores de p das comparações das glicemias nos diferentes momentos de avaliação dentro de cada subgrupo

SUBGRUPO	valor de p						
	pré-indução x pré-op. x 30 PO x 60 PO	pré-indução x pré-op.	pré-indução x 30 PO	pré-indução x 60 PO	pré-op. x 30 PO	pré-op. x 60 PO	30 PO x 60 PO
CN	0,394						
CE	0,803						
DN	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,763
DE	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,738

As glicemias dos ratos do grupo controle se mantiveram estáveis e em níveis considerados normais, não se encontrando assim diferenças estatisticamente significantes na comparação dos valores nos diversos momentos de avaliação.

Já nos animais do grupo diabetes, as glicemias se elevaram após a indução do DM e houve diferenças estatisticamente significativas na comparação dos resultados do momento pré-indução com o pré-operatório, 30 e 60 dias, em ambos os subgrupos. Também se observou que as medidas de glicemia do pré-operatório foram superiores às medidas de 30 e 60 dias, sendo a diferença estatisticamente significativa. No entanto, não foi detectada diferença na comparação das glicemias de 30 e 60 dias de pós-operatório.

4.3 Teste da marcha (*Walking Track*)

Em 2 ratos, 1 do subgrupo controle com enxerto e outro do subgrupo diabético com enxerto, foi observada automutilação da pata operada do animal, no vigésimo dia de pós-operatório. Assim ficou impossibilitada a realização do cálculo do IFC (Índice de Função Ciática), já que não era possível a obtenção das medidas correspondentes das pegadas.

Figura 18 – Automutilação da pata operada de animal do subgrupo diabético com enxerto observada no pós-operatório

O IFC foi medido em todos os outros animais, no pré-operatório, e com 20, 40 e 60 dias de pós-operatório. Na tabela 4 são apresentados os valores de médias e desvios padrões do IFC nas avaliações dos diferentes momentos, sendo expressos como porcentagem de perda da função normal.

Também são apresentados os valores de p das comparações dos 4 subgrupos entre si.

Tabela 4 – Médias e desvios padrões do Índice de Função Ciática (IFC) dos subgrupos nos diferentes momentos. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos

SUBGRUPO	pré-operatório		20 PO		40 PO		60 PO	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
CN	-6,5 ^a	1,1	-25,9 ^a	4,0	-10,7 ^a	1,6	-12,7 ^a	1,0
CE	-6,0 ^a	0,8	-36,7 ^b	4,1	-12,6 ^b	2,1	-12,9 ^a	1,6
DN	-6,7 ^a	1,1	-67,8 ^c	4,6	-15,3 ^c	1,6	-12,9 ^a	1,1
DE	-6,0 ^a	0,5	-79,3 ^d	7,2	-14,8 ^c	1,8	-14,4 ^b	0,9
valor de p	0,224		<0,001		<0,001		0,007	

Letras diferentes indicam diferença estatística na comparação.

Os IFCs no pré-operatório foram similares entre os subgrupos, não se observando diferença estatística significativa.

Já na avaliação de 20 dias de pós-operatório, evidenciou-se que o IFC foi mais próximo do normal nos animais do grupo controle do que no grupo diabetes, sendo a diferença estatisticamente significativa. Quando se compararam os valores do IFC dentro de cada grupo, controle ou diabetes, observou-se que o índice dos subgrupos submetidos à neurorrafia foi mais próximo da normalidade do que o dos animais submetidos à enxerto de nervo, sendo as diferenças estatisticamente significativas.

Com 40 dias de pós-operatório o panorama se manteve, encontrando-se as mesmas diferenças estatísticas anteriormente descritas, exceto quando se comparou o IFC do subgrupo diabético com neurorrafia

com o subgrupo diabético com enxerto, em que os valores foram aproximados e não foi evidenciada diferença estatística significativa.

Na comparação entre os grupos, com 60 dias, evidenciou-se que os valores do IFC dos 2 subgrupos controles, com neurorrafia e com enxerto, foram muito semelhantes ao IFC do subgrupo diabético com neurorrafia, não se observando diferença estatisticamente significativa nesta comparação. Em contrapartida, o oposto foi visto na comparação com o subgrupo diabético com enxerto, que apresentou um IFC pior, sendo a diferença estatisticamente significativa. No grupo controle, não se viu diferença estatística significativa entre os valores de IFC dos subgrupos com neurorrafia e com enxerto, sendo os resultados muito próximos. No grupo diabetes, verificou-se que o IFC do subgrupo com enxerto foi pior, e tal diferença foi estatisticamente significante quando comparada ao subgrupo com neurorrafia.

Figura 19 – Impressões de pegadas no teste da marcha com 60 dias. Padrão semelhante entre ratos do subgrupo controle com neurorrafia (A), do subgrupo controle com enxerto (B) e do subgrupo diabético com neurorrafia (C)

O gráfico 3 ilustra a evolução do IFC dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 3 – Evolução do IFC (% de perda da função normal) dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação

Para se aferir o grau de piora do IFC, visto no gráfico anterior no pós-operatório dos diferentes subgrupos, foi realizada comparação das suas variações, calculadas pela diferença dos índices nos diferentes momentos após a cirurgia (20°, 40° e 60° PO) e o índice basal pré-operatório.

Gráfico 4 – Variação do IFC (% de perda da função normal) dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação

As flechas brancas pontilhadas indicam a variação do IFC dos subgrupos nos diferentes momentos de avaliação, em relação ao índice basal pré-operatório.

Observou-se que aos 20 dias ocorreu uma piora substancial do IFC em todos os subgrupos, em comparação com os índices obtidos no pré-operatório. Tal piora foi mais acentuada nos animais do grupo diabetes do que no controle, observando-se diferença estatisticamente significativa em tal comparação. Dentro do mesmo grupo, tanto controle quanto diabetes, viu-se uma piora maior do índice nos subgrupos submetidos à enxertia de nervo em comparação com os submetidos à neurorrafia, sendo esta diferença também com significância estatística.

Aos 40 dias, verificou-se que o IFC de todos os subgrupos ainda se encontrava pior que o pré-operatório, porém a piora foi substancialmente menor que na avaliação aos 20 dias, como verifica-se pelo patamar alcançado no gráfico. Na comparação dos dois grupos, controle e diabetes,

observou-se que a piora do índice nos subgrupos diabéticos, tanto com neurorrafia quanto com enxerto, em relação ao pré-operatório, foi maior que nos subgrupos controles, com diferença estatisticamente significativa sendo encontrada. Entretanto, observou-se que em ambos os grupos, controle e diabetes, as variações dos IFCs dos subgrupos com enxerto já se situavam bem próximas às dos correspondentes subgrupos com neurorrafia, e não se obteve diferenças estatisticamente significativas na comparação.

Aos 60 dias de pós-operatório, os IFCs ainda se encontravam piores que no pré-operatório em todos os subgrupos, no entanto, o grau de piora em comparação com o índice basal pré-operatório, foi semelhante em todos os animais e não se observaram diferenças estatísticas significantes na comparação do grupo controle com o diabetes.

A tabela 5 expõe os valores de p das comparações dos valores de IFC obtidos dentro de um mesmo subgrupo nos diferentes momentos de avaliação.

Tabela 5 – Valores de p da comparação dos valores de IFC de cada subgrupo nos diferentes momentos

SUBGRUPO	valor de p						
	pré-op. x 20 PO x 40 PO x 60 PO	pré-op. x 20 PO	pré-op. x 40 PO	pré-op. x 60 PO	20 PO x 40 PO	20 PO x 60 PO	40 PO x 60 PO
CN	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,952
CE	<0,001	<0,001	<0,001	0,008	<0,001	<0,001	0,204
DN	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,238
DE	<0,001	<0,001	0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,863

Constata-se que em todos os subgrupos o IFC piorou bastante com 20 dias de pós-operatório, em relação ao pré-operatório, encontrando-se diferença estatisticamente significativa na comparação. Aos 40 e 60 dias o panorama teve melhora, porém o IFC de todos os subgrupos ainda se mostrava pior do que no pré-operatório, notando-se diferença estatística significativa na comparação.

Na comparação de 20 com 40 e 60 dias de pós-operatório, viu-se que o IFC melhorou com a evolução e a diferença foi estatisticamente significativa em todos os subgrupos. Quando os períodos de 40 e 60 dias foram comparados, os valores encontrados de IFC foram semelhantes dentro de cada subgrupo, não se obtendo diferença estatística significativa em nenhum deles.

4.4 Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados (eletroneurografia - ENG)

As amplitudes dos potenciais evocados do nervo ciático dos ratos foram mensuradas em todos os subgrupos, antes do sacrifício dos animais, no sexagésimo dia de pós-operatório. No gráfico 5 são apresentadas as médias dos valores encontrados, expressas em microvolts (μV), nos diferentes subgrupos e os respectivos desvios padrões.

Gráfico 5 – Amplitude do potencial evocado na ENG. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos e os respectivos desvios padrões, assim como o valor de p da comparação dos 4 subgrupos

Nota-se que as amplitudes do potencial evocado alcançaram os maiores níveis no subgrupo controle com neurorrafia, porém foram razoavelmente semelhantes na comparação com os demais subgrupos, e não foi constatada diferença estatística significativa, conforme demonstra o valor de p encontrado.

4.5 Peso do músculo tríceps sural

A tabela 6 mostra as médias e desvios padrões dos pesos do músculo tríceps sural da pata operada e da não operada dos diferentes subgrupos, assim como o índice de peso entre os dois lados (divisão do

peso do lado operado pelo lado não operado). Também são mostrados os valores de p da comparação dos 4 subgrupos.

Tabela 6 – Médias e desvios padrões do peso (g) da musculatura tríceps sural do lado operado, do lado não operado e do índice de peso entre os lados. Valor de p da comparação entre os 4 subgrupos

SUBGRUPO	Peso lado operado (g)		Peso lado não operado (g)		Índice de peso (lado operado/lado não operado)	
	M	DP	M	DP	M	DP
CN	1,8 ^a	0,1	2,3 ^a	0,2	0,78 ^a	0,2
CE	1,6 ^b	0,1	2,7 ^b	0,2	0,59 ^b	0,2
DN	1,1 ^c	0,1	2,2 ^a	0,1	0,5 ^b	0,2
DE	1,1 ^c	0,1	2,2 ^a	0,1	0,5 ^b	0,2
valor de p	<0,001		<0,001		<0,001	

Letras diferentes indicam diferença estatística na comparação.

Observa-se que na avaliação do peso muscular do lado operado, os músculos encontravam-se mais pesados nos ratos do grupo controle, em comparação com o grupo diabetes, havendo diferença estatística significativa. Dentro do mesmo grupo, viu-se que o peso muscular foi superior no subgrupo controle com neurraxia do que no controle com enxerto, havendo diferença estatística significativa na comparação. O mesmo não se verificou na comparação dos subgrupos diabéticos, em que os pesos foram semelhantes.

O peso muscular do lado não operado foi superior nos animais do grupo controle, principalmente no subgrupo controle com enxerto, onde se encontrou o maior peso. Encontrou-se diferenças com significância

estatística nas comparações do subgrupo controle com enxerto e os subgrupos diabéticos, com neurorrafia e enxerto. Observou-se diferença estatística significativa entre os subgrupos controles, com neurorrafia e enxerto. O mesmo não se verificou na comparação dos subgrupos diabéticos, já que os pesos musculares foram semelhantes no subgrupo com neurorrafia e com enxerto.

Na avaliação do índice de peso do lado operado com o lado não operado, encontrou-se o valor mais alto no subgrupo controle com neurorrafia, seguido pelo subgrupo controle com enxerto e, pelos subgrupos diabéticos, estes últimos com índices iguais. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação do subgrupo controle com neurorrafia e os subgrupos controle com enxerto, diabético com neurorrafia e diabético com enxerto. Não foi constatado o mesmo nas comparações entre os subgrupos controle com enxerto e os subgrupos diabéticos, além dos subgrupos diabéticos entre si.

Figura 20 – Músculo tríceps sural da pata operada de rato do subgrupo diabético com neurorrafia

4.6 Análise histomorfométrica

4.6.1 Densidade axonal dos nervos ciáticos

A densidade de axônios distais à neurorrafia ou ao enxerto de nervo, medida em número de axônios por micrômetro quadrado, foi verificada nos diferentes subgrupos após o sacrifício dos ratos. O gráfico 6 representa os valores de médias e desvios padrões das densidades axonais, e o valor de p da comparação dos 4 subgrupos.

Gráfico 6 – Densidade axonal do nervo ciático (axônios/11869.33 μm^2). No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos, os respectivos desvios padrões e o valor de p da comparação entre os 4 subgrupos

Os resultados evidenciam que a densidade axonal foi maior no subgrupo controle com neurorrafia, e na comparação dentro do mesmo grupo, a densidade foi superior nos subgrupos com neurorrafia, em relação aos com enxerto, tanto no grupo controle quanto no diabetes. Não obstante, como pode-se ver pelo valor de p, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação dos subgrupos.

Figura 21 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios (destacados nos círculos pontilhados amarelos) no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 22 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 23 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 24 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 25 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 26 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, mostrando a densidade de axônios no estroma neural. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

4.6.2 Áreas das secções transversas das fibras nervosas, dos axônios e das células de Schwann

Também foram calculadas as áreas das secções transversas das fibras nervosas, axônios e células de Schwann em todos os subgrupos. Os gráficos seguintes representam os valores de médias e desvios padrões das áreas calculadas em cada subgrupo, bem como os valores de p das comparações.

Gráfico 7 – Áreas médias (μm^2) das secções transversas das fibras nervosas dos diferentes subgrupos. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos com os respectivos desvios padrões e o valor de p das comparações

Gráfico 8 – Áreas médias (μm^2) das secções transversas dos axônios dos diferentes subgrupos. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos com os respectivos desvios padrões e o valor de p das comparações

Gráfico 9 – Áreas médias (μm^2) das das secções transversas das células de Schwann dos diferentes subgrupos. No gráfico estão representadas as médias dos subgrupos com os respectivos desvios padrões e o valor de p das comparações

As maiores áreas médias das secções transversas das fibras nervosas foram observadas no subgrupo diabético com neurorrafia, seguido pelo subgrupo controle com enxerto e por fim pelos subgrupos diabético com enxerto e controle com neurorrafia, ambos em patamares muito próximos. Em relação às áreas médias das secções transversas dos axônios, verificou-se que os maiores valores foram encontrados nos subgrupos controles, com enxerto e neurorrafia, sendo muito próximos um do outro. Em um patamar mais inferior, vieram os subgrupos diabéticos, com neurorrafia e enxerto, também muito semelhantes entre si. Já as áreas médias das secções transversas das células de Schwann tiveram relação direta com as áreas das fibras nervosas, sendo maiores no subgrupo diabético com neurorrafia, seguido pelo subgrupo controle com enxerto, e em um nível um pouco mais inferior, os subgrupos diabético com enxerto e controle com neurorrafia.

Apesar dos valores evidenciados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação às medidas das áreas das secções transversas das fibras nervosas, dos axônios e das células de Schwann, nas comparações dos subgrupos.

Figura 27 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. As linhas verdes pontilhadas correspondem ao menor diâmetro das secções transversas das fibras nervosas. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 28 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. As linhas vermelhas pontilhadas correspondem ao menor diâmetro das secções transversas dos axônios. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 29 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 30 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 31 – Subgrupo diabético com neuropatia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 32 – Subgrupo diabético com neuropatia: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 33 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

Figura 34 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de corte transversal do segmento distal do nervo ciático. Coloração Tricrômico de Masson. Microscopia óptica com aumento de 400X

4.7 Análise histológica pela hematoxilina-eosina (HE)

A arquitetura geral do nervo foi avaliada pela coloração HE. Observou-se que os segmentos do nervo ciático dos animais do grupo controle eram mais regulares no seu contorno externo do que o grupo diabetes. Os nervos variaram de monofasciculados até tetrafasciculados, tanto nos animais do grupo controle, quanto no grupo diabetes. A descontinuidade do perineuro foi mais frequentemente vista nos animais do grupo diabetes. A formação de tecido conjuntivo, especialmente a de neovasos, se mostrou mais exuberante nos animais do grupo diabetes. A distribuição de axônios remielinizados no estroma do nervo se deu de forma mais homogênea no grupo controle do que no diabetes. A reação tecidual foi maior nos subgrupos com enxerto, tanto do grupo controle quanto diabetes. O escape de fibras nervosas foi pouco observado, sendo semelhante entre os subgrupos.

Tendo em vista que as avaliações foram subjetivas, não foram realizados testes estatísticos para comparação dos subgrupos.

Figura 35 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal trifasciculado do nervo ciático, com epineuro parcialmente íntegro (seta verde) e perineuro contínuo e bem delimitado (setas amarelas), estroma neural com axônios remielinizados (setas laranjas). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X

Figura 36 – Subgrupo controle com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, evidenciando axônios remielinizados (estruturas circulares com ponto central mais escuro), com diâmetros regulares e homogeneamente distribuídos no estroma neural, vaso sanguíneo neoformado (seta vermelha). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 200X

Figura 37 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal monofasciculado do nervo ciático, com contorno externo regular, perineuro (setas amarelas) bem delimitado e axônios remielinizados no estroma (seta laranja). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X

Figura 38 – Subgrupo controle com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, com axônios remielinizados (seta laranja) com diâmetros razoavelmente regulares e distribuídos homogeneamente no estroma neural, perineuro bem delimitado (seta amarela) e com vasos sanguíneos (seta vermelha). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 100X

Figura 39 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal trifasciculado do nervo ciático, mostrando formação exuberante de tecido conjuntivo (setas vermelhas) entre os fascículos, estroma neural com axônios remielinizados (setas laranjas). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X

Figura 40 – Subgrupo diabético com neurorrafia: Fotomicrografia de segmento distal tetrafasciculado do nervo ciático, com contorno irregular, mostrando falta de continuidade do perineuro (setas amarelas) em algumas áreas e estroma neural com axônios remielinizados (seta laranja). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 50X

Figura 41 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal bifasciculado do nervo ciático, com grande formação de neovasos (setas vermelhas), reação tecidual no perineuro (seta amarela), estroma neural preenchido por axônios remielinizados (setas laranjas) com distribuição razoavelmente heterogênea e diâmetros irregulares. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 100X

Figura 42 – Subgrupo diabético com enxerto: Fotomicrografia de segmento distal do nervo ciático, com a formação exuberante de tecido conjuntivo e neovasos (setas vermelhas) no perineuro e no estroma neural, axônios remielinizados (setas laranjas) heterogeneamente distribuídos no estroma e com diâmetros irregulares. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Microscopia óptica com aumento de 200X

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O conceito de que a regeneração nervosa é deficitária em pacientes com DM frequentemente é aceito de maneira inquestionável, no entanto, se for realizada análise mais crítica sobre o assunto, constata-se que existe frágil suporte da literatura médica para se afirmar que isso ocorre de fato. Além do mais, observa-se que dentre os não muitos trabalhos sobre regeneração nervosa e diabetes, a grande maioria não dispõe de múltiplas variáveis para análise mais aprofundada dos resultados, e sabe-se que quanto menor a quantidade de avaliações, maior a chance de resultados não consistentes.

A revisão sistemática dos diversos estudos que sugerem decréscimo da regeneração nervosa em diabéticos, mostra que muitas vezes os autores se fundamentam em simples observação, que por si só não indicaria de fato piora na regeneração nervosa. Eliasson (1965) se baseia somente em simples alteração bioquímica, já Sharma e Thomas (1975) não mostram mudanças na taxa de mielinização de ratos diabéticos submetidos à lesão do nervo ciático por esmagamento, apesar de sugerirem ligeiro atraso da regeneração em diabéticos. Bisby (1980) não encontra taxas de regeneração nervosa diferentes em ratos diabéticos e sim um simples atraso, de 1.71 dia para 3.05 dias, para iniciar a regeneração nervosa após lesão por esmagamento do nervo ciático. Sharma et al. (1981) observaram taxa de degeneração axonal maior no nervo plantar lateral de ratos

diabéticos, o que na verdade deve ser consequência de uma síndrome compressiva do túnel do tarso, que se não estivesse presente provavelmente não mostraria os mesmos achados. Longo et al. (1986) constataram atraso de 1 semana na regeneração axonal de nervos ciáticos de ratos diabéticos para cruzar falha segmentar de 10mm do nervo através de tubo de silastic.

Assim, são muito escassos os trabalhos como o presente, que fazem análise global da regeneração nervosa na vigência do DM, por meio de diversos parâmetros, como avaliações funcionais, testes eletrofisiológicos, peso da massa muscular, e análises histomorfométricas e histológicas dos nervos.

No meio médico, e também entre os pacientes com DM, existe um pessimismo já predeterminado de que a neuropatia do paciente diabético é progressiva e irreversível (DELLON, 2002). Com isso, nos últimos anos, houve até mesmo uma falta de estímulo científico para pesquisas nessa área, tendo em vista que já se partia do princípio básico de que a regeneração nervosa em pacientes com DM era significativamente pior. Isto indubitavelmente prejudicou o desenvolvimento do conhecimento científico nesse assunto e comprometeu o tratamento de muitos pacientes portadores de neuropatia diabética, já que tal doença foi tida por muitos anos como irreversível e progressiva, e o único tratamento oferecido para os pacientes foi o de medidas suportivas como controle estrito da glicemia e prevenção de lesões tegumentares, especialmente nos pés com sensibilidade diminuída. Infelizmente, hoje já se sabe que mesmo quando se consegue

controle glicêmico bastante estrito, os pacientes podem desenvolver sintomas de neuropatia diabética (DELLON , 2002). O cirurgião ficava a cargo do tratamento de infecções, úlceras, debridamentos de tecidos necróticos e por fim das amputações de membros.

O grande incentivo para novamente se estudar um tema que parecia já esgotado e sem grandes perspectivas para novas descobertas, é o fato de que nos últimos anos uma série de trabalhos clínicos e experimentais têm mostrado de maneira mais clara a fisiopatologia da neuropatia diabética e, as cirurgias de descompressões nervosas vêm apresentando resultados promissores (DELLON, 1988a, 1988b, 1994, 2002, 2004, 2011; BABOVIC et al., 1998; DUCIC et al, 2011). Os trabalhos experimentais mostram que se pode conseguir, em animais induzidos ao DM, regeneração nervosa efetiva e similar a não diabéticos, além do que, boa retomada da função nervosa pode ser obtida após cirurgias de descompressões nervosas em ratos. Ademais, os trabalhos clínicos têm sugerido que pacientes com DM podem conseguir recuperação da função nervosa, variando de boa a excelente, após cirurgias de descompressões de nervos periféricos nos membros superiores e inferiores (DELLON, 1988a, 1992, 2002, 2004, 2011; DUCIC et al., 2011).

5.1 Animais

Muitos fatores podem interferir na evolução da regeneração nervosa, entre os quais pode-se citar: os diferentes animais usados no experimento

(MCDONALD, 1972; BLUNDON et al., 1990), a idade dos animais (CHAUDHRY et al., 1992), o tipo de fibra nervosa predominante no nervo, se mielínica ou amielínica (LUBINSKA, 1975; VERONESI e BOYES, 1988), o tipo de lesão nervosa (LUBINSKA, 1975), e fatores ambientais, como a temperatura (LUBINSKA, 1975; BLUNDON et al., 1990).

Diversas espécies de animais, dentre as quais camundongos (MYCKATYN et al., 2004), ratos (BISBY, 1980; SHARMA et al., 1981; DE MEDINACELI et al., 1982; LONGO et al., 1986; BAIN et al., 1989; DELLON et al., 1988a, 1994; BABOVIC et al., 1998; AKEDA et al., 2006; BERTELLI et al., 2006), coelhos (ASKAR et al., 2001; JABERY et al., 2003), gatos (MOLDOVAN et al., 2006), cães (SUNDINE et al., 2003), primatas (MENNEN, 1998^b; AUBA et al., 2006), entre outras, têm sido utilizadas em trabalhos experimentais de regeneração nervosa. Na grande maioria dos centros de pesquisa os ratos são os animais mais utilizados, pelo baixo custo de aquisição, facilidade na obtenção, manipulação e manutenção, e pelo seu reduzido tamanho, o que facilita a realização de estudos de longa duração, uma vez que os animais ocupam espaço reduzido (ELLIS & MCCAFFREY, 1984). Além disso os ratos ainda possuem nervos com estrutura anatômica muito favorável para estudos sobre neurorrafias, uso de enxertos e regeneração nervosa, e desta forma vêm sendo muito utilizados nessas linhas de pesquisa.

Contando com essas características vantajosas, foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem Wistar no presente trabalho. Levou-se em consideração-se também o fato de que,

de acordo com Pereira et al. (1998), na escolha do animal de experimentação deve-se considerar a espécie mais utilizada na literatura e a quantidade mínima necessária para obtenção de resultados válidos. Não obstante, segundo Kennedy e Zochodne (2000), camundongos induzidos ao DM com estreptozotocina podem servir como modelo experimental melhor, uma vez que eles têm maturidade mais precoce e perda de peso insignificante após a indução do distúrbio.

Em relação ao sexo dos animais, sabe-se que ratos do sexo feminino são mais susceptíveis à ação de hormônios adenohipofisários e gonadais (LINCOLN e SHORT, 1980; CARANDENTE et al., 1989), além do que, pesquisas têm demonstrado que hormônios sexuais podem ter efeitos neurotróficos em várias regiões do sistema nervoso adulto, como o brotamento de axônios sensoriais mielínicos (KOVACIC et al., 2003). Tendo em vista o exposto, optou-se por utilizar todos os animais do sexo masculino, desta forma retirando fator de viés que poderia ser acrescentado à amostra do estudo.

Quanto à idade, decidiu-se pelo uso de animais considerados jovens, com 10 semanas de vida no início do experimento, já que a idade mais avançada pode ser fator de interferência, prejudicando a regeneração tecidual (BHARALLI e LISNEY, 1990), diminuindo a velocidade da regeneração nervosa (FAWCETT, 1992; VAUGHAN, 1992), assim como reduzindo a liberação dos fatores neurotróficos (ANDREWS, 1996).

5.2 Nervo ciático

O nervo ciático dos ratos foi escolhido para neurorrafia ou o enxerto de nervo, dependendo do subgrupo em questão, tendo em vista que é muito fácil de ser acessado, através de pequena incisão longitudinal na pata traseira do animal, tem anatomia constante e calibre razoavelmente grosso, facilitando a realização das suturas nervosas e possibilitando assim que elas sejam semelhantes em todos os animais, garantindo que o fator técnico não interfira de modo diferente entre os subgrupos. As divisões fibular e tibial do nervo inervam toda musculatura posterior da pata do animal, e o padrão de recuperação funcional da musculatura pode ser analisado de modo objetivo através de testes específicos, como o índice de função ciática (IFC). Além do mais, muitos trabalhos de regeneração nervosa em ratos foram feitos utilizando-se o nervo ciático (DE MEDINACELI et al., 1982; LONGO et al., 1986; DELLON et al., 1988b; BAIN et al., 1989; YASUDA, 1999; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000, 2002; ECKERSLEY et al., 2001; COSTA, 2001; CONTI et al., 2002; PIERSON et al., 2003; SCOPEL, 2007; ZOCHODNE et al., 2007; TUMA JUNIOR et al., 2008)

No manuseio do nervo ciático seguiu-se a técnica microcirúrgica padrão e o microscópio cirúrgico foi utilizado para diminuir a possibilidade de lesão durante a manipulação e anastomose. O microscópio, como meio de amplificação da visão, é recomendado por aumentar a precisão cirúrgica, consequentemente possibilitando técnica mais atraumática e oferecendo melhor recuperação funcional (FERREIRA et al., 1974; TERZIS, 1979;

MILLESSE, 1990; NOAH et al., 1997a, 1997b).

A sutura epineural, tanto na neurorrafia quanto na enxertia de nervo, constitui-se em técnica amplamente utilizada na literatura em trabalhos experimentais em ratos (CARTER et al., 1998; COSTA, 2001; TUMA JUNIOR et al., 2008).

5.3 Indução do DM

O diabetes mellitus pode ser produzido em animais de diversas formas: cirurgia, por meio de pancreatectomia, infecção viral, administração de dietas e agentes químicos. A doença também pode se desenvolver de forma espontânea em ratos BB, NOD e nude atímicos (MENDEZ e RAMOS, 1994).

A forma mais usada para indução de DM experimental é pela administração de agentes químicos, sendo as 2 substâncias mais comumente empregadas a estreptozotocina (STZ) e a aloxana. A previsibilidade de indução do DM parece ser maior quando se usa a STZ. Carvalho et al. (2003), em modelo experimental de indução de DM com aloxana em ratos, verificaram que 40% dos animais desenvolveram DM crônico, 20% apresentaram grau leve à moderado do distúrbio ou não o desenvolveram, e os 40% restantes morreram na primeira semana após a tentativa de indução do distúrbio endócrino.

O presente trabalho fez uso da STZ para indução do modelo experimental de DM, tendo em vista que a grande maioria dos estudos de

regeneração nervosa, na vigência de diabetes, utilizou tal droga (JAKOBSEN e LUNDBAECK, 1976; JAKOBSEN, 1976, 1978; JAKOBSEN e SIDENIUS, 1980; BISBY, 1980; BESTETTI et al., 1981; SHARMA et al., 1981; DAHLIN et al., 1986; LONGO et al., 1986; FINK et al., 1987; DELLON, 1988a; DELLON E. e DELLON A., 1991; DELLON et al., 1994; BABOVIC et al., 1998; TERADA et al., 1998; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000, 2002; KALE et al, 2003; SIEMIONOW et al., 2007; MAINARDES et al., 2007). Para que comparações dos resultados pudessem ser feitas era necessário que modelo experimental semelhante tivesse sido usado.

A STZ é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de tumor carcinóide e de tumores endócrinos do pâncreas, como o insulinoma, principalmente na sua forma metastática. Ela é uma droga altamente seletiva e citotóxica para a célula beta-pancreática, constituindo-se assim numa potente substância diabetogênica. Quando administrada leva à destruição seletiva da célula beta em várias espécies animais (RAKIETEN et al., 1968), sendo que quanto maior a dose maior a destruição da célula. A STZ se deriva da cultura do *Streptomyces achromogenes* e consiste de 1-metil-1-nitrosouréia ligada ao carbono 2 da D-glucose, sendo um derivado N-nitroso da glicosamina (HERR et al., 1967). A maneira pela qual o STZ produz lesão citotóxica é bastante discutida e muitas hipóteses têm sido aventadas. A geração de radicais livres, quebras do DNA, ativação da enzima poli-ADP-ribose polimerase, depleção do NAD das células beta, alterações do metabolismo do ácido araquidônico e da produção de endotelinas, e aumento

do óxido nítrico, parecem ser fatores comuns na morte das ilhotas pancreáticas (TAKASU et al., 1991; GALE, 1996; GONZALES, 1999).

Neste trabalho, antes da indução do DM os ratos foram randomizados, a fim de estabelecer a que grupo pertenceriam. As doses diabetogênicas da STZ variam entre diferentes espécies, sendo que uma mesma dose pode ser tóxica e causar índice de mortalidade alto em uma espécie e ao mesmo tempo ser pouco diabetogênica em outra. Em ratos, alguns trabalhos usaram a dosagem de 90mg/kg de peso em dose única, por via intraperitoneal, e obtiveram sucesso na indução do DM (MAINARDES et al, 2007; WEIDE e LACY, 1991). A mesma dosagem foi inicialmente utilizada no presente trabalho, e apesar da elevação dos níveis glicêmicos para acima de 200mg/dl em todos os animais induzidos ao DM, eles apresentaram perda de peso significativa, ficaram muito astênicos e gravemente desidratados, obviamente não apresentando nenhuma condição para serem submetidos à anestesia e procedimento cirúrgico. Foi então reduzida a dose para 60mg/kg, em aplicação única, mantendo a via intraperitoneal, de acordo com o recomendado em outros trabalhos da literatura (BABOVIC et al., 1998; DELLON et al., 1994). Desta forma obteve-se êxito na indução do DM, sem que os animais evoluíssem com condição clínica precária. Outra razão de escolha da dosagem menor de STZ para indução do DM, foi o fato de que neste trabalho pretendia-se estudar os efeitos da hiperglicemia sobre a regeneração nervosa. Assim, uma dose menor de STZ levaria ao aumento da glicose plasmática como pretendido, porém sem levar à falência total das células beta, de acordo com Nóbrega (2005). A via intra-venosa de

administração da STZ foi utilizada por alguns autores (DELLON et al., 1988a), baseando-se no fato da STZ ter meia vida curta, estimada em apenas 5 minutos em camundongos (RERUP, 1970). No entanto, a via intraperitoneal sem dúvida é a mais simples de ser executada e também obtém sucesso na indução do DM, como observado no presente trabalho.

Recuperações espontâneas e reversões do quadro diabético foram raramente observadas em ratos, contudo, somente com o uso de doses de STZ entre 30 e 40mg/kg de peso. O retorno à condição de normoglicemia ocorreu em 10 dias e a secreção de insulina em resposta à glicose se recuperou em 3 meses (JUNOD et al., 1969; AR'RAJAB e AHREN, 1993).

As alterações da glicemia após a administração da STZ em ratos, assim como quando se usa a aloxana, se dão em padrões de flutuação trifásicos, ou seja, hiperglicemia inicial até 2 horas após a inoculação da droga, seguida por hipoglicemia acentuada cerca de 10 horas após a injeção, e enfim a hiperglicemia permanente (JUNOD et al., 1969).

Em ratos, a especificidade da STZ sobre as células beta parece ser mais acentuada que a da aloxana, para a qual foram relatadas lesões renais e hepáticas associadas à lesão pancreática (LASAROW e PALAY, apud RERUP, 1970).

Os efeitos do DM por STZ incluem aumento progressivo da glicosúria e do volume urinário na primeira semana após a indução. A lipemia normalmente está presente, porém a cetonúria é rara, somente sendo observada com doses de 100mg/kg (JUNOD et al., 1969). Tais dosagens ficaram bem longe dos 60mg usados neste trabalho, em que se conseguiu

DM mais equilibrado e compensado, não levando a um quadro tão grave, que por si só, poderia interferir com os resultados obtidos em termos de regeneração nervosa.

Segundo Furlan (2001) as características da STZ permitem afirmar que ela é mais indicada do que a aloxana nos estudos que requerem quadro diabético experimental consistente e reprodutível. Além disso, quando se usa a STZ, a faixa de atividade diabetogênica de moderada a severa é mais ampla e reprodutível do que a aloxana.

Após 15 dias da indução do DM ou da inoculação de solução tampão citrato, dependendo do grupo do animal, as glicemias foram medidas e considerou-se diabético aquele animal com glicemia superior a 200mg/dL (MACHADO et al., 2000). Somente após 8 semanas de indução do DM ou da inoculação do tampão foi realizado o procedimento cirúrgico, seguindo alguns autores da literatura que orientam que os ratos fiquem expostos aos efeitos da hiperglicemia por este período, para que as alterações de neuropatia possam ocorrer (BABOVIC et al., 1998; ECKERSLEY et al., 2001). O período exato para que as alterações sistêmicas provocadas pela hiperglicemia possam se estabelecer, e, ao mesmo tempo, outros fatores como a nefropatia e a angiopatia diabética não se instalem de maneira tão grave que interfiram com os resultados, não está bem estabelecido na literatura, não havendo consenso entre os autores.

5.4 Avaliações

5.4.1 Massa corporal

Neste trabalho, para se dar início à fase de indução do DM com STZ, no grupo diabetes, ou inoculação de solução tampão, no grupo controle, selecionaram-se ratos com 10 semanas de vida e peso similar, caracterizando assim amostra inicial homogênea, conforme recomendado por Vieira e Hossne (2001). Após 8 semanas da indução do distúrbio endócrino ou da inoculação do tampão, no momento pré-operatório, verificou-se que os pesos dos animais ainda eram semelhantes e sem diferenças estatísticas ($p>0,05$), indicando que os animais diabéticos acompanharam o ganho ponderal observado nos animais do grupo controle, panorama este que não se manteve após o procedimento cirúrgico. Segundo Furlan (2001), quando se utiliza a STZ em ratos para indução de DM, normalmente se observa que o peso corporal dos animais tende a diminuir ou se estabilizar, enquanto animais controle da mesma idade e peso inicial tendem a aumento ponderal progressivo.

No 15º dia de pós-operatório, observou-se perda de peso em todos os subgrupos, provavelmente pela dificuldade que os animais tiveram para se locomover dentro das gaiolas e tomar água ou comer a ração, já que o nervo ciático estava seccionado e houve perda dos movimentos da pata operada. O emagrecimento observado foi significativamente maior ($p<0,05$) nos ratos

diabéticos do que nos controles, possivelmente pela resposta metabólica exacerbada ao trauma cirúrgico.

Com 30 dias de pós-operatório os animais diabéticos até ganharam certo peso, porém ainda se apresentavam bastante emagrecidos em relação ao momento pré-operatório. Por outro lado, os ratos do grupo controle retomaram o ganho de peso e já se apresentavam com peso bem superior ao pré-operatório. Na comparação dos pesos, observou-se que eram significativamente menores ($p < 0,05$) nos ratos diabéticos, mostrando que estes animais ainda tinham dificuldades na resposta ao trauma cirúrgico.

Já no 60º dia de pós-operatório constatou-se que todos animais ganharam peso, não obstante, o ganho foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais do grupo controle em comparação ao grupo diabetes. É consenso, quando se analisa uma série de trabalhos em ratos diabéticos, que o peso dos animais com o distúrbio é significativamente menor do que animais controles, de idades e pesos iniciais semelhantes, ao final dos experimentos (DELLON et al., 1988b, 1994; BABOVIC et al., 1998).

Obviamente que o peso é variável muito importante para que alguns resultados de determinados testes possam ser comparados e validados. O peso diferente entre os animais de diferentes grupos, conforme visto neste trabalho entre os ratos do grupo diabético e controle, poderia ser fator de interferência nas comparações. Sharma et al. (1981) e Dockery e Sharma (1990) argumentaram que a indução do DM com STZ e a consequente hiperglicemia resultante, podem interferir e retardar as taxas de crescimento normais dos ratos. Assim sendo é quase sempre esperado diferença

significativa de peso de ratos diabéticos em relação a animais controles. Este fato fez alguns autores usarem artifício para tentar compensar a discrepância de peso na amostra, escolhendo ratos pareados não pela idade, e sim pelo peso (BABOVIC et al., 1998). No presente trabalho não foi realizada tal manobra de compensação, já que a própria idade diferente dos animais também poderia ser fator de viés importante na comparação dos resultados, até mesmo mais relevante que os pesos diferentes.

5.4.2 Glicemias

Antes da indução do DM ou da inoculação de solução tampão citrato, as glicemias de todos os animais foram medidas para se constatar que eles não eram previamente diabéticos, além de comprovar a homogeneidade da amostra. Conforme os testes estatísticos demonstraram não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos valores de glicemia encontrados neste momento, confirmando assim a homogeneidade dos ratos de ambos os grupos, controle e diabetes.

No pré-operatório, após 8 semanas da indução do DM ou da inoculação do tampão, as glicemias novamente foram medidas, verificando-se que o grupo diabetes já apresentava níveis acima de 400mg/dL, significativamente maiores ($p < 0,05$) que o grupo controle. Confirmou-se, desta forma, que havia uma população de animais diabéticos e outra controle.

No pós-operatório, com 30 e 60 dias, as glicemias novamente foram aferidas e observou-se que se mativeram em patamares significativamente superiores ($p>0,05$) nos animais do grupo diabetes, acima de 300mg/dL. Constatou-se assim a presença do distúrbio metabólico no grupo de estudo durante toda a evolução, desde o pré-operatório até o pós-operatório e o sacrifício dos ratos. Dellon et al. (1988b), em modelo experimental semelhante, encontraram níveis de glicemia pouco inferiores a 300mg/dL após 4 meses da indução do DM.

Na comparação de 30 e 60 dias de pós-operatório com o momento pré-operatório, observou-se queda significativa ($p<0,05$) das glicemias nos animais do grupo diabetes. A curva glicêmica vista neste trabalho se assemelhou à encontrada por Nóbrega (2005), que afirmou que o fato da hiperglicemia atingir um pico e depois um platô com níveis menos elevados, embora ainda mantendo aumento significativo, indica a recuperação de parte das células beta-pancreáticas. A variação da glicemia observada no presente estudo foi ao encontro do que era objetivado no que se refere à produção do DM, haja vista que a intenção não era produzir distúrbio metabólico tão grave que destruísse todas as células beta, e sim DM mais próximo do que é visto em pacientes com DM tipo II. O resultado diferiu um pouco do obtido por Dellon et al. (1994) e Babovic et al. (1998), que mantiveram ratos diabéticos com níveis glicêmicos maiores, em torno de 400mg/dL, por períodos de 6 meses a 1 ano. Entretanto, diferentemente do presente trabalho, os autores reinjetavam a dose original de STZ se os animais mostrassem níveis de glicemia inferiores a 400mg/dL, o que pode ter relação com o elevado

número de óbitos resultantes. Dos 30 ratos induzidos ao DM, 22 (73%) morreram ao final do primeiro estudo, com 1 ano, e 32 (71%) ao término do segundo, com 6 meses. Em contraste, no presente estudo houve somente 2 (10%) mortes dos 20 ratos induzidos ao diabetes, ressaltando-se, é claro, que o sacrifício foi realizado num período bem mais curto, com 60 dias de pós-operatório.

5.4.3 Teste da marcha (*Walking Track*)

O teste da marcha (*walking track*) avalia de modo objetivo e matemático o modo de andar do animal, por meio do cálculo do índice de função ciática (IFC), que é expresso como porcentagem de perda da função normal do nervo ciático (DE MEDINACELI et al., 1982; BAIN et al., 1989), sendo que a porcentagem zero ($\pm 10\%$) representa função normal e -100% a perda completa da função do nervo, que resulta de sua transecção total. Tal índice se constitui numa ferramenta extremamente útil para avaliação da regeneração nervosa e vem sendo muito utilizado nos trabalhos sobre o assunto nos últimos anos. De acordo com Monte-Raso et al. (2008) o IFC parece ser o mais versátil e, apesar de apresentar alguns inconvenientes, é teste de baixo custo e facilmente aplicável. O teste da marcha é método confiável para avaliação funcional da regeneração nervosa de ratos (HARE et al., 1993; DELLON E. e DELLON A., 1991; MACKINNON et al., 1985), e é provável que reflita a função do membro como um todo, e não puramente sua parte motora, incluindo os efeitos do DM na sensibilidade plantar e nos

aferentes dos músculos e articulações dos membros inferiores (DELLON et al., 1994).

Um dos problemas enfrentados para realização do teste da marcha foi naqueles animais que se automutilaram após a cirurgia. Como o nervo ciático é responsável, além da parte motora, por toda sensibilidade da pata dos animais, sua secção completa leva à anestesia total nesta região. Dois animais, 1 do subgrupo controle com enxerto e outro do subgrupo diabético com enxerto, automutilaram suas patas operadas e conseqüentemente o teste não pôde ser feito, já que medidas de extensão e largura da pegada, além da distância entre os dedos não eram acessíveis. Segundo Hare et al. (1993), a extensão da pegada é o indicador mais sensível de regeneração nervosa.

No pré-operatório, o teste da marcha mostrou que não havia diferenças significativas ($p>0,05$) entre os IFCs dos diferentes subgrupos. Dellon et al. (1994) mostraram que, mesmo sem cirurgia o IFC pode se alterar em ratos diabéticos, porém, com tempo bem maior de evolução da indução do distúrbio endócrino, diferente do período de 8 semanas em que os ratos se encontravam no pré-operatório deste trabalho. Os autores mostraram que ratos diabéticos não submetidos a descompressão do túnel do tarso, desenvolviam padrões neuropáticos progressivos do teste da marcha com 1 ano de evolução.

O IFC do pós-operatório imediato foi realizado, mas não foi considerado devido a inúmeros fatores de distorção dos resultados, como dor pós-operatória e stress dos animais.

Com 20 dias de pós-operatório os IFCs foram significativamente ($p < 0,05$) piores nos animais do grupo diabetes em relação aos do grupo controle, e dentro do mesmo grupo, nos animais submetidos à enxertia de nervo. Normalmente a regeneração nervosa através de enxertos de nervo é mais lenta que quando comparada ao seu reparo primário sem tensão, sem a necessidade de interposição do enxerto (MILLES *et al.*, 1972; TERZIS *et al.*, 1975; MILLES, 1977, 1990).

Na próxima medida do IFC, no 40º pós-operatório, os resultados das comparações anteriores entre os subgrupos se confirmaram parcialmente, porém os valores de IFC foram bem mais próximos da faixa considerada de normalidade. Houve mudança do subgrupo diabético com enxerto, que teve melhora do IFC. Dessa forma, não se observou mais diferença significativa ($p > 0,05$) com o subgrupo diabético com neurorrafia.

Na última avaliação, com 60 dias de pós-operatório, o que chamou a atenção foi a recuperação do IFC do subgrupo diabético com neurorrafia, que não mais apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) com os animais do grupo controle, tanto com neurorrafia quanto com enxerto, indicando regeneração nervosa semelhante aos ratos não diabéticos. Este resultado se mostrou parecido ao encontrado por Babovic *et al.* (1998), que avaliaram a recuperação do nervo tibial posterior de ratos diabéticos submetidos à neurorrafia ou enxerto de nervo. No entanto, houve diferença quanto ao tempo de recuperação do IFC, que demorou mais no estudo do autor do que no presente trabalho. Alguns autores, que utilizaram outras formas de avaliação da regeneração nervosa, que não o teste da marcha, também

demonstraram recuperação um pouco mais lenta em ratos diabéticos (BISBY, 1980; LONGO et al., 1986). Já o índice do subgrupo diabético com enxerto foi significativamente ($p < 0,05$) pior que o dos subgrupos controles e que o subgrupo diabético com neurorrafia, indicando que quando se usa enxerto nos ratos diabéticos a recuperação funcional se dá mais lentamente. Não obstante, provavelmente se tivesse sido feita nova avaliação do IFC com mais algumas semanas o resultado poderia ser semelhante ao dos animais controles. Babovic et al. (1998) fizeram as avaliações finais com 6 meses, e não encontraram diferenças no teste da marcha entre ratos diabéticos e controles com enxerto. Como também já era esperado, não houve diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os subgrupos controles com neurorrafia e com enxerto, tendo em vista que com este tempo de evolução o nervo já cresceu pelo enxerto e atingiu o órgão alvo.

O teste da marcha tem algumas limitações, como pode-se ver pelo resultado no subgrupo diabético com neurorrafia e com enxerto, com 40 dias de pós-operatório. Não foi encontrada diferença estatística entre esses subgrupos, ao passo que, no grupo controle observou-se que o subgrupo com neurorrafia apresentava IFC significativamente ($p < 0,05$) mais próximo da normalidade que o subgrupo com enxerto. Já com 60 dias o subgrupo diabético com enxerto voltou a ter IFC significativamente ($p < 0,05$) pior que o subgrupo diabético com neurorrafia. Provavelmente o teste não foi sensível o suficiente para detectar diferença entre esses subgrupos, conforme observado por Goheen-Robilard et al. (2002), que em estudo de anastomose término-lateral de longo enxerto de nervo ciático, afirmaram que o teste da

marcha não foi sensível o suficiente para detectar pequenas alterações funcionais nervosas. Daí vem a extrema importância de se utilizarem outras avaliações, como o teste eletrofisiológico, pesos musculares, análises histomorfométricas e histológicas. Diferentemente de outros estudos que só se valeram do teste da marcha (DELLON et al., 1994; DELLON E. e DELLON A., 1991, BABOVIC et al., 1998), este trabalho usou o máximo possível de variáveis pertinentes ao que se pesquisava, de modo a buscar resultados mais confiáveis e consistentes, já que a limitação de um teste pode ser compensada pela comparação com resultados de outros testes.

Em relação ao peso dos animais, que se apresentou diferente entre os grupos controle e diabetes nos momentos de avaliação pós-operatória do teste da marcha, optou-se pelo pareamento dos animais pela idade, diferente de outros trabalhos que optaram pelo pareamento de acordo com o peso dos animais (BABOVIC et al., 1998, DELLON et al., 1994). A modificação do IFC, originalmente descrito por De Medinaceli et al. (1982), feita por Bain et al. (1989), faz com que o índice seja calculado por meio de 3 medidas da pegada do rato, e sendo o peso corporal do animal uma variável que se aplicaria igualmente às essas 3 mensurações, haveria proporcionalidade e o resultado seria o mesmo independentemente do peso. O pareamento só pelo peso, com os animais tendo idades diferentes, poderia se constituir num viés ao trabalho, uma vez que sabidamente os sistemas orgânicos são afetados pelo processo de envelhecimento, conforme estudo de Nóbrega (2005).

5.4.4 Teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados (eletroneurografia - ENG)

O teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados complementou a parte dos testes funcionais deste trabalho, juntamente com o teste da marcha. Assim sendo, houve a possibilidade de uma análise mais aprofundada dos resultados funcionais deste estudo. O teste em questão é procedimento eletrodiagnóstico que consiste de avaliação eletrofisiológica das funções dos músculos, junções neuromusculares, nervos periféricos motores, sensitivos e autonômicos.

O aparelho disponibilizado para realização do exame proporcionou a avaliação da neurocondução por meio da determinação da amplitude dos potenciais de ação evocados. Esta medida é obtida após a estimulação do nervo em estudo e a captação do potencial de ação gerado pelo músculo correspondente inervado. Assim sendo, a amplitude informa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico e, conseqüentemente, o número de axônios excitáveis (ROBINSON e SNYDER-MACKLER, 2001). Como desejava-se avaliar a regeneração nervosa em ratos diabéticos e controles, após neurorrafia ou enxerto de nervo, era imprescindível um exame que proporcionasse estimativa do contingente de axônios funcionantes no nervo.

A diminuição da amplitude pode ocorrer basicamente por acometimento do nervo ou da musculatura. Após lesões axonais ou desmielinização das fibras nervosas, haverá redução da condução do

estímulo elétrico do nervo e conseqüentemente queda da amplitude. Da mesma forma, se houver alguma patologia primária no músculo, este não responderá adequadamente ao estímulo elétrico e resultará em amplitude diminuída.

Neste trabalho, a medida da amplitude foi realizada por meio da estimulação direta do nervo ciático, proximal à neurorrafia ou ao enxerto de nervo, dependendo do subgrupo, e captação dos potenciais evocados na musculatura tríceps sural dos animais. O teste foi feito imediatamente antes do sacrifício dos animais no 60º dia de pós-operatório. Determinou-se que a frequência, duração e intensidade do estímulo fossem constantes, de maneira que a única variável fosse o subgrupo ao qual o animal pertencesse. Como o estímulo pode variar de um trabalho para o outro na literatura, é difícil fazer comparação dos valores isolados de amplitude encontrados, tendo em vista que a intensidade do estímulo determinará a amplitude alcançada.

Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os subgrupos do estudo, indicando que com 60 dias de pós-operatório, os ratos diabéticos, seja com neurorrafia ou com enxerto de nervo, apresentavam amplitude semelhante à dos ratos controles. Kennedy e Zochodne (2000) estudaram a regeneração nervosa em camundongos diabéticos submetidos à lesão por esmagamento do nervo ciático, observando amplitude significativamente reduzida na 4ª semana de pós-operatório nos animais com DM, entretanto, após a 6ª semana já houve recuperação da amplitude para valores iguais aos dos animais controles,

corroborando os resultados obtidos no presente trabalho. De acordo com os autores isso pode ser indicativo de reinervação colateral exuberante da musculatura, já que o número de fibras nervosas do nervo tibial não estava restituído ainda. Os autores avaliaram também lesões por transecção do nervo ciático, encontrando diminuição das amplitudes e retardo na sua recuperação, tanto nos animais diabéticos quanto controles, sem diferenças estatísticas entre eles. A análise crítica dos resultados do estudo indica que pode haver regeneração mais lenta nos animais diabéticos, porém, confirma que o processo ocorre adequadamente e atinge os mesmos patamares dos animais controles.

Sharma et al. (1981) e Dockery e Sharma (1990) argumentaram que a indução do DM com STZ e a consequente hiperglicemia resultante podem interferir e retardar as taxas de crescimento normais dos ratos, levando a regeneração deficiente e demora maior na velocidade de condução dos nervos, não relacionados propriamente ao aumento do nível glicêmico.

5.4.5 Peso do músculo tríceps sural

Os animais utilizados no experimento não diferiram no peso inicial, porém, após a indução do DM e o posterior procedimento cirúrgico a que foram submetidos, houve queda de peso significativamente maior nos ratos diabéticos. Sendo assim, se somente as medidas isoladas das massas musculares fossem comparadas, haveria forte interferência do peso corporal, já que os animais diabéticos estavam bem mais emagrecidos.

Como já era de se esperar, verificou-se que os pesos musculares do lado operado eram significativamente ($p < 0,05$) menores nos ratos diabéticos, não se detectando diferença estatística entre os subgrupos diabéticos com neurorrafia e com enxerto. O peso muscular do subgrupo controle com neurorrafia foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que o do subgrupo controle com enxerto, provavelmente pela reinervação mais precoce e restabelecimento do trofismo muscular.

Já na análise do lado não operado, somente o peso muscular do subgrupo controle com enxerto foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que o do subgrupo controle com neurorrafia e o dos 2 subgrupos diabéticos, sendo que entre estes 3 últimos não houve diferença estatística significativa. Esses achados podem ser explicados pelo fato de que normalmente se um lado atrofia o outro hipertrofia para tentar equilibrar e compensar as diferenças. Como o lado operado do subgrupo controle com enxerto atrofiou mais que o mesmo lado do subgrupo controle com neurorrafia, é de se esperar que o seu lado não operado tenha hipertrofia maior.

Tentando compensar a importante variação ponderal da amostra, foi optado pelo cálculo de um índice de peso, por meio da divisão do peso do músculo tríceps sural da pata operada pela contralateral não operada, conforme trabalho de Siemionow et al. (2007). Tal relação se constituiu indubitavelmente no dado mais relevante e confiável da avaliação do peso muscular.

O índice de peso foi significativamente ($p < 0,05$) maior no subgrupo controle com neurorrafia do que nos outros 3 subgrupos. Este resultado

indica que provavelmente a reinervação da musculatura tríceps sural se deu antes nos animais do subgrupo controle com neurorrafia, sendo assim, houve recuperação da atrofia muscular do lado operado e a hipertrofia compensatória do lado não operado diminuiu. Nos outros subgrupos, controle com enxerto e diabéticos com neurorrafia e enxerto, possivelmente a reinervação demorou um pouco mais, e, o índice de peso se equilibraria em mais algumas semanas, à medida que o músculo do lado operado e, agora reinervado, começasse a hipertrofiar, e o lado contralateral voltasse à normalidade.

Não foram encontrados trabalhos na literatura usando o mesmo modelo experimental e delineamento de estudo, que tivessem usado o peso da musculatura para comparação da regeneração nervosa entre ratos diabéticos e controles.

5.4.6 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica deste trabalho abrangeu as densidades axoniais, diâmetros mínimos das secções transversas das fibras nervosas, dos axônios e das células de Schwann, e suas respectivas áreas. Alguns autores realizaram somente a contagem do número total de fibras no corte transversal do nervo (VITERBO et al., 1994; NOAH et al., 1997a). Já outros, como Hayashi et al. (2004), analisaram além da contagem do número de fibras, a medida do menor diâmetro da fibra mielinizada. As análises feitas no presente trabalho foram nos fragmentos do nervo ciático distais à

neurorrafia ou ao enxerto, obviamente para mensurar o crescimento das fibras nervosas em direção ao órgão alvo, após 60 dias de evolução.

Não há na literatura consenso sobre o período de tempo que se deva esperar para análise efetiva da regeneração nervosa, variando de alguns dias até meses. Sabendo que com aproximadamente 6 semanas o coto distal do nervo ciático já é alcançado pelos axônios proximais que se regeneram (STANCIC et al., 1998; FANSA et al., 1999) e, considerando margem um pouco superior a este período já que variações podem ocorrer, especialmente por se tratarem de ratos diabéticos, foi optado neste estudo por 60 dias até as avaliações funcionais finais e o sacrifício dos animais para coleta das peças para análises. Kennedy e Zochodne (2000), em estudo da regeneração nervosa em lesões por esmagamento e transecção do nervo ciático de camundongos diabéticos, fizeram as avaliações finais com 10 semanas de pós-operatório.

A histomorfometria aqui realizada utilizou-se dos recursos do software *Image Pro Plus* (Media Cybernetics®) para coleta das medidas das estruturas nervosas e áreas das fotomicrografias, entretanto, a contagem de axônios regenerados, para cálculo da densidade, foi manual. Tuma Júnior et al. (2008) usaram a histomorfometria convencional, alegando que o uso do método computadorizado ainda não foi alvo de estudos críticos sobre suas aplicações e limitações. Além do que, segundo os autores, a modificação da imagem e a possibilidade de distorções é um aspecto que pode induzir ao erro quando a análise computadorizada é utilizada, principalmente em se tratando de tecidos como o nervo periférico, em que muitas vezes existe a

necessidade de edição da imagem. No entanto, com os softwares bastante avançados e aprimorados que podem ser encontrados hoje em dia, essas possibilidades ficam mais reduzidas, de modo que a histomorfometria computadorizada vem sendo extensivamente utilizada (MACHADO et al., 2000; KENNEDY e ZOCHODNE, 2000; STIPP BRAMBILLA, 2009).

Especificamente no cálculo das áreas das secções transversas das estruturas, os mesmos campos de maior aumento selecionados para a medida da densidade axonal foram utilizados, sendo que se media o diâmetro do menor eixo da estrutura tubular externa, correspondendo às fibras nervosas, e da tubular interna, correspondendo aos axônios. Tomou-se o cuidado de se fazer as medidas dos menores diâmetros, uma vez que às vezes o corte não estava perfeitamente transversal e a medida do maior eixo não corresponderia ao real diâmetro da estrutura. De acordo com Romão et al. (2007), a medida do diâmetro mínimo é mais confiável que a medida de área ou de diâmetro máximo, pois não sofre alteração da inclinação da navalha durante o corte histológico. De Sá et al. (2004) afirmaram que a medida do diâmetro mínimo das fibras axonais é o parâmetro mais confiável na regeneração nervosa. Com a medida dos diâmetros reais das fibras nervosas e dos axônios, foi possível o cálculo das áreas correspondentes das secções transversas destas estruturas, e a diferença entre as medidas resultou na área de secção transversa da célula de Schwann.

A avaliação da morfologia e da morfometria das fibras nervosas remielinizadas é o pilar para pesquisas sobre regeneração de nervos

periféricos. A coloração tricrômico de Masson é bastante apropriada para estudos de regeneração nervosa, e nos últimos anos vem sendo bastante utilizada (OHSUMI et al., 2005; GONG et al., 2009; ZHENG et al., 2010). Segundo Di Scipio et al. (2008), tal coloração permite boa avaliação dos resultados, e, diferentemente do azul de toluidina, possibilita imagens também do tecido conjuntivo, além das estruturas nervosas, como os axônios e células de Schwann.

O presente trabalho mostrou que a densidade axonal (axônios/ $11869,33\mu\text{m}^2$) foi maior no subgrupo controle com neurorrafia ($41,9 \pm 9,5$), seguido pelo subgrupo diabético com neurorrafia ($38,1 \pm 5,8$), subgrupo controle com enxerto ($35,1 \pm 10,0$), e por fim, subgrupo diabético com enxerto ($32,4 \pm 6,4$). Apesar das diferenças de densidade, não foi encontrada significância estatística ($p>0,05$) na comparação dos subgrupos. Tais resultados corroboram com os outros achados deste trabalho, como os testes eletrofisiológico e da marcha, em que não se observaram diferenças estatísticas na comparação dos subgrupos controle com os diabéticos ao final de 60 dias, com a única exceção sendo o subgrupo diabético com enxerto no teste da marcha. De acordo com Yasihashi et al. (1979) a correlação da densidade de fibras remielinizadas e alterações funcionais é discutível.

Em relação às áreas (μm^2) das secções transversas das fibras nervosas, observou-se que foram maiores no subgrupo diabético com neurorrafia ($113,4 \pm 31,9$), seguido pelo subgrupo controle com enxerto ($106,6 \pm 43,5$), diabético com enxerto ($96,3 \pm 35,5$), e por último controle

com neurorrafia ($93,8 \pm 35,1$). Não houve significância estatística ($p > 0,05$) na comparação dos resultados. As áreas das secções transversas axonais foram maiores nos subgrupos controles, com neurorrafia ($10,0 \pm 2,6$) e com enxerto ($10,2 \pm 3,4$), seguidos pelos subgrupos diabéticos, com neurorrafia ($7,9 \pm 2,3$) e com enxerto ($7,7 \pm 3,6$). Apesar da diferença encontrada entre os 2 grupos, controle e diabetes, esta não foi significativa ($p > 0,05$). Já quando se avaliaram as áreas das secções transversas das células de Schwann, verificou-se que foram maiores no subgrupo diabético com neurorrafia ($105,5 \pm 30,5$), depois subgrupo controle com enxerto ($96,4 \pm 40,9$), em seguida subgrupo diabético com enxerto ($88,7 \pm 32,4$), e por último subgrupo controle com neurorrafia ($83,8 \pm 33,7$). Assim como nas avaliações anteriores não foram vistas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na comparação dos subgrupos.

Não foram encontrados estudos na literatura com o mesmo delineamento experimental deste trabalho, e que tenham feito a histomorfometria das mesmas estruturas nervosas. Isso gerou certa dificuldade na comparação dos resultados com outros estudos semelhantes da literatura.

Kennedy e Zochodne (2000) observaram que nervos tibiais de camundongos diabéticos não mostraram qualquer aparente atraso de regeneração com 2 semanas após a lesão do nervo ciático, seja por esmagamento ou transecção, mas tiveram bainhas de mielina significativamente mais grossas. Contrapondo os resultados deste estudo, os autores encontraram que a densidade de fibras estava diminuída nos

animais diabéticos, com 8 semanas seguindo a lesão por esmagamento, e com 10 semanas seguindo a transecção nervosa. Além disso, o diâmetro e consequentemente as áreas das fibras nervosas e dos axônios foram significativamente menores, com 4 e 8 semanas nas lesões por esmagamento, e com 10 semanas após a transecção do nervo. As bainhas de mielina dos nervos tibiais foram significativamente mais finas nos camundongos diabéticos submetidos a lesão por esmagamento do nervo ciático, com 4 e 8 semanas. A regeneração deficitária observada nos animais com o distúrbio endócrino, pode ser atribuída a diversos fatores, segundo os autores. Dentre os inúmeros fatores, pode-se citar a depleção da proteína GAP-43/B-50 observada em diabéticos (MAEDA et al., 1996; SCOTT et al., 1999). A expressão aumentada desta proteína de crescimento é componente crítico para o crescimento neuronal, e, normalmente uma lesão nervosa estimula sua liberação (MEIRI et al. 1998). Ademais, déficits de peptídeos vasoativos em diabéticos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P, podem limitar a hiperemia que normalmente ocorre nos microvasos do nervo, seguindo lesão, talvez gerando assim condição de isquemia relativa (ZOCHODNE e HO, 1993). Outro fator, é que a ativação de macrófagos é anormal em ratos diabéticos (CONTI et al., 1997), e tais células são fundamentais em assistir às células de Schwann na fagocitose de debris de axônios e mielina, seguindo lesão nervosa. Assim, a degeneração Walleriana é retardada se a migração de macrófagos for lenta (PERRY e BROWN, 1992). O déficit da regeneração também pode estar relacionado à persistência tardia relativa de macrófagos

endoneurais, que podem diminuir a viabilidade e função das células de Schwann (SKOFF et al., 1998; TAMURA e PARRY, 1994).

Machado et al. (2000), em estudo sobre a caracterização de modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos, observaram achados histomorfométricos do nervo ciático que não diferiram estatisticamente de animais controles, em avaliações efetuadas com 1, 3 e 6 meses de seguimento. No entanto, aos 9 e 12 meses verificaram que os animais diabéticos apresentavam diminuição significativa na densidade de fibras mielínicas e frequência aumentada de fibras de menor calibre, ao contrário do grupo controle, que mostrava frequência maior de fibras de maior calibre. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre animais diabéticos e controles quanto às áreas das fibras mielínicas e dos axônios. Já a relação entre a área do axônio e a área da bainha de mielina foi menor nos ratos diabéticos, independente do tamanho da fibra. Em modelo semelhante, Jakobsen e Lundbaeck (1976) demonstraram diminuição do diâmetro axonal, mais acentuada que o diâmetro total da fibra nervosa, em ratos diabéticos. Os dados são muito conflitantes e discutíveis na literatura, já que alguns estudos têm relatado tanto aumento quanto diminuição do diâmetro axonal, dependendo do segmento nervoso analisado (CHOKROVERTY et al., 1988; MEDORI et al., 1985).

De acordo com alguns autores a lesão dos nervos periféricos em animais diabéticos é mais evidente numa fase tardia da doença (POWELL e MYERS, 1984; POWELL et al., 1979). Já outros, diferem deste relato, descrevendo alterações dos nervos periféricos de ratos diabéticos numa

fase bem mais precoce, já a partir do 2º mês de indução do distúrbio metabólico (SHARMA et al., 1977; JAKOBSEN, 1978). Machado et al. (2000) sugerem em seu estudo, que os processos de degeneração, atrofia e desmielinização da fibra nervosa e dos axônios são mais acelerados no animal diabético do que no animal normal, a partir do 9º mês da indução do DM.

Há que se ter muito cuidado quando se estuda alterações nervosas em animais diabéticos, já que muitos achados anormais, que são imputados à presença do DM, na verdade são apenas consequência do processo normal de envelhecimento (KNOX et al., 1989). A diminuição de fibras mielínicas em animais diabéticos tem sido apontada por vários autores (SHARMA e THOMAS, 1974; SHARMA et al., 1977; BROWN et al., 1980), no entanto, esses dados precisam ser analisados com critério em função dos inúmeros fatores de erro que podem ocorrer. Diversos fatores podem influenciar nas dimensões da fibra nervosa e de seus componentes estruturais, tais como: a idade do animal (SHARMA e THOMAS, 1974), a própria indução do diabetes (SHARMA et al., 1981), o estado nutricional (SIMA e JANKOWSKA, 1975), o estado de hidratação do animal (JAKOBSEN, 1978), e o processo de fixação e preparo do material para o estudo anátomo-patológico (JAKOBSEN, 1976).

Os resultados deste trabalho levam à interpretação de que as medidas das áreas das secções transversas das fibras nervosas e das células de Schwann não necessariamente tem correlação direta com a recuperação funcional dos animais, vistas pelos testes da marcha e

eletrofisiológico. Isto pode ser melhor visualizado quando se analisa o subgrupo controle com neurorrafia, onde se encontraram os menores valores dessas áreas, embora sem significância estatística, e, ao mesmo tempo, o melhor IFC e a maior amplitude do teste eletrofisiológico com 60 dias.

A avaliação das áreas das secções transversas axonais, que foram maiores nos subgrupos controles, porém, também sem significância estatística, induz a imaginar que haja relação com a recuperação funcional mais precoce observada nestes subgrupos. Em contrapartida, com 60 dias, a recuperação funcional, pelo teste da marcha e teste eletrofisiológico, não foi significativamente diferente entre os subgrupos controles e o subgrupo diabético com neurorrafia, apesar da área de secção transversa axonal menor observada neste último subgrupo.

Thomas (1970) e De Medinaceli (1995) já afirmaram que a precisão das conexões restabelecidas pelos axônios regenerados com o órgão alvo é mais importante do que o número total de fibras. Pode-se acrescentar à esta afirmação, pelos resultados aqui obtidos, que o fato da área de secção transversa de uma fibra nervosa ou célula de Schwann ser maior, não indica necessariamente que a reinervação seja de melhor qualidade. As características histológicas proporcionariam um quadro confiável das condições tróficas do nervo regenerado, mas não se correlacionariam diretamente com o grau de recuperação funcional (DE MEDINACELI, 1995).

5.5 Considerações finais e perspectivas futuras

Os trabalhos sobre a fisiopatologia da neuropatia diabética e posteriormente sobre os efeitos das descompressões nervosas foram divisores de água, abrindo nova fase de pesquisas sobre a regeneração nervosa no paciente com DM e levando a perspectivas otimistas de tratamento de uma patologia que até então era considerada progressiva e intratável.

O diagnóstico precoce da polineuropatia diabética, especialmente com o uso de novos testes, como o PSSD, que podem revelar a disfunção nervosa periférica mesmo antes do aparecimento de sinais e sintomas clínicos, seguido pelo controle glicêmico estrito, oferece a melhor oportunidade de prevenir os sintomas progressivos de perda sensorial, dor, disfunção autonômica, ulcerações e amputações dos membros.

A observação de que em média cerca de 80% dos pacientes com DM e neuropatia tiveram a sensibilidade dos seus pés restabelecida e a dor aliviada com a cirurgia de descompressão do nervo tibial e seus ramos (SOSENKO et al., 1990; TASSLER et al., 1995; TASSLER et al., 1996; WIEMAN e PATEL, 1995), e assim não desenvolveram úlceras ou necessitaram de amputações, sugere que a sequela natural da neuropatia diabética pode ser passível de mudança (WOOD W. e WOOD M., 2003). Como atualmente nenhuma medicação é realmente efetiva no alívio dos sintomas da neuropatia diabética, especialmente a perda sensorial, o tratamento cirúrgico de descompressão nervosa vem se mostrando como

terapia promissora para aqueles pacientes desesperançados com a dificuldade de controle clínico do problema.

Se tal conceito puder ser introduzido aos clínicos que prestam o atendimento básico aos pacientes com o distúrbio metabólico, um decréscimo significativo nas taxas de úlceras de pé e amputações deve ser atingido (DELLON, 2002; 2004), assim como, teoricamente, o número de quedas e fraturas associadas que ocorrem em pacientes diabéticos pela falta de sensibilidade do pé e do equilíbrio (DELLON, 2004). Desta forma, o papel do cirurgião, que antes ficava resignado ao tratamento de infecções, ulcerações, reconstrução de deformidades de Charcot, ou amputação do pé insensível, passará a ter importância maior com as indicações das descompressões nervosas para alívio da dor e restauração da sensibilidade em pacientes com neuropatia diabética, podendo mudar a história natural da doença (DELLON, 2004).

Quando o indivíduo com neuropatia diabética se encontra em estado mais avançado da doença, onde a discriminação de dois pontos não é mais possível, é provável que a intervenção cirúrgica de descompressão nervosa já tenha passado do seu melhor momento de indicação e não traga os mesmos benefícios esperados se realizada mais precocemente (DELLON, 2000). Uma quantidade significativa de axônios sensitivos geralmente já se encontra degenerada quando há ulceração de pé, a tal ponto que somente a restauração da sensibilidade protetora do pé é possível de ser adquirida pela descompressão do nervo periférico (DELLON, 2002; 2004).

Os resultados promissores do presente trabalho, mostrando boa regeneração em ratos diabéticos, por meio de diversas formas de avaliação, abrem perspectiva para estudos de descompressão nervosa em pacientes com úlceras diabéticas de pé refratárias ao tratamento convencional, já que a regeneração nervosa pode ocorrer, mesmo que seja mais lenta e difícil, e assim há chance de se mudar a história natural desses pacientes, que muitas vezes caminha para amputação do membro e baixa sobrevida a longo prazo.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista as diversas análises do presente trabalho, sobre a regeneração nervosa de ratos diabéticos, como as análises funcionais, pelo teste da marcha e teste eletrofisiológico; análise da atrofia muscular, pela pesagem da musculatura tríceps sural; e análise histomorfométrica, pela contagem da densidade axonal e cálculo das áreas das fibras nervosas, axônios e células de Schwann; pode-se concluir que:

1. O teste da marcha mostrou que a recuperação funcional foi mais rápida nos animais do grupo controle, porém, com 60 dias, verificou-se que o subgrupo diabético com neurorrafia apresentava uma recuperação semelhante aos animais controles. Já o subgrupo diabético com enxerto ainda não havia alcançado um nível de IFC semelhante aos dos outros animais.
2. A resposta da musculatura tríceps sural dos ratos ao estímulo elétrico do nervo ciático com 60 dias de evolução, verificada pelo teste eletrofisiológico da amplitude dos potenciais evocados, não se mostrou com diferença estatística significativa nos animais diabéticos, tanto com neurorrafia quanto com enxerto, em relação aos ratos do grupo controle.

3. A atrofia muscular, vista pelo índice de peso do músculo tríceps sural do lado operado com o lado não operado, foi significativamente menor somente no subgrupo controle com neurorrafia, sem diferenças estatísticas significativas entre os subgrupos controle com enxerto e diabéticos com neurorrafia e enxerto.
4. Ao término de 60 dias de evolução dos subgrupos, a densidade axonal, assim como os calibres das fibras nervosas e dos axônios não foram estatisticamente diferentes nos animais diabéticos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Akeda K, Hirata H, Matsumoto M, Fukuda A, Tsuji M, Nagakura T, Yoshida SOT, Uchida A. Regenerating axons emerge far proximal to the coaptation site in end-to-side nerve coaptation without a perineurial window using a Tsharped chamber. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117(4):1194-203.

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

Ar'rajab A, Ahren B. Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas*. 1993; 8(1):50-7.

Armstrong DG, Lavery L, Vela SA, et al. Choosing a practical screening instrument to identify patients at risk for diabetic foot ulceration. *Arch Intern Med*. 1998; 158:289.

Asbury AK, Porte DJr. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations 1995; Consensus Statement on Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. 1995a; suppl.1(18):53-8.

Asbury AK, Porte DJr. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations 1995; Consensus Statement on Standardized Measures in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. 1995b; suppl.1(18):59-82.

Asbury AK. Understanding diabetic neuropathy (Editorial). *N Eng J Med*. 1988; 319:577-8.

Askar I, Sabuncuoglu BT, Yormuk E, Saray A. The fate of neurotization techniques on reinnervation after denervation of the gastrocnemius muscle: an experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(5):347-55.

Aszmann O, Kress KM, Dellon AL. Results of decompression of peripheral nerves in diabetics: a prospective, blinded study. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106:816–21.

Aszmann O, Tassler PL, Dellon AL. Changing the natural history of diabetic neuropathy: Incidence of ulcer/amputation in the contralateral limb of patients with a unilateral nerve decompression procedure. *Ann Plast Surg*. 2004; 53:517–22.

Aszmann OC, Dellon ES, Dellon AL. Anatomical course of the lateral femoral cutaneous nerve and its susceptibility to compression and injury. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 100:600–4.

Auba C, Hontanilla B, Arcocha J, Gorria O. Peripheral nerve regeneration through allografts compared with autografts in FK506-treated monkeys. *J Neurosurg*. 2006; 105(4): 602-9.

Babovic S, Ress AM, Dellon AL, Angel MF, Im MJ, Manson PN. Nerve regeneration in diabetic rats. *Microsurgery*. 1998; 18:9-11.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989; 83:129-36.

Barbin G, Manthorpe M, Varon S. Purification of chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem*. 1984; 43:1468-78.

Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 1989; 2:1525-34.

Basset CAL, Campbell JB, Husby J. Peripheral nerve and spinal cord regeneration technique employing millipore. *Exp Neurol*. 1959; 1:386-406.

Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *J Neurotrauma*. 2007; 24(5):909-916.

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

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

Bestetti G, Rossi GL, Zemp C. Changes in peripheral nerves of rats four months after induction of streptozotocin diabetes. *Acta Neuropathol*. 1981; 54:129-34.

Beuche W, Friede RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol*. 1984; 13:767–96.

Bharalli LA, Lisney SJW. Success of regeneration of peripheral nerve axons in the rats after injury at different postnatal ages. *J Neurol Sci*. 1990; 100:203-10.

Biddinger KR, Amen KJ. The role of surgical decompression for diabetic neuropathy. *Foot Ankle Clin N Amer*. 2004; 9:239–254.

Bisby MA. Axonal transport of labeled proteins and regeneration rate in nerves of streptozotocin-diabetic rats. *Exp Neurol*. 1980; 69:74-84.

Blundon JA, Sheller RA, Moehlenbruck JW, Bittner GD. Effect of temperature on long-term survival of anucleate giant axons in crayfish and goldfish. *J Comp Neurol.* 1990; 297:377-91.

Boner W, Trent DS, Honey RN, Weir GS. Response of neonatal islets to streptozotocine - limited cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes.* 1981; 30(1):64-9.

Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tenvall G, Aplequist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005; 366:1719–24.

Boyes JH. On the shoulders of giants: Notables names in hand surgery. Philadelphia: JB Lippincott Co.; 1976 apud Terzis JK, Smith KL 1990, p.631.

Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ. A role for apolipoprotein A-1 and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination in rat sciatic nerve. *J Clin Invest.* 1989; 83:1015-31.

Brasil. Leis etc. Lei n.6638 de 08 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1979 10 mai.; p. 1.

Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 120(1):215-23.

Brown AK, Sumer AJ, Greene DA. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Ann Neurol.* 1980; 8:168-78.

Brown CJ, Evans PJ, Mackinnon SE, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GMT. Inter- and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery.* 1991; 12:76-9.

Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GMT. Self-evaluation of walking-track measurement using a sciatic function index. *Microsurgery*. 1989; 10:226-35.

Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery*. 1994; 15:176-8.

Brushart TME, Seiler WA. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*. 1987; 97:289-300.

Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16(5):1-7.

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

Carter AJ, Kristmundsdottir F, Gilmour J, Glasby MA. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. *J Hand Surg Br*. 1998; 23:365-9.

Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir Bras*. 2003; 18:60-4.

Causay G. The cell of Schwann. Edinburgh: Livingstone; 1960 apud Terzis JK, Smith KL 1990, p. 631.

Centers for Disease Control and Prevention. *National Diabetes Fact Sheet: General Information and National Estimates on Diabetes in the United States, 2007*. Atlanta, Ga: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2008.

Chafee H. Decompression of peripheral nerves for diabetic neuropathy. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106:813-5.

Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW. Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin*. 1992; 10:613-27.

Chokroverty S, Seiden D, Navidad P, Cody R. Distal axonopathy in streptozotocin diabetes in rats. *Experientia*. 1988; 44(5):444-6.

Conti G, Stoll G, Scarpini E, Baron PL, Bianchi R, Livraghi S, et al. p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp Neurol*. 1997; 146:206–11.

Conti G, Scarpini E, Baron P, Livraghi S, Tiriticco M, Bianchi R, Vedeler C, Scarlato G. Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-1beta and p75NTR. *J Neurol Sci*. 2002; 195(1):35-40.

Costa MP. Tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos: estudo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Curtis RM, Eversmann Jr WW. Internal neurolysis as an adjunct to the treatment of carpal tunnel syndrome. *J Bone Joint Surg*. 1973; 55-A(4):733-40.

Da-Silva CF. Fatores Neurotróficos: estrutura, funções e aplicações clínicas. *Atual Neurocienc*. 1995a; 1(1):1-20.

Da-Silva CF. Biologia Celular e Molecular da regeneração do sistema nervoso periférico. *Atual Neurocienc.* 1995b; 1:1-16.

Dahlin LB. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. *Brain Res.* 1995; 679:274–80.

Dahlin LB, Meiri KF, McLean WG, Rydevik B, Sjostrand I. Effects of nerve compression on fast axonal transport in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1986; 29:181-5.

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CL, *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *The Lancet.* 2011; 378(9785):31-40.

Dash H, Kononov A, Prayson RA, Petras S, Browne EZ. Evaluation of nerve recovery from minimal duration crush injury. *Ann Plast Surg.* 1996; 37(5):526-31.

Davidson MB. Diabetes Mellitus: Diagnosis and Treatment. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1986.

Davis L. The return of sensation to transplanted skin. *Surg Gynecol Obstet.* 1934; 59:533-43.

De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based an measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77:634-43.

De Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Meth.* 1995; 58:29-37.

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

Dellon AL. A cause for optimism in diabetic neuropathy (Editorial). *Ann Plast Surg.* 1988a; 20(2):103-5.

Dellon AL. Clinical grading of peripheral nerve problems. *Neurosurg Clin N Am.* 2001; 12:229-40.

Dellon AL. Computer-assisted sensibility evaluation and surgical treatment of tarsal tunnel syndrome. *Adv Podiatry.* 1996; 2:17-40.

Dellon AL. Diabetic neuropathy: review of a surgical approach to restore sensation, relieve pain, and prevent ulceration and amputation. *Foot Ankle Int.* 2004; 25(10):749-55.

Dellon AL. Neurosurgical prevention of ulceration and amputation by decompression of lower extremity peripheral nerves in diabetic neuropathy: update 2006. *Acta Neurochir.* 2007; 100(suppl.):149–151.

Dellon AL. Operative technique for submuscular transposition of the ulnar nerve. *Contemp Orthop.* 1988c; 16:17-24.

Dellon AL. Preventing foot ulceration and amputation by decompressing peripheral nerves in patients with diabetic neuropathy. *Ostomy Wound Manage.* 2002; 48(9):36-45.

Dellon AL. Somatosensory Testing and Rehabilitation. Baltimore, MD: Institute for Peripheral Nerve Surgery; 2000.

Dellon AL. The Role of Peripheral Nerve Surgery in Diabetic Limb Salvage (Discussion). *Plast Reconstr Surg*. 2011; 127(1S):270-3.

Dellon AL. Tinel or not Tinel. *J Hand Surg Br*. 1984; 9(2):216.

Dellon AL. Treatment of symptoms of diabetic neuropathy by surgical decompressions of multiple peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 89:869-97.

Dellon AL, Aszmann O, Tassler PL. Outcome of surgical decompression of nerves in diabetics on incidence of ulceration and amputation. *J Reconstr Microsurg*. 2003; 19:350-1.

Dellon AL, Dellon ES, Seiler IV WA. Effect of tarsal tunnel decompression in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Microsurgery*. 1994; 15:265-8.

Dellon AL, Mackinnon SE. Chronic nerve compression model for the double crush hypothesis. *Ann Plast Surg*. 1991; 26(3):259-64.

Dellon AL, Mackinnon SE. Radial sensory nerve entrapment in the forearm. *J Hand Surg Am*. 1986; 11(2):199-205.

Dellon AL, Mackinnon SE, Seiler IV WA. Susceptibility of the diabetic nerve to chronic compression. *Ann Plast Surg*. 1988b; 20(2):117-9.

Dellon ES, Dellon AL. Functional assesment of neurologic impairment: Track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg*. 1991; 88:686-94.

Dellon ES, Mourey R, Dellon AL. Human pressure perception values for constant and moving one- and two-point discrimination. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 90:112-7.

Di Scipio F, Raimondo S, Tos P, Geuna S. A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microsc Res Tech*. 2008; 71(7):497-502.

Dockery P, Sharma AK. Ultrastructural abnormalities of myelinated fibres in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci*. 1990; 98:327-45.

Droz B, Rambourg A, Koenig HL. The smooth endoplasmic reticulum structure and role in the reneval of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. *Brain Res*. 1975; 93:1-13.

Ducic I, Felder III JM, Iorio ML. The role of peripheral nerve surgery in diabetic limb salvage. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 127(1S):259-69.

Ducic I, Taylor NS, Dellon AL. Relationship between peripheral nerve decompression and gain of pedal sensibility and balance in patients with peripheral neuropathy. *Ann Plast Surg*. 2006; 56:145–50.

Dyck PJ, Hansen S, Karnes J, O'Brien P, Yasuda H, Windebank A, *et al*. Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82:2513–7.

Dyck PJ, Karnes J, O'Brien PC. Diagnosis, staging, and classification of diabetic neuropathy and associations with other complications. In: Dyck PJ, Thomas PK, Asbury AK. Diabetic neuropathy. Philadelphia: W. B. Saunders; 1987. p.36-44.

Dyck PJ, Lais A, Karnes JL, O'Brien P, Rizza R. Fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. *Ann Neurol*. 1986; 19(5):425-39.

Dyck PJ, Thomas PK, Asbury AK, Winegrad AI, Porte D. Diabetic Neuropathy. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1987.

Dyck PJ, Zimmerman BR, Vilen TH, Minnerath SR, Karnes JL, Yao JK, Poduslo JF. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Eng J Med*. 1988; 319:542-8.

Eckersley L, Ansselin AD, Tomlinson DR. Effects of experimental diabetes on axonal and Schwann cell changes in sciatic nerve isografts. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001; 92(1-2):128-37.

Eliasson, SG. Regeneration process in experimental diabetes neuropathies. *Trans Am Neurol Assoc*. 1965; 90:35-7.

Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur*. 1984; 92(5):546-50.

Eversmann Jr WW. Entrapment and compression neuropathies. In: Green DP. Operative Hand Surgery. 3rd ed. New York: Churchill-Livingstone; 1993. p.1341-54.

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

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

Fernandez E, Lauretti L, Tufo T, D'Ercole M, Ciampini A, Doglietto F. Endo-to-side nerve neuroorrhaphy: critical appraisal of experimental and clinical data. *Acta Neurochirur Suppl*. 2007; 100:77-84.

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

Ferreira MC, Erhart EA, Tedesco-Marchese A. Microcirurgia de nervo periférico. Novas técnicas. *Rev Paul Med.* 1974; 84:52-3.

Fields RD, Lebeau JM, Longo FM, Ellisman HH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989; 33:87-134.

Fink DJ, Purkiss D, Mata M. Alterations in retrograde axonal transport in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 1987; 36:996-1000.

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

Furlan MMDP. A estreptozotocina como agente diabetogênico. *Arq Ciênc Saúde Unipar.* 2001; 5(2):197-201.

Gabrielson GJ, Stenstrom SJ. A contribution to peripheral nerve suture technique. *Plast Reconstr Surg.* 1966; 38:68-72.

Gale EA. Molecular mechanisms of beta-cell destruction in IDDM: the role of nicotinamide. *Horm Res.* 1996; 45(1):39-43.

Gentili F, Hudson AR, Hunter D. Clinical and experimental aspects of injection injuries of peripheral nerves. *Can J Neurol Sci.* 1980; 7(2):143-51.

Goheen-Robilard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. *Laryngoscope.* 2002; 112(5):899-905.

Gong Y, Gong L, Gu X, Ding F. Chitooligosaccharides promote peripheral nerve regeneration in a rabbit common peroneal nerve crush injury model. *Microsurgery*. 2009; 29(8):650-6.

González E, Jawerbaum a, Sinner D, Pustovrh C, Xaus C, Peralta C, *et al*. Evolution of streptozotocin-pancreatic damage in the rat: modulatory effect of endothelins on the nitridergic and prostanoid pathway. *Nitric Oxide*. 1999; 3(6):459-66.

Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi MG. Muscle reinnervation-II. Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience*. 1983; 8(3):403-16.

Grafstein B, McQuarrie IG. Role of the nerve cell body in axonal regeneration. In: Cotman CW (ed). *Neuronal Plasticity*. New York: Raven Press; 1978. p.155.

Gregerson G. Diabetic neuropathy: Influence of age, sex, metabolic control, and duration of diabetes on motor conduction velocity. *Neurology*. 1967; 17:972-80.

Griffey RH, Eaton RP, Sibbitt RR, Sibbitt WL Jr, Bicknell JM. Diabetic neuropathy. Structural analysis of nerve hydration by magnetic resonance spectroscopy. *JAMA*. 1988; 260(19):2872-8.

Griffin JW, George R, Ho T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993; 52:553–60.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assesment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconst Surg*. 1992; 89(2):251-8.

Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Midha R, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: utilization of individual footprint parameters. *Ann Plast Surg*. 1993; 30(2):147-53.

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

Herr RR, Jahnke HK, Argoudelis AD. The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc*. 1967; 89(18):4808-9.

Holewski JJ, Stess RM, Graf PM, Grunfeld C. Aesthiometry: quantification of cutaneous pressure sensation in diabetic peripheral neuropathy. *J Rehabil Res Dev*. 1988; 25(2):1-10.

Horch K. Central responses of cutaneous sensory neurons to peripheral nerve crush in the cat. *Brain Res*. 1978; 151:581-6.

Horowitz SH. Recent clinical advances in diabetic polyneuropathy. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006; 19(5):573-8.

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

Ignatius MJ, Shooter EM, Pitas RE, Mahley R. Lipoprotein uptake by neuronal growth cones in vitro. *Science*. 1987; 236:959-62.

Jabery FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery*. 2003; 23:359-62.

Jacobson JH 2nd. Microsurgical technic in repair of the traumatized extremity. 1963. *Clin Orthop Relat Res*. 1995; 314:4-7.

Jacques L, Kline DG. Response of peripheral nerve to physical injury. In: Crockard A, Hayward R, Hoff JT (Eds). *Neurosurgery: The Scientific Basis of Clinical Practice*, 3rd ed. London: Blackwell; 2000. p.516-25.

Jakobsen J, Lundbaeck K. Neuropathy in experimental diabetes: an animal model. *Br Med J*. 1976; 2:178-279.

Jakobsen J, Sidenius P. Decreased axonal transport of structural proteins in streptozotocin diabetic rats. *J Clin Invest*. 1980; 66:292-7.

Jakobsen J. Axonal dwindling in early experimental diabetes: A study of cross-sectioned nerves. *Diabetes*. 1976; 12:539-46.

Jakobsen J. Peripheral nerves in early experimental diabetes: Expansion of the endoneurial space as a cause of increased water content. *Diabetologia*. 1978; 14:113-9.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969; 48(11):2129-39.

Kale B, Yuksel F, Celikoz B, Sirvanci S, Ergun O, Arbak S. Effect of various nerve decompression procedures on the functions of distal limbs in streptozotocin-induced diabetic rats: further optimism in diabetic neuropathy. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 111:2265-72.

Keck C. The tarsal tunnel syndrome. *J Bone Joint Surg*. 1962; 44(A):180-2.

Keeley RD, Nguyen KD, Stephanides MJ, Padilla J, Rosen JM. The artificial nerve graft: a comparison of blended elastomer-hydrogel with polyglycolic acid conduits. *J Reconstr Microsurg*. 1991; 7(2):93-100.

Kennedy JM, Zochodne DW. Influence of the experimental diabetes on the microcirculation of injured peripheral nerve: functional and morphological aspects. *Diabetes*. 2002; 51(7):2233-40.

Kennedy JM, Zochodne DW. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain*. 2000; 123:2118-29.

Kimura J. Electrodagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2001.

Kimura J, Yamada T, Stevland NP. Distal slowing of motor nerve conduction velocity in diabetic polyneuropathy. *J Neurol Sci*. 1979; 42:291–302.

Knox CA, Kokmen E, Dyck DJ. Morphometric alteration of rat myelinated fibers with aging. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1989; 2:119-39.

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

Kovacic U, Sketelj J, Bajrovic FF. Sex-related difference in collateral sprouting of nociceptive axons after peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol*. 2003; 184:479-88.

Kozak GP, Hoar CS Jr, Rowbotham JL, Wheelock FC Jr, Gibbons GW, Campbell D. Management of diabetic foot problems. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1984.

Królewski AS, Warram JH. Epidemiology of diabetes mellitus. In: Marble A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soeldner JS. Joslin's diabetes mellitus. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1985. p.12-42.

Krystosek A, Seeds NW. Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science*. 1981; 213(4515):1532-4.

Kumar S, Fernando DJS, Veves A, Knowles EA, Young MJ, Boulton AJ. Semmes-Weinstein monofilaments: a simple, effective and inexpensive screening device for identifying diabetic patients at risk of foot ulceration. *Diabetes Res Clin Pract*. 1991; 13:63-7.

Lam SJS. A tarsal tunnel syndrome. *Lancet*. 1962; 27:1354-5.

Lasarow A, Palay SI. The production and course of alloxan diabetes in the rat. *J Lab Clin Med*. 1946; 31:1004-15 apud Rerup CC 1970, p.485.

Lasek JR, Shelansky ML, Brinkely BR, Condeelis JS, Ellisman MH, Goldman RD, Solomon F, Taylor EW. Cytoskeletons and architecture of nervous systems. *Neurosci Res Program Bull*. 1981; 19:1-153.

Lee C, Dellon AL. Prognostic ability of Tinel sign in determining outcome for decompression surgery decompression surgery in diabetic and non-diabetic neuropathy. *Ann Plast Surg*. 2004; 53:523–7.

Lemos SPS. Nervo alógeno conservado em glicerol na regeneração de nervos periféricos: estudo experimental em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Letourneau PC. Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. *Develop Biol*. 1975; 44:77-91.

Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryo. *J Exp Zool*. 1951; 116:321-61.

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

LoGerfo FW, Coffman JD. Current concepts: Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes: Implications for foot care. *N Engl J Med*. 1984; 311:1615-9.

Longo FM, Powell HC, Lebeau J, Gerrero MR, Heckman H, Myers RR. Delayed nerve regeneration in streptozotocin diabetic rats. *Muscle Nerve*. 1986; 9(5):385-93.

Lubinska L. On axoplasmic flow. *Int Rev Neurobiol*. 1975; 17:241-96.

Lubiska L, Niemierko S. Velocity and intensity in bidirectional migration of acetylcholinesterase in transected nerves. *Brain Res*. 1971; 27:329-42.

Lundborg G. Ischemic nerve injury: Experimental studies on intraneural microvascular pathophysiology and nerve function in a limb, subjected to temporary circulatory arrest. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1970; 6:3-113.

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

Lundborg G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation and nerve function. *J Bone Joint Surg Am*. 1975; 57:938-48.

Lundborg G. The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *J Hand Surg*. 1971; 4(1):34-41.

Lundborg G, Danielson N, Dahlin LB, Nachensson A, Polloryd P. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Surg*. 1986; 20(3):279-83.

Lundborg G, Meyers R, Powell H. Nerve compression injury and increased endoneural fluid pressure: "a miniture compartment syndrome." *J Neurol Neurosurg Psych*. 1983; 46:1119-24.

Lundborg G, Rydevik B. Effects of stretching the tibial nerve of the rabbit, a preliminary study of the intraneural circulation and the barrier function of the perineurium. *J Bone Joint Surg*. 1973; 55(B):390-401.

Machado JLM, Macedo AR, Silva MD, Spadella CT, Montenegro MRG. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzido pela aloxana. *Acta Cir Bras*. 2000; 15(2):86-93.

Mackinnon SE, Dellon AL. Homologies between the tarsal and carpal tunnels: Implications for surgical treatment in the tarsal tunnel syndrome. *Contemp Orthop*. 1987; 14:75-9.

Mackinnon SE, Dellon AL. Surgery of the peripheral nerve. New York: Thieme; 1988.

Mackinnon SE, Dellon AL. Two-point discrimination tester. *J Hand Surg Am*. 1985; 10:906-7.

Mackinnon SE, Dellon AL, Lundborg G, Hudson AR. A study of neurotropism in primate model. *J Hand Surg*. 1986; 11:888-94.

Mackinnon SE, Dellon AL, McLean AR, Hudson AR, Hunter DA. An assessment of the effects of internal neurolysis on a chronically compressed rat sciatic nerve. *Plas Reconstr Surg*. 1988; 81(2):251-5.

Maeda K, Fernyhough P, Tomlinson DR. Regenerating sensory neurones of diabetic rats express reduced levels of mRNA for GAP-43, gamma-preprotachykinin and the nerve growth factor receptors, trkA and p75NGFR. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 37:166–74.

Maier CE, McQuarrie I. Increased slow transport in axons of regenerating newt limbs after a nerve conditioning lesion. *Dev Biol*. 1990; 140:172-81.

Mainardes KC, Viana Netto R, Donoso CPM, Kume PK, Kume KY, Busato TS. Efeito do diabetes associado ao envelhecimento na consolidação de fraturas na tíbia de ratos. *Rev Bras Ortop*. 2007; 42(3):55-63.

Majno G. The healing hand: man and wound in ancient world. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1975 apud Terzis JK, Smith KL 1990, p.630.

Martyn CN, Reid W, Young RJ, Ewing DJ, Clarke BF. Six-month treatment with sorbinil in asymptomatic diabetic neuropathy: Failure to improve abnormal nerve function. *Diabetes*. 1987; 36:987-90.

McDonald WI. The time course of conduction failure during degeneration of a central tract. *Exp Brain Res*. 1972; 14:550-6.

Mcnamara MJ, Garret WE, Seaber AV. Neurorraphy nerve grafting and neurotization. A functional comparison of nerve reconstruction techniques. *J Hand Surg*. 1987; 12:354-61.

McQuarrie GI. Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation of nodes of Ranvier. *J Comp Neurol*. 1985; 231:239-49.

Medori R, Autilio-Gambetti L, Monaco S, Ganbetti P. Experimental diabetic neuropathy: impairment of slow transport with changes in axon cross – sectional area. *Proc Nat Acad Sci*. 1985; 82:7716-20.

Meiri KF, Saffell JL, Walsh FS, Doherty P. Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci*. 1998; 18:10429–37.

Mendez JD, Ramos HG. Animal models in diabetes research (review). *Arch Med Res*. 1994; 25(4):367-75.

Mengs U, Stotzem CD. Ganglioside treatment and nerve regeneration: a morphological study after nerve crush in rats. *Eur J Pharmacol*. 1987; 142:419-24.

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

Millesi H. Healing of nerves. *Clin Plast Surg*. 1977; 4(3):459-73.

Millesi H. Progress in peripheral nerve reconstruction. *World J Surg*. 1990; 14(6):733-47.

Millesi H, Meissel G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg*. 1972; 54(A):727-50.

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

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

Montes GS, Cotta-Pereira G, Junqueira LCU. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Adv Cell Neurobiol.* 1984; 5:177-218.

Morris JH, Hudson AR, Weddell G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972; 124(1):76-102.

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

Mueller MJ. Identifying patients with diabetes mellitus who are at risk for lower extremity complications: use of Semmes-Weinstein monofilaments. *Phys Ther.* 1996; 76:68-71.

Mulder DW, Lambert EH, Bastron JA, Sprague RG. The neuropathies associated with diabetes mellitus: A clinical and electromyographic study of 103 unselected diabetic patients. *Neurology.* 1961; 11:275-84.

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

Nathan D. Long-term complications of Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328(23):1676-85.

Nickerson DS, Alzheimer D, Dellon AL. Early stage diabetic Charcot foot syndrome may respond to nerve decompression. *Microsurgery.* 2009; 29:541-7.

Noah EM, Williams A, Fortes W, Terzis JK. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 1997a; 13:317-25.

Noah EM, Williams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorrhaphy: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve grafts. *J Reconstr Microsurg*. 1997b; 13:99-106.

Nóbrega NL. Efeitos da hiperglicemia e do envelhecimento sobre a angiogênese e reepitelização de anastomoses colônicas, em ratos [dissertação]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2005.

Noel P. Sensory nerve conduction in upper limbs at various stages of diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1973; 36(5):786-96.

Ohsumi H, Hirata H, Nagakura T, Tsujii M, Sugimoto T, Miyamoto K, Horiuchi T, Nagao M, Nakashima T, Uchida A. Enhancement of perineurial repair and inhibition of nerve adhesion by viscous injectable pure alginate sol. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 116(3):823-30.

Olsson Y, Kristensson K. Permeability of blood vessels and connective tissue sheaths in the peripheral nervous system to exogenous proteins. *Acta Neuropathol Berlin Suppl*. 1971; 5:61-9.

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

Papalia I, Geuna S, D'Alcontres FS, Tos P. Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 2007; 27(1):56-61.

Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras*. 1998; 13(2):123-8.

Perkins BA, Olaleye D, Bril V. Carpal tunnel syndrome in patients with diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*. 2002; 25:565–9.

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

Perry VH, Brown MC. Macrophages and nerve regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol*. 1992, 2:679-82.

Pierson CR, Zhang W, Murakawa Y, Sima AA. Insulin deficiency rather than hyperglycemia accounts for impaired neurotrophic responses and nerve fiber regeneration in type 1 diabetic neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; 62(3):260-71.

Pirat J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: A prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care*. 1978; 1:168-252.

Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res*. 1982; 253:1-12.

Powell HC, Myers RR. Axonopathy and microangiopathy in chronic alloxan diabetes. *Acta Neuropathol*. 1984; 38:128-37.

Powell HC, Rosoff J, Myers RR. Microangiopathy in human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol*. 1985; 68:295-305.

Powell HC, Ward HW, Garrett RS. Glycogen accumulation in the nerves and kidneys of chronically diabetic rats. A quantitative electron - microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1979; 38:114-27.

Rader A. Surgical decompression in diabetic neuropathy. *J Amer Pod Med Assoc*. 2005; 95:446–50.

Rakieten N, Gordon BS, Cooney DA, Davis RD, and Schein PS. Renal tumorigenic action of Streptozotocin in rats. *Cancer Chemother Rep*. 1968; 52(5):563-7.

Ramsey SD, Newton K, Blough D, McCulloch DK, Sandhu N, Reiber GE, *et al*. Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 1999; 22:382–7.

Rathur HM, Boulton AJ. Recent advances in the diagnosis and management of diabetic neuropathy. *J Bone Joint Surg Br*. 2005; 87(12):1605–10.

Reiber GE, Vileikyte L, Boyko EJ, Aguila M, Smith DG, Lavery LA, *et al*. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care*. 1999; 22:157–62.

Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cell. *Pharmacol Rev*. 1970; 22(4):485-518.

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

Rodger W. Insulin-dependent (type I) Diabetes Mellitus. *CMAJ*. 1991; 145(10):1227-37.

Romão AM, Viterbo F, Stipp EJ, Garbino JA, Rodrigues JA. Muscle electro stimulation of the cranial tibial muscle after crushing of the common fibular nerve: neurophysiologic and morphometric study in rats. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(3):41-6.

Ronnemaa T, Hamalainen H, Toikka T, Liukkonen I. Evaluation of the impact of podiatrist care in the primary prevention of foot problems in diabetic subjects. *Diabetes Care.* 1997; 20:1833-7.

Rosson GD, Larson AR, Williams EH, Dellon AL. Tibial nerve decompression in patients with tarsal tunnel syndrome: Pressures in the tarsal, medial plantar, and lateral plantar tunnels. *Plast Reconstr Surg.* 2009; 124:1202–10.

Rydevik B, Lundborg G. Effects of graded compression on intraneural blood flow. *J Hand Surg.* 1981; 6(A):3-12.

Rydevik B, Lundborg G, Nordborg C. Intraneural tissue reactions induced by internal neurolysis – an experimental study on the blood-nerve barrier, connective tissues and nerve fibers of rabbit tibial nerve. *Scand Plast Reconstr Surg.* 1976; 10:3-8.

Said, G. Diabetic neuropathy: A review. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3:331–40.

Sanders FK, Yoltng JZ. The influence of peripheral connections on the diameter of regeneration nerve fibres. *J Exp Biol.* 1946; 22:203-12.

Schneider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53(2):278–85.

Scopel GP. Estudo experimental do hematoma intraneural associado à compressão extrínseca: análise funcional e histomorfométrica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Scott JN, Clark AW, Zochodne DW. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes. Failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain*. 1999; 122:2109–18.

Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 1990; 13:785-800.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66:237-47.

Seeds NW, Gilman AG, Amano T, Nirenberg MW. Regulation of axonal formation by clonal lines of a neural tumour. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1970; 66:160-7.

Sharma AK, Bajada S, Thomas PK. Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fibre maturation and on body growth in rat. *Acta Neuropathol*. 1981; 53:257-65.

Sharma AK, Thomas PC, Molina AF. Peripheral nerve fiber size in experimental diabetes. *Diabetes*. 1977; 26:639-92.

Sharma AK, Thomas PK. Peripheral nerve regeneration in experimental diabetes. *J Neurol Sci*. 1975; 24:417-24.

Sharma AK, Thomas PK. Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J Neurol Sci*. 1974; 23:1-15.

Shaw G, Bray D. Movement and extension of isolated growth cones. *Exp Cell Res*. 1977; 104:55-62.

Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002; 288:2579–88.

Siemionow M, Demir Y. Diabetic neuropathy; pathogenesis and treatment: a review. *J Reconstr Microsurg*. 2004; 20:241–52.

Siemionow M, Sari A, Demir Y. Effect of early nerve release on the progression of neuropathy in diabetic rats. *Ann Plast Surg*. 2007; 59:102–8.

Sima AAF, Jankowska E. Sensory nerve conduction velocity as correlated to fiber size in experimental undernutrition in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1975; 1:31-7.

Sima AAF, Bril V, Nathaniel V, McEwen TAJ, Brown MB, Lattimer SA, Greene DA. Regeneration and repair of myelinated fibers in sural nerve biopsy specimens from patients with diabetic neuropathy treated with sorbinil. *N Eng J Med*. 1988; 319:548-55.

Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA*. 2005; 293:217–28.

Skoff AM, Lisak RP, Bealmear B, Benjamins JA. TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. *J Neurosci Res*. 1998; 53:747–56.

Slack JR, Hopkins WG, Pockett S. Evidence for a motor nerve growth factor. *Muscle Nerve*. 1983; 6:243-52.

Smith BK, Kornblit PL. Axoplasmic transport in neurological surgery. *Neurosurgery*. 1982; 10:268-76.

Sociedade Brasileira de Diabetes: “Conceito”. In: Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. Rio de Janeiro: Diagrafic; 2003. p.5-6.

Sosenko JM, Kato M, Soto R, Bild DE. Comparison of quantitative sensory threshold measures for their association with foot ulceration in diabetic patients. *Diabetes Care*. 1990; 13(10):1057-61.

Spyropoulou GA, Lykoudis EG, Batistatou A, Papalois AE, Tagaris G, Pikoulis E, *et al*. New Pure Motor Nerve Experimental Model for the Comparative Study between End-to-End and End-to-Side Neurorrhaphy in Free Muscle Flap Neurotization. *J Reconstr Microsurg*. 2007; 23(7):391-8.

Stancic MF, Micovic V, Potocnjak M, Draganic P, Sasso A, Mackinnon SE. The value of an operating microscope in peripheral nerve repair. *Int Orthop*. 1998; 22:107-10.

Stipp Brambilla EJ. Dupla inervação muscular com neurorrafia término-lateral: estudo em ratos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2009.

Suematsu N. Tubulation for peripheral nerve gap: Its history and possibility. *Microsurgery*. 1989; 10(1):71–4.

Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des*. 2008; 14:953–61.

Sunderland S. Nerve injuries and their repair: a critical appraisal. New York: Churchill Livingstone; 1991.

Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, *et al.* The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(7):2255-64.

Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes.* 1991; 40(9):1141-5.

Tambwekar SR. Extended neurolysis of the posterior tibial nerve to improve sensation in diabetic neuropathic feet. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 108:1452–3.

Tamura E, Parry GJ. Severe radicular pathology in rats with longstanding diabetes. *J Neurol Sci.* 1994; 127:29–35.

Tassler PL, Dellon AL. Correlation of measurements of pressure perception using Pressure-specified Sensory Device with electrodiagnostic testing. *J Occup Environ Med.* 1995; 37(7):862-6.

Tassler PL, Dellon AL. Pressure perception in the normal lower extremity and in tarsal tunnel syndrome. *Muscle Nerve.* 1996; 19:285-9.

Terada M, Yasuda H, Kikkawa R. Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerves of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neurol Sci.* 1998; 155(1):23-30.

Terris DJ, Fee WE Jr. Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 119(7):725-31.

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

Terzis J, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg*. 1975; 56:166-70.

Terzis JK, Smith KL. The peripheral nerve: structure, function, and reconstruction. Norfolk, VA. New York: Hampton Press, Raven Press; 1990.

Thomas PK, Eliasson SG. Diabetic neuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert PH, Bunge R (eds). *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1984. p.1773-810.

Thomas PK. Changes in the endoneural sheaths of peripheral myelinated nerve fibers during Wallerian degeneration. *J Anat*. 1964; 98:175-82.

Thomas PK. The cellular response to nerve injury. The effect of repeated crush injuries. *J Anat*. 1970; 106:463-70.

Tomlinson DR, Maher JH. Defects of axonal transport in diabetes mellitus: A possible contribution to the etiology of diabetic neuropathy. *J Auton Pharmacol*. 1984; 4:59-72.

Tuma Júnior P, Ferreira MC, Nakamoto HA, Milcheski DA, Cheroto Filho A. Influência da imunossupressão na regeneração nervosa com utilização de aloenxertos. Estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2008; 16(1):41-4.

Upton AR, McComas AJ. Hypothesis: The double crush in nerve entrapment syndromes. *Lancet*. 1973; 2:359-62.

Valdivia JMV, Dellon AL, Weinand MD, Maloney CT Jr. Surgical treatment of peripheral neuropathy: outcomes from 100 consecutive decompressions. *J Amer Pod Med Assoc*. 2005; 95:451-4.

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

Veronesi B, Boyes WK. Morphometric and electrophysiological evidence for a diameter-based rate of degeneration in the optic nerve of the rat. *Exp Neurol*. 1988; 101:176-89.

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

Vinik A, Mehrabyan A, Colen L, Boulton A. Focal entrapment neuropathies in diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:1783–8.

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

Walker K. Peripheral neuropathy. In: Davidson (ed). Clinical Diabetes Mellitus: A Problem Oriented Approach. New York: Thieme; 1986. p.416-26.

Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerve of frog and observations on the alterations produced thereby in the structure on their primitive fibres. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1850; 140:423-9 apud Terzis JK, Smith KL 1990.

Weber RA, Schuchmann JA, Albers JH, Ortiz J. A prospective blinded evaluation of nerve conduction velocity versus Pressure-Specified Sensory Testing in carpal tunnel syndrome. *Ann Plast Surg*. 2000; 45:252–7.

Weide LG, Lacy PE. Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes*. 1991; 40(9):1157-62.

Wieman TJ, Patel VG. Treatment of hyperesthetic neuropathic pain in people with diabetes: decompression of tarsal tunnel. *Ann Surg.* 1995; 221:660-5.

Wilgis EFS. Nerve repair and grafting. In: Green DP (Ed). *Operative Hand Surgery*. New York: Churchill Livingstone; 1982.

Williams PL, Hall SM. Chronic Wallerian degeneration: an in vivo and ultrastructural study. *J Anat.* 1971; 109:487-503.

Wise AJ, Topuzlu C, Davis P, Kaye IS. A comparative analysis of macro and microsurgical neurorrhaphy techniques. *Am J Surg.* 1969; 117:566-72.

Witzke KA, Vinik AI. Diabetic neuropathy in older adults. *Rev Endocrin Metab Disord.* 2005; 6:117-27.

Wong BJB, Crumley RL. Nerve wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin N Am.* 1995; 28(5):881-95.

Wood WA, Wood MA. Decompression of peripheral nerve for diabetic neuropathy in the lower extremity. *J Foot Ankle Surg.* 2003; 42:268-75.

Yan Q, Elliot J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature.* 1992; 360:753-5.

Yan YH, Yan JG, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Matloub HS. Nerve repair at different angles of attachment: experiment in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2002; 18(8):703-8.

Yao Y, Wang RZ, Shang B, Liu FY, Wei UK. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy by surgical decompression of three peripheral nerves. *Chin Med J.* 2005; 242:35-7.

Yasuihashi S, Nishikira M, Baba M. Morphometrical analysis of the peripheral nerve lesions in experimental diabetes rats. *J Exp Med*. 1979; 129:139-99.

Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, *et al*. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol*. 2003; 69(4):229-85.

Yasuda H. New trend in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Rinsho Shinkeigaku*. 1999; 39(1):87-9.

Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg Br*. 1998; 23:433-7.

Young MJ, Breddy JL, Veves A, Boulton AJ. The prediction of diabetic neuropathic foot ulceration using vibration perception thresholds: A prospective study. *Diabetes Care*. 1994; 17:557–60.

Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G, Lu SB. Axonal projections and functional recovery following fascicular repair of the rat sciatic nerve with Ytunneled silicone chambers. *Rest Neurol Neurosc*. 1992; 4(1):13-9.

Zheng L, Ao Q, Han H, Zhang X, Gong Y. Evaluation of the chitosan/glycerol-beta-phosphate disodium salt hydrogel application in peripheral nerve regeneration. *Biomed Mater*. 2010; 5(3):35003. Epub 2010 Apr 19.

Zochodne DW, Ho LT. Diabetes mellitus prevents capsaicin from inducing hyperaemia in the rat sciatic nerve. *Diabetologia*. 1993; 36:493–6.

Zochodne DW, Guo GF, Magnowski B, Bangash M. Regenerative failure of diabetic nerves bridging transection injuries. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007; 23(6):490-6.