



MEDICINA

USP

HOUGELLE SIMPLÍCIO GOMES PEREIRA

**Influência do número de pontos na regeneração axonal e
produção de matriz extracelular na sutura epineural
terminoterminal do nervo ciático do rato**

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

Área de concentração: Neurologia
Orientador: Dr. Roberto Sergio Martins

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Hougelle Simplício Gomes

Influência do número de pontos na regeneração axonal e produção de matriz extracelular na sutura epineural terminoterminal do nervo ciático do rato / Hougelle Simplício Gomes Pereira. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Roberto Sergio Martins.

Descritores: 1.Sistema nervoso periférico/cirurgia 2.Regeneração
nervosa 3.Nervos periféricos 4.Colágeno tipo I 5.Colágeno tipo III
6.Matriz extracelular 7.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-494/09

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha, Nicole, e aos seus belos e apaixonantes olhos à primeira vista, que tem se tornado a mais emocionante, inesperada e fascinante experiência neurocientífica da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa, Mariana, pela presença e apoio constantes, mesmo com a ausência do convívio familiar, e condução do nosso lar em todos os momentos de minha ausência sem os quais não poderia ter concluído este trabalho.

À minha mãe, Thelma, pelo estímulo e esforço dedicados a me ensinar o valor da educação para o indivíduo e para a sociedade.

À minha irmã, Hallissa, pela cumplicidade e alegria demonstrada nas nossas vitórias.

Aos meus sogros, Mizael e Ana Marina, que me apoiaram em todos os momentos, mesmo tendo que se afastar da convivência da sua amada filha para a realização deste projeto.

Ao Dr. Roberto Sergio Martins pelo precioso convite a aventura do doutorado, pelas suas valiosas orientações durante esta jornada e pela sua amizade.

Aos colegas de residência médica do Hospital Santa Marcelina, Daniel Guilherme Agapito e Emerson L. C. de Oliveira, pelo auxílio nos cuidados dos nossos pacientes, assumindo mais atribuições para que eu pudesse me dedicar ao curso do doutorado.

Ao Dr. José Píndaro Pereira Plese, Departamento de Neurologia da FMUSP, pelo auxílio na elaboração e condução inicial deste projeto.

À Dra. Walcy Rosolia Teodoro, Laboratório de Matrix Extra-celular da FMUSP, pelas orientações e iniciação no estudo do colágeno.

Ao Prof. Dr. Ciro Ferreira da Silva, Laboratório de Neurobiologia no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, pela colaboração e orientação no preparo das amostras histológicas

À Profa. Dra. Maria Ângela Fernandes Ferreira, Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelas orientações na análise estatística dos resultados.

Aos amigos, Sidarta Ribeiro e Antônio Pereira, pesquisadores do Instituto Internacional de Neurociências de Natal Edmond e Lily Safra, pelo convite realizado e confiança depositada em me unir ao grupo mesmo antes da conclusão desta tese.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa da diretoria clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o n.º 073/05

Este estudo foi aprovado e financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP através do processo n.º 05/52138-0.

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 O nervo periférico como unidade funcional.....	6
2.2 Regeneração dos nervos periféricos.....	11
2.3 Métodos de avaliação da regeneração dos nervos periféricos.....	14
2.3.1 Modelos animais.....	14
2.3.2 Avaliação histomorfométrica.....	15
2.3.3 Avaliação eletrofisiológica.....	17
2.3.4 Avaliação funcional.....	18
2.3.5 Avaliação do colágeno.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
4. MÉTODOS.....	24
4.1 Protocolo cirúrgico.....	25
4.2 Protocolo de avaliação eletrofisiológica.....	31
4.3 Protocolo de avaliação histomorfométrica.....	33
4.4 Protocolo de quantificação e caracterização do colágeno.....	36
4.5 Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1 Resultados da cirurgia.....	41
5.2 Avaliação eletrofisiológica.....	41
5.3 Avaliação histomorfométrica.....	44

5.3.1 Índice de Regeneração.....	44
5.3.2 Diâmetro.....	45
5.4 Avaliação do colágeno	49
5.4.1 Colágeno tipo I.....	49
5.4.2 Colágeno tipo III.....	52
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	63
8. ANEXOS.....	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	amplitude do potencial de ação motor
ATF	fator ativador de transcrição-3
BDNF	fator neutrófico derivado do cérebro
CP	comprimento da pegada
CS	células de Schwann
DD	distância entre o primeiro e quarto dedos da pata
DiP	distância entre as patas
DNA	ácido desoxiribonucléico
DP	desvio padrão
D1	diâmetro do axônio no segmento proximal do nervo
D2	diâmetro do axônio no segmento distal do nervo
Dra.	Doutora
FGF-2	fator de crescimento fibroblástico
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IAD	índice de alteração do diâmetro
ICB	Instituto de ciências biomédicas
IGF-I	fator de crescimento tipo insulina-I
IGF-II	fator de crescimento tipo insulina-II
IL-1	interleucina 1
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
IR	índice de regeneração
IRC	índice de regeneração ciático
LAT	latência do potencial de ação motor
LIF	fator inibidor de leucemia
M6PR	receptor manose-6-fosfato
n. ^o	número
N Ax1	número de axônios no segmento proximal do nervo

N Ax2	número de axônios no segmento distal do nervo
NFκB	fator nuclear Kappa B
NGF	fator de crescimento neural
NT-3	neurotrofina-3
PAM	potencial de ação motor
Prof ^a .	professora
RNA	ácido ribonucléico
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
TGF-β	1 fator de crescimento transformador beta 1
USP	Universidade de São Paulo
VC1	velocidade de condução do potencial de ação antes da secção do nervo na primeira cirurgia
VC2	velocidade de condução do potencial de ação após oito semanas do reparo na segunda cirurgia
VCM	velocidade do potencial de ação motor

LISTA DE SÍMBOLOS

°	grau
α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	teta
C	Celsius
g	grama
G	Gauge
H	hora
KD	Quilodaltons
M	Molar
mA	miliampere
ml	mililitros
mm	milímetros
ms	milisegundos
m/s	metros por segundo
mV	miliVolts
μm	micrômetros
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Desenho esquemático mostrando uma fibra nervosa, seus constituintes principais e medidas histomorfométricas..... 16
- Figura 2: Fotografia mostrando o ambiente em que foram realizadas as cirurgias do experimento no Laboratório de Neurocirurgia experimental.. 26
- Figura 3: Fotografia com visão ampliada da exposição cirúrgica do nervo ciático direito do rato..... 27
- Figura 4: Fotografia cirúrgica mostrando a secção do nervo ciático direito do rato..... 28
- Figura 5: Fotomicrografia cirúrgica mostrando sutura epineural término-terminal com três pontos equidistantes de fio de náilon..... 28
- Figura 6: Fotomicrografia cirúrgica demonstrando sutura epineural término-terminal com seis pontos equidistantes de fio de náilon..... 29
- Figura 7: Desenho esquemático demonstrando os segmentos ressecados do nervo ciático do rato, de cinco milímetros cada, tendo a linha de sutura como ponto médio do segmento central..... 30
- Figura 8: Fotografia mostrando os quatro eletrodos utilizados nos experimentos. ▲ Eletrodo de estímulo, ● Eletrodo terra do tipo helicoidal, ★ Eletrodo terra para inserção muscular, ◀ Eletrodo de registro..... 31
- Figura 9: Fotografia cirúrgica demonstrando o posicionamento dos

eletrodos utilizados no protocolo eletrofisiológico. ▲ Eletrodo de estímulo, ◀ Eletrodo de registro, ★ Eletrodo terra inserido no músculo, ● Eletrodo terra envolvendo o nervo..... 32

Figura 10: Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal do nervo ciático do rato (animal 3), com auxílio de câmera digital acoplada a microscópio óptico, demonstrando os axônios já contados marcados com círculo azul central (setas largas) e axônios ainda não marcados (setas estreitas). Coloração azul de toluidina 1%..... 34

Figura 11: Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal do nervo ciático do rato (animal 3) com auxílio de câmera digital acoplada a microscópio óptico demonstrando os axônios cujo perímetro foi demarcado manualmente (setas largas). Coloração azul de toluidina 1%..... 35

Figura 12: Fotografia microscópica (aumento 20x) digitalizada de nervo ciático de rato marcado com anticorpo de coelho para colágeno tipo I. O colágeno é marcado na cor verde..... 37

Figura 13: Fotografia microscópica (aumento 40x) digitalizada de nervo ciático de rato marcado com anticorpo de coelho para colágeno tipo I para estudo do epineuro. O colágeno é marcado na cor verde..... 38

Figura 14: Fotografia microscópica (aumento 40x) digitalizada de nervo ciático de rato marcado com anticorpo de coelho para colágeno tipo I para estudo do endoneuro. O colágeno é marcado na cor verde..... 38

Figura 15: Exemplos de imagens de microscopia (aumento 40x) dos

segmentos proximal e distal do nervo ciático do rato de acordo com o grupo de reparo..... 48

Figura 16: Exemplos de imagens de microscopia da imunomarcção do Colágeno tipo I no epineuro e endoneuro de acordo com o grupo de reparo. O colágeno é marcado na cor verde..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das fibras nervosas segundo o diâmetro e velocidade de condução.....	6
Tabela 2: Valores médios das avaliações eletrofisiológicas por grupo de reparo.....	43
Tabela 3: Valores médios da contagem de axônios e cálculo do índice de regeneração por grupo de reparo.....	45
Tabela 4: Valores médios dos diâmetros das fibras nervosas por grupo de reparo.....	47
Tabela 5: Valores médios de quantificação do colágeno tipo I e III por grupo de reparo.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Valores médios da velocidade de condução do potencial de ação motor na segunda avaliação eletrofisiológica segundo o grupo de reparo.....	42
Gráfico 2: Valores médios da velocidade de condução do potencial de ação motor nas duas avaliações eletrofisiológicas segundo o grupo de reparo.....	43
Gráfico 3: Valores médios dos diâmetros nas duas avaliações histomorfométricas segundo o grupo de reparo.....	46
Gráfico 4: Valores médios quantificados para o colágeno tipo I no epineuro e endoneuro segundo o grupo de reparo.....	50
Gráfico 5: Valores médios quantificados para o colágeno tipo III no epineuro e endoneuro segundo o grupo de reparo.....	53

RESUMO

SIMPLÍCIO, H. Influência do número de pontos na regeneração axonal e produção de matriz extracelular na sutura epineural terminoterminal do nervo ciático do rato [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 110p.

INTRODUÇÃO: Após uma lesão de um nervo periférico, o seu reparo é realizado com suturas epineurais dos cotos utilizando-se fio de náilon. O processo inflamatório provocado pela passagem da agulha e pela presença do material de sutura com conseqüente formação de tecido cicatricial na linha de sutura torna-se um obstáculo à regeneração axonal após o reparo do nervo. Existe na literatura a hipótese que a utilização de um menor número de pontos necessários para assegurar a união dos dois cotos correlaciona-se com uma melhor regeneração axonal. Foi avaliada a influência do diferente número de suturas epineurais terminotermiais no nervo ciático do rato na regeneração axonal, além de avaliar o remodelamento da matriz extracelular através da caracterização dos tipos de colágenos tipo I e III presentes no local de sutura de acordo com o número de pontos adotados. **MÉTODOS:** Neste estudo experimental foram utilizados trinta ratos machos *Wistar* submetidos à exposição do nervo ciático direito e divididos em três grupos. Em dois grupos, o nervo foi seccionado e imediatamente reparado com três (Grupo 3P, n=10), ou seis (Grupo 6P, n=10) suturas epineurais usando fio de náilon 10.0. Um grupo (Grupo C, n=10) foi utilizado como controle para determinar os valores normais de todos os parâmetros avaliados. Cada animal pertencente aos grupos de reparo foram submetidos à avaliação eletrofisiológica previamente a secção do nervo e após um intervalo de oito semanas após a neurografia, consistindo de registro do potencial de ação motor do músculo gastrocnêmio. Segmentos do nervo foram utilizados para avaliação histomorfométrica da regeneração axonal, avaliada pela contagem de axônios e medida do diâmetro das fibras, e para caracterização e quantificação do colágeno no local de reparo. Imunofluorescência foi utilizada para caracterização dos colágenos tipo I e II no epineuro e endoneuro. **RESULTADOS:** O índice de regeneração axonal (IR) foi menor no grupo submetido à sutura epineural com seis pontos (IR=1,18±0,26) que no grupo de três pontos (IR=1,32±0,25) e, naquele mesmo grupo, houve uma diminuição mais acentuada da velocidade de condução do potencial de ação do nervo. Os animais submetidos à sutura epineural com seis pontos apresentaram uma diferença significativa na produção do colágeno epineural tipo I (p=0,014) e de colágeno epineural tipo III (p=0,002) quando comparados com os animais submetidos à sutura com três pontos. Não houve diferença significativa na produção de colágeno tipo I ou tipo III endoneural. **CONCLUSÕES:** O grupo submetido a um maior número de suturas epineurais apresentou maior quantidade de colágenos tipo I e III no epineuro, mas não no endoneuro, que se correlacionou com um menor

índice de regeneração axonal e uma diminuição mais acentuada da velocidade de condução do potencial de ação do nervo.

Descritores: 1.Sistema nervoso periférico/cirurgia 2.Regeneração nervosa 3.Nervos periféricos 4.Colágeno tipo I 5.Colágeno tipo III 6.Matriz extracelular 7.Ratos Wistar

SUMMARY

SIMPLÍCIO, H. Influence of the number of stitches in axonal regeneration and production of extracellular matrix in end-to-end epineural suture in the rat sciatic nerve [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009. 110p.

PURPOSE: After an injury to a peripheral nerve, its repair is performed with epineural sutures of the stumps using nylon. The inflammatory process caused by the passage of the needle and the presence of suture material with the consequent formation of scar tissue at the suture line becomes an obstacle to axonal regeneration after nerve repair. In the literature there is a hypothesis that the use of a smaller number of points needed to ensure the union of the two stumps is correlated with better axonal regeneration. It was evaluated the influence of different number of end-to-end epineural sutures in rat sciatic nerve on axonal regeneration and the remodeling of the extracellular matrix through the characterization of collagen type I and III present at the suture according to the number of stitches. **METHODS:** Thirty male *Wistar* rats were operated on to exposure the right sciatic nerve and were divided in three groups. In two groups the nerve was sectioned and immediately repaired by means of three (Group 3P, n=10) or six (Group 6P, n=10) epineurium sutures using 10-0 monofilament nylon. One group (Group C, n=10) was used as a control to assess normal values of all evaluated parameters. Each animal from repaired groups underwent electrophysiologic evaluation previously to nerve section and at 8-week interval after neurorrhaphy, consisting of motor action potential recording from the gastrocnemius muscle. Nerve biopsy specimens were used for histomorphometric assessment of axonal regeneration, evaluated by axonal counting and measurement of fiber diameter, and for collagen characterization and quantification at repair site. Immunofluorescence was used for characterization of types I and III collagen at epineurium and endoneurium. **RESULTS:** The axonal regeneration index (RI) was lower in the group submitted to suture with six stitches ($RI = 1.18 \pm 0.26$) than in the group of three stitches ($RI = 1.32 \pm 0.25$) and the group submitted to six stitches showed a greater reduction in conduction velocity of nerve action potential. Animals submitted to suture with six stitches showed a significant difference in the production of epineural collagen type I ($p = 0.014$) and type III ($p = 0.002$) compared to animals submitted to suture with three stitches. There was no significant difference in production of endoneural collagen type I or type III. **CONCLUSIONS:** The group submitted a greater number of epineural sutures had a higher amount of collagen type I and III in the epineurium but not in the endoneurium, which correlated with a lower rate of axonal regeneration and a greater reduction in conduction velocity of action potential nerve.

Descriptors: 1. Peripheral nervous system/surgery 2. Nerve regeneration
3. Peripheral nerves 4. Collagen type I 5. Collagen type III 6. Extracellular
matrix 7. Rats, Wistar

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A sutura epineural sob magnificação é a técnica convencionalmente utilizada para o reparo de um nervo seccionado por permitir a adequada coaptação dos cotos proximal e distal, facilitando o crescimento axonal em direção ao órgão alvo. Diversos materiais foram utilizados com esta finalidade; no entanto, está estabelecido que o fio de náilon é o material mais adequado para o reparo cirúrgico epineural de um nervo por causar uma reação tecidual menos intensa ao redor do ponto^{1,2,3,4,5}.

O grande obstáculo à regeneração axonal após o reparo do nervo é o inevitável processo inflamatório com conseqüente formação de tecido cicatricial na linha de sutura que obstrui e comprime os axônios, reduzindo o suprimento sanguíneo local^{6,7}. Essa dificuldade de progressão axonal foi inicialmente identificada por Ramon Y Cajal em 1928⁸ e confirmada por estudos mais recentes^{9,10}. Witzel et al. demonstraram que os axônios se regeneram de forma assíncrona e que um número considerável de brotamentos laterais e retrógrados ocorrem na linha de sutura antes que os axônios de fato atinjam o tubo endoneural distal^{11,12}.

No nervo, o material de sutura ocasiona uma resposta celular inicialmente mediada por polimorfonucleares, linfócitos, células gigantes e histiócitos. Em seguida, fibroblastos direcionam-se à região de síntese isolando o material utilizado com a formação de um tecido fibrocicatricial¹³. Embora este mesmo processo inflamatório seja importante para se obter o suporte mecânico que resulta numa coaptação adequada dos cotos do

nervo, o colágeno produzido em excesso é considerado como o principal fator responsável pela ineficácia do processo de regeneração após a sutura^{14,15}.

Além da presença do material de sutura, o trauma provocado pela passagem da agulha durante a realização da sutura entre os cotos do nervo é suficiente para promover uma reação dos fibroblastos localizados no trajeto da agulha que, embora localizada, persiste como uma cicatriz linear. De maneira ideal o trajeto da agulha não deve atingir o conteúdo fascicular, permanecendo restrito ao epineuro externo e interno e, por vezes, a lamela externa do perineuro¹⁶. Este trajeto deve ser radial e superficial ao nervo, de tal forma que não ocorra fibrose no caminho dos axônios em regeneração.

Como a extensão da reação inflamatória é proporcional à superfície do trajeto realizado pela agulha, o número de vezes que esta transfixa o nervo e a área de superfície de contato do material de sutura com o nervo, tais parâmetros devem ser o menor possível^{7,17}.

Para minimizar os efeitos da reação inflamatória alguns autores recomendam a utilização de um número mínimo de pontos necessário para assegurar a união dos dois cotos¹⁸. Não há na literatura nenhum estudo que avalie a vantagem do emprego do menor número possível de pontos de sutura, confrontando o número de pontos com a eficácia da regeneração axonal e correlacionando a mesma com a produção de colágeno local.

O presente estudo experimental pretende comparar a regeneração axonal em nervos seccionados e reparados com suturas com três ou seis pontos, além de avaliar o remodelamento da matriz extracelular através da

caracterização dos tipos de colágeno presentes no local de sutura de acordo com o número de pontos adotados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O nervo periférico como unidade funcional

A unidade funcional do nervo é a fibra neural, formada pelo axônio que é envolvido por uma camada única de células de Schwann (CS). Fibras neurais motoras, sensitivas e simpáticas contribuem para a formação do nervo que podem ser exclusivamente motores, sensitivos ou mistos. As fibras podem ser também aferentes ou eferentes, mielinizadas ou não. As fibras mielinizadas possuem um calibre maior e velocidade de condução do impulso elétrico superior às fibras não mielinizadas. Tais fibras são responsáveis pela inervação de fibras musculares intrafusais da musculatura esquelética. As fibras não mielinizadas inervam vasos, órgãos terminais especializados ou terminam livremente na pele.

As fibras neurais são classificadas segundo o diâmetro e a velocidade de condução do impulso elétrico. A tabela 1 descreve esta classificação e a função desempenhada por tais fibras.

Tabela 1: Classificação das fibras nervosas segundo o diâmetro e a velocidade de condução.

Tipo de fibra nervosa	Diâmetro (μm)	Velocidade de Condução (m/s)	Função
A α	12-20	70-120	Motricidade de fibras musculares extrafusais.
A β	5-12	30-70	Sensibilidade de tato e pressão.
A γ	3-6	15-30	Motricidade de fibras musculares extrafusais.
A δ	2-5	10-30	Tato, temperatura e sensibilidade nociceptiva,
B	1.5-3	3-15	Fibras simpáticas pré-ganglionares.

C	<2	0.5-2	Sensibilidade nociceptiva. Simpáticas pós-ganglionares.
---	----	-------	--

Legenda: α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (teta), μm (micrômetros), m/s (metros por segundo).

Os nervos recebem vascularização de artérias e veias que seguem essas estruturas ao longo do seu maior eixo e emitem ramos transversais que atravessam o epineuro e atingem a profundidade do nervo através do tecido perineural.

Key e Retzius (1873)* citados por Thomas e Olsson¹⁹ descreveram uma subdivisão para o tecido conjuntivo que envolve a estrutura do nervo periférico em epineuro, perineuro e endoneuro. Apesar de outras denominações terem sido sugeridas, esta classificação persiste de forma consagrada.

O epineuro foi adequadamente descrito como “tecido conectivo perineural” por Ranvier em 1873, que utilizou a denominação anterior de Key e Retzius. O mesmo consiste de um tecido areolar situado ao redor do envoltório perineural que está ligado de forma tênue ao tecido conjuntivo ao seu redor, o que permite uma grande mobilidade do nervo. O epineuro é mais volumoso nas regiões dos nervos adjacentes às articulações e é responsável por 30% a 75% da área seccional do nervo^{20,21}.

Identificam-se duas camadas distintas no epineuro. A camada mais externa é constituída por tecido conectivo areolar contendo vasos sanguíneos, quantidades variáveis de tecido adiposo, uma rede de drenagem linfática, fibroblastos e mastócitos. A camada mais interna envolve os fascículos nervosos e é composta de fibras de elastina com diâmetro de 25 a 50 nm dispostas longitudinalmente ao eixo do nervo e fibras de colágeno com disposição longitudinal e oblíqua e diâmetro estimado, por

* Key A, Retzius G. Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Stockholm .1873.

microscopia eletrônica, entre 60 a 110 nm. A disposição longitudinal e oblíqua das fibras de colágeno no epineuro estabelece uma configuração em zigzag com frequência de 39 μm denominada bandas de Fontana que permite o estiramento de um nervo em cerca de 20% sem que haja comprometimento ou perda da função do mesmo^{7,22,23}.

O perineuro tem origem mesotelial e é constituído por três camadas. A mais interna é formada por células mesoteliais e é separada do endoneuro por um pequeno espaço subperineural onde se situam septos unindo estas camadas. Na camada intermediária, células perineurais se organizam em lamelas concêntricas que se intercalam com fibras de colágeno e elastina^{19,24}. As camadas interna e intermediária do perineuro, devido as junções comunicantes (“*gap junctions*”) entre as células, constituem uma barreira à entrada de macromoléculas no nervo denominada barreira hematoneural. A camada externa do perineuro está associada ao epineuro e suas células perineurais progressivamente são substituídas por fibroblastos e fibras colágenas, sendo mais difícil uma delimitação precisa entre essas duas camadas²⁵.

O endoneuro compreende o tecido conectivo mais intimamente relacionado aos axônios, sendo constituído pela membrana basal, pela bainha endoneural, por fibroblastos e por fibras colágenas que fornecem estrutura de suporte às fibras nervosas e capilares²⁶. As fibras de colágeno presentes no endoneuro possuem diâmetro de 30 a 65 nm e estão dispostas em duas camadas. A primeira, mais externa, está orientada longitudinalmente em relação ao eixo da fibra nervosa; e a segunda, mais interna, segue a disposição das fibras e estão agrupadas em uma trama que, juntamente com a membrana basal das células de Schwann, delimitam o tubo endoneural com seus constituintes: axônio, mielina e a própria célula de Schwann^{25,26}.

Por volta do 16° ao 17° dia de gestação, as células epineurais se multiplicam e formam camadas. Nessa fase as células de Schwann também se multiplicam e adquirem uma membrana basal. Ao nascimento, as fibras de colágeno apresentam diâmetro ainda de 25 a 30 nm e não há diferença

entre o diâmetro das fibras localizadas no epineuro ou endoneuro. Na primeira semana de vida, as fibras de colágeno do epineuro atingem o diâmetro de 30 a 35 nm, mas é na segunda semana que a diferença entre o colágeno endoneural e epineural é mais perceptível. A partir desse período, as fibras de colágeno epineural atingem diâmetros maiores, chegando até a 40 a 45 nm no quinto mês de vida^{27,28,29,30}.

No homem, as células de Schwann (CS) se diferenciam de células da crista neural por volta do 14º dia de vida embrionária e iniciam a sua migração. Posteriormente, modificam o seu fenótipo de células precursoras das CS à CS imaturas e à CS maduras e progressivamente se relacionam com um número menor de axônios até estabelecerem a relação de uma CS para um axônio mielinizado, processo acompanhado por um aumento concomitante do diâmetro axonal. Axônios não mielinizados são agrupados e se relacionam com CS não mielinizantes. O processo de mielinização tem início ao redor do quarto mês de vida fetal e está associado com a interrupção das divisões celulares das CS^{29,30}. Ochoa demonstrou que a mielina vai se alongando de acordo com o crescimento do axônio, fato não identificado nos estudos de Friede e Samorajski^{28,30}.

A estrutura da mielina estudada por microscopia óptica e eletrônica e o processo de mielinização presentes no sistema nervoso periférico, tanto de vertebrados não mamíferos quanto de mamíferos, são indistinguíveis. Waehneltd et al. sugerem, através de evidências bioquímicas e estruturais, que a mielina tenha ocorrido de forma única no processo evolucionário dos vertebrados e, por isso, existem semelhanças significativas tanto estrutural como funcional da mielina entre as diversas espécies. A importância deste fato reside na geração de axônios mielinizados com conseqüente ganho de eficiência e velocidade de condução dos impulsos elétricos que permitem a complexidade comportamental das espécies de vertebrados³¹.

O colágeno presente em um nervo periférico, incluindo o epineuro, perineuro e endoneuro, compreende cerca de 50% da proteína do nervo e 16% do peso seco do nervo^{32,33}. Os tipos mais comuns são o I e o III, mas o tipo IV também está presente em menor quantidade no nervo, associado à

membrana basal ao redor da célula de Schwann. Junqueira et al., utilizando o método do Picrosirius com avaliação por microscopia óptica com luz polarizada, identificaram o colágeno tipo III como o tipo predominante no endoneuro³⁴.

Junqueira et al. (1979) estudaram e caracterizaram, através de microscopia óptica e eletrônica, o colágeno presente em várias espécies de vertebrados abrangendo as principais classes; peixes (*Tilapia melanopleura* e *Pterophyllum scalare*), anfíbios (*Bufo ictericus* e *Rana ridibunda*), reptéis (*Lyophis miliaris* e *Xenodon merremii*) e mamíferos (rato, camundongo, coelho e cachorro) e identificaram concordância entre tais espécies na localização de colágeno tipo I no epineuro e o tipo III no endoneuro, assim como semelhança no seu arranjo estrutural, sugerindo que a organização do colágeno no nervo é um fenômeno único na evolução dos vertebrados³⁵.

Osawa e Ide (1986) estudaram o desenvolvimento do colágeno presente no espaço epineural e endoneural do nervo ciático do rato no período embrionário, com 12, 15 e 17 dias de gestação, ao nascimento e após sete dias, 14 dias, um mês e cinco meses do nascimento. Até o 14º dia de gestação os axônios são envoltos por uma célula precursora da célula de Schwann e não se observam células epineurais e fibras de colágeno entre os mesmos. Por volta do 15º dia, células de Schwann e a membrana basal são identificadas, assim como fascículos contendo cerca de 30 a 50 axônios. Células precursoras de células epineurais, com formato achatado, se desenvolvem nesse mesmo período e envolvem o nervo. Um espaço é delimitado entre essas células e as células de Schwann onde podem ser identificadas fibras de colágeno com 25 a 30 nm de diâmetro. Nessa fase ainda não há fibras de colágeno no espaço endoneural²⁷.

Independente do tipo de fibra nervosa, o colágeno presente no sistema nervoso periférico é um importante constituinte da matriz extracelular definida como o ambiente em que as células migram, proliferam e se diferenciam. A matriz extracelular é responsável pela citoarquitetura dos tecidos e pela relação espacial entre os tipos celulares, permitindo uma interação com o micro ambiente tecidual e celular, influenciando na fisiologia

dos tecidos de acordo com a síntese e degradação de substâncias³⁶. Bioquimicamente, a matriz extracelular é constituída por glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanas e colágeno³⁷.

As células envoltas pela matriz extracelular são conectadas às macromoléculas através da laminina, uma glicoproteína com peso molecular de 800 kD formada por duas cadeias de 200 kD e uma de 400 kD. A laminina, assim como o colágeno tipo IV, localiza-se na membrana basal das células de Schwann e é identificada também junto aos vasos sanguíneos presentes no epineuro³⁸. A fibronectina, uma glicoproteína assimétrica, é responsável por promover adesão e propagação de células através de sua ligação com as fibras do colágeno, fibrina ou outras substâncias. A perda de fibronectina, em estudos que avaliam a fisiologia das células tumorais, tem implicado em perda da adesividade e organização do citoesqueleto e infere-se que a mesma tenha importância no processo de regeneração da fibra nervosa, mas sua função neste processo ainda não está estabelecida^{39,40}. Demais glicoproteínas como a entactina ou vitronectina não foram adequadamente estudadas no SNP.

Os glicosaminoglicanos são polímeros de carboidratos de alto peso molecular que se ligam a proteínas e formam macromoléculas com natureza elétrica, as proteoglicanas. Estas estão envolvidas principalmente nos processos de crescimento e adesividade celular. Margolis e Margolis (1977) sugeriram que as proteoglicanas selecionam eletricamente as moléculas que entrariam em contato com os cones de crescimento das fibras nervosas, hipótese ainda não comprovada⁴¹.

2.2 Regeneração dos nervos periféricos

Após uma lesão de um nervo periférico, as fibras nervosas distais à lesão são descontinuadas do corpo celular e iniciam um processo de degeneração envolvendo o axônio e a mielina denominado degeneração Walleriana. Os primeiros sinais de degeneração são observados dentro de

24 horas após a lesão e progridem por cerca de duas semanas, principalmente no segmento distal; a degeneração também ocorre em uma extensão menor no segmento proximal.

Com a lesão produtos de degradação da mielina ativam o receptor tirosina quinase erbB2⁴² que fazem com que as CS se destaquem da mielina. Após se desprenderem, as CS alteram sua expressão fenotípica se assemelhando a CS imaturas e iniciam a fagocitose dos produtos de degradação da mielina.

Por volta do terceiro dia, macrófagos se infiltram no nervo em degeneração atraídos por citocinas, como a proteína quimioatratadora de monócitos 1, o fator inibidor de leucemia (LIF) e a interleucina-1 (IL-1), secretadas pelas próprias CS⁴³ e acentuam a fagocitose dos produtos de degradação da mielina. As CS se alinham dentro do tubo endoneural numa configuração ímpar denominada de bandas de Bungner, fornecendo suporte mecânico aos axônios em regeneração⁴⁴ e que, quando associadas à membrana basal, constituem a unidade de regeneração.

As alterações que ocorrem no corpo celular após a lesão periférica são a dissolução dos corpúsculos de Nissl, ou cromatólise, a ocorrência da excentricidade nuclear, o alargamento nuclear e nucleolar, o inchaço celular e a retração dos dendritos. A cromatólise se inicia cerca de oito horas após a lesão e consiste na desorganização dos agregados de ribossomos que representa uma resposta anabólica do neurônio com diminuição da repressão do DNA, aumento da síntese de RNA, transferência do RNA para o citoplasma e aumento da síntese protéica^{45,46,47}. Estas alterações caracterizam a mudança do neurônio do estado de transmissão ao estado de regeneração, onde há diminuição da síntese de neurotransmissores e aumento da síntese de proteínas envolvidas no crescimento axonal^{48,49}. A transição, que pode ocorrer do estado de reação neuronal e cromatólise à apoptose, depende do acúmulo de mitocôndrias metabolicamente ativas contendo substâncias oxidativas que podem danificar os ácidos nucléicos e as proteínas dos neurônios.

O primeiro sinal que chega ao corpo celular neuronal após a lesão periférica de seu axônio é um sinal elétrico de alta frequência. Durante poucos segundos após a lesão do nervo e antes da reconstituição da membrana do axônio, o seu citoplasma fica em contato direto com o meio extracelular permitindo um rápido influxo de íons cálcio e sódio que causam uma resposta elétrica anterógrada⁵⁰. Este sinal elétrico de alta frequência ativa diversos genes de expressão imediata^{51,52} que são dependentes do tipo de nervo lesado e do tipo de lesão. Tais genes interferem em vias de sinalização e regulam a expressão de fatores de transcrição, tais como: c-fos, c-jun, fator ativador de transcrição-3 (ATF), fator nuclear Kappa B (NFκB), entre outros, que interferem com a adesão celular, com proteínas do citoesqueleto e com a expressão de neuropeptídeos, e interagem com citocinas, fatores neurotróficos e enzimas sintetizadoras de neurotransmissores^{53,54,55}. Desta forma, induzem diversas vias de sinalização no corpo celular neuronal que podem ter como consequência a resposta regenerativa ou a apoptose.

No segmento proximal, os axônios iniciam um fenômeno conhecido como brotamento axonal que consiste na formação de vários brotos de crescimento a partir de um axônio direcionados ao segmento distal. O material necessário para o crescimento axonal é transportado, na sua maioria, do corpo celular através de transporte axonal^{56,57,58}, mas também há participação axonal local na síntese e degradação de substâncias^{59,60,61}. Os axônios se regeneram a uma taxa de cerca de 1 a 3 mm ao dia. Um grande número de fatores influenciam este crescimento e, em sua maioria, são produzidos localmente como fatores neurotróficos a partir de células de Schwann imaturas. A matriz extracelular participa deste processo possibilitando a manutenção de um micro ambiente adequado aos axônios em crescimento. Ao alcançar a região de sinapse com o órgão alvo, os brotos axonais supranumerários envolvem, assim como os axônios que se regeneraram em uma via errônea, como por exemplo, fibras nervosas motoras que alcançaram uma terminação sensitiva^{62,63}.

Quando os axônios em regeneração não conseguem progredir no segmento distal, realizam um trajeto sinuoso e formam um neuroma composto de brotos de axônios imaturos e tecido conjuntivo⁶⁴.

Após uma lesão do nervo periférico, o axônio proximal e o corpo celular sofrem transformações que permitem a regeneração ou que desencadeiam uma série de processos bioquímicos que culminam com a apoptose. Em estudos experimentais com neurônios do gânglio da raiz dorsal do rato, após lesão do nervo ciático há uma perda de fibras sensitivas que varia de 10 a 30% e de fibras motoras entre 0 a 10%^{65,66,67,68,69}. A manutenção neuronal ou morte celular dependerá de fatores como idade do indivíduo, grau da lesão e proximidade da lesão ao corpo celular. Quanto mais próxima a lesão do corpo celular, maiores as taxas de apoptose.

Vários fatores neurotróficos e neurotrópicos são liberados e atuam conjuntamente após uma lesão neural periférica a fim de estimular a regeneração neural e incluem o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3), os fatores de crescimento tipo insulina (IGF-I e IGF-II), o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2), entre outros^{70,71,72,73}.

2.3 Métodos de avaliação da regeneração dos nervos periféricos

2.3.1 Modelos animais

Apesar de vários animais como coelhos, gatos e macacos serem adotados como modelos para o estudo das lesões neurais periféricas, o rato tem sido o mais amplamente utilizado. Algumas características contribuem para este fato. O rato é um animal que não acarreta uma grande despesa para sua manutenção, possui fácil manuseio no laboratório e é bem estudado quanto a sua anatomia e ao seu comportamento⁷⁴. Além disso, a

histologia do nervo periférico de um rato é muito semelhante a do nervo humano⁷⁵.

Na prática clínica a regeneração de um nervo periférico é aferida através de testes de sensibilidade, tal como o teste de discriminação de dois pontos, e testes que quantificam a função motora, como a aferição da força de um músculo ou de um grupo muscular na realização de um ato voluntário⁷⁶.

Em estudos de regeneração neural com modelos animais este tipo de aferição não pode ser aplicada, sendo utilizados outros métodos para se avaliar a regeneração do nervo, representados principalmente pela avaliação histomorfométrica, eletrofisiológica ou funcional.

2.3.2 Avaliação histomorfométrica

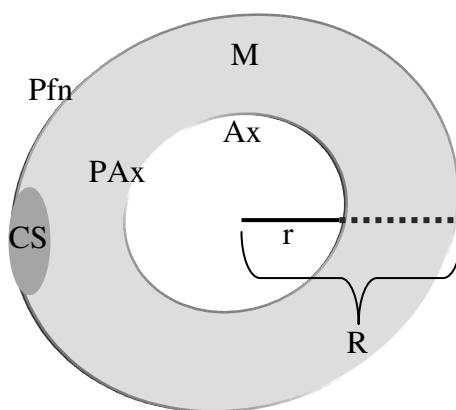
A avaliação histomorfométrica consiste em se quantificar e caracterizar a morfologia do nervo. As avaliações mais frequentemente utilizadas são a contagem do número de axônios, a medida do diâmetro da fibra neural, a aferição da espessura da bainha de mielina e a quantificação da massa do músculo alvo⁷⁷.

Exceto para a pesagem do músculo alvo, as demais variáveis são mensuradas através de cortes histológicos geralmente corados com azul de toluidina a 1%. Tal técnica marca intensamente a mielina, possibilitando a visualização dos axônios mielinizados por microscopia óptica. A partir da digitalização do corte histológico e com a utilização de programas específicos é possível a análise da imagem e mensuração das variáveis citadas. O estudo das fibras não mielinizadas só é realizado adequadamente com o uso de microscopia eletrônica. A contagem do número de axônios mielinizados pode ser realizada nos segmentos proximal e distal à região do reparo, o que possibilita o cálculo do índice de regeneração (IR) pela divisão do número de axônios no segmento distal ao reparo pelo número de axônios no segmento proximal ao reparo. Apesar desse índice ser útil para a

avaliação do percentual de axônios que atravessaram a região do reparo, a interpretação dos valores obtidos deve ser cautelosa. A ocorrência de brotamento axonal justifica a existência de um número maior de axônios no segmento distal em relação ao proximal, o que pode resultar em valores do IR próximos a um (cem por cento) ou até maiores. Além disso, esse tipo de resultado pode não se correlacionar com uma boa recuperação funcional, devido ao fato de que nem todos aqueles axônios que atravessam a região do reparo atingem o órgão alvo^{78,79,80,81,82,83}.

O mesmo pode ocorrer com o cálculo de índices baseados na avaliação do diâmetro axonal. Esse parâmetro depende da maturidade do nervo e uma inadequada inervação do órgão alvo ou integração com o sistema nervoso central (SNC) podem produzir um grande diâmetro axonal sem função. A espessura da bainha de mielina também expressa o grau de maturidade da regeneração neural sem necessariamente haver uma correlação com a função, pois o processo de mielinização dos axônios ocorre antes destes atingirem o órgão alvo^{5,84}. Dellon e Mackinnon (1989) sugerem que a razão entre a espessura de mielina e o diâmetro do axônio ou a razão entre os diâmetros da fibra nervosa e do axônio são as medidas que tem maior correlação com a função (figura 1)⁸⁴.

Figura 1: Desenho esquemático mostrando uma fibra nervosa, seus constituintes principais e medidas histomorfométricas.



Legenda: Ax: axônio; CS: célula de Schwann; M: bainha de mielina; PAx: perímetro do axônio; Pfn: perímetro da fibra nervosa; r: raio do axônio; R: raio da fibra nervosa.

Alguns autores utilizam a pesagem do músculo alvo como parâmetro de regeneração neural com a justificativa que músculos inervados têm uma massa maior que aqueles desnervados. Apesar desse princípio ser correto, o acúmulo de gordura e fibrose em um músculo desnervado torna este parâmetro questionável, assim como, o fato de que pode haver uma reinervação inadequada de nervos flexores em músculos extensores ou vice-versa.

As avaliações histomorfométricas não medem a integração dos axônios em regeneração com o SNC ou com os órgãos alvo; por isso não expressam necessariamente a funcionalidade do nervo. No entanto, são indicadores da quantidade e qualidade da regeneração neural no local da amostra analisada.

2.3.3 Avaliação eletrofisiológica

As variáveis comumente analisadas na avaliação eletrofisiológica são as velocidades de condução do nervo, a amplitude e a área do potencial de ação.

A velocidade de condução do nervo mede a velocidade das fibras nervosas que têm condução mais rápida, parâmetro que é dependente do diâmetro do axônio, do grau de mielinização do mesmo e da distância internodal⁸⁵.

A amplitude do potencial de ação de um nervo se correlaciona com a corrente elétrica gerada pelos axônios mielinizados de maior diâmetro. Desta forma, quando são aferidas a velocidade e a amplitude do potencial de ação de um nervo, medem-se as fibras nervosas mais largas e mais mielinizadas e não todas as fibras daquele nervo. Alguns estudos mostraram uma

correlação entre velocidade de condução e diâmetro das fibras e amplitude do potencial de ação e número das fibras⁷⁷.

A área do potencial de ação mede a atividade elétrica gerada por todas as fibras do nervo, mas como é obtida através de estímulo elétrico diretamente no nervo, não mede a inervação do órgão alvo^{77,78,80}.

2.3.4 Avaliação funcional

Numerosos métodos foram descritos para quantificar a recuperação funcional incluindo a avaliação da função dos dedos, da pata, do tornozelo ou de todo o caminhar^{86,87,88,89}.

Com base em estudos prévios, em 1982, De Medinaceli publicou uma análise quantitativa da função do nervo ciático do rato baseado nas pegadas do animal durante a marcha⁹⁰. No trabalho desses autores, os animais eram colocados para marchar em um corredor com 8,3 cm de largura e 43 cm de comprimento com um abrigo coberto e escuro no final. Os animais marchavam nesse corredor, por duas ou três vezes, durante um período de condicionamento em que paravam para exploração do ambiente; ao final do condicionamento, os animais caminhavam diretamente até o abrigo no final do corredor deixando as impressões de suas pegadas em um filme de radiografia que após seco as mantinham permanentemente.

Quatro variáveis em cada lado, na pata do lado normal e na pata do lado do nervo operado, foram obtidas para o cálculo de um índice denominado índice de regeneração ciático (IRC): distância entre as patas (DiP), comprimento da pegada (CP), distância entre o primeiro e quarto dedos da pata (DD) e distância entre os dedos intermediários.

Como descrito, a fórmula do IRC avalia as quatro variáveis citadas anteriormente e considera cada uma delas de mesma importância para a marcha, mas as alterações desses parâmetros após uma lesão são diferentes quando comparadas tais variáveis. Além disso, a constante que multiplica as variáveis é um artifício matemático para se atingir o valor de

cem para a perda total da função do nervo. Devido a essas deficiências, dois outros estudos posteriores ao de De Medinaceli propuseram alterações no cálculo do IRC. Carlton e Goldberg, em 1986, e Bain et al., em 1989, propuseram fórmulas diferentes para o cálculo do IRC. Ambos não consideraram a distância entre as patas como um parâmetro a ser avaliado devido à ausência de alteração significativa nesse parâmetro após a lesão e propuseram pesos diferentes para as demais variáveis de acordo com os resultados de seus próprios estudos; a constante em cada uma destas fórmulas também representou a forma matemática de se atingir o valor cem para a perda completa da função do nervo^{80,91}. O resultado do IRC expressa, em percentual, o grau de função do nervo em relação à marcha. Desta forma, um IRC de 11, significa perda de 11% da função do nervo e 100, a perda total de sua função. O valor zero reflete um nervo com função normal.

O IRC é considerado por alguns autores como o teste mais apropriado para se avaliar a funcionalidade de um nervo em regeneração uma vez que é dependente da integração sensorial e motora do nervo com o SNC e órgão alvo. No entanto, não considera os animais que desenvolvem contraturas no membro lesado ou ferimentos secundários à autotomia, complicação que altera significativamente o valor do IRC mesmo que os músculos estejam adequadamente reinervados^{80,92}.

2.3.5 Avaliação do colágeno

A avaliação sistemática do tecido conectivo no nervo se iniciou com os estudos de Sunderland, mas foi só mais recentemente que o estudo do colágeno tem recebido atenção. Seyer et al. (1978) descreveram o primeiro estudo que caracterizou bioquimicamente o colágeno em nervos periféricos humanos utilizando o método da mensuração da hidroxiprolina. Este método quantifica peptídeos específicos desta substância, que ocorre quase exclusivamente no colágeno, sendo possível calcular a razão molar das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ presentes no colágeno tipo I e III, respectivamente³³.

Através desse método esses autores relataram que 82% do colágeno no nervo eram do tipo I e 18% do tipo III, mas colágeno tipo IV não foi identificado. McFarlane et al. (1980) compararam a quantificação do colágeno pelo método da hidroxiprolina em nervos de animais obtidos no *post mortem* imediato e após quatro semanas de armazenamento das carcaças a 4°C e concluíram que não houve diferença significativa nos resultados⁹³. Brown et al. (1976) avaliaram a quantidade de lipídeos e colágeno em nervos humanos ressecados *post mortem* submetidos previamente a separação dos compartimentos do epineuro e do endoneuro por microdissecção. Esses autores relataram que a proporção de colágeno no epineuro e endoneuro foi de 85 % e 15 %, respectivamente²⁵.

Junqueira et al. (1979) identificaram as fibras de colágeno com utilização do método histoquímico do Picrosirius aplicado sob microscopia com luz polarizada. Nesta preparação os grupos sulfônicos, que são ácidos, do Sirius-Red se acoplam aos grupos de base presentes na molécula de colágeno gerando um paralelismo longitudinal entre as duas moléculas. Tal paralelismo ocasiona o fenômeno de birrefringência o que permite que, com aplicação de luz polarizada, as fibras colágenas sejam visibilizadas em vermelho com o fundo do tecido escuro, permitindo uma fácil diferenciação^{94,95}.

Lorimier et al. (1992), em um estudo dos constituintes da matrix extracelular do nervo do rato, utilizaram o método imunohistoquímico para caracterização das fibras de colágeno. Identificaram fibras de colágeno tipo I e III no epineuro, colágeno tipo III e IV no perineuro, e colágeno tipo I, III e IV no endoneuro. Neste mesmo estudo foram comparados os achados da imunohistoquímica e visualização por microscopia óptica com os achados de microscopia eletrônica, não havendo discordância entre os métodos⁴⁰.

A imunohistoquímica é um método molecular de análise de tecidos que utiliza o reconhecimento do antígeno a ser pesquisado por um anticorpo específico, associado a diversos tipos de processos de visibilização. A caracterização da molécula de colágeno é específica e realizada aplicando-

se o anticorpo específico para cada fibra de colágeno, tipo I, II ou IV, por exemplo.

Lowry et al. (1997) utilizaram o método imunohistoquímico para avaliar o colágeno tipo IV presente em nervos humanos adquiridos de pacientes submetidos a amputação ou *postmortem* com o objetivo de descrever o protocolo mais confiável de técnicas histológicas de fixação e preparação das amostras e concluíram que a fixação em parafina é superior a congelação⁹⁶.

Schmidhammer et al. (2004) realizaram estudo no qual avaliaram o efeito de diferentes tensões no local da sutura de nervos ciáticos de rato com parâmetros eletrofisiológicos, testes funcionais e histológicos. Na avaliação histológica foi utilizada a imunohistoquímica como método de escolha da quantificação do colágeno endoneural¹².

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo comparar a regeneração axonal do nervo ciático do rato submetido à secção e reparo imediato com sutura epineural com fio de náilon 10.0 com três ou seis pontos e avaliar o remodelamento da matriz extracelular através da caracterização dos tipos de colágeno I e III presentes no local de reparo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Avaliar a regeneração axonal através da mensuração histomorfométrica do índice de regeneração nos diferentes grupos de reparo;
- 3.2.2 Avaliar o diâmetro das fibras mielinizadas em regeneração nos diferentes grupos de reparo;
- 3.2.3 Caracterizar e quantificar o colágeno tipo I presente no epineuro e endoneuro do nervo ciático do rato no local do reparo cirúrgico e comparar a produção deste nos grupos de reparo;
- 3.2.4 Caracterizar e quantificar o colágeno tipo III presente no epineuro e endoneuro do nervo ciático do rato no local do reparo cirúrgico e comparar a produção deste nos grupos de reparo;
- 3.2.5 Avaliar os índices de velocidades de condução do potencial de ação do nervo ciático do rato nos diferentes grupos de reparo.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

Foram utilizados trinta e cinco ratos albinos Wistar machos adultos jovens pesando aproximadamente 300 gramas, oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e divididos ao acaso em três grupos, contendo dez animais em cada grupo. Cinco animais foram excluídos do estudo devido à impossibilidade de obtenção dos resultados devido a falhas no processo de fixação dos espécimes.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa da diretoria clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o n.º 073/05 e todos os procedimentos estiveram de acordo com as diretrizes nacionais de bem-estar animal e com os princípios éticos da experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A metodologia adotada esteve de acordo com a Lei Federal n.º 6638, de 8 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo aprovou e apoiou financeiramente o presente estudo sob o processo n.º 05/52138-0.

4.1. PROTOCOLO CIRÚRGICO

O protocolo cirúrgico deste trabalho foi realizado no Laboratório de Neurocirurgia Experimental, LIM 45, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Esse protocolo incluiu a realização de duas cirurgias com intervalo de oito semanas entre o primeiro e segundo procedimento em um mesmo animal. O tempo entre a primeira e segunda cirurgia foi definido com base

em dados da literatura descritos no anexo A. Cada animal teve seu peso aferido antes de cada cirurgia.

A anestesia utilizada foi a injeção intraperitoneal de diazepam, na quantidade de 0,2 ml, associada ao cloridrato de Ketamina, na dose de 0,2ml/100g. Uma dose intraperitoneal suplementar de cloridrato de Ketamina, variando de 0,1 a 0,2ml, era administrada após uma hora da anestesia inicial, ou antes, se houvesse reação do animal (Anexos B e C).

Após anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral, submetidos à tricotomia na região dorso-caudal próxima a pata direita traseira e à assepsia com álcool a 70 graus. Foi realizada uma incisão longitudinal da pele e tecido celular subcutâneo, iniciada 0,5 cm lateral em relação à linha média do animal e que era prolongada por três centímetros lateralmente em direção à articulação tíbio-femoral (figura 2).

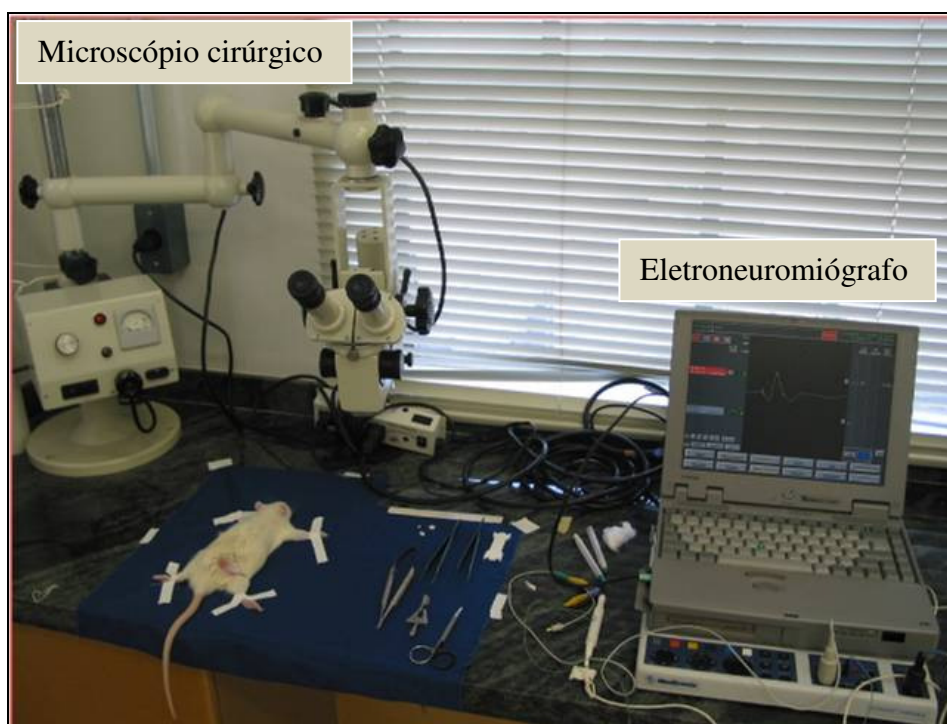


Figura 2: Fotografia mostrando o ambiente em que foram realizadas as cirurgias do experimento no Laboratório de Neurocirurgia experimental.

Os músculos bíceps femoral e glúteo foram afastados com dissecação romba permitindo a exposição do nervo ciático desde sua origem na incisura

ciática até sua divisão nos nervos tibial posterior e fibular distalmente (figura 3).

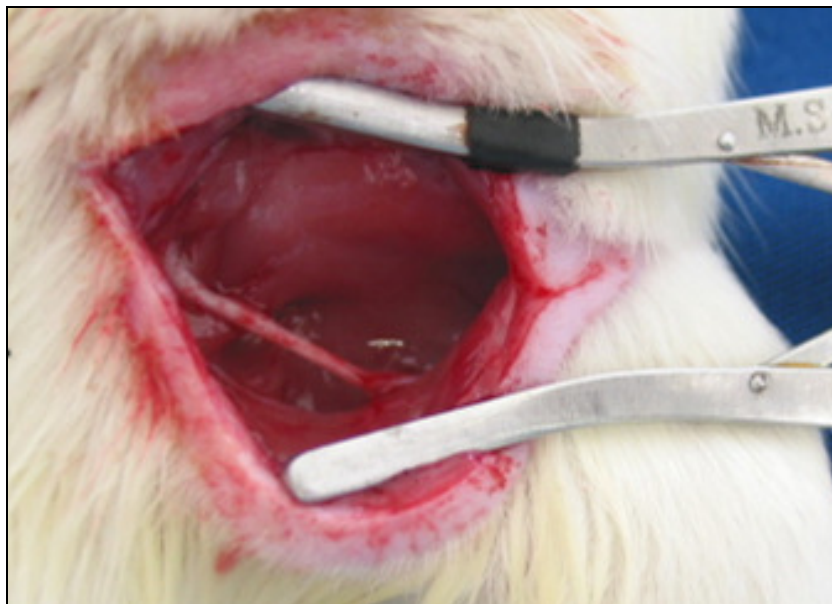


Figura 3: Fotografia da com visão ampliada da exposição cirúrgica do nervo ciático direito do rato.

Após a exposição do nervo ciático, foi realizada a avaliação eletrofisiológica segundo protocolo pré-estabelecido e descrito posteriormente. Em seguida, foi realizada uma secção total do nervo no ponto médio entre a incisura ciática e suas divisões utilizando-se técnica microcirúrgica, com magnificação de 25 vezes* (figura 4). O nervo foi reparado imediatamente sob magnificação de 40 vezes* com fio monofilamentar de náilon 10.0 com duas técnicas distintas. Em um grupo de 10 animais, denominado 3P, a coaptação dos dois cotos do nervo foi realizada com sutura epineural terminoterminal com três pontos equidistantes de fio de náilon (figura 5). Em outro grupo de 10 animais, denominado 6P, o reparo foi realizado com sutura epineural terminoterminal com seis pontos equidistantes do mesmo fio (figura 6).

* Microscópio D.F.Vasconcelos modelo M900, D.F.Vasconcelos S.A., Brasil.

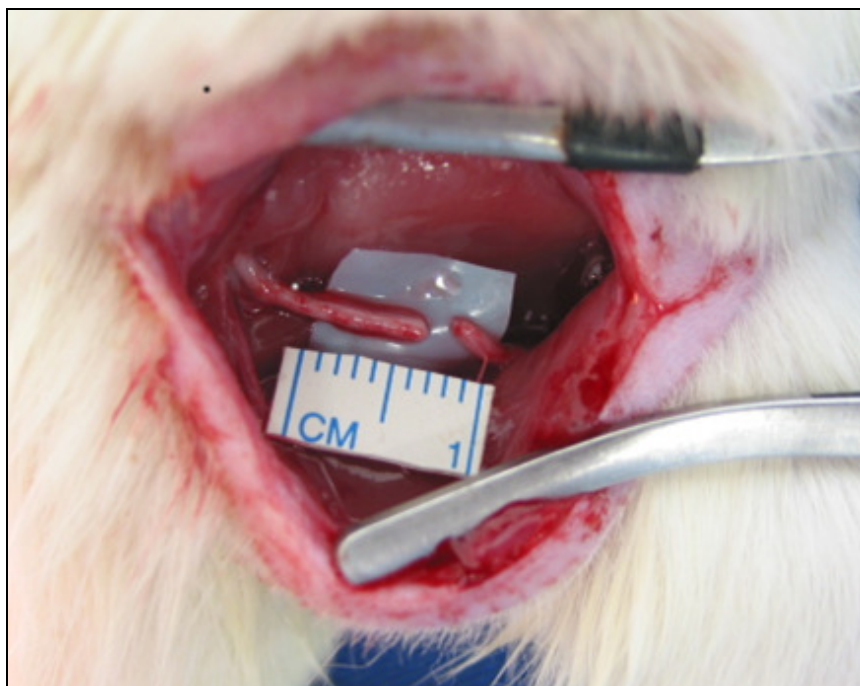


Figura 4: Fotografia cirúrgica mostrando a secção do nervo ciático direito do rato.

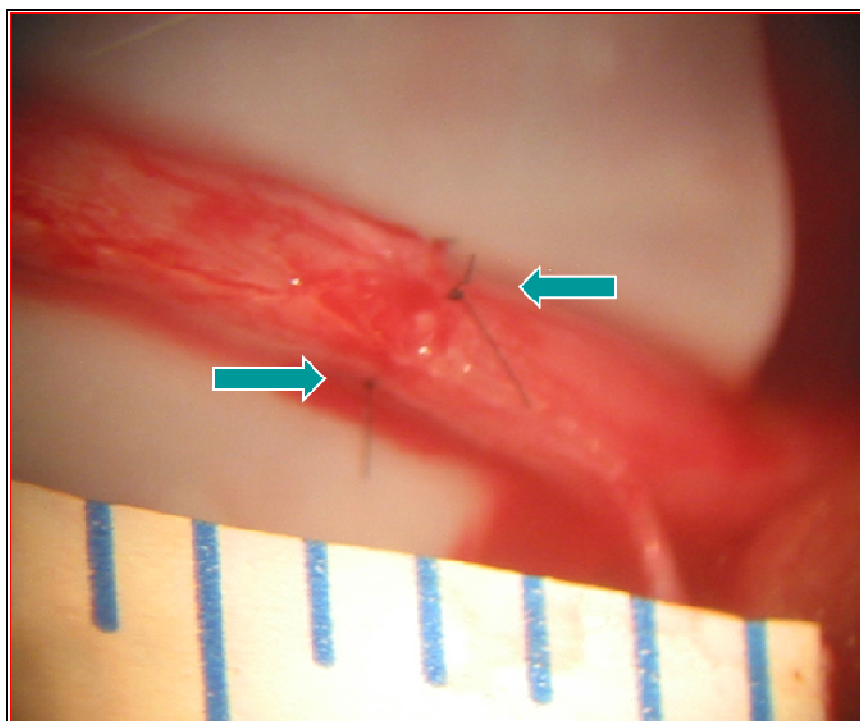


Figura 5: Fotomicrografia cirúrgica evidenciando sutura epineural terminoterminal com três pontos equidistantes de fio de náilon. Setas indicam dois dos três pontos de náilon.

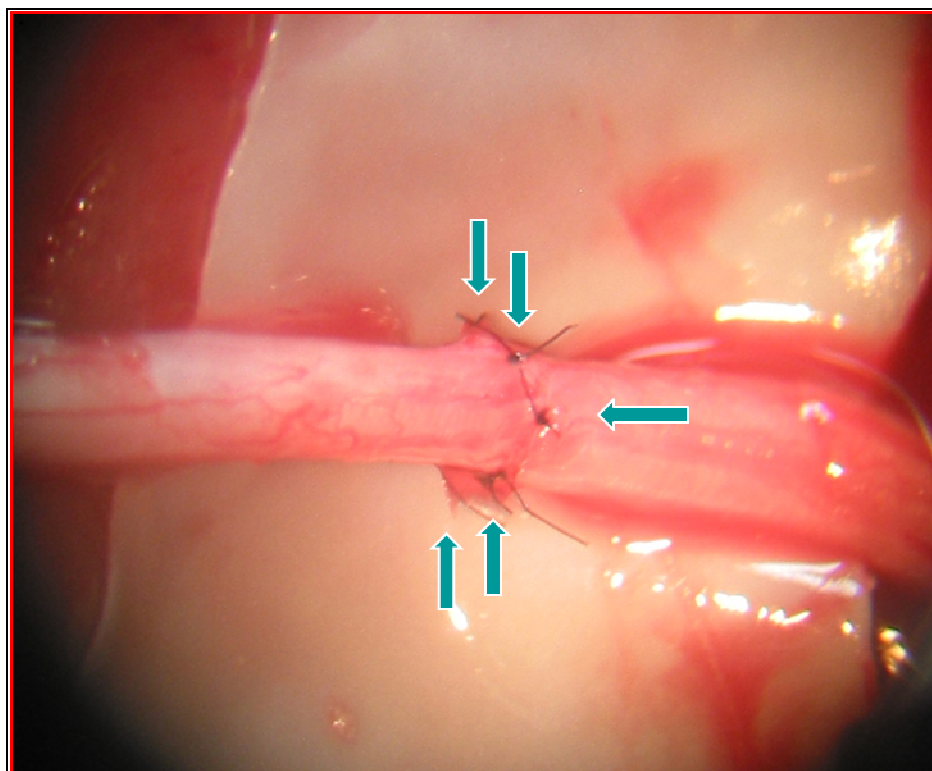


Figura 6: Fotomicrografia cirúrgica demonstrando sutura epineural terminoterminal com seis pontos equidistantes de fio de náilon. Setas indicam cinco dos seis pontos de náilon.

O terceiro grupo (Grupo C), também contendo dez animais, foi utilizado como controle e, neste caso, tais animais não foram submetidos a primeira cirurgia.

Após o reparo do nervo, os músculos foram aproximados com pontos separados de náilon monofilamentar 5.0 e a pele suturada com pontos separados de algodão 2.0.

As cirurgias, assim como o estudo eletrofisiológico intraoperatório, foram realizadas pelo mesmo pesquisador* em todos os animais para se evitar variabilidade interpessoal.

No período pós-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas separadas com água e ração “*ad libitum*” e receberam uma numeração cardinal de forma que o examinador não correlacionasse o tipo de reparo realizado com o animal no momento das avaliações que se seguiram. A

* Dr. Roberto Sergio Martins, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Neurologia.

correlação da numeração cardinal do animal com o grupo a que pertence e o tipo de reparo adotado é identificada no anexo B.

Decorridas oito semanas de observação, os animais dos grupos 3P e 6P foram submetidos a segunda cirurgia, seguindo-se o mesmo protocolo de anestesia e técnica cirúrgica na qual foram expostos os nervos ciáticos reparados anteriormente. Foi realizada nova avaliação eletrofisiológica e, em seguida, um segmento de cinco milímetros (mm) do nervo foi ressecado, tendo a linha de sutura como ponto médio do segmento ressecado. Cada nervo foi fixado *in vivo* com solução fixadora de Karnovsky constituída por 1% de paraformaldeído em associação com 2% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio em pH de 7,3 a 0,1 molar. Após três minutos, um segmento proximal e um distal de cinco mm foram ressecados, medidos a partir da extremidade dos cotos remanescentes (figura 7). Os segmentos proximal e distal foram enviados para análise histomorfométrica dos axônios regenerados e o segmento central foi destinado à dosagem e caracterização do colágeno.

Após a retirada dos segmentos do nervo ciático, os animais foram sacrificados através de injeção intraperitoneal de pentobarbital em altas doses.

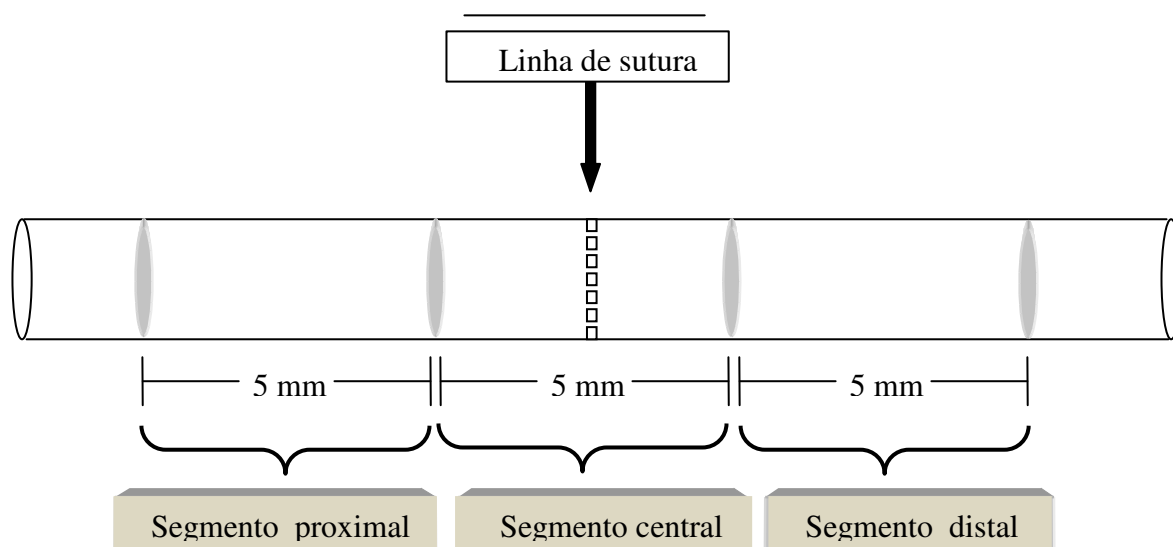


Figura 7: Desenho esquemático demonstrando os segmentos ressecados do nervo ciático do rato, de cinco milímetros cada, tendo a linha de sutura como ponto médio do segmento central.

4.2. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

As avaliações eletrofisiológicas foram realizadas durante a primeira cirurgia, após a exposição do nervo, e na segunda cirurgia, antes da retirada dos segmentos do nervo para análise histológica. No grupo controle a avaliação eletrofisiológica foi realizada durante o único procedimento cirúrgico.

A metodologia foi a mesma descrita por Martins et al¹³. Foram utilizados quatro eletrodos (figura 8), constituídos em aço inox 316L* confeccionados para esta finalidade, sendo dois eletrodos tipo terra, um eletrodo para estímulo do nervo e outro para registro do potencial de ação motor (PAM).

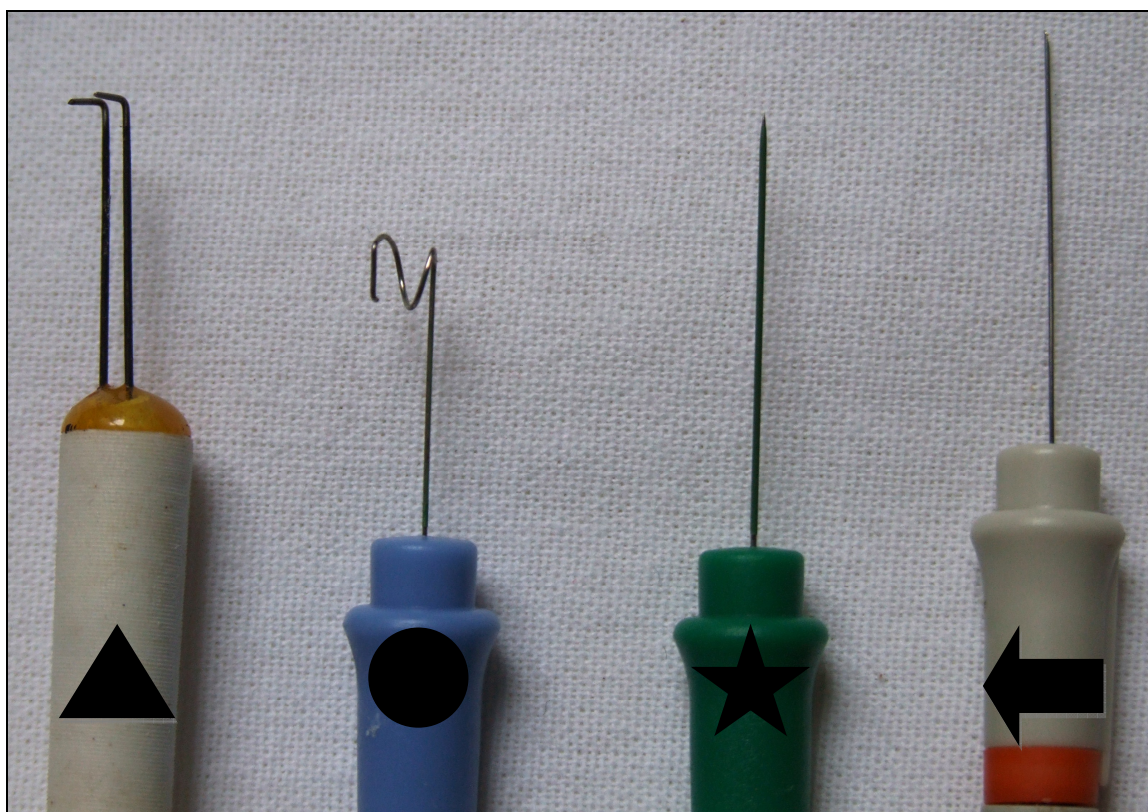


Figura 8: Fotografia mostrando os quatro eletrodos utilizados nos experimentos. ▲ Eletrodo de estímulo, ● Eletrodo terra do tipo helicoidal, ★ Eletrodo terra para inserção muscular, ← Eletrodo de registro.

* O valor de 316L refere-se a constituição da liga metálica do aço utilizado de acordo com as normas da American National Standards Institute

O eletrodo de estímulo foi do tipo bipolar confeccionado em aço inox 316L com 0,5 mm de diâmetro e espaçamento de um milímetro entre o ânodo e cátodo e que era posicionado na região proximal do nervo ciático direito do animal. O eletrodo de registro utilizado foi do tipo agulha coaxial com 0,3 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento com 30 Gauge (G) e área de registro de 0,019 mm², que era inserido no músculo gastrocnêmio de forma percutânea. Padronizou-se uma distância de três centímetros entre esses dois eletrodos. O eletrodo tipo terra foi posicionado por punção direta na musculatura adjacente ao nervo e consistia de uma agulha monopolar com diâmetro de 0,4 mm por 25 mm de comprimento com 26 Gauge (G). O outro eletrodo terra apresentava diâmetro de 0,4 mm e constituição helicoidal, o que permitia envolver o nervo com uma maior área de contato entre as duas estruturas (figura 9).

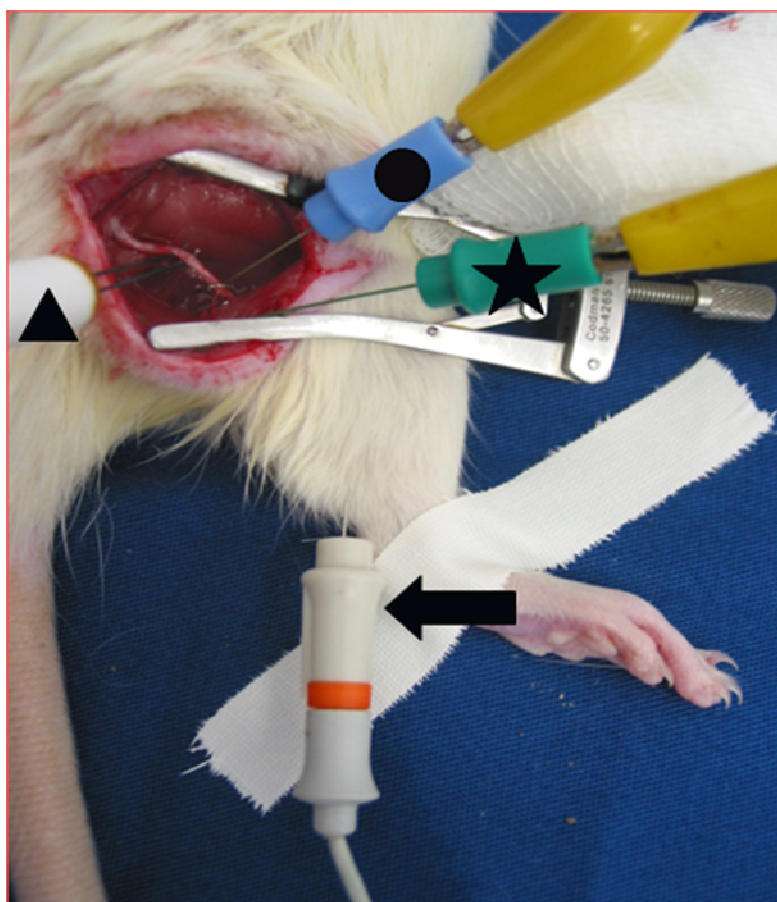


Figura 9: Fotografia cirúrgica demonstrando o posicionamento dos eletrodos utilizados no protocolo eletrofisiológico. ▲ Eletrodo de estímulo, ← Eletrodo de registro, ★ Eletrodo terra inserido no músculo, ● Eletrodo terra envolvendo o nervo.

Os registros foram obtidos através de um aparelho de eletroneuromiografia de dois canais (Keypoint Lite, Medtronic, modelo DMN 25, Dinamarca) com filtros de alta e baixa frequência regulados para cinco Kiloherz e dois Hertz, respectivamente, e pulso elétrico retangular monofásico e largura de 0,04 ms. A velocidade de varredura horizontal foi regulada à razão de 0,5 ms por divisão e o ganho vertical a cinco mV por divisão.

A mensuração do PAM foi realizada através de estímulos supra máximos de curta duração, com um ms, suficientes para gerar um potencial de ação motor. A corrente elétrica foi aumentada gradativamente, de 0,1 em 0,1mA, até que a amplitude dos dois últimos estímulos fosse a mesma, determinando-se a corrente supramáxima. A partir do registro deste PAM foram medidas a sua amplitude (AMP) e latência (LAT). Dividindo-se a latência pela distância entre os eletrodos, determinou-se a velocidade de condução do potencial (VCM), expressa em metros por segundo (m/s).

4.3. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

Um único pesquisador* realizou todos os estudos do protocolo de avaliação histomorfométrica de forma cega, não tendo conhecimento a que grupo do experimento pertencia a lâmina do animal em avaliação.

Os segmentos proximal e distal à região central da sutura foram utilizados para avaliação histomorfométrica. Após a retirada dos mesmos durante a segunda cirurgia, logo depois de realizada a eletromiografia e a fixação *in vivo*, estes foram condicionados em frascos com solução de Karnovsky† e seguiram ao Laboratório de Neurobiologia no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo onde foram fixados em solução de

* Hougelle Simplício, Universidade de São Paulo, Curso de Doutorado, Programa de Neurologia.

† Solução de Karnovsky: Paraformaldeído 1% + Glutaraldeído 2% associado a tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH de 7,3.

tetróxido de ósmio a 2%, desidratado em soluções crescentes de álcool etílico, clareado em óxido de propileno, infiltrado e incluído em resina epóxi, o que possibilitou a obtenção de cortes transversais de um micrômetro. Estes foram corados com azul de toluidina a 1%, que tem a propriedade de corar fortemente a mielina, permitindo a análise por microscopia de luz.

Foi utilizado um sistema computadorizado semi-automático de análise de imagens, Sigma Scan Pro 5.0 SPSS Inc Chicago EUA, acoplado a um sistema composto por um microscópio de luz adaptado a uma câmera digital. A imagem de cada corte foi digitalizada e analisada através de um programa de computador específico (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, Inc, EUA).

A avaliação histomorfométrica consistiu na mensuração de dois parâmetros; a contagem dos axônios e a mensuração de seu diâmetro. Para a contagem dos axônios, cada corte histológico foi fotografado no aumento de objetiva de 40 vezes e selecionados cinco campos de forma aleatória. O programa de análise de imagens permite que se marque, com o cursor, o axônio somente uma vez (figura 10) e fornece o número total de axônios marcados ao final da contagem. Com a contagem de axônios nos segmentos proximal e distal ao reparo foi calculado o índice de regeneração (IR) dividindo-se o número de axônios no segmento distal à linha de sutura pelo número de axônios no segmento proximal. O IR estabelece a porcentagem de axônios que conseguiram ultrapassar a linha de sutura; neste estudo o valor do IR está expresso em números absolutos.

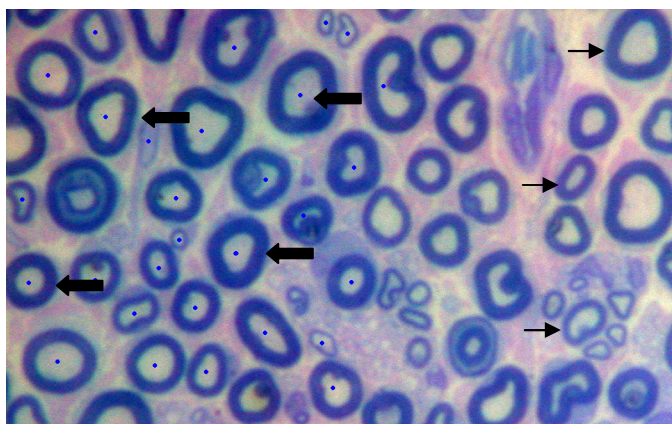


Figura 10: Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal do nervo ciático do rato (animal 3), com auxílio de câmera digital acoplada a microscópio óptico, demonstrando os axônios já contados marcados com círculo azul central (setas largas) e axônios ainda não marcados (setas estreitas). Coloração azul de toluidina 1%.

Para o cálculo do diâmetro, cinco campos de cada lâmina foram selecionados de modo randômico e ampliados 100 vezes sob imersão e mais quatro vezes digitalmente, perfazendo um aumento total de 400 vezes. Com o mesmo programa descrito, foram demarcados os perímetros das fibras nervosas, calculando-se o diâmetro dividindo-se o perímetro pelo valor de π (Pi)* (Figura 11). Da mesma forma que a descrita para a contagem dos axônios, o sistema computadorizado impede que uma fibra nervosa seja analisada mais de uma vez e fornece uma planilha com os valores dos perímetros dos axônios avaliados. Com os valores da média dos diâmetros dos axônios nos segmentos proximal (D1) e distal (D2) de cada nervo foi calculada a porcentagem do D2 em relação ao D1, denominado de índice de alteração do diâmetro (IAD). Esse índice permitiu avaliar a alteração do diâmetro axonal após o axônio ultrapassar a linha de sutura.

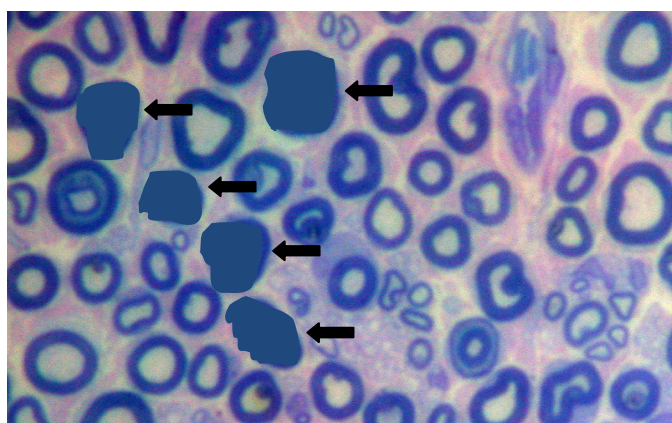


Figura 11: Fotomicrografia obtida de corte histológico de segmento distal do nervo ciático do rato (animal 3) com auxílio de câmera digital acoplada a microscópio óptico demonstrando os axônios cujo perímetro foi demarcado manualmente (setas largas). Coloração azul de toluidina 1%.

* $\pi = 3,14159\ 26535\ 89793\ 23846\ 26433\ 83279\ 50288\ 41971\ 69399\ 3751$

4.4. PROTOCOLO DE QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO

Assim como na avaliação histomorfométrica, os estudos deste protocolo foram realizados de forma cega, impossibilitando o conhecimento a que grupo do experimento pertencia à lâmina do animal em avaliação.*

O segmento central de cinco mm do nervo ciático do rato, que incluía a linha de sutura, foi utilizado para análise da produção e caracterização do colágeno produzido. Foram analisados quantitativamente e qualitativamente de forma separada o epineuro e o endoneuro. O preparo das amostras e o estudo do colágeno foram realizados no Laboratório de matrix extra-celular, LIM 17, da FMUSP.

Cortes transversais do nervo ciático foram preparados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxy Silano (Sigma Chemical Co; St. Louis, Missouri, EUA), imersos em xilol quente por 20 minutos e, a seguir, submetidos a três banhos de xilol frio e hidratados com sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100% - 75%), água destilada e tampão fosfato (PBS). Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, o material foi digerido com pepsina de porco (10000U/ ml) (Sigma Chemical Co; St. Louis, Missouri, EUA) por 30 minutos a 37°C, dissolvida em ácido acético a 0,5M. Os cortes tratados foram lavados por três vezes com PBS e a reação bloqueada com leite mólico a 5% em PBS durante 30 minutos. As lâminas foram incubadas por uma noite com anticólageno do tipo I (1:60) e tipo III (1:50) humanos policlonais monoespecíficos obtidos de coelho. Após este período, os cortes foram lavados em PBS com Tween 20 0.05% e incubados por 1 hora e meia com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Sigma Chemical Co; St. Louis, Missouri, USA) diluído 1:50 em solução de PBS contendo azul de Evans 5% em PBS e montados com solução de glicerina

* Hougelle Simplício, Universidade de São Paulo, Curso de Doutorado, Programa de Neurologia.

A avaliação imunohistoquímica foi realizada com auxílio da Bióloga Cristiane Carla de Oliveira, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Clínica Médica, Laboratório de Matrix Extra-celular.

tamponada. A reação foi finalmente analisada em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema computadorizado (Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, Inc, EUA) que permite a digitalização da imagem (câmera digital Nikon) e posterior análise.

Foram avaliados separadamente, mas em cada amostra de um mesmo animal, o epineuro e o endoneuro (Figura 12). Os valores obtidos da quantificação do colágeno estão expressos como valor relativo em relação à área total do epineuro ou do endoneuro. As figuras 13 e 14 demonstram as imagens digitalizadas e avaliadas separadamente para quantificação do colágeno no epineuro e endoneuro respectivamente.

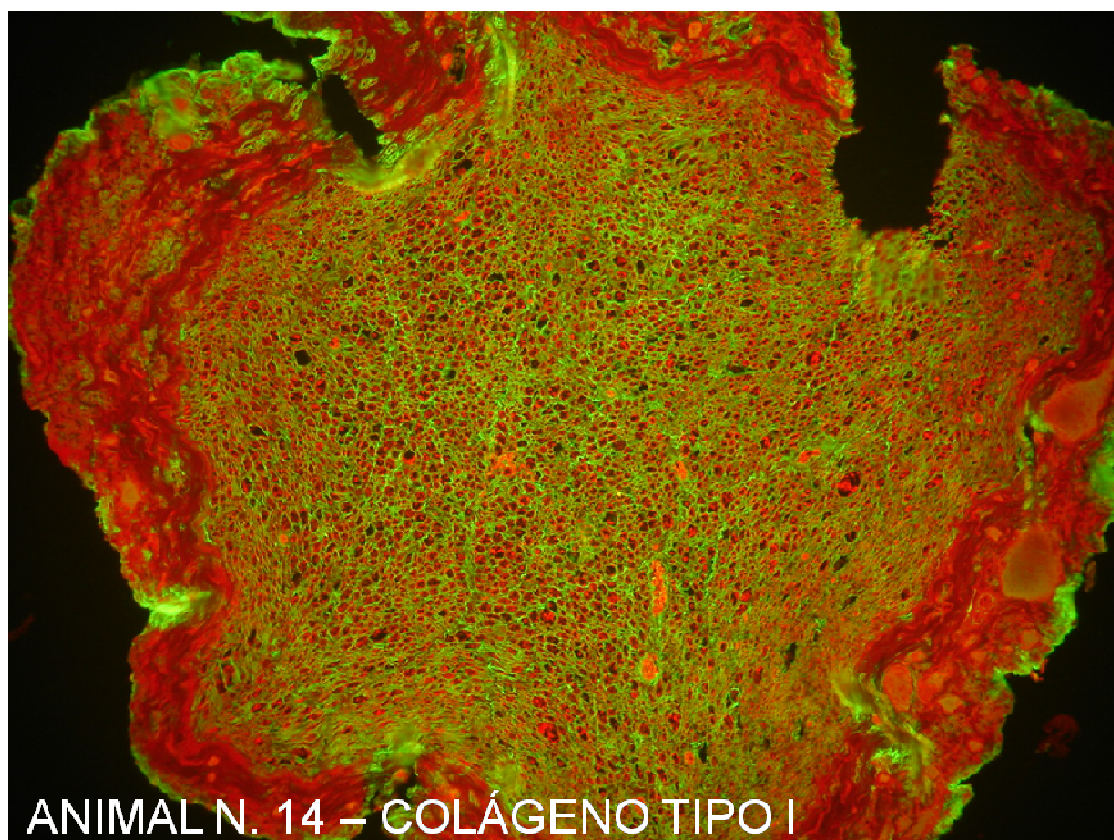


Figura 12: Fotografia microscópica (aumento 20x) digitalizada de nervo ciático de rato marcado com anticorpo de coelho para colágeno tipo I. O colágeno é marcado na cor verde.

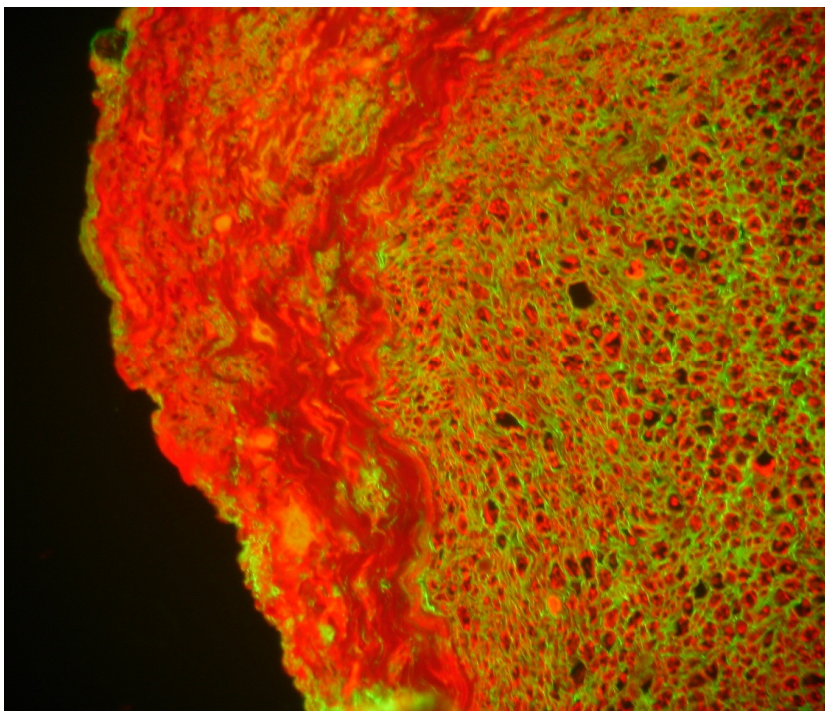


Figura 13: Fotografia microscópica (aumento 40x) digitalizada de nervo ciático de rato marcado com anticorpo de coelho para colágeno tipo I para estudo do epineuro. O colágeno é marcado na cor verde.

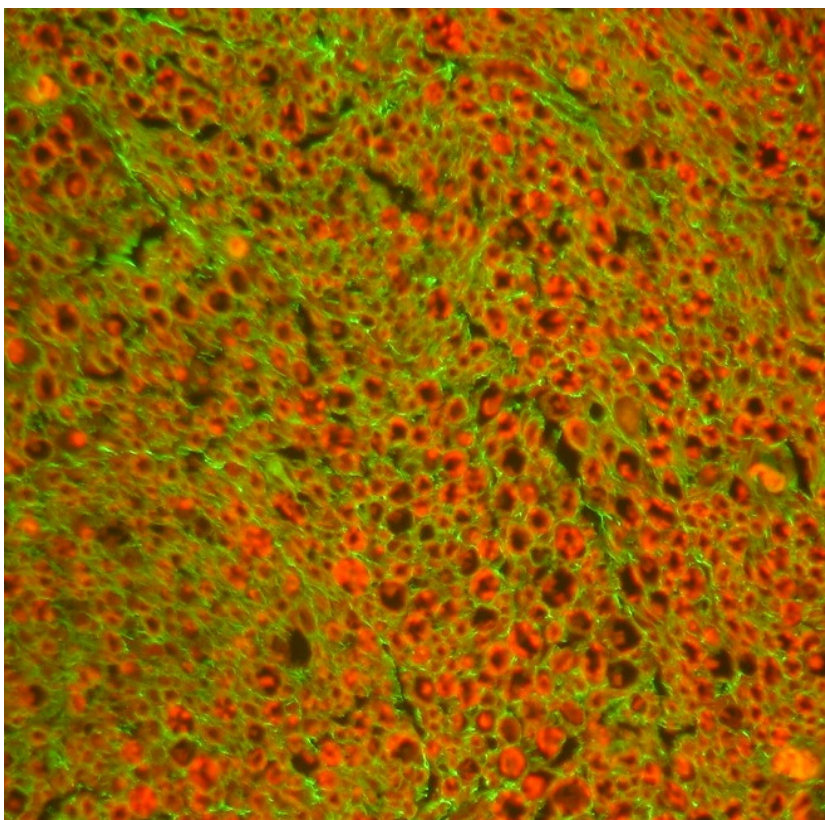


Figura 14: Fotografia microscópica (aumento 40x) digitalizada de nervo ciático de rato marcado com anticorpo de coelho para colágeno tipo I para estudo do endoneuro. O colágeno é marcado na cor verde.

A quantificação do colágeno por imunohistoquímica e o estudo histomorfométrico não foram realizados na mesma região do nervo porque a técnica de fixação necessária ao estudo de um inviabiliza o estudo do outro.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Para a análise estatística os resultados das avaliações dos três grupos do experimento foram expressos como média \pm desvio padrão. Os valores foram avaliados quanto à distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

A comparação entre os diferentes grupos foi realizada através de análise de variância, utilizando o teste de ANOVA ou teste “t” Student. Quando uma diferença significativa entre os grupos foi identificada, o teste de Tukey foi utilizado para comparar e definir os grupos envolvidos. O teste “t” Student foi aplicado para se verificar as diferenças das médias obtidas entre duas variáveis de um mesmo grupo quando necessário. O nível de significância estabelecido foi de 5% com 95% de intervalo de confiança*.

* Hougelle Simplício, Universidade de São Paulo, Curso de Doutorado, Programa de Neurologia.
A análise estatística foi realizada com auxílio da Profª. Dra. Maria Ângela Fernandes Ferreira, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA CIRURGIA

Não houve perda de animais devido à anestesia ou no período pós-operatório e não houve infecção no sítio cirúrgico.

Os cotos proximais e distais dos nervos foram adequadamente alinhados nos três grupos a que pertenciam os animais e, na segunda cirurgia, verificou-se que as neurorrafias estavam intactas e sem formação de neuroma.

5.2 AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

No grupo controle, submetidos a uma única avaliação eletrofisiológica, a velocidade de condução (VC) variou de 0,95 ms a 2,45 ms, com média de 1,51ms e DP \pm 0,49.

Na primeira cirurgia e antes da secção do nervo, os animais do grupo 3P apresentaram velocidade de condução com valores mínimos de 1,42 ms e máximos de 2 ms, média de 1,60 ms com DP \pm 0,19. No grupo 6P, a VC variou de 1 ms a 2,35 ms, média de 1,59 ms com DP \pm 0,4.

Nenhum animal apresentou um valor da velocidade de condução do potencial de ação motor após oito semanas do reparo na segunda cirurgia (VC2) maior que a velocidade de condução antes da secção do nervo na primeira cirurgia (VC1).

Não houve diferença significativa entre os valores de VC do grupo controle e as VC1 dos grupos 3P e 6P.

Na avaliação eletrofisiológica durante a segunda cirurgia a velocidade de condução do nervo variou de 0,89 ms a 1,55 ms no grupo 3P e variou de

0,73 ms a 1,41 ms no grupo 6P. As médias foram, respectivamente, 1,27 ms \pm 0,16 e 1,07 ms \pm 0,23.

No grupo 3P a velocidade de condução do potencial do nervo apresentou diminuição absoluta, em média, de 0,33 ms (VC2-VC1) e representou 0,80 \pm 0,15 do seu valor inicial (VC2/VC1). No grupo 6P a velocidade de condução do potencial do nervo apresentou uma diminuição absoluta, em média, de 0,52 ms (VC2-VC1) e representou 0,70 \pm 0,16 do seu valor inicial (VC2/VC1).

A análise estatística comparativa das velocidades de condução do nervo na segunda cirurgia demonstra uma diferença significativa entre o grupo controle e o submetido a sutura com seis pontos e não houve diferença entre o grupo controle e o Grupo 3P (Gráfico 1).

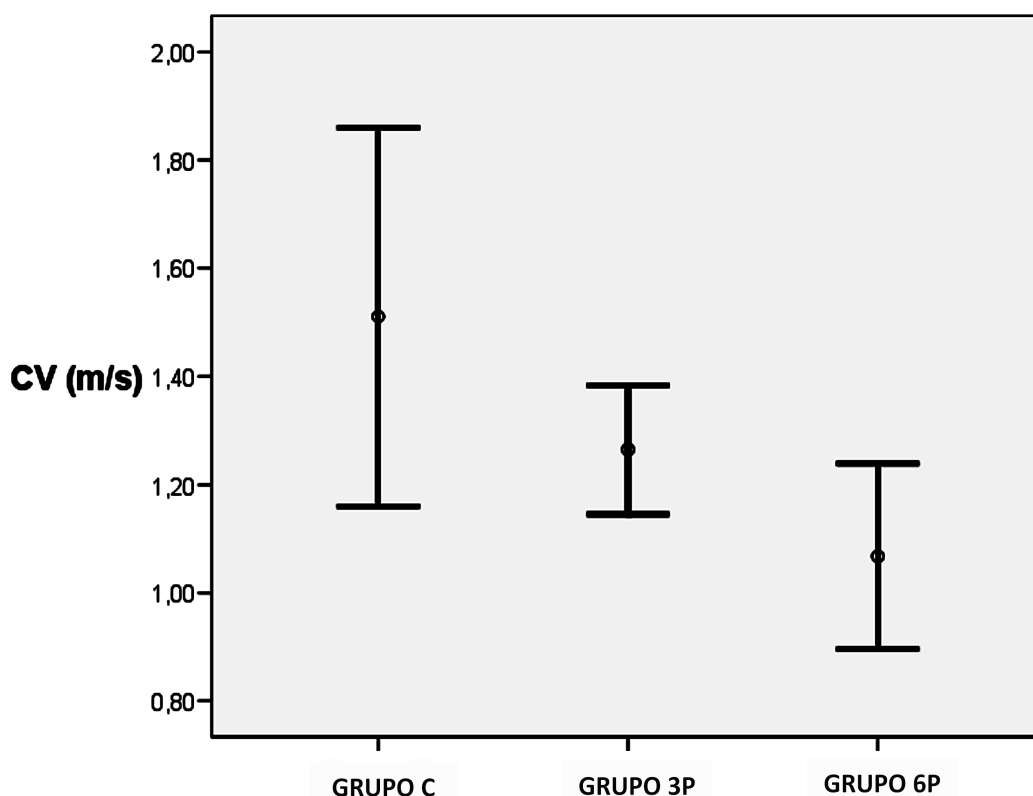


Gráfico 1: Valores médios da velocidade de condução do potencial de ação motor na segunda avaliação eletrofisiológica segundo o grupo de reparo.

Comparando-se os valores de VC1 e VC2 dos grupos 3P e 6P, constata-se que houve um decréscimo significativo da velocidade de condução nestes grupos em comparação com o grupo controle (gráfico 2).

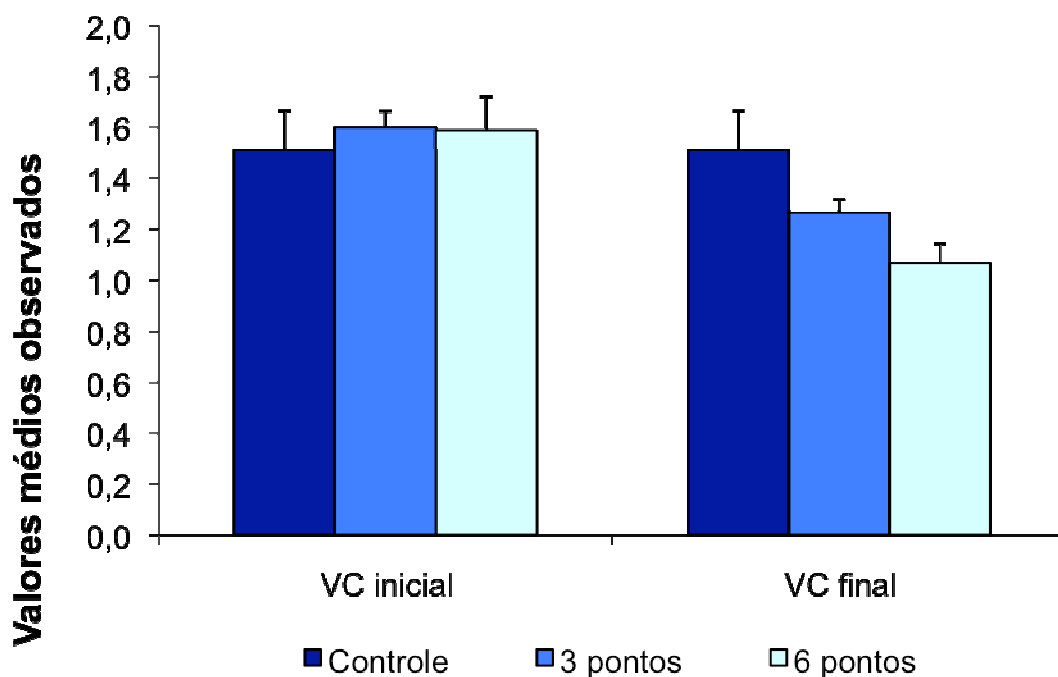


Gráfico 2: Valores médios da velocidade de condução do potencial de ação motor nas duas avaliações eletrofisiológicas segundo o grupo de reparo.

A tabela 2 resume os valores médios obtidos nas avaliações eletrofisiológicas em cada grupo e a relação entre a média das velocidades final e inicial dentro de cada grupo.

Tabela 2: Valores médios das avaliações eletrofisiológicas por grupo de reparo.

	Grupo C	Grupo 3P	Grupo 6P
VC1 ± DP	-	1,60±0,19	1,59±0,40
VC2 ± DP	1,51±0,46	1,27±0,16	1,07±0,23
VC2-VC1	-	0,33	0,52
VC2/VC1	-	0,80±0,15	0,70±0,17

Legenda: VC1: velocidade de condução do potencial de ação motor antes da secção do nervo na primeira cirurgia; VC2: velocidade de condução do

potencial de ação motor após oito semanas do reparo na segunda cirurgia; VC2-VC1: valor absoluto da diminuição da velocidade de condução após o reparo do nervo; VC2/VC1: relação da velocidade de condução após e antes do reparo do nervo; DP: desvio padrão.

O anexo E demonstra os valores de VC1, VC2 e a relação entre estes valores para cada animal de acordo com o grupo ao qual pertencem.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

5.3.1 Índice de Regeneração

Foram contados 803025 axônios, sendo 374602 axônios no segmento proximal e 428423 no segmento distal em relação à linha de sutura, nos três grupos. No segmento proximal do grupo 3P (3 pontos) o número de axônios variou de 1485 a 3492, com média de 2565,7 e desvio padrão (DP) de $\pm 711,52$. O grupo 6P (6 pontos) apresentou uma variação de axônios no segmento proximal de 1744 a 4006, média de 2478,2 e DP $\pm 758,08$. O grupo C (controle) variou de 1434 a 2978 axônios proximais, com média de 2448,2 e DP $\pm 473,77$.

No segmento distal do grupo 3P o número de axônios variou de 2297 a 4229, com média de 3287,6 e desvio padrão (DP) de $\pm 821,79$. O grupo 6P apresentou variação de axônios no segmento distal de 1857 a 4297, com média de 2813,1 e DP $\pm 717,94$. O grupo C variou de 2090 a 3042 axônios distais, com média de 2467,9 e DP $\pm 349,61$.

O índice de regeneração (IR) no grupo 3P variou entre os animais de 0,77 a 1,66, média de $1,32 \pm 0,25$; no grupo 6P variou de 0,67 a 1,65, média de 1,18 e DP $\pm 0,26$; no grupo C variou de 0,83 a 1,46, média de $1,03 \pm 0,17$.

A tabela 3 mostra os valores médios de contagem de axônios e IR por grupo de reparo.

Tabela 3: Valores médios da contagem de axônios e cálculo do índice de regeneração por grupo de reparo.

	Grupo C	Grupo 3P	Grupo 6P
Ax 1±DP	2448,2±473,77	2565,7±711,52	2478,2±758,08
Ax 2±DP	2467,9±349,61	3287,6±821,79	2813,10±717,94
IR±DP	1,03±0,17	1,32±0,25	1,18±0,26

Legenda: DP: desvio padrão; N Ax1: número de axônios no segmento proximal do nervo; N Ax2: número de axônios no segmento distal do nervo; IR: índice de regeneração do nervo (N Ax1/N Ax2).

A análise do IR não mostrou diferença significativa entre os grupos controle e 6P ($p=0,174$), no entanto, uma diferença foi identificada entre os grupos controle e 3P ($p= 0,001$).

Os valores referentes ao número de axônios proximais e distais em relação à linha de sutura e o índice de regeneração de cada animal estão no anexo F.

5.3.2 Diâmetro

Foi medido o perímetro de um total de 24130 axônios mielinizados. No segmento proximal do grupo 3P, a média dos diâmetros foi de 7,208 μm e DP $\pm 1,301$, com variações entre as médias dos animais de 5,192 a 9,443 μm . No grupo 6P, a média dos diâmetros foi de 7,775 μm e DP $\pm 1,226$, com variações entre as médias dos animais de 5,994 a 9,802 μm . No grupo C, a média dos diâmetros foi de 7,414 μm e DP $\pm 0,801$, com variações entre as médias dos animais de 6,445 a 9,298 μm .

Nos segmentos distais as médias \pm desvio padrão dos grupos C, 3P e 6P foram 7,196 $\pm 0,496$ com variação de 6,208 a 7,785; 4,630 $\pm 0,958$ e variação de 3,631 a 6,510; 7,775 $\pm 0,864$ e variação de 5,994 a 9,802, respectivamente (gráfico 3).

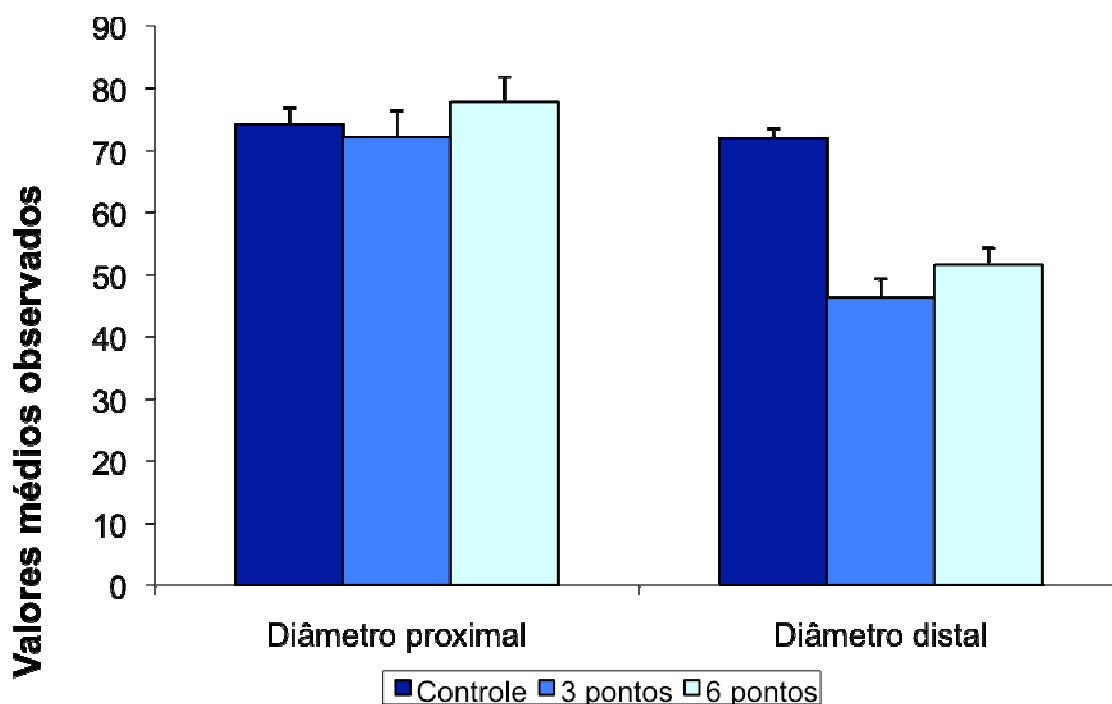


Gráfico 3: Valores médios dos diâmetros nas duas avaliações histomorfométricas segundo o grupo de reparo.

O índice de alteração do diâmetro (IAD) foi calculado segundo a razão das médias dos diâmetros do segmento distal sobre o proximal nos três grupos. No grupo C o valor desse parâmetro foi $0,98 \pm 0,09$ com valores mínimos de 0,80 e máximo de 1,12. No grupo 3P, o IAD foi $0,64 \pm 0,05$ e variação mínima e máxima de 0,54 a 0,70. No grupo 6P, o IAD foi $0,67 \pm 0,06$ e variação de 0,57 a 0,77.

A tabela 4 demonstra os resultados das médias de diâmetro das fibras nervosas por grupo e os índices de alteração do diâmetro por grupo de reparo.

Tabela 4: Valores médios dos diâmetros das fibras nervosas e IAD por grupo de reparo.

	Grupo C	Grupo 3P	Grupo 6P
D 1(μm) \pm DP	7,414 \pm 0,801	7,208 \pm 1,301	7,775 \pm 1,226
D 2(μm) \pm DP	7,196 \pm 0,496	4,630 \pm 0,909	5,159 \pm 0,820
IAD \pm DP	0,98 \pm 0,09	0,64 \pm 0,05	0,67 \pm 0,06

Legenda: DP: desvio padrão; D1: diâmetro dos axônios no segmento proximal do nervo (Perímetro/ π); D2: diâmetro dos axônios no segmento distal do nervo (Perímetro/ π); IAD: índice de alteração do diâmetro (D1/D2); μm : micrometro.

O IAD foi significativamente mais baixo nos grupos 3P e 6P comparativamente com o grupo controle ($p < 0,001$), mas não houve diferença significativa entre estes grupos ($p = 0,329$).

Os valores referentes aos perímetros aferidos e diâmetros calculados de cada animal estão no anexo G.

A figura 15 exemplifica as imagens obtidas das fibras mielinizadas nos segmentos proximal e distal de acordo com o grupo de reparo.

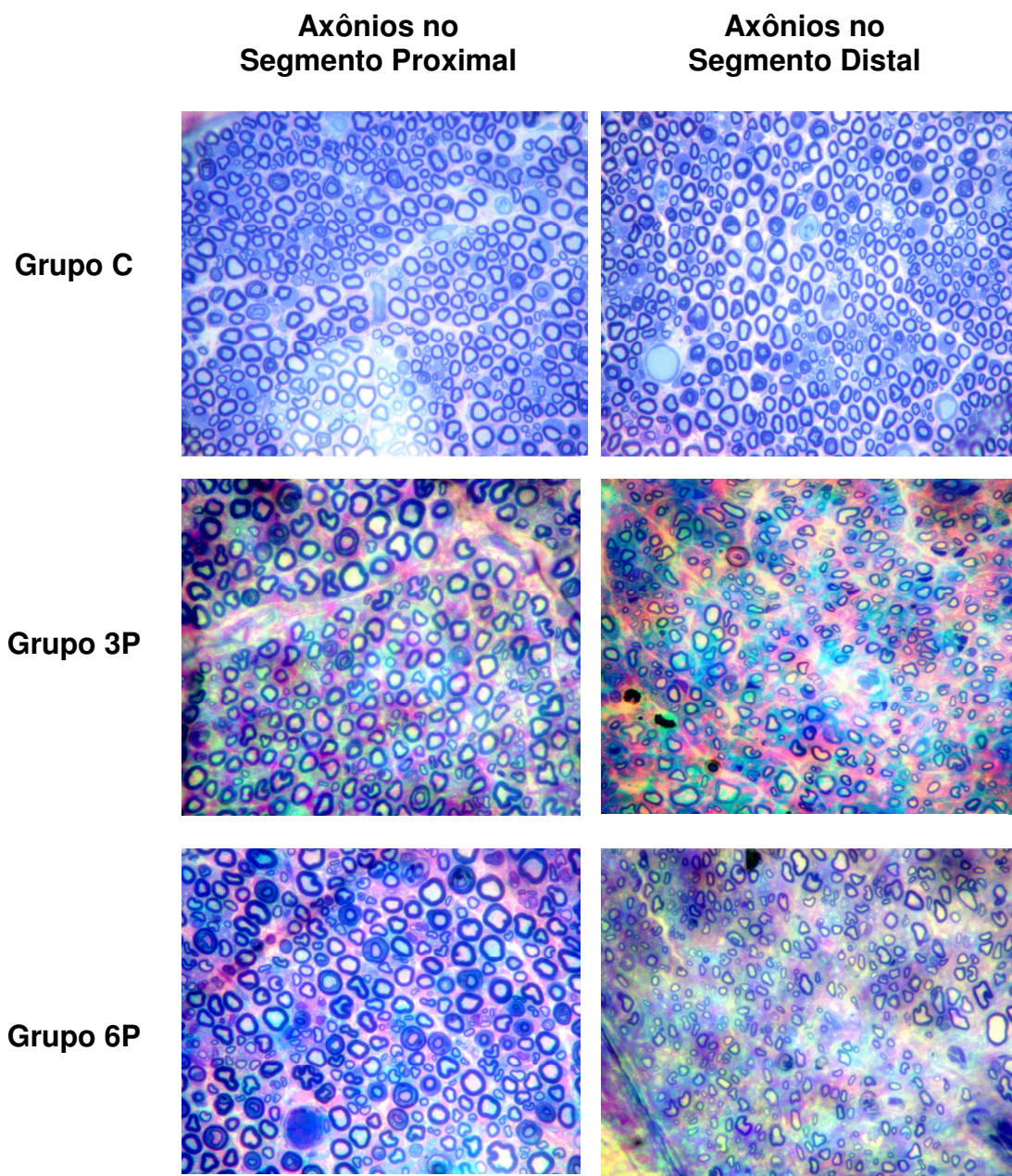


Figura 15: Exemplos de imagens de microscopia (aumento 40x) dos segmentos proximal e distal do nervo ciático do rato de acordo com o grupo de reparo.

5.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

5.4.1 Colágeno tipo I

No epineuro, a média de quantificação do colágeno tipo I no grupo C foi $8,25/\mu^2 \pm 2,47$. Nos grupos 3P e 6P foram $11,58/\mu^2 \pm 5,83$ e $21,14/\mu^2 \pm 8,82$, respectivamente.

No endoneuro, o grupo C teve uma média $7,57/\mu^2 \pm 2,24$; o grupo 3P média $9,87/\mu^2 \pm 3,85$ e o grupo 6P média $7,87/\mu^2 \pm 2,80$.

A quantidade de colágeno tipo I no epineuro aumentou significativamente no grupo 6P ($p < 0,001$) em comparação com o grupo controle (gráfico 4). Entre os grupos 3P e 6P houve uma diferença significativa ($p = 0,014$). Não houve diferença significativa na quantificação do colágeno endoneural entre os grupos.

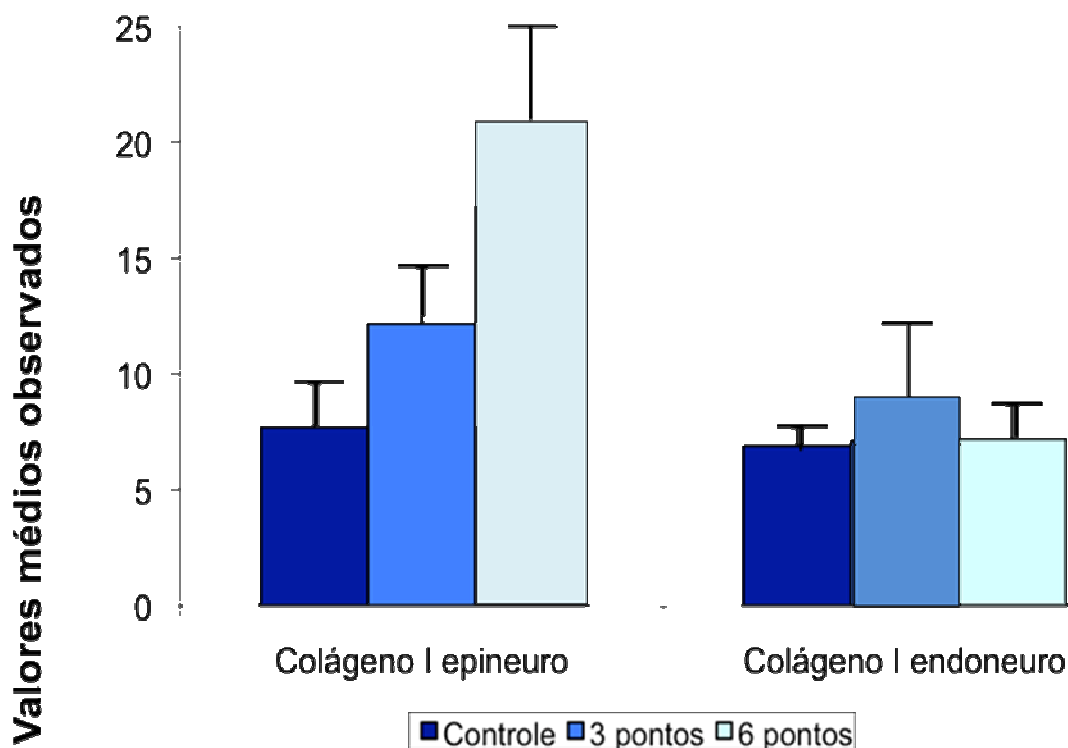


Gráfico 4: Valores médios quantificados para o colágeno tipo I no epineuro e endoneuro segundo o grupo de reparo. Nota-se uma elevação progressiva na quantidade de colágeno I no epineuro com o aumento do número de pontos.

Foi estabelecida a relação da quantidade de colágeno tipo I no epineuro em relação ao endoneuro nos diferentes grupos. Esta relação foi de 3,1 vezes no grupo 6P ($p < 0,001$), 2,4 vezes no grupo 3P e 1,2 vezes no grupo C. A figura 16 demonstra a marcação do colágeno I no epineuro e endoneuro de acordo com o grupo de reparo.

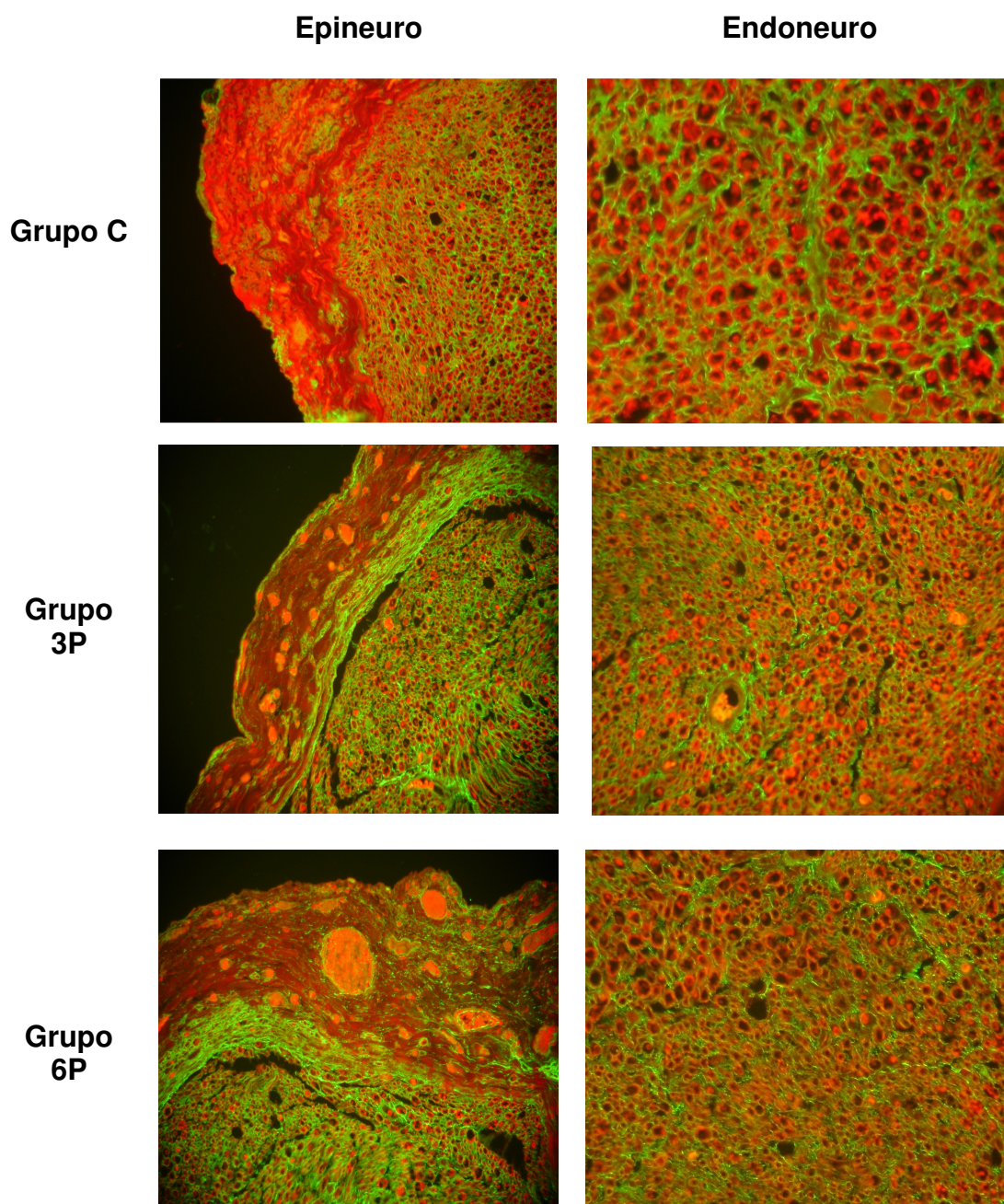


Figura 16: Exemplos de imagens de microscopia da imunomarcção do colágeno tipo I no epineuro e endoneuro de acordo com o grupo de reparo. O colágeno é marcado na cor verde.

No anexo H estão expressos os valores de quantificação do colágeno tipo I por imunohistoquímica no epineuro e endoneuro de acordo com o grupo de reparo.

5.4.2 Colágeno tipo III

No epineuro, a média da quantidade do colágeno tipo III no grupo C foi $6,25/\mu^2 \pm 2,70$. Nos grupos 3P e 6P essa quantificação foi de $8,48/\mu^2 \pm 5,23$ e $16,38/\mu^2 \pm 8,04$, respectivamente.

No endoneuro, a média da quantidade do colágeno tipo III no grupo C foi de $5,76/\mu^2 \pm 2,31$; no grupo 3P e 6P a média foi de $10,13/\mu^2 \pm 4,60$ e $8,88/\mu^2 \pm 6,09$, respectivamente.

Foi identificada uma diferença estatisticamente significativa em relação à quantidade de colágeno tipo III no epineuro quando comparados o grupo 6P e o grupo controle ($p=0,002$). Entre os grupos 3P e 6P houve uma diferença significativa ($p=0,002$), mas não houve diferença significativa entre os grupos controle e 3P ($p=0,271$) (gráfico 5).

Não houve diferença significativa na quantificação do colágeno endoneural entre os grupos.

Calculando-se a relação da quantidade de colágeno tipo III epineural versus endoneural nos diferentes grupos, esta relação foi 3,7 vezes no grupo 6P ($p<0,001$), 1,5 vezes no grupo 3P e 1,2 vezes no grupo C.

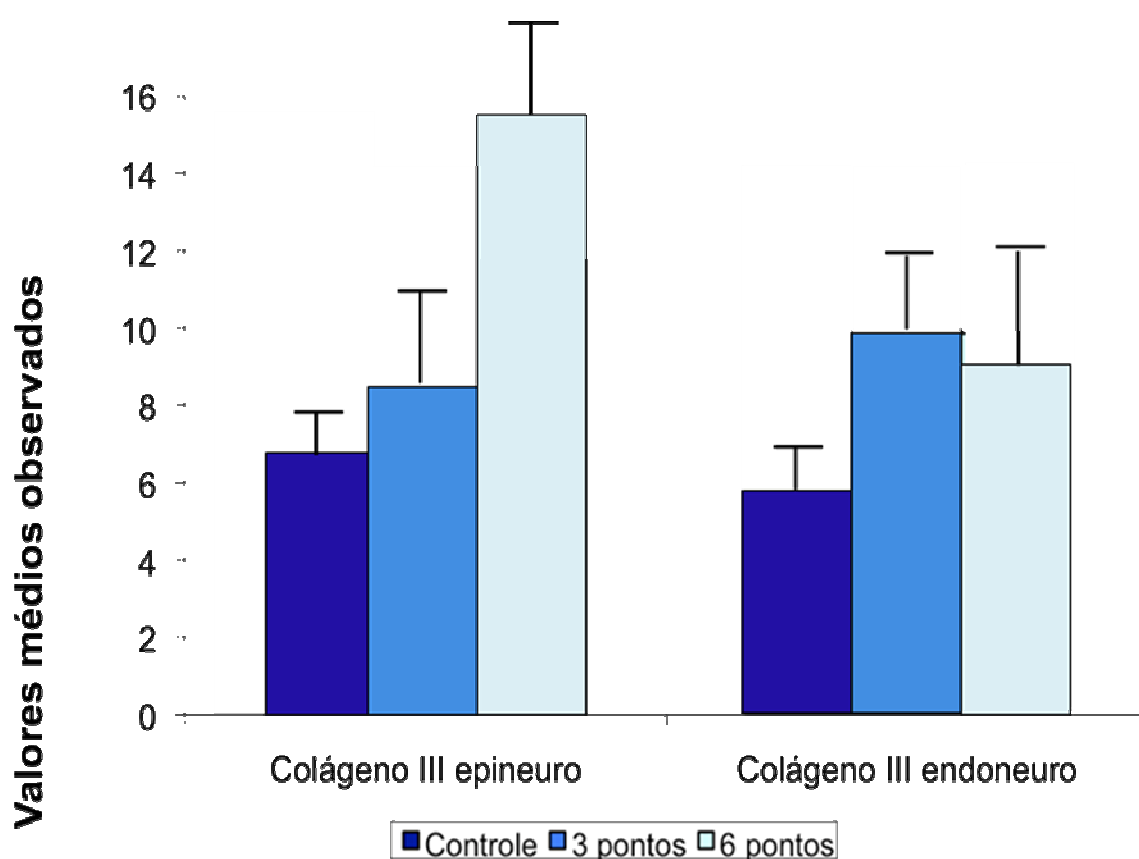


Gráfico 5: Valores médios quantificados para o colágeno tipo III no epineuro e endoneuro segundo o grupo de reparo.

A tabela 5 demonstra os resultados das médias de quantificação do colágeno tipo I e III por grupo de reparo.

Tabela 5: Valores médios de quantificação do colágeno tipo I e III por grupo de reparo.

		Grupo C	Grupo 3P	Grupo 6P
Colágeno tipo I	Epineuro (μ^2)	8,25±2,60	11,58±6,15	21,14±9,30
	Endoneuro (μ^2)	7,57±2,36	9,87±4,06	7,87±2,95
Colágeno tipo III	Epineuro (μ^2)	6,25±2,85	8,48±5,51	16,38±8,47
	Endoneuro (μ^2)	5,76±2,43	10,13±4,85	8,88±6,42

Legenda: μ : micrômetro ao quadrado.²

No anexo H estão expressos os valores de quantificação do colágeno tipo III por imunohistoquímica no epineuro e endoneuro de acordo com o grupo de reparo.

No Anexo I estão demonstrados a média e desvio padrão de cada parâmetro avaliado dispostos por cada grupo do estudo.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Analisando-se os valores obtidos da avaliação eletrofisiológica inicial, não houve diferença na velocidade de condução entre os animais que tiveram os nervos suturados e os do grupo controle; comprovando não haver diferença eletrofisiológica nos nervos ciáticos entre os grupos previamente a experimentação. A determinação do valor basal da velocidade de condução do nervo para cada animal foi utilizado também por He et al. (1992)⁹⁷.

Os valores de velocidade de condução do potencial de ação motor após oito semanas do reparo na segunda cirurgia (VC2) foram menores que os valores da velocidade de condução antes da secção do nervo na primeira cirurgia (VC1) e estão de acordo com o estudo de Maragh et al. (1990)⁹⁸, que utilizaram o mesmo período de observação de dois meses, e Cham et al. (1984)⁹⁹ que realizaram medidas seriadas da velocidade de condução após secção e reparo do nervo ciático do rato e identificaram uma alteração do valor basal de cerca de 38% após seis semanas do reparo.

Houve piora da velocidade de condução nos grupos experimentais, sendo esta piora acentuada nos animais cujos nervos foram submetidos à neurorrafia com seis pontos. Szal e Miller (1975)¹⁰⁰, utilizando como modelo o nervo facial de coelhos, publicaram o único estudo onde foram comparados animais com nervos submetidos a números diferentes de pontos na neurorrafia. Neste estudo foram analisados dois grupos, um submetido à sutura com três pontos e outro com sete pontos separados, divididos em subgrupos de acordo com envolvimento da neurorrafia por um tubo de silicone ou veia, e um grupo adicional com 14 pontos contínuos. Os autores obtiveram melhores resultados no grupo com sete pontos em relação ao de três pontos. Não é possível a comparação desses resultados com os obtidos no presente estudo devido à incongruência de metodologia. Como exemplo, um dos parâmetros utilizados no estudo daqueles autores foi a avaliação subjetiva da formação de neuroma no local da sutura e no

presente estudo, nenhum dos animais apresentou neuroma no local da sutura no momento da segunda cirurgia.

A análise estatística do índice de regeneração mostrou diferença significativa quando comparados o grupo controle e o grupo com três pontos, no entanto não mostrou diferença entre o grupo controle e o com seis pontos. No estudo realizado por Martins et al. (2006)⁸³ não foi identificada diferença entre nenhum dos parâmetros histomorfométricos entre grupos submetidos a diferentes formas de reparo, no entanto, o período de observação foi mais longo e as técnicas de sutura envolveram a utilização de adesivo de fibrina. Já foi estudado que após o sexto mês o número de axônios no segmento distal diminui em decorrência destes brotos axonais não terem atingido o órgão alvo. Utilizando-se o mesmo modelo animal e técnica de lesão e reparo do nervo semelhantes, mas observando-se o seus efeitos em um momento diferente, estarão sendo analisados, na verdade, eventos fisiológicos diferentes. No estudo de Martins et al. (2006)⁸³ analisou-se o efeito final da reinervação funcional da pata do rato. No presente experimento, devido ao menor tempo de observação, restringiu-se a análise ao evento da passagem dos brotos axonais pelo local do reparo com menor interferência do efeito da integração sináptica destes axônios com o órgão alvo.

Estudos realizados por Jenq e Coggeshall^{101,102} e confirmados por Mackinnon et al. (1991)¹⁰³ já demonstraram que, após o reparo do nervo ciático do rato, o segmento distal apresenta um número de axônios mielinizados maior que o segmento proximal durante os primeiros doze meses, havendo um aumento progressivo do número de fibras mielinizadas do primeiro mês até o sexto mês, quando se observa um decréscimo progressivo no número de axônios distais que retornam aos valores anteriores à secção e ao reparo cirúrgico por volta do 24º mês. Estes estudos utilizaram técnicas microcirúrgicas com uso de fio de náilon, mas não especificam o número de pontos na sutura.

Estes resultados são consistentes com a hipótese de que há um brotamento axonal que resulta em um maior número de fibras no segmento

distal após uma correção microcirúrgica de uma lesão de nervo periférico¹⁰⁴. No estudo conduzido por Mackinnon et al. (1991)¹⁰³ o índice de regeneração foi de $1,56 \pm 0,18$ no primeiro mês.

Desta forma, tendo-se como parâmetro o grupo de três pontos e apesar de não ter sido demonstrada uma diferença significativa, sugere-se que o menor número de axônios no segmento distal resultando em menores índices de regeneração apresentados pelos animais do grupo com seis pontos em relação ao esperado, seja devido a um impedimento ao brotamento axonal promovido pela sutura com seis pontos.

As análises dos diâmetros das fibras mielinizadas nos segmentos distais dos grupos experimentais e do índice de alteração do diâmetro dos três grupos mostraram diferença quando comparados os grupos experimentais com o controle, mas não mostrou diferença significativa entre aqueles. Martins¹³ cita que dois meses podem não ser suficientes para uma avaliação adequada da regeneração, já que a mielinização e a maturação das fibras nervosas podem necessitar um tempo mais prolongado.

Isto demonstra que as diferentes suturas tiveram o mesmo efeito no diâmetro das fibras mielinizadas presentes no segmento distal e, portanto na maturação destas fibras, apesar de efeitos diferentes no número de axônios distais. Baseado nestes dados, conclui-se que a sutura influenciou a quantidade de fibras em regeneração que conseguiram atravessar a linha de sutura, mas não interferiu no diâmetro alcançado por aquelas fibras que a atravessaram.

Estes dados são consistentes com a observação de outros autores em relação à correlação dos achados histomorfométricos e eletrofisiológicos nos mesmos animais submetidos ao reparo cirúrgico de nervos que identificaram uma melhor correlação entre a velocidade de condução do potencial de ação do nervo e o diâmetro das fibras mielinizadas⁸⁴.

A análise da quantificação das fibras de colágeno tipo I e III mostrou que o total de colágeno no epineuro aumentou consideravelmente no grupo de animais submetidos a seis suturas, grupo onde foram identificados os

menores valores de velocidade de condução do potencial de ação e do índice de regeneração ao final de oito semanas de observação.

Há um consenso na literatura que os avanços mais significativos no reparo das lesões do sistema nervoso periférico resultarão da manipulação da resposta à lesão e que pouco resta a ser melhorado em relação à técnica cirúrgica^{105,106,107,108,109}. No entanto, ainda restam algumas hipóteses que tem aplicação direta na manipulação cirúrgica de tais lesões a serem adequadamente testadas através de estudos clínicos ou básicos.

Desde os estudos iniciais de Ramon Y Cajal (1894)⁸, de Gutmann e Medawar (1942)⁹, Sunderland (1965)^{7,21} e Pleasure et al. (1974)¹¹² e mais recentemente com os estudos de Atkins S. et al. (2006, 2007)^{110,111} existem referências ao impedimento que o processo inflamatório e produção de tecido conjuntivo exercem na regeneração axonal na forma de uma barreira mecânica.

A despeito das afirmações destes autores de que um maior número de suturas causaria uma maior reação tecidual com conseqüente piora da regeneração axonal, tal hipótese não havia sido testada. O presente estudo é o primeiro a demonstrar claramente o efeito que o número diferente de suturas promove na regeneração axonal. Isto serve como prova do conceito que o maior número de suturas causa uma maior produção de colágeno tipo I epineural e se correlaciona com uma pior regeneração axonal. Não há na literatura um estudo que quantifique e diferencie a produção de colágeno decorrente do maior número de suturas após secção e reparo de um nervo periférico, portanto, a comparação com outros estudos é realizada de forma indireta.

Abercrombie e Johnson (1946)^{*} citados por Pleasure et al. (1974)¹¹² já afirmavam que a produção de colágeno no local da coaptação neural geraria uma barreira a passagem dos brotamentos axonais. Utilizando um método bioquímico de quantificação do colágeno através da hidroxiprolina, Pleasure et al. demonstraram que uma maior quantidade de colágeno no local do reparo de nervos ciáticos de ratos correlacionava-se a uma quantidade

* Abercrombie M, Johnson M. Collagen content of rabbit sciatic nerve during Wallerian degeneration. J Neurol Neurosurg Psychiatr. 1946;9:11-8.

menor de constituintes da mielina (lipídeos e colesterol não esterificado) distalmente ao reparo. Lane et al. (1978)¹¹³ também observaram a mesma relação entre o colágeno e a regeneração axonal no local de secção do nervo. Tais estudos, no entanto, utilizaram a inibição farmacológica da produção do colágeno através da *cis*-hidroxiprolina, que se liga ao pró-colageno e impede sua conversão em colágeno, diminuindo a produção deste durante o processo de regeneração do nervo e não relacionaram a influência da técnica de reparo na produção de colágeno.

Hastings e Peacock Jr. (1973)¹¹⁴ sugerem que a secção do nervo e o processo de regeneração são os principais fatores desencadeantes da produção de colágeno e que, apesar da maior quantidade de colágeno ser identificada no local da linha de sutura, não haveria relação entre estes dois fatores. No entanto, essa conclusão baseou-se na comparação de grupos que foram submetidos a uma mesma técnica de reparo.

Graham et al. (1973)¹¹⁵ foram os primeiros a descrever que a aplicação tópica de um esteróide, acetato de triancinolona, melhora a regeneração neural em esquilos e macacos. Mas, estudos de Bucko et al. (1981)¹¹⁶ utilizando a penicilamina como inibidor da formação do colágeno em suturas neurais de macacos não demonstrou tal efeito, embora tal estudo seja difícil de comparação uma vez que a administração da droga foi realizada por via oral e não tópica.

Wehling et al. (1992)¹¹⁷ utilizando a aplicação tópica de colagenase após a secção e reparo do nervo ciático de ratos verificou, com base nos resultados de potencial evocado, contagem de fibras mielinizadas e quantificação de colágeno, que o grupo com menor produção do colágeno apresentou melhor regeneração axonal e concluiu que havia uma relação causal.

Estudos posteriores de Rydevik et al. (2002)¹¹⁸ não demonstraram benefício na aplicação de colagenase no local da sutura epineural em ratos. No entanto, neste estudo a avaliação da regeneração axonal foi realizada através da mensuração da força de contração do músculo tibial anterior e a quantificação do colágeno não foi realizada.

Nachemson AK et al. (1985)¹¹⁹ estudando o efeito do uso de inibidores farmacológicos da reação inflamatória, *cis*-hidroprolina ou acetato de metilprednisolona, sob a produção de colágeno, correlacionaram valores superiores de velocidade de condução nos grupos submetidos a inibição da produção de colágeno, não identificando uma correlação com parâmetros histomorfométricos. A avaliação do colágeno foi baseada em aspectos morfológicos do tecido conectivo perineural e não houve diferença entre os grupos, mas não foi realizada avaliação bioquímica ou imunohistoquímica do colágeno produzido.

Davison et al. (1999)¹²⁰ demonstraram a presença de TGF- β 1, um indutor da cicatrização, nos locais de lesão e reparo neural do nervo ciático do rato e que o grupo exposto a aplicação local e diária de anticorpos neutralizadores de TGF- β 1 tiveram melhor potencial de ação motor e melhor força de contração dos músculos gastrocnêmios e sóleo após doze semanas.

Atkin S et al. (2006) utilizaram grupos de animais transgênicos (IL-4/IL-10 - ; M6PR/IGF-II -) que tem, respectivamente, uma maior e menor capacidade de reação cicatricial e os submeteram a secção e reparo imediato com suturas epineurais. Após um período de observação de seis semanas foi realizada a análise eletrofisiológica da velocidade de condução e potencial de ação do nervo, a mensuração histomorfométrica através da alteração do índice de regeneração e do diâmetro das fibras mielinizadas e a quantificação do colágeno I e III pelo método de Picrosirius no local da sutura, excluindo-se o epineuro. Os autores descreveram uma maior produção de colágeno no nervo ciático do rato e menor velocidade de condução e potencial de ação no grupo em que houve uma maior reação cicatricial. Este mesmo grupo apresentou um número menor de brotamentos axonais no segmento distal ao local de reparo, mas tal resultado não foi estatisticamente significativo¹⁰⁷.

No presente estudo a proporção de colágeno tipo I no epineuro foi cerca de três vezes maior em relação à identificada no endoneuro. Não houve diferença significativa no aumento da produção de colágeno I

endoneural entre os três grupos. Como esperado, o efeito do trauma tecidual pelas múltiplas passagens da agulha de sutura e da presença do fio de náilon permaneceu concentrado no epineuro.

Estudos histomorfométricos da regeneração do nervo ciático do rato já foram realizados de forma seriada e mostraram alterações dinâmicas dependentes do tempo de observação e análise com resultados ligeiramente diferentes¹⁰³. Neste estudo, as alterações no colágeno foram quantificadas em um momento único, após oito semanas de observação, e não demonstram alterações dinâmicas ao longo do processo de regeneração do nervo.

A aplicação prática dos resultados do presente estudo requer uma consideração importante. O nervo ciático do rato tem um diâmetro reduzido comparável somente a alguns nervos humanos, como os digitais, intercostais e ramos terminais do facial ou nervos de crianças. Portanto, as alterações de maior produção epineural do colágeno e sua correlação com parâmetros eletrofisiológicos e histomorfométricos podem se restringir aos nervos de pequena área transversal. Nervos mais calibrosos, como os nervos mediano, ulnar ou ciático humanos, podem apresentar maior produção de colágeno epineural decorrente das suturas, mas sua área transversal pode constituir uma proteção relativa em relação à perda funcional e a eventual piora da regeneração.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que:

1. O índice de regeneração foi menor no grupo submetido à sutura com seis pontos em relação ao grupo com três pontos;
2. Houve alteração do diâmetro das fibras mielinizadas em regeneração quando comparados o grupo controle com os dois grupos experimentais, mas não houve alteração do diâmetro das fibras mielinizadas em regeneração entre os grupos com três ou seis pontos;
3. Os animais submetidos à sutura epineural com seis pontos apresentaram uma maior quantidade epineural dos colágenos tipo I e III quando comparados com os animais submetidos à sutura com três pontos;
4. Não houve diferença significativa no aumento da produção de colágeno tipo I ou tipo III endoneural entre os grupos submetidos à sutura com três ou seis pontos;
5. Após oito semanas de observação os animais do grupo com seis pontos apresentaram diminuição mais acentuada da velocidade de condução do potencial de ação do nervo em comparação com os animais do grupo com três pontos.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo A – Intervalo entre cirurgias

Estudos conduzidos por Mackinnon et al. (1991) avaliaram parâmetros histomorfométricos da regeneração do nervo ciático do rato após o reparo cirúrgico no intervalo de um, três, seis, nove, doze e vinte e quatro meses e demonstraram que o número de axônios mielinizados distalmente à região do reparo foi significativamente maior em relação ao período que antecedeu a lesão e o reparo durante os doze primeiros meses seguintes, retornando a valores próximos do estado prévio ao reparo por volta do vigésimo quarto mês. Analisando-se o diâmetro das fibras nervosas, a média dos diâmetros distal ao reparo foi significativamente menor ao longo dos 24 meses seguintes. No entanto, avaliando-se o primeiro e terceiro mês após o reparo cirúrgico não havia diferença significativa entre as médias de número de axônios mielinizados ou diâmetro dos mesmos entre o primeiro e terceiro mês, dados que justificam os dois meses de observação considerados no presente estudo¹⁰³. Este intervalo também foi utilizado por outros autores^{74,84,101,102,121}.

Anexo B – Correlação entre o grupo de estudo, numeração do animal e tipo de reparo utilizado.

Grupo do estudo	Tipo de reparo	Número do animal
Grupo 3P	Três pontos	4
		5
		7
		8
		13
		31
		32
		33
		34
		35
Grupo 6P	Seis pontos	1
		2
		3
		6
		9
		10
		11
		12
		14
		15
Grupo C	Controle	21
		22
		23
		24
		25
		26
		27
		28
		29
		30

Legenda: Grupo C: grupo controle; Grupo 3P: grupo da neurorrafia com três pontos; Grupo 6P: grupo da neurorrafia com 6 pontos.

Anexo C – Dados da primeira cirurgia

ANIMAL	DATA DA CIRURGIA 1	PESO 1(g)	DIAZEPAM(ml)	KETAMINA(ml)
1	7/7/2005	245	0,1	0,7+0,2
2	7/7/2005	285	0,1	0,7
3	7/7/2005	265	0,1	0,4+0,2
4	7/7/2005	280	NR	0,7+0,2+0,2+0,2+0,2
5	7/7/2005	255	0,1	0,6
6	15/9/2005	305	0,1	0,6+0,2
7	15/9/2005	280	0,15	0,6+0,2
8	15/9/2005	285	0,15	0,6+0,2+0,2+0,2
9	15/9/2005	290	0,15	0,6
10	15/9/2005	280	0,1	0,6+0,2+0,2
11	8/12/2005	295	0,1	0,7
12	8/12/2005	310	0,1	0,7+0,2+0,2+0,2
13	15/12/2005	280	0,1	0,7+0,3+0,2
14	8/12/2005	340	0,1	0,7+0,2
15	8/12/2005	300	0,1	0,7
21	11/5/2006	318	0,1	1,0+0,3+0,3
22	11/5/2006	328	0,1	1,0+0,4+0,3
23	11/5/2006	332	0,1	1,0+0,3+0,3
24	11/5/2006	320	0,1	1,0+0,4+0,4
25	11/5/2006	264	0,1	1,0+0,3+0,3
26	23/2/2006	250	0,1	0,7
27	23/2/2006	290	0,1	0,6
28	23/2/2006	310	0,1	0,7+0,2
29	23/2/2006	290	0,1	0,7
30	11/5/2006	264	0,1	1,0+0,3+0,3
31	13/07/2006	280	0,1	1,0+0,3+0,3
32	13/07/2006	350	0,1	0,7
33	13/07/2006	420	0,1	0,8
34	13/07/2006	300	0,1	0,6+0,1
35	13/07/2006	320	0,1	0,6+0,1

Legenda: Cirurgia 1: primeira cirurgia realizada no animal;Peso 1: peso no momento da primeira cirurgia; g: grama; ml: mililitro; NR: não realizado.

Anexo D – Dados da segunda cirurgia

ANIMAL	DATA DA CIRURGIA 2	PESO 2(g)	DIAZEPAM(ml)	KETAMINA (ml)
1	31/8/2005	425	0,2	0,6+0,2+0,2
2	31/8/2005	455	0,2	0,7+0,2
3	31/8/2005	500	0,2	0,7
4	31/8/2005	450	0,2	0,6+0,2+0,2
5	31/8/2005	420	0,2	0,6+0,2
6	17/11/2005	455	0,2	0,7+0,3+0,2+0,3
7	17/11/2005	395	0,2	0,7
8	17/11/2005	460	0,2	0,8+0,3+0,2+0,2
9	17/11/2005	405	0,2	0,8
10	17/11/2005	370	0,2	0,8
11	9/2/2006	440	0,2	0,7+0,3+0,3
12	9/2/2006	450	0,2	0,7+0,3+0,3
13	9/2/2006	445	0,2	0,7+0,3+0,3+0,3
14	9/2/2006	505	0,3	0,8+0,3
15	9/2/2006	460	0,3	0,7+0,3+0,3
21	NR	-	-	-
22	NR	-	-	-
23	NR	-	-	-
24	NR	-	-	-
25	NR	-	-	-
26	19/4/2006	398	0,2	1,0+0,3+0,3+0,3
27	19/4/2006	416	0,2	1,0+0,3+0,3+0,3
28	19/4/2006	466	0,2	1,0+0,5+0,5+0,5
29	19/4/2006	423	0,2	1,0+0,5
30	19/4/2006	478	0,2	1,0+0,4
31	07/08/2006	390	0,2	0,8
32	07/08/2006	466	0,2	1,0+0,5+0,5+0,5
33	07/08/2006	462	0,2	0,9+0,2+0,2
34	07/08/2006	423	0,2	1,0+0,2
35	07/08/2006	450	0,2	0,9

Legenda: Cirurgia 1: primeira cirurgia realizada no animal; Peso 1: peso no momento da primeira cirurgia; g: grama; ml: mililitro; NR: Não realizada.

Anexo E – Valores referentes à VC1, VC2 e relação entre estes valores para cada animal de acordo com o grupo de reparo.

Grupo C	
Número do animal	VC2 (ms)
21	0,95
22	2,13
23	1,61
24	1,25
25	2,45
26	1,03
27	1,34
28	1,31
29	1,21
30	1,82

Grupo 3P				
Número do animal	VC1 (ms)	VC2(ms)	VC1-VC2 (ms)	VC2/VC1
4	1,47	1,28	0,19	0,870748
5	1,53	1,19	0,34	0,777778
7	2	1,21	0,79	0,605
8	1,44	1,36	0,08	0,944444
13	1,81	0,89	0,92	0,491713
31	1,42	1,26	0,16	0,887324
32	1,49	1,36	0,13	0,912752
33	1,6	1,55	0,05	0,96875
34	1,8	1,26	0,54	0,7
35	1,43	1,29	0,14	0,902098

Legenda: ms: milissegundo; VC1: velocidade de condução do potencial de ação do nervo antes da secção do nervo na primeira cirurgia; VC2: velocidade de condução do potencial de ação do nervo após oito semanas do reparo na segunda cirurgia; VC1-VC2: valor absoluto da diminuição da velocidade de condução após o reparo do nervo; VC2/VC1: relação da velocidade de condução após e antes do reparo do nervo.

Grupo 6P				
Número do animal	VC1 (ms)	VC2 (ms)	VC1-VC2 (ms)	VC2/VC1
1	1	0,76	0,24	0,76
2	1,76	1,29	0,47	0,732955
3	1,31	1,12	0,19	0,854962
6	1,81	0,73	1,08	0,403315
9	2,35	0,96	1,39	0,408511
10	1,93	1,41	0,52	0,73057
11	1,27	1,08	0,19	0,850394
12	1,23	0,82	0,41	0,666667
14	1,31	1,21	0,1	0,923664
15	1,9	1,29	0,61	0,678947

Legenda: ms: milissegundo; VC1: velocidade de condução do potencial de ação do nervo antes da secção do nervo na primeira cirurgia; VC2: velocidade de condução do potencial de ação do nervo após oito semanas do reparo na segunda cirurgia; VC1-VC2: valor absoluto da diminuição da velocidade de condução após o reparo do nervo; VC2/VC1: relação da velocidade de condução após e antes do reparo do nervo.

Anexo F – Valores referentes ao número de axônios proximais e distais a linha de sutura do nervo e índice de regeneração (IR) de cada animal de acordo com o grupo de reparo.

Grupo C			
Número do animal	N Ax1	N Ax2	IR
21	2951	2720	0,92
22	2557	2986	1,17
23	2978	3042	1,02
24	2934	2758	0,94
25	2652	2282	0,86
26	1434	2090	1,46
27	2641	2202	0,83
28	2149	2140	1,00
29	2009	2290	1,14
30	2177	2169	1,00

Grupo 3P			
Número do animal	N Ax1	N Ax2	IR
4	2018	2297	1,14
5	2015	2643	1,31
7	1485	2465	1,66
8	1548	2378	1,54
13	3373	2583	0,77
31	3234	4044	1,25
32	2792	4229	1,51
33	3058	4180	1,37
34	3492	4071	1,17
35	2642	3986	1,51

Legenda: N Ax1: número de axônios no segmento proximal do nervo; N Ax2: número de axônios no segmento distal do nervo; IR: índice de regeneração do nervo ($N\ Ax2/N\ Ax1$).

Grupo 6P			
Número do animal	N Ax1	N Ax2	IR
1	2084	2515	1,21
2	1744	2878	1,65
3	1873	2558	1,37
6	1986	2506	1,26
9	2015	2052	1,02
10	1843	1857	1,01
11	2991	4297	1,44
12	3570	3899	1,09
14	2670	2898	1,09
15	4006	2671	0,67

Legenda: N Ax1: número de axônios no segmento proximal do nervo; N Ax2: número de axônios no segmento distal do nervo; IR: índice de regeneração do nervo ($N\ Ax2/N\ Ax1$).

Anexo G – Valores referentes aos perímetros aferidos e diâmetros calculados de cada animal de acordo com o grupo de reparo.

Grupo C			
Número do animal	D1(μm)	D2(μm)	IAD
21	6,655	7,044	1,06
22	7,397	6,650	0,90
23	6,445	6,208	0,96
24	6,673	7,268	1,09
25	7,303	6,968	0,95
26	9,298	7,410	0,80
27	6,934	7,785	1,12
28	7,816	7,678	0,98
29	7,613	7,287	0,96
30	8,009	7,658	0,96

Grupo 3P			
Número do animal	D1(μm)	D2(μm)	IAD
4	8,562	5,589	0,65
5	7,574	5,079	0,67
7	9,443	6,510	0,69
8	8,927	5,366	0,60
13	6,044	4,190	0,69
31	6,703	3,632	0,54
32	6,648	4,223	0,64
33	6,528	4,138	0,63
34	5,192	3,631	0,70
35	6,460	3,940	0,61

Legenda: D1: diâmetro dos axônios no segmento proximal do nervo (Perímetro/ π); D2: diâmetro dos axônios no segmento distal do nervo (Perímetro/ π); IAD: índice de alteração do diâmetro ($D2/D1$); μm : micrômetro.

Grupo 6P			
Número do animal	D1(μm)	D2(μm)	IAD
1	8,212	5,873	0,72
2	9,125	5,543	0,61
3	7,670	5,929	0,77
6	9,802	6,152	0,63
9	7,389	5,151	0,70
10	9,279	6,043	0,65
11	6,542	4,288	0,66
12	5,994	3,976	0,66
14	7,151	4,064	0,57
15	6,590	4,571	0,69

Legenda: D1: diâmetro dos axônios no segmento proximal do nervo (Perímetro/ π); D2: diâmetro dos axônios no segmento distal do nervo (Perímetro/ π); IAD: índice de alteração do diâmetro ($D2/D1$); μm : micrômetro.

Anexo H – Valores referentes à quantificação de colágeno tipo I e tipo III em relação à área total no endoneuro e epineuro do nervo ciático do animal após reação de imunofluorescência de acordo com o grupo de reparo.

Grupo C				
Número do animal	Colágeno tipo I		Colágeno tipo III	
	Epineuro	Endoneuro	Epineuro	Endoneuro
21	7	3,5	5,4	2,7
22	11,6	5,6	10,9	6,1
23	11,27	6,1	7	3,8
24	8,9	8,2	6,5	3,9
25	4,3	9,3	1,8	5
26	6,8	10,2	2,8	5,6
27	8,8	11,4	8,1	11,5
28	5,8	6	4,3	5,3
29	11,6	8	9,6	6,5
30	6,4	7,4	6,1	7,2

Grupo 3P				
Número do animal	Colágeno tipo I		Colágeno tipo III	
	Epineuro	Endoneuro	Epineuro	Endoneuro
4	7,8	13,4	7,3	13,1
5	10,4	10,3	11	11,9
7	18,5	5,5	13,6	1,7
8	10,5	11,6	0,6	7,2
13	10,5	9,1	3	6,2
31	8,9	10,3	11,3	19,7
32	21,5	1,6	2,9	11,2
33	3,9	16,5	13,1	12,9
34	19,3	9,9	17,1	9
35	4,5	10,5	4,9	8,4

Grupo 6P				
Número do animal	Colágeno tipo I		Colágeno tipo III	
	Épineuro	Èndoneuro	Épineuro	Èndoneuro
1	11,6	6	5	16,1
2	23,6	4,1	23,5	2,1
3	31	8,1	29,4	6
6	12,20	5,1	10,2	19,8
9	5,3	13,9	3,1	7,9
10	15,3	9,5	12	4,1
11	31,8	7,8	18,2	3,4
12	28,8	5,3	20,38	2,6
14	26,8	10,5	20,5	11
15	25	8,4	21,5	15,8

Anexo I – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros avaliados no estudo referente a cada grupo de animais.

Parâmetro	Grupo C (Controle)		Grupo 3P (3 pontos)		Grupo 6P (6 pontos)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
VC1 (m/s)	1,51	0,46	1,60	0,19	1,59	0,40
VC2 (m/s)	1,51	0,46	1,27	0,16	1,07	0,23
N Ax1	2448,2	473,7	2565,7	711,5	2478,2	758,1
N Ax2	2467,9	349,6	3287,6	821,8	2813,1	717,9
IR	1,03	0,17	1,32	0,25	1,18	0,26
D1 (μm)	7,41	0,80	7,20	1,30	7,77	1,22
D2 (μm)	7,19	0,49	4,63	0,91	5,16	0,82
IAD	0,98	0,09	0,64	0,05	0,67	0,06
Colágeno I Epineuro	8,25	2,60	11,58	6,15	21,14	9,30
Colágeno I Endoneuro	7,57	2,36	9,87	4,06	7,87	2,95
Colágeno III Epineuro	6,25	2,85	8,48	5,51	16,38	8,47
Colágeno III Endoneuro	5,76	2,43	10,13	4,85	8,88	6,42

Legenda: VC1: velocidade de condução do potencial de ação antes da secção do nervo na primeira cirurgia; VC2: velocidade de condução do potencial de ação antes oito semanas do reparo na segunda cirurgia; N Ax1: número de axônios no segmento proximal do nervo; N Ax2: número de axônios no segmento distal do nervo; IR: índice de regeneração do nervo ($\text{N Ax2}/\text{N Ax1}$); D1: diâmetro dos axônios no segmento proximal do nervo ($\text{Perímetro}/\pi$); D2: diâmetro dos axônios no segmento distal do nervo ($\text{Perímetro}/\pi$); IAD: índice de alteração do diâmetro ($\text{D2}/\text{D1}$); m/s: metros por segundo; μm : micrômetro.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

-
- ¹ DeLee JC, Smith MT, Green DP. The reaction of nerve tissue to various suture materials: A study in rabbits. *J Hand Surg Am.* 1977;2:38-43.
- ² Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JPP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surg Neurol.* 2005;64(SI):10-(SI):16.
- ³ Park JW, Lee KS, Kim SK, Park JH, Hong JS, Oh KJ. Rapid neurorrhaphy with titanium clips. *Microsurgery.* 2002;22:386-90.
- ⁴ Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg.* 2001;95:694-9.
- ⁵ Bratton BR, Kline DG, Hudson AR, Coleman WT. Use of monofilament Polyglycolic Acid Suture for Experimental Peripheral Nerve Repair. *J Surg. Res.* 1981;31:482-89.
- ⁶ Nachemson AK, Lundborg G, Myrhage R, Rank F. Nerve regeneration and pharmacological suppression of the scar reaction at the suture site. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1985;19:255-60.
- ⁷ Sunderland S. Factors influencing the quality of the recovery after nerve repair. In: Sunderland S (ed). *Nerve Injuries and Their Repair.* 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone Inc.; 1991. p.395-412.
- ⁸ Ramon Y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system (reimpressão. Tradução: Raoul May) ed. 1991. Oxford, UK: Oxford University Press; 1928.
- ⁹ Gutmann E, Gutmann L, Medawar PB et al. The rate of regeneration of nerve. *J Exp Biol.* 1942;19:14-44.
- ¹⁰ Forman DS, Wood DK, De Silva S. Rate of regeneration of sensory axons in transected rat sciatic nerve repaired with epineural sutures. *J Neurol Sci.* 1979;44:55-9.
- ¹¹ Witzel C, Rhode C, Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol.* 2005;485:183-90.

-
- ¹² Schidhammer R, Zandieh S, Hopf R, Mizner I, Pelinka LE, Kroepfl A, Redl H. Alleviated Tension at the Repair Site Enhances Functional Regeneration: The Effect of Full Range of Motion Mobilization on the Regeneration of Peripheral Nerves-Histologic, Electrophysiologic, and Functional results in a Rat Model. *J Traum.* 2004;56:571-84.
- ¹³ Martins RS. Avaliação da eficácia do reparo na regeneração do nervo ciático do rato com utilização de sutura, adesivo de fibrina ou combinação das duas técnicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2004.
- ¹⁴ Eather TF, Pollock M, Myers DB. Proximal and distal changes in collagen content of peripheral nerve that follow transection and crush lesions. *Exp Neurol.* 1986;92:299-310.
- ¹⁵ Siironen J, Vuorio E, Sandberg M, Roytta M. Expression of type I and III collagen and laminin beta1 after rat sciatic nerve crush injury. *J Peripher Nerv Syst.* 1996;1:209-21.
- ¹⁶ Van Beek AL, Glover JL, Zook EG. Primary versus delayed primary neurorrhaphy in rat sciatic nerve. *J Surg Res.* 1975;18:335-9.
- ¹⁷ Kline DG, Hudson AR. Operative care and techniques. In: Kline DG, Hudson AR (eds). *Nerve injuries: operative results for major nerve injuries, entrapments and tumors.* 2nd edition. Philadelphia; WB Saunders; 1995.p117-47.
- ¹⁸ Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* 1991;2:93-104.
- ¹⁹ Thomas PK, Olsson Y. Microscopic anatomy and function of the connective tissue components of peripheral nerve. In: Dick PK, Thomas PK, Lambert EH, Bunge ER, editors. *Peripheral Neuropathy.* Philadelphia: WB Saunders Company; 1984. p.97-120.
- ²⁰ Sunderland S, Bradley KC. The cross-sectioned area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibers. *Brain.* 1949;72:428.
- ²¹ Sunderland S, Bradley KC. The connective tissue of peripheral nerves. *Brain.* 1965;88:841.
- ²² Carke E, Bearn JG. The spiral nerve bands of Fontana. *Brain.* 1972; 95:1-20.
- ²³ Haftek J. Stretch injury of peripheral nerve. Acute effects of stretching on rabbit nerve. *J Bone Joint Surg.* 1970;52B:354-65.

-
- ²⁴ Sunderland S. Connective tissues of nerve trunks. In: Sunderland S, editor. Nerve injuries and their repair. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Inc; 1991. p 47-52.
- ²⁵ Brown MJ, Pleasure DE, Asbury AK. Microdissection of Peripheral Nerve: Collagen and Lipid Distribution with Morphological Correlation. *J Neurol Sci.* 1976;29:361-9.
- ²⁶ Friede RL, Bischhausen R. The organization of endoneural collagen in peripheral nerves as revealed with the scanning electron microscope. *J Neurol Sci.* 1978;38:83-8.
- ²⁷ Osawa T, Ide C. Changes in Thickness of Collagen Fibrils in the Endo- and Epineurium of the mouse sciatic nerve during development. *Acta Anat.* 1986;125:245-51.
- ²⁸ Friede RK, Samorajski T. Myelin Formation in The Sciatic Nerve of The Rat: A quantitative Electron Microscope, Histochemical and Radioautographic Study. *J. Neuropath. Exp Neurol.* 1968;27:546-70.
- ²⁹ Gamble HJ. Further electron microscope studies of human foetal peripheral nerves. *J Anat.* 1966;100(3):487-502.
- ³⁰ Ochoa J. The sural nerve of the human foetus: electron microscope observations and counts of axons. *J Anat.* 1971.108(2):231-45.
- ³¹ Waehneltd , Matthieu JM, Jeserich G. Appearance of myelin proteins during vertebrate evolution. *Neurochem Int.* 1986;9:463-74.
- ³² Fujii K, Tsuji M, Murota K. Isolation of peripheral nerve collagen. *Neurochem Res.* 1986;11:1439-46.
- ³³ Seyer JM, Kang AH, Whitaker JN. The characterization of type I and III collagens from human peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta.* 1977;492:415-25.
- ³⁴ Junqueira LCU, Montes GS, Bezerra MS. Do Schwann cells produce collagen type III? *Experientia.* 1978;35:114.
- ³⁵ Junqueira LCU, Montes GS, Krisztán RM. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. *Cell Tissue Res.* 1979;202:453-60.
- ³⁶ Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: Early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol.* In press 2009.

-
- ³⁷ Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg.* 1988;69:155-70.
- ³⁸ Bradley JL, King RHM, Muddle JR, Thomas PK. The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol.* 2000;99:539-46.
- ³⁹ Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:761-99.
- ⁴⁰ Lorimier P, Mezin P, Labat Moleur F, Pinel N, Peyrol S, Stoebner P. Ultrastructural localization of the major components of the extracellular matrix in normal rat nerve. *J Histochem Cytochem.* 1992;40:859-68.
- ⁴¹ Margolis RU, Margolis RK. Metabolism and function of glycoproteins and glycosaminoglycans in nervous tissue. *Int J Biochem.* 1977;8:85-91.
- ⁴² Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci.* 2005;25:3478-87.
- ⁴³ Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci.* 2002;22:6696-703.
- ⁴⁴ Salonen V, Aho H, Roytta M, Peltonen J. Quantification of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropathol. (Berlin).* 1988;75:331-36.
- ⁴⁵ Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol.* 1971;14:49-124.
- ⁴⁶ Kreutzberg GW. Reaction of the neuronal cell body to axonal damage. In: Waxma SG, Kocsis JD, Stys PK (Eds.). *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology.* Oxford: Oxford University Press; 1995. p.355-74.
- ⁴⁷ Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14:67-116.
- ⁴⁸ Heiwell PO, Dahlström A, Larsson PA, Boj S. The intra-axonal transport of acetylcholine and cholinergic enzymes in rat sciatic nerve during regeneration after various types of axonal trauma. *J Neurobiol.* 1979;10:119-36.

-
- ⁴⁹ Frizell M, Sjöstrand J. Transport of proteins, glycoproteins, and cholinergic enzymes in regenerating hypoglossal neurons. *J Neurochem.* 1974;22:845–50.
- ⁵⁰ Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 1995;268:239–47.
- ⁵¹ Haas CA, Donath C, Kreutzberg GW. Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience.* 1993;53:91–9.
- ⁵² Herdegen T, Fiallos-Estrada CE, Schmid W, Bravo R, Zimmermann M. The transcription factors c-JUN, JUN D and CREB, but not FOS and KNOX-24, are differentially regulated in axotomized neurons following transection of rat sciatic nerve. *Mol. Brain Res.* 1992;14:155–65.
- ⁵³ Yang Y, Xie Y, Chai H, Fan M, Liu S, Liu H, Bruce I, Wu W. Microarray analysis of gene expression patterns in adult spinal motoneurons after different types of axonal injuries. *Brain Res.* 2006;1075:1–12.
- ⁵⁴ Schmitt AB, Breuer S, Liman J, Buss A, Schlangen C, Pech K, Hol EM, Brook GA, Noth J, Schwaiger FW. Identification of regeneration-associated genes after central and peripheral nerve injury in the adult rat. *BMC Neurosci.* 2003;4:8.
- ⁵⁵ Kubo T, Yamashita T, Yamaguchi A, Hosokawa K, Tohyama M. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *J. Neurochem.* 2003;82:1129–36.
- ⁵⁶ Hoffman PN, Lasek JR. Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. *Brain Res.* 1980;202:317-33.
- ⁵⁷ Tashiro T, Komiya Y. Changes in organization and axonal transport of cytoskeletal proteins during regeneration. *J Neurochem.* 1991;56:1557-63.
- ⁵⁸ Mcquarrie IG, Lasek RJ. Transport of cytoskeletal elements from parent axons into regenerating daughter axons. *J Neurosci.* 1989;9:436-46.
- ⁵⁹ Zheng JQ, Kelly TK, Chang B, Ryazantsev S, Rajasekaran AK, Martin KC, Twiss JL. A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci.* 2001;21(23):9291-303.
- ⁶⁰ Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyery RL, Holt CE et al. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci.* 2005;25:331-42.

-
- ⁶¹ Willis D, Li KW, Zheng J-Q, Smit AB, Kelly TK, Merianda TT, Sylvester J, van Minnen J, Twis, JL. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci.* 2005;25:778–91.
- ⁶² Brushart TM. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci.* 1993;13:2730–38.
- ⁶³ Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci.* 1998;18: 8674–81.
- ⁶⁴ Fried K, Govrin-Lippmann R, Rosenthal F, Ellisman MH, Devor M. Ultrastructure of afferent axon endings in neuroma. *J Neurocytol.* 1991;20:682–701.
- ⁶⁵ Arvidsson J, Ygge J, Grant G. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res.* 1986;373:15–21.
- ⁶⁶ Vestergaard S, Tandrup T, Jakobsen J. Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. *J Comp Neurol.* 1997; 388:307–12.
- ⁶⁷ Ygge J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res.* 1997;478: 193–5.
- ⁶⁸ Vanden-Noven S, Wallace N, Muccio D, Turtz A, Pinter MJ. Adult spinal motoneurons remain viable despite prolonged absence of functional synaptic contact with muscle. *Exp Neurol.* 1993;123:147–56.
- ⁶⁹ Lowrie MB, Lavalette D, Davies CE. Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev Neurosci.* 1994;16:279–84.
- ⁷⁰ Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol.* 2003;27:277–324.
- ⁷¹ Markus A, Patel TD, Snider WD. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12:523–31.
- ⁷² Perlson E, Hanz S, Medzihradzky KF, Burlingame AL, Fainzilber M. From snails to sciatic nerve: retrograde injury signaling from axon to soma in lesioned neurons. *J Neurobiol.* 2004;58:287–94.

-
- ⁷³ Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1–14.
- ⁷⁴ Kemp RW. Housing, feeding, and maintenance of rodents. In: Tatlisumak T and Fisher M. *Handbook of Experimental Neurology methods and techniques in animal research.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006.p.19-32.
- ⁷⁵ Aguayo AJ, Bray GM. Cell interactions studied in the peripheral nerves of experimental animals. In: Dyck, Thomas, Lambert, Bunge. *Peripheral Neuropathy, volume I, 2ª edição.* W. B. Saunders Company; 1984.p.360-377.
- ⁷⁶ Midha R. Peripheral Nerve: Approach to the Patient. In: Winn HR. *Youmans Neurological Surgery.* Saunders; 2004.p.3819-30.
- ⁷⁷ Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1998;21:1095-97.
- ⁷⁸ Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98:1264-71.
- ⁷⁹ Discussão de artigo por: Mackinnon SE. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98:1272-74.
- ⁸⁰ 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. Discussion by E Watkins.
- ⁸¹ Discussão de artigo por: E Watkins. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83:137-39.
- ⁸² Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otol Head Neck Surg.* 1984;92:546,
- ⁸³ Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64(3-B): 750-6.
- ⁸⁴ Dellon AL, Mackinnon SE: Selection of appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg.* 1989;23:197-202.

⁸⁵ Wilgis EFS. Epineural repair: technique and long-term results. In Omer GE, Spinner M, Van Beek AL (eds). Management of peripheral nerve problems, 2nd edition. Philadelphia; WB Saunders; 1998.p 271-3.

⁸⁶ Terzis JK, Smith KJ. Repair of severed peripheral nerves: Comparison of the "de Medinaceli" and standard microsuture methods. *Exp Neurol.* 1987;96:672-80.

⁸⁷ Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci.* 1979;25:171-80.

⁸⁸ Jolicouer FB, Rondeau DB, Hamel E, Butterworth RF, Barbeau A. Measurements of ataxia and related neurological signs in the laboratory rat. *Can J Neurol Sci.* 1979;6:209-15.

⁸⁹ Newby MB, Norton S. Detection of subtle effects on the locomotor ability of chicken. *Neurobehav Toxic Terat.* 1981;3:45-8.

⁹⁰ De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77:634-43.

⁹¹ Carlton JM, Goldberg NA. Quantification of integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum.* 1986;37:611-19.

⁹² Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat: Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery.* 1989;10:220-6.

⁹³ McFarlane KR, Pollock M, Myers DB. Collagen and Protein Content of Autopsied Peripheral Nerve. *Acta Neuropathol(Berl).* 1980;50:167-8.

⁹⁴ Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11, 447-55.

⁹⁵ Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Path* 1973; 150, 174-187.

⁹⁶ Lowry A, Wilcox D, Masson EA, Williams PE. Immunohistochemical methods for semiquantitative analysis of collagen content in human peripheral nerve. *J Anat.*1997;191:367-74.

⁹⁷ He C, Chen Z, Chen Z. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery.* 1992;13:151-4.

-
- ⁹⁸ Maragh H, Meyer BS, Davenport D, et al. Morphofunctional evaluation of fibrin glue versus microsuture nerve repairs. *J Reconstr Microsurg.* 1990;6:331-7.
- ⁹⁹ Cham RB, Peimer CA, Howard CS, Walsh WP, Eckert BS. Absorbable versus nonabsorbable suture for microneurography. *J Hand Surg (AM).* 1984;9:434-40.
- ¹⁰⁰ Szal GJ, Miller. Surgical repair of facial nerve branch. An analysis of different sheathing and suturing techniques. *Arch Otolaryngol.* 1975 Mar; 101(3):160-5.
- ¹⁰¹ Jenq CB, Coggeshall RE. Effects of sciatic nerve regeneration on axonal populations in tributary nerves. *Brain Res.* 1984;295:91-100.
- ¹⁰² Jenq CB, Coggeshall RE. Numbers of regenerating axons in parent and tributary peripheral nerves in the rat. *Brain Res.* 1985;326:27-40.
- ¹⁰³ Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve.* 1991;14:1116-22.
- ¹⁰⁴ Gutman E, Sanders FK. Recovery of fiber numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J Physiol.* 1943;101:489-518.
- ¹⁰⁵ Hall K. Nerve Repair: A Neurobiologist's view. *J Hand Surg Br.* 2001;2(26B):129-36.
- ¹⁰⁶ Jiang X, et al.. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp neurol.* 2009, doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.009.
- ¹⁰⁷ Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J.* 2005;272(11):2628-37.
- ¹⁰⁸ Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J.* 2005;272(11):2628-37.
- ¹⁰⁹ Trumble TE, Archibald S, Allan CH. Bioengineering for Nerve Repair in the Future. *J Hand Surg Am.* 2004;3(4):134-42.
- ¹¹⁰ Atkins S et al. Scarring impedes regeneration at sites of peripheral nerve repair. *Neuroreport.* 2006a;17:1245-49.
- ¹¹¹ Atkins S et al. Interleukin-10 reduces scarring and enhances regeneration at a site of sciatic nerve repair. *J Peripher Nerv Syst.* 2007 Dec;12(4):269-76.

-
- ¹¹² Pleasure D, Bora FW, Lane J, Prockop D. Regeneration after nerve transection: Effect of inhibition of Collagen Synthesis. *Exp Neurol.* 1974;45:72-8.
- ¹¹³ Lane J, Bora W, Pleasure D. Neuroma scar formation in rats following peripheral nerve transaction. *J Bone joint Surg.* 1978;60A:197.
- ¹¹⁴ Hastings JC, Peacock EE Jr. Effect of injury, repair and ascorbic acid deficiency on collagen accumulation in peripheral nerves. *Surg Forum.* 1973;24:516.
- ¹¹⁵ Graham W, Patakey P, Calabretta A, Munger B, Buda M. Enhancement of peripheral nerve regeneration with triamcinolone after neurography. *Surg Forum.* 1973;24:457-61.
- ¹¹⁶ Bucko CD, Joynt RL, Grabb WC. Peripheral nerve regeneration in primates during D-penicillamine-induced Lathyrism. *Plast Reconstr Surg.* 1981;67:23-31.
- ¹¹⁷ Wehling P, Pak M, Cleveland S, Nieper R. The influence of bacterial collagenase on regeneration of severed rat sciatic nerves. *Acta Neurochir (Wien).* 1992;119:121-7.
- ¹¹⁸ Rydevik M, Bergstrom F, Mitts C, Danielson N. Locally-applied collagenase and regeneration of transected and repaired rat sciatic nerves. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2002;36:193-6.
- ¹¹⁹ Nachemson AK, Lundborg G, Myrhage R, Rank F. Nerve regeneration and pharmacological suppression of the scar reaction at the suture site. An experimental study on the effect of estrogen-progesterone, methylprednisolone-acetate and CIS-hydroxyproline in rat sciatic nerve. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1985;19:255-60.
- ¹²⁰ Davison SP, McCaffrey TV, Porter MN, Manders E. Improved Nerve Regeneration With Neutralization of Transforming Growth Factor-beta 1. *Laryngoscope.* 1999 Apr;109(4):631-5.
- ¹²¹ Cruz NI, Debs N, Fiol RE. Evaluation of Fibrin Glue in Rat Sciatic Nerve Repairs. *Plast Reconstr Surg.* 1986;78(3):369-73.