Fabiano Inácio de Souza

**Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta
na regeneração nervosa. Estudo experimental
em camundongos isogênicos (C57BL/6J)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Valdir Zumioti

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Fabiano Inácio de

Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração nervosa. Estudo experimental em camundongos isogênicos (C57BL/6J) / Fabiano Inácio de Souza. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Arnaldo Valdir Zumiotti.

Descritores: 1.Neuregulinas 2.Nervo ciático 3.Células de Schwann
4.Regeneração nervosa 5.Camundongos

USP/FM/SBD-419/07

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está em concordância com:

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 Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2ª ed.- São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP, 2005.

Terminologia Anatômica em Português conforme a TERMINOLOGIA ANATÔMICA INTERNACIONAL DA FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY – FCAT (COMISSÃO FEDERATIVA DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1 Ed São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.

Terminologia e definições estatísticas conforme o GUIA PARA EXPRESSÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO, 2ª ed. do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Edição revisada, 1998 – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

Referências: seguiu-se normas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver, 2005).

*“Contudo, seja qual for o grau a que chegamos,
o que importa é prosseguir decididamente.”*
Fil. 3,16

*“É Deus quem me cinge de coragem e aplanar o
meu caminho.”*
Sal. 17,33

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Darci, alicerce da família, sempre irradiando amor,
carinho, alegria e esperança.*

*Ao meu pai, José Antônio, pelo amor e apoio incondicional em
todas as fases da minha vida.*

*Ao meu padrinho, Osvaldo, ícone da perseverança, pela
confiança em mim depositada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Arnaldo Valdir Zumioti, exemplo de determinação, competência e responsabilidade, pelo incentivo neste projeto e apoio na minha formação profissional e acadêmica.

Ao Professor Doutor Ciro Ferreira da Silva, por apresentar-me os caminhos da pesquisa científica, por meio da sua integridade moral, idoneidade e paciência.

Ao Professor Doutor Rames Mattar Júnior, admirado por sua inteligência, educação e carisma, pela ajuda nesta dissertação e pela oportunidade de convivência.

Ao Doutor Mário Yoshihide Kuwae, verdadeiro mestre, exemplo profissional, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos Doutores Marcelo Rosa de Rezende, Samuel Ribak, Luiz Kioti Kimura, grandes amigos, pesquisadores e incentivadores.

Ao técnico do Laboratório de Microcirurgia do IOT, Gustavo Bispo dos Santos, pela amizade, cooperação e perseverança.

Aos funcionários do IOT Jane Donini dos Santos, Veroneide de Andrade Folha, Diva Godoi, Tomaz Puga Leivas e Luciana Cristina da Silva Menezes, profissionais dedicados e competentes, pelo auxílio nesta dissertação.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
4. MÉTODOS.....	46
4.1 MATERIAL.....	47
4.2 METODOLOGIA.....	49
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5. RESULTADOS.....	69
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	86
8. REFERÊNCIAS	88

Lista de Abreviaturas

aFGF: ácido fibroblástico

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CNTF: fator neurotrófico ciliar

FGF1: fator de crescimento de fibroblastos

GM1: gangliosídeo

GDNF: fator neurotrófico derivado de célula glial

IGF1: fator de crescimento *insuline-like*

NGF: fator de crescimento neural

NT3: neurotrofina

Lista de Símbolos

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

mg: miligrama

mm: milímetro

M: massa molar

ng: nanograma

pH: concentração de Hidrogênio

UI: Unidade Internacional

μl: microlitro

μm: micrômetro

μM: micromol

%: por cento

°C: grau Celsius

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema que demonstra agulha transfixando a prótese de polietileno	51
Figura 2.	Exteriorização da agulha	51
Figura 3.	Esquema demonstrando a transfixação do epineuro, da superfície interna para a externa	52
Figura 4.	Agulha penetrando a prótese, de dentro para fora, lateralmente ao primeiro orifício.....	52
Figura 5.	Desenho reproduzindo a fase de preparação do tensionamento das extremidades do fio	53
Figura 6.	Esquema demonstrando o nervo invaginado.....	53
Figura 7.	Coto do nervo fixado à prótese por ponto de sutura convencional.....	54
Figura 8.	Desenho representando a introdução do colágeno	54
Figura 9.	Esquema do tubo implantado, contendo colágeno	55
Figura 10.	Exposição do nervo ciático (NC) esquerdo.....	56
Figura 11.	Esquema demonstrando a exposição do nervo ciático (NC)	56
Figura 12.	Coto proximal (CP) implantado no tubo de polietileno (TP) e extremidade distal da prótese transfixada pelo fio de sutura	57
Figura 13.	Desenho esquemático da implantação do tubo de polietileno no coto proximal (CP)	57

Figura 14. Tubo de polietileno contendo colágeno (C) e selante de fibrina (SF) nas extremidades	59
Figura 15. Esquema final do implante do tubo contendo colágeno (C) e selante de fibrina (SF) nas extremidades	59
Figura 16. Exposição da prótese de polietileno contendo cabo de regeneração (CR).	62
Figura 17. Desenho que demonstra o nervo regenerado (CR).....	62
Figura 18. Corte histológico do grupo Colágeno.....	64
Figura 19. Corte histológico do grupo Colágeno e neuregulina 1-alfa	65
Figura 20. Corte histológico do grupo Colágeno e neuregulina 1-beta	65

Lista de Tabelas

- TABELA 1.** Contagens de axônios, NA seção transversal do nervo ciático dos camundongos, obtidas das amostras controle (nervo Íntegro) e obtidas dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta70
- TABELA 2.** Estatística descritiva do número de axônios contados na seção transversal do nervo ciático regenerado das amostras obtidas dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta (nervo regenerado). Avaliação da normalidade pelo coeficiente de variação de pearson e pela prova de Kolmogorov-Smirnov. Comparação pela análise de variância ($\alpha=0,05$)71
- TABELA 3.** Estatística descritiva do número de axônios contados na seção transversal do nervo ciático das amostras controle (nervo íntegro) e obtidas dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno ou neuregulina 1-beta. Avaliação da normalidade pelo coeficiente de variação de pearson e pela prova de Kolmogorov-Smirnov. Comparação do nervo controle e cada regenerado pelo teste t de student ($\alpha=0,05$).....72

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1. Contagens de axônios, na seção transversal do nervo ciático dos camundongos, obtidas das amostras controle (nervo íntegro) e obtidas dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta (nervo regenerado).....	73
--	----

Resumo

Souza FI. *Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração nervosa. Estudo experimental em camundongos isogênicos (C57BL/6J)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 99p.

OBJETIVO: avaliar o efeito das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração de nervos ciáticos de camundongos C57BL/6J, adultos, machos, através da técnica de tubulização. **MÉTODOS:** Utilizaram-se 18 animais, divididos em 3 grupos, implantando-se prótese de polietileno em falhas de 4,0 mm no nervo ciático esquerdo: grupo 1 contendo apenas colágeno purificado (Vitrogen®); grupo 2, colágeno associado a neuregulina 1-alfa; grupo 3 com colágeno e neuregulina 1-beta. O grupo controle foi formado por 6 segmentos de nervos ciáticos direitos. Após 4 semanas, os animais foram sacrificados; extraiu-se segmento do ponto médio do nervo regenerado no interior das próteses, padronizaram-se cortes histológicos e confecção das lâminas para análise histomorfométrica. Confrontaram-se os resultados estatisticamente. **RESULTADOS:** Os animais tratados com neuregulinas tiveram maior número de axônios mielinizados, com diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo colágeno. Não houve diferença estatística entre os grupos de neuregulinas 1-alfa e 1-beta. **CONCLUSÃO:** a adição de neuregulinas proporcionou aumento significativo do número de fibras mielinizadas.

Descritores: 1.neuregulina 2.nervo ciático 3.células de Schwann 4.regeneração nervosa 5. camundongo

Summary

Souza FI. *Neuregulins 1-alpha e 1-beta on the regeneration the sciatic nerves of (C57BL/6J) isogenic mice using the tubulization technique* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 99p.

PURPOSE: To evaluate the effect of neuregulins 1-alpha and 1-beta on the regeneration the sciatic nerves of male adult C57BL/6J mice, using the tubulization technique. **METHODS:** Eighteen animals were used, divided into three groups. A polyethylene prosthesis was implanted in a 4.0 mm defect of the left sciatic nerve, as follows: group 1 containing only purified collagen (Vitrogen®); group 2, collagen with neuregulin 1-alpha; group 3, collagen with neuregulin 1-beta. The control group was formed by six segments of right sciatic nerves. Four weeks later, the animals were sacrificed. A segment from the midpoint of the nerve regenerated inside the prostheses was extracted, histological sections were standardized and slides were made up for histomorphometric analysis. The results were statistically compared using the Tukey multiple comparisons test and Student's t test. **RESULTS:** The animals treated with neuregulins had greater numbers of myelinated axons, with a statistically significant difference in relation to the collagen-only group. There was no statistical difference between the neuregulin 1-alpha and 1-beta groups. **CONCLUSION:** It was concluded that the addition of neuregulins provided a significant increase in the number of myelinated fibers.

Descriptors: 1-neuregulin 2.sciatic nerve 3.Schwann cells 4.nerve regeneration 5.mice

1. INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas do sistema nervoso constituem um grave problema de saúde pública, pois geralmente acometem indivíduos na idade produtiva, demandam altos custos de internação e reabilitação, longos períodos de afastamento do trabalho e determinam grande número de seqüelas.

No Brasil, não há estatísticas confiáveis acerca do número de pacientes vítimas das lesões neurológicas pós-traumáticas. Estima-se em 500.000, por ano, o número de novos casos nos Estados Unidos, cujo custo de tratamento hospitalar varia de 15.000 a 60.000 dólares por paciente (Spencer, 2006).

Desde o primeiro relato de tratamento de lesão do sistema nervoso periférico (Ferrara, 1608, citado por Belkas, 2004), constitui-se no maior desafio à cirurgia reconstrutiva e à microcirurgia a obtenção de resultados satisfatórios após o reparo nervoso (Johnson *et al.*, 2005).

A introdução de técnicas microcirúrgicas no tratamento de lesões nervosas (Millesi, 1967, citado por Millesi, 1984), o desenvolvimento de material específico (pinças, tesouras, porta-agulhas, etc), o avanço da tecnologia da microscopia, o treinamento especializado, ainda não

proporcionam a completa regeneração neurológica, ocasionando déficits de sensibilidade e motricidade (Johnson *et al.*, 2005; Hall, 2005).

O afrontamento dos cotos lesionados seguido de epineurorrafia sob visão magnificada, a ausência de tensão excessiva, utilização de fios e instrumental apropriados, constitui o padrão-ouro de tratamento na fase aguda. Após este período, não há a possibilidade da coaptação das extremidades lesionadas sem proporcionar tensão excessiva (Battiston *et al.*, 2005).

Nestas situações, a auto-enxertia, utilizando-se o nervo sural, o cutâneo medial do antebraço, o safeno, dentre outros, é amplamente empregada. Esta técnica proporciona resultados aquém dos padrões normais, sempre lesa estruturas íntegras, ocasionando seqüelas, como parestesias, anestésias, hiperestesias, cicatrizes, neuromas, dor crônica (Lundborg *et al.*, 2004).

Uma alternativa promissora à auto-enxertia é a técnica de tubulização, que consiste na introdução das extremidades dos nervos em próteses cilíndricas, objetivando direcionamento axonal, a proteção do cone de crescimento da fibrose adjacente, a orientação longitudinal da neovascularização. Ainda possibilita a contenção de fatores neurotróficos endógenos e exógenos, proporcionando baixa morbidade e a diminuição do tempo cirúrgico (Battiston *et al.*, 2005).

Atualmente tem sido descritos e utilizados em pesquisas experimentais vários tipos de próteses, como polietileno, colágeno, silicone, poliésteres, veias, artérias, âmnion humano, dentre outras (Meek e Coert, 2002).

A capacidade de contenção de substâncias exógenas promovida por esta técnica possibilita o estudo de inúmeros fatores promotores da regeneração neuronal, como aFGF, cardiotrofina-1, oncostatina-M, GM1, CNTF, GDNF, NT-3, NGF, neuregulinas (Ohbayashi *et al.*, 1996; Chamberlain *et al.*, 1998; Terenghi, 1999; Gama, 2000; Cai *et al.*, 2004; Kingham e Terenghi, 2006).

As neuregulinas constituem uma família de fatores de crescimento e de diferenciação responsáveis por inúmeros papéis no sistema nervoso (Esper *et al.*, 2006). Nas células de Schwann, as neuregulinas promovem a proliferação, a diferenciação, a sobrevivência, a maturação e a mielinização (Leimeroth *et al.*, 2002; Falls, 2003; Lyons *et al.*, 2005).

A fisiologia do sistema nervoso periférico depende diretamente da integridade da bainha de mielina, onde as células de Schwann exercem papel fundamental, desde a remielinização após lesão até o equilíbrio funcional (Kang *et al.*, 2003).

A atuação das neuregulinas nas células de Schwann seriam decorrentes da sua capacidade de ativação dos receptores erbB, que

determinariam as ações citadas (Geuna *et al.*, 2003; Lyons *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Apesar do grande potencial no processo de regeneração do sistema nervoso periférico, as pesquisas das neuregulinas *in vivo* são praticamente inexistentes (Cai *et al.*, 2004; Atanasoski *et al.*, 2006).

A relevância deste estudo decorre da possibilidade de utilização de neuregulinas contidas em condutos artificiais, em substituição ao auto-enxerto, no reparo das lesões do sistema nervoso periférico. No futuro, essa modalidade de tratamento poderá proporcionar melhores resultados na prática clínica.

2. OBJETIVO

Avaliar pela morfometria a mielinização axonal de nervos ciáticos de camundongos C57BL/6J, empregando-se neuregulinas 1-alfa e 1-beta, utilizando-se a técnica de tubulização.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Ferrara (1608), citado por **Belkas (2004)**, descreve a primeira tentativa de reparo de lesão nervosa.

Huber (1895), citado por **Belkas (2004)**, aponta possibilidades de reconstrução neurológica em lesões que apresentam falhas, cujas tentativas passariam por encurtamento ósseo, flexão articular, estiramento dos cotos, enxertos e pontes de material orgânico ou sintético.

Wrede (1909), citado por **Meek (2002)**, utiliza, pela primeira vez, enxerto de veia na reconstrução de lesão do nervo mediano, em paciente de 27 anos de idade. Após seguimento de 2 meses, descreve bons resultados, com retorno da sensibilidade e movimentação do polegar.

Bahia (1920) apresenta dissertação de mestrado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, citando duas correntes relacionadas à regeneração nervosa após lesão. Lembra Bethe, Van Gehchten, Apthi, afirmando que a regeneração distal é proveniente do próprio segmento. Já His, Cayal, Lugano, Perroncito, Kupffer, Harrison são defensores da “teoria da continuidade”, a qual afirma que a regeneração é continuidade do segmento proximal. Menciona a possibilidade de utilização

de enxertos heterólogo, autólogo, pediculado ou não. Afirma que as células de Schwann são originadas do neurotropismo do coto distal, não exercendo ação neurotrófica sobre os “cilindros eixos” do coto proximal.

Ramon y Cajal (1928), citado por **Dahlin (2001)**, edita livro sobre o processo da regeneração nervosa, descrevendo sua estrutura após lesão traumática e possibilidades de reparo.

Sanders (1942), citado por **Belkas (2004)**, divide o tratamento de lesões de nervos com falhas em dois grupos: cirurgias com confecção de pontes (enxertos, transposições ou tubos) e procedimentos manipulativos (afrontamento das extremidades a qualquer custo).

Garrity (1955), citado por **Meek (2002)**, descreve, pela primeira vez, o emprego clínico de tubos de polietileno em três pacientes portadores de defeitos de nervo radial de 70 a 150 mm.

Sunderland (1978) preconiza que o desaparecimento da bainha de mielina inicia-se após o segundo dia de lesão axonal. Já os condutos de membrana basal do coto distal permanecem íntegros após ausência do axônio e bainha de mielina.

Lundborg et al. (1982) descrevem a importância da presença do coto distal no crescimento axonal pela técnica de tubulização. Utilizam 24 ratos

adultos Spague-Dawley, divididos em 2 grupos. Confeccionam defeitos de 6 mm entre os cotos. No grupo A, ocorre invaginação de ambos os cotos no interior da prótese, enquanto, no segundo grupo, não há introdução do coto distal. Dois animais são sacrificados em diferentes intervalos de tempo (3,7,14,21,28,42,90 dias). Observam que, na ausência do coto distal, os tecidos vascular e conectivo possuem estruturas delgadas, além de diminuição do número de axônios. Ressaltam a importância da presença do coto distal na regeneração neuronal.

Millesi (1984) afirma que os resultados das neurorrafias, empregando-se enxertos fasciculares, são superiores à coaptação direta entre os cotos com tensão excessiva.

Henry et al. (1985) testam tubos de poliésteres simples e compostos, de diversos diâmetros e comprimentos, no reparo de lesões de nervo ciático de camundongos C57BL\6J e BALB\c. Os resultados são coletados de 3 semanas a 2 anos. Demonstram claramente maior número de fibras mielinizadas nos tubos com maior diâmetro interno. Sugerem que os principais fatores de sucesso no procedimento são a capacidade de suporte do edema e deformação das paredes dos tubos. Destacam as características do tubo ideal: diâmetro interno adequado, estabilidade das paredes, baixa toxicidade, biodegradabilidade, baixo custo e facilidade de esterilização.

Jenq e Coggeshall (1987) apresentam estudo experimental em 14 ratos Sprague-Dawley, onde comparam a regeneração axonal entre tubos permeáveis e impermeáveis, em falhas de 16 mm. Após seis semanas, demonstram maior número de axônios mielinizados nos tubos permeáveis, com diferença estatisticamente significativa. Mencionam a ausência de brotamento lateral e possibilidade dos poros em proporcionar migração de substâncias neurotróficas circunvizinhas.

Zumiotti (1987) compara duas técnicas cirúrgicas de utilização de auto-enxerto longo no tratamento de lesões de nervos em 14 coelhos. Sutura convencional em tempo único e em dois tempos. Não demonstra diferença estatisticamente significativa do número de fibras mielinizadas entre os métodos.

Cordeiro et al. (1988) realizam estudo experimental, objetivando avaliar a regeneração axonal, empregando-se fator neurotrófico. Após adição de ácido fibroblástico purificado (aFGF) em tubos de colágeno, o aumento do número de axônios mielinizados através de falha de 5,0 mm é estatisticamente significativo. Enfatizam ser este o primeiro e altamente purificado fator neurotrófico testado, desde que fator de crescimento tem mostrado promover regeneração de nervo *in vivo*. Concluem que este estudo fornece meios convenientes e quantitativos para avaliar os efeitos dos fatores neurotróficos na regeneração de nervos *in vivo*.

Silva et al. (1988) adotam modelo experimental em que tubos vazios são comparados a tubos contendo laminina ou colágeno, em perdas de 20 e 25 mm, em 18 ratos Sprague-Dawley. Os dados são coletados após 4 a 16 semanas, demonstrando a capacidade de tubos preenchidos por colágeno ou laminina determinarem mielinização de axônios em grandes distâncias. Acreditam que estas substâncias forneceriam substratos à regeneração.

Mattar Júnior (1989) testa o adesivo de fibrina na reparação cirúrgica de nervos, comparando-o à sutura epineural, através de análise histológica e resistência à tração. Não demonstra diferença significativa entre os métodos de reparo.

Suematsu (1989) expõe a dificuldade de coaptação dos cotos neurais em lesões com falhas. Discute as diversas técnicas de tubulização, ressalta a necessidade de evolução das técnicas microcirurgicas e conhecimentos em imunologia e neurobiologia. Enfatiza que o enxerto interfascicular deve ser analisado não apenas como um tubo de direcionamento axonal, mas sim como depósito de fatores neurotróficos, os quais devem ser pesquisados e utilizados clinicamente em técnicas de tubulização.

Hentz et al. (1991) confrontam técnicas de sutura epineural, perineural e tubulização fascicular, onde há remoção do epineuro, formando falhas de 1 a 1,5mm em nervos mediano e ulnar de macacos da espécie *Macaca fascicularis*. Análises eletrofisiológicas demonstram que a condução

axonal através do sítio de reparo não difere significativamente entre as três técnicas, apesar da sutura epineural apresentar melhor padrão de condução. Histologicamente, não há diferença estatisticamente significativa entre as técnicas. Ponderam que a tubulização fascicular ainda não deve ser empregada clinicamente, devendo-se desenvolver tubos de melhor qualidade.

Holmes et al. (1992) identificam subtipos de neuregulinas, sugerindo maior grau de afinidade do subtipo alfa perante ao beta, na ativação de receptores erbB2.

Archibald et al. (1994) comparam três diferentes tipos de reparo de 15 nervos medianos e um ulnar em macacos (*Macaca fascicularis*), ao nível do punho. Resultados obtidos através de sutura direta, enxerto de nervo e tubulização por colágeno, em defeito de 5 mm, são analisados por eletrofisiologia, durante 42 meses, onde ocorre avaliação histológica. Não são demonstradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Concluem ressaltando as qualidades da técnica de tubulização de nervos e preconizando sua utilização em humanos com perdas até 5 mm.

Podhajsky et al. (1994) estudam a neovascularização endoneural durante o processo de regeneração de nervo ciático em ratos 2, 3, 4 e 52 semanas após tubulização. Secções transversais seriadas são analisadas, quantificando-se o número de vasos, densidade capilar e perímetro luminal

por área do nervo. Os resultados indicam que o crescimento vascular relativo ao tecido existente no tubo aumenta em um pico além dos níveis normais e, mais tarde, diminuem para valores associados ao grupo controle. Enquanto este crescimento, que ocorre a partir dos cotos distal e proximal, surge, predominantemente, como uma onda em movimento na direção proximal-distal, precedendo o crescimento neural do coto proximal. Concluem, enfatizando a diferença do padrão de angiogênese relatado em estudos prévios após lesão por esmagamento e a possibilidade da formulação de modelo do padrão regenerativo do sistema nervoso periférico.

Dunnen *et al.* (1995) defendem a possibilidade de reconstrução de lesão de nervo através da utilização de tubos biodegradáveis. Pesquisam os efeitos do diâmetro interno e espessura de parede em tubos de polímeros de ácido láctico caprolactone. Quatro tipos são avaliados: diâmetros internos de 1,12 e 1,23 mm e espessura de parede de 0,34 e 0,68 mm. Avalia a biodegradabilidade, reação de corpo estranho e o padrão regenerativo em três intervalos de tempo distintos (1, 2, 3 meses). Após 2 meses, observa-se opacificação, edema e diminuição da resistência em todos os grupos. A reação de corpo estranho é caracterizada pela presença de células gigantes e fibroblastos em torno do tubo em degradação. Concluem que o tubo, com diâmetro interno de 1,23 mm e espessura de 0,34 mm, pode assegurar melhor regeneração em falha de 1,0 cm em nervo ciático de ratos. Tubos com espessuras superiores e menor diâmetro interno podem comprometer a regeneração devido à compressão pelo edema na fase de degradação.

Gulati et al. (1995) descrevem os efeitos do emprego de enxertos acelulares enriquecidos com células de Schwann. Utilizam três independentes estágios no processo, em diferentes grupos de ratos Fischer, machos e isogênicos: cultura de células de Schwann, obtenção de enxertos acelulares (nervo fibular pré-degenerado e congelado), transplante de nervo e avaliação dos resultados. Ao passo que o defeito de 2,0 cm do nervo ciático direito é reconstruído, utilizando-se enxerto enriquecido com células de Schwann; o nervo contralateral não as contém. Os dados examinados com 1, 2, 4 e 8 semanas demonstram, favorável ao grupo com células de Schwann, regeneração mais rápida, sistemática, organizada, qualitativamente superior, devido à ausência de tecido fibroso e formação de pequenos fascículos. Discutem a impossibilidade de descrição precisa dos fatores responsáveis por estes resultados. Atentam à clareza dos resultados distintos entre os dois grupos do estudo e ressaltam a importância de novos estudos, objetivando melhor conhecimento biológico desses achados.

Langone et al. (1995) citam as vantagens do emprego de tubos biodegradáveis e a necessidade de novas pesquisas, visando maior conhecimento ultra-estrutural, funcional e suas conseqüências na regeneração nervosa.

Grinspan et al. (1996) sugerem que as neuregulinas regulariam a apoptose na pré-mielinização das células de Schwann, via receptores erbB2 e erbB3. A administração exógena de neuregulina previniria a apoptose após

axotomia, ocasionando maior interação entre as células de Schwann e mielinização axonal.

Ohbayashi et al. (1996) utiliza próteses de silicone, em falhas de 10 mm, em nervo ciático de ratos, comparando os resultados entre tubos vazios, contendo colágeno, laminina ou pirimidina. Avaliações histológicas realizadas após três semanas, 6, 12 e 18 meses demonstram maior número de fibras mielinizadas nos grupos contendo laminina e pirimidina.

Meyer et al. (1997) confrontam tubulização do nervo ciático em ratos, epineurorrafia término-terminal e lesão por esmagamento. Avaliações eletromiográficas são expressas em 8 e 16 semanas, enquanto mensurações de contratilidade do músculo sóleo em 8, 16 e 32 semanas. A velocidade de condução do nervo ciático no grupos de esmagamento e transecção é significativamente menor quando comparado ao grupo controle em 8 e 16 semanas. O reparo epineural proporciona resultados superiores à tubulização em 8 semanas, não havendo diferença significativa em 16 e 32 semanas. Estes resultados demonstram que a tubulização é potencial alternativa ao reparo epineural.

Rosenbaun et al. (1997) demonstram, *in vitro*, que as neuregulinas estimulam as mitoses das células de Schwann.

Zhang et al. (1997) pesquisam, experimentalmente, a influência do volume de segmento do nervo distal sobre a regeneração em intervalo de 8,0 mm em tubo de silicone. Os ratos são divididos em quatro grupos de 8 animais, formados por segmentos distais de 5 mm, 1 mm ou a metade do volume de um segmento de nervo de 1 mm (seccionado longitudinalmente) inserido na extremidade distal de tubo de silicone de 11 mm. O grupo vazio, sem segmento de nervo, é usado como controle. Avaliam resultados obtidos através do diâmetro do axônio mielinizado, densidade, espessura da bainha de mielina e razão entre área mielinizada e área total no ponto médio do tubo de silicone, seis semanas após procedimento cirúrgico. Não há diferença significativa entre os grupos, mas sim entre estes e o controle. Concluem que a regeneração está diretamente relacionada com a presença de segmento distal e não com o volume deste segmento.

Chamberlain et al. (1998) testam a influência da composição dos tubos e presença de colágeno no seu interior, em perdas de 10 mm no nervo ciático. Dividem 21 ratos Sprague-Dawley em sete grupos: controle, tubo de silicone vazio, tubo de silicone contendo colágeno como matriz, tubo de colágeno poroso vazio, tubo poroso de colágeno contendo matriz, tubo de colágeno não poroso vazio, tubo de colágeno não poroso contendo matriz. Analisam a resposta celular local e do tecido conectivo, o número e distribuição dos axônios e presença de miofibroblastos (imunohistoquímica) após 6 semanas. Demonstram maior número de axônios e maior diâmetro de fibras em tubos contendo polímero de colágeno, além da presença de miofibroblastos ao redor dos tubos.

Davies (1998) elabora estudo explicativo sobre a dependência precoce das células Schwann a receptores específicos. As células de Schwann falham ao se desenvolverem em embriões de camundongos que não apresentam o receptor de neuregulina funcional erbB3 e a maioria dos neurônios motores e sensoriais, subseqüentemente, morrem nesses camundongos. Como o erbB3 atua autonomamente no desenvolvimento da célula de Schwann, mas não na sobrevivência neuronal, os neurônios dependem dessas células para sobreviverem. Pelo menos alguns neurônios são dependentes do suporte trófico intermediário derivado das células que seguem em direção a seus alvos periféricos, antes de se tornarem dependentes das neurotrofinas para sobreviverem. Recentes análises de camundongos sem erbB3 evidenciam que as células Schwann e/ou suas precursoras, que estão associadas com os axônios periféricos ao longo do percurso até seus alvos, são a maior fonte de suporte trófico para motoneurônios e para neurônios da raiz do gânglio dorsal. A morte de neurônios da raiz do gânglio dorsal em embriões deficientes de erbB3, em estágio no qual muitos axônios ainda estão crescendo em direção aos seus alvos, sugere que as células Schwann ou suas precursoras fornecem suporte trófico intermediário aos neurônios cujos axônios ainda não atingiram seu alvo final. Conclui que os neurônios são dependentes de suporte trófico de seus alvos de inervação no sistema nervoso periférico em desenvolvimento. Elucidar o fator derivado da célula Schwann que desempenha este proeminente papel de sustentar a sobrevivência dos neurônios motores e dos neurônios da raiz do gânglio dorsal é uma importante meta.

Stopiglia et al. (1998) investigam o emprego de prótese tubular e auto-enxerto em falhas de 1,0 cm do nervo ulnar em cães. Realizam análise morfométrica, medindo-se o diâmetro médio das fibras mielínicas e amielínicas e espessura da bainha de mielina. Demonstram não haver diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos após 26 semanas.

Jones et al. (1999) estudam a especificidade e afinidade dos domínios dos receptores erbB, revelando maior potência das neuregulinas beta.

Kim et al. (1999) demonstram o importante papel das neuregulinas nos mecanismos de diferenciação de células musculares embrionárias, em que o subtipo alfa possuiria maior potência quando comparado ao beta.

Bryan et al. (1999) introduzem células de Schwann em tubos de polietileno em perdas de 10 mm nos nervos ciáticos de 15 ratos Sprague-Dawley. Demonstram, através de imunohistoquímica, presença de células de Schwann exógenas e endógenas em 2 semanas de pós-operatório. Até 4 semanas não há aumento significativo destas células no interior dos tubos. Enfatizam o importante papel das células de Schwann nos estágios precoces pós-lesão, ressaltando a necessidade de realização de novas pesquisas.

Mohammad et al. (1999) demonstram método de utilização de âmnion humano na regeneração de nervos periféricos em ratos, comparando-o com enxerto autólogo e tubo de silicone, em perdas de 10

mm nos nervos ciáticos de ratos. Analisam os resultados após 2, 4, 10 e 17 semanas, através da histologia e do índice ciático. Tubulização por âmnion é equivalente ao enxerto autólogo e superior ao silicone. Enaltecem as características de biodegradabilidade, facilidade de obtenção, maleabilidade, resistência, baixa imunogenicidade dos tubos de âmnion, aproximando-os dos tubos ideais.

Terenghi (1999) elabora artigo de revisão sobre a regeneração de nervos e potencialidades dos fatores neurotróficos. O papel destes fatores na manutenção e sobrevivência dos neurônios tem sido o tema de inúmeras pesquisas. Administração de fatores neurotróficos exógenos, após dano neuronal, tem o objetivo de mimetizar o efeito fisiológico de substâncias produzidas em órgãos-alvo e atuando em células neuronais. Após axotomia e durante regeneração nervosa, neurotrofinas NGF, NT-3 e BDNF mostram um bem definido e seletivo efeito benéfico na sobrevivência e expressão fenotípica dos neurônios sensoriais primários. Outros fatores neurotróficos, tais como CNTF e GDNF também exercem uma variedade de ações nas células neuronais, que parecem sobrepor e complementar as ações da neurotrofinas. Em adição, existe uma contribuição indireta do GGF para a regeneração do nervo. GGF é produzido por neurônios e estimula a proliferação das células de Schwann, sublinhando a íntima interação entre células gliais e neuronais durante o processo regenerativo. Diferentes possibilidades têm sido investigadas para se utilizarem fatores de crescimento em neurônios lesionados, em busca de um sistema adaptável

às aplicações clínicas. Os estudos revisados, nesse artigo, demonstram o potencial terapêutico de vários fatores neurotróficos para o tratamento de lesões de nervos e neuropatias.

Flores et al. (2000) elaboram artigo de revisão sobre a anatomia, fisiologia e reparo do sistema nervoso periférico. Apontam as contradições existentes entre o bem estabelecido conhecimento da anatomia e técnicas de reparo direto e o obscuro tema da fisiopatologia pós-traumática. Discorrem acerca das principais alterações do corpo celular, segmentos proximal e distal, degeneração walleriana. Citam cromatólise, migração celular, interações metabólicas, migração e proliferação das células de Schwann, fatores neurotróficos. Preconizam o desenvolvimento de novas linhas de pesquisa, focando o entendimento das interações metabólicas.

Gama (2000) testa as neuroquinas cardiotrofina-1 e oncostatina-M, na regeneração de nervos ciáticos em camundongos C57BL/6J, através de tubulização por polietileno, em falhas de 4,0 mm. Após quatro semanas, conclui que há favorecimento da regeneração com o emprego destas neurotrofinas.

Garratt et al. (2000) revisam a literatura sobre a neuregulina e seu importante papel nas funções da célula de Schwann. As neuregulinas atuam no desenvolvimento precoce das células na crista neural, na sobrevivência e crescimento das células de Schwann. Enfatizam que a

disponibilidade de neuregulina-1 é restrita, apenas as células de Schwann em contato axonal direto sobrevivem. A descoberta das isoformas de neuregulina-1 resulta em complexa nomenclatura, estando adotado, neste estudo, os tipos I-III relacionados às principais isoformas. Neuregulina-1 tipo I (receptor de acetilcolina) manifesta-se no desenvolvimento precoce, fornecendo o sinal de direcionamento exigido para o desenvolvimento inicial do sistema nervoso simpático. Neuregulina-1 tipo II (fator de crescimento glial, GGF) manifesta-se, mais tardiamente, e é produzida por neurônios na raiz do gânglio dorsal e na medula, permitindo a sobrevivência das células Schwann precursoras e providenciando que elas estejam próximas a essas fontes. Neuregulina-1 tipo III (fator derivado de neurônio sensorial motor) é a principal isoforma produzida por neurônios sensoriais e motores, que se manifesta no cérebro e contém uma transmembrana e domínio citoplasmático, responsável por fornecer o sinal específico ao axônio. Enfatizam que a neuregulina-1 e seus receptores são absolutamente necessários para o desenvolvimento das células de Schwann *in vivo*. Estas células são especializadas em formar bainha de mielina em axônios periféricos e fornecer isolamento elétrico. Concluem que as neuregulinas controlam vários eventos da diferenciação da linhagem da célula de Schwann e determinam se um axônio será mielinizado ou não, ressaltando que as funções da neuregulina, no desenvolvimento da célula Schwann, estão firmemente estabelecidas *in vitro* e *in vivo*.

Herrera et al. (2000) relatam o importante papel exercido pelas células de Schwann na maturação das sinapses neuromusculares.

Lundborg (2000) descreve a presença de alterações no córtex cerebral após reparo de lesões neurológicas. Afirma que sempre ocorrem mudanças na reorganização sináptica após trauma ou amputação.

Dadalt Filho (2001) demonstra os resultados insatisfatórios inerentes ao reparo nervoso com tensão excessiva entre os cotos.

Dahlin et al. (2001) estudam as respostas locais à utilização de tubos de silicone no reparo de lesões de nervos mediano e ulnar, em humanos. Sete pacientes, com idade média de 20 anos, (de 15 a 49) são incluídos no estudo, prospectivamente. Os diâmetros dos tubos excedem em um terço o diâmetro dos nervos, com falha entre os cotos de 3 a 4 mm. Após 12 a 44 meses, os pacientes são reoperados objetivando a retirada da prótese. Em todos os casos, não se observam sinais inflamatórios macroscópicos nas proximidades dos tubos, os quais se apresentam envoltos por fina cápsula fibrosa. Microscopicamente, quatro de seis cápsulas examinadas consistem em tecido conectivo, pequenos vasos sangüíneos, sem sinais de reação granulomatosa ou inflatória crônica. Em apenas dois casos, foram encontrados macrófagos em tecidos circunvizinhos à prótese. Concluem que os tubos de silicone podem ser utilizados como pontes entre cotos de nervos lesados em humanos. Ponderam a necessidade de novos estudos, a fim de se desenvolverem próteses absorvíveis, resistentes e sem reação inflamatória crônica.

Dahlin e Lundborg (2001) propõem discussão acerca dos eventos relacionados à regeneração de nervos periféricos e potencialidades da utilização de tubos como condutor axonal. Ressaltam a multiplicidade de fatores envolvidos no processo regenerativo, tais como eventos moleculares, bioquímicos, celulares, nível de comprometimento dos órgãos-alvo (mecanorreceptores sensoriais, músculos), lesões no segmento distal do nervo, sitio do trauma, corpo celular do neurônio, localização do trauma medular, subcortical ou cortical no cérebro. Objetivando criação de microambiente favorável, o reparo de lesões com pequenas perdas utilizando-se tubos, pode servir de depósito dos fluidos produzidos no local, como fatores neurotróficos, citocinas, células inflamatórias. Tais elementos são encontrados no foco da lesão entre 3 e 6 horas após o trauma. Em poucos dias, matriz de fibrina se forma no interior do tubo, essencial ao processo regenerativo. Em direção à matriz, há migração do cone de crescimento proximal, células de Schwann e neovascularização. Ressaltam a possibilidade da tubulização de nervos no reparo também de lesões agudas e subagudas, e possibilidade dos tubos depositarem substâncias exógenas potencializadoras da mielinização.

Scherman et al. (2001) pesquisam a interposição de pequeno segmento de nervo entre cotos distantes 15 mm entre si, através de sutura caracterizada por três voltas entre as extremidades epineurais. Verificam aumento do número de células de Schwann e da contagem de axônios mielinizados no grupo com interposição de segmentos associados aos melhores resultados com a utilização deste método.

Itoh et al. (2002) comparam três diferentes situações em tubos de colágeno: irradiação ultravioleta (UV), aquecimento e imersão em glutaraldeído (GA). Lesões de 15 mm no nervo ciático são tubulizadas em 63 animais. O grupo controle é formado por enxerto autólogo. Após avaliação histológica em 1, 2, 4, 6, 8, 12 semanas. O interior dos tubos irradiados é preservado, havendo pequena infiltração celular e satisfatória regeneração. Ocorre rápida degeneração nos tubos tratados com aquecimento e muitos macrófagos são mobilizadas a remover os resíduos do colágeno. Os tubos imersos em GA mostram menor atividade celular e precário regenerado, comparado aos outros grupos. Concluem que irradiação UV, em tubos de colágeno, favorece a regeneração de nervos periféricos.

Jubran e Widenfalk (2002) defendem que fatores neurotróficos têm habilidades de promover a sobrevivência do neurônio e estimular o crescimento axonal, tornando-os excelentes candidatos para o uso clínico em reparo de nervos danificados. Investigam os possíveis efeitos benéficos do reparo do nervo ciático em 172 ratos Sprague-Dawley, utilizando-se selante de fibrina contendo fator de crescimento de nervo (NGF), fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF) ou ácido fibroblástico (aFGF). Avaliação histológica, realizada com 6 e 12 semanas após o reparo, não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. Quanto à regeneração de motoneurônios, através do emprego de FluoroGold®, houve diferença estatisticamente significativa a favor do grupo NGF. Discutem os melhores resultados obtidos nesse grupo, bem como as facilidades do emprego da técnica cirúrgica, enfatizando a necessidade de novas pesquisas.

Leimeroth et al. (2002) ressaltam o importante papel das neuregulinas na diferenciação e sobrevivência das células de Schwann. Demonstram essa afirmação, pesquisando células progenitoras derivadas da crista neural, através de marcadores específicos.

Maki (2002) revisa a literatura, questionando se as novas pesquisas experimentais asseguram aplicabilidade clínica, enfocando principalmente a presença de especificidade sensitiva ou motora das células de Schwann. Cita estudo, utilizando tubulização em “Y” invertido, com falha de 4 mm, onde o coto proximal é proveniente da raiz ventral de L5 (motora) ou nervo safeno (sensitivo), e os distais de segmentos de L5 e safeno. Demonstra que células de Schwann sensoriais induzem regeneração motora e sensorial, enquanto as células de Schwann motoras não promovem regeneração sensorial. Declara que as ausências de especificidade topográfica e seletividade da regeneração motora não suporta o emprego de tubos clinicamente. Enfatiza a ausência de tratamento do multidirecionamento axonal, onde sua minimização seria um grande passo à obtenção de melhores resultados clínicos.

Meek e Coert (2002) realizam extensa revisão da literatura sobre emprego clínico da tubulização de nervos. Discorrem sobre a não utilização clínica de pontes arteriais, ressaltam resultados satisfatórios, utilizando-se enxerto venoso em perdas de 5 a 35 mm, e apresentam relatos de tubos venosos preenchidos por músculo desnaturado, cujas falhas variam de 2 a

60 mm, em 84 casos. Descrevem a pequena experiência clínica referente aos tubos de silicone, sendo apenas 43 casos em 4 artigos, onde há necessidade de segundo tempo, cirúrgico visando à remoção do implante. Os tubos constituídos de ácido poliglicólico, absorvíveis, são descritos em 168 casos, obtendo-se bons resultados em defeitos até 30 mm. Concluem, enfatizando a importância clínica dos tubos absorvíveis na reconstrução de lesões de nervos.

Barcelos et al. (2003) comparam os resultados da tubulização, utilizando artérias e veias. Vinte e quatro ratos Wistar, divididos em 3 grupos, onde se realiza o reparo do nervo ciático, com falha de 10 mm, por enxerto de veia jugular ou artéria aorta, doados por animais isogênicos. O grupo controle, sem realização de cirurgia. Após 10 semanas, os animais são sacrificados, observando-se presença de fibras mielinizadas em todos os enxertos venosos. O grupo das pontes arteriais demonstra a ausência de regeneração intraluminal em dois casos, ausência de fibras mielinizadas no coto distal em dois casos. Ressaltam a possibilidade de utilização destes tecidos na condução da regeneração neuronal, embora as veias apresentem padrões morfométricos superiores.

Falls (2003) realiza revisão da literatura, analisando publicações dos últimos 10 anos sobre as funções das neuregulinas no sistema neuromuscular. Enfatiza a capacidade das neuregulinas na mediação intercelular no sistema nervoso e outros órgãos, desde a sinapse

neuromuscular, interações neurônio-gliais ao desenvolvimento e funções cardíacas. Descreve evidências *in vivo* e *in vitro* do papel das neuregulinas nas células de Schwann: proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, maturação e mielinização. Relatam contradições acerca da intensidade de afinidade entre as neuregulinas 1-alfa e 1-beta. Sugere a realização de novas pesquisas, objetivando maior conhecimento das características das neuregulinas e suas funções.

Francel et al. (2003) descrevem um estudo experimental para avaliar a regeneração do sistema nervoso periférico através de um tubo composto por material absorvível (Lacto Sorb[®]). Um longo intervalo de 20 mm é criado no nervo ciático de grupos de ratos. No Grupo 1 o intervalo é reparado com auto-enxerto; no Grupo 2, com tubo de silicone vazio; no Grupo 3, com tubo de silicone contendo um curto segmento de nervo interposto; no Grupo 4, com tubo vazio e no Grupo 5 com tubo contendo segmento de nervo interposto de 2 mm. O nervo ciático intacto serve como controle em cada animal. Dezesesseis semanas após operação, a regeneração não ocorre nem nos tubos de silicone vazios e nem nos tubos vazios. A regeneração ocorre em todos os animais que recebem auto-enxerto como também em todos animais reparados com tubos contendo 2 mm de segmento de nervo interposto. Conclui que a regeneração efetiva é atingida, baseada em critérios histológico, eletrofisiológico e morfométrico. O uso de material absorvível com curtos segmentos de nervo interposto para promover a regeneração de nervo na reconstrução de defeito de nervo é desejável e prático.

Geuna et al. (2003) investigam os estágios pós-operatórios precoces da tubulização com veia, contendo músculo e a expressão da neuregulina 1 e receptor erbB3 no seu interior. Sacrificam os animais 16, 24, 36, 48, 65, 115 e 140 horas após procedimento cirúrgico, realizando-se análises imunohistoquímicas, objetivando o estudo das células de Schwann em todos os grupos e PCR, para se avaliarem os receptores erbB3 e neuregulinas, apenas no último grupo. Demonstram, através de marcadores específicos, presença de células de Schwann e síntese de DNA, que sugere reprodução celular, proporcionando a proliferação destas células não somente nos cotos neurais, mas contínua proliferação no interior dos tubos. Enfatizam o importante papel dos receptores erbB3 não somente na geração de células de Schwann durante o desenvolvimento, mas também na regeneração neural na vida adulta.

Ikeguchi et al. (2003) investigam se um tubo com sua superfície interna implantada com íons de carbono carregados negativamente pode capacitar os axônios a proliferarem por distância superior a 10 mm. Demonstram a capacidade de promover a regeneração nervosa em falhas de 15 mm. Afirmam que tubo de silicone tratado com íons de carbono demonstra aumento de propriedades hidrofílicas, afinidade celular, proporcionando regeneração axonal pelo aumento da biocompatibilidade.

Kang et al. (2003) revisam a literatura investigando o papel das células de Schwann, na reinervação muscular, após lesão traumática. Ressaltam sua importância na regulação do crescimento axonal, onde

precederia a remielinização a caminho da junção neuromuscular, direcionaria a regeneração axonal entre os sítios de sinapses vizinhas, acelerando o processo de reinervação da fibra muscular, visto que não há rigoroso sincronismo na velocidade de sua reinervação. As células de Schwann regulariam a extensão do contato entre os neurônios terminais e as fibras musculares. Concluem, enfatizando a necessidade de novas pesquisas a fim de definir com detalhes as funções das células de Schwann na junção neuromuscular.

Midha et al. (2003) pesquisam o emprego de tubos hidrogel associados a fatores neurotróficos, em falhas de 10 mm do nervo ciático em 47 ratos Lewis. Dividem os grupos em tubos vazios, contendo Vitrogen® (colágeno purificado), e associações de Vitrogen e FGF-1 (divididos em alta e baixa concentrações), NT-3 e BDNF. Após 8 semanas, os resultados histomorfométricos, obtidos no ponto médio do tubo, demonstram superioridade ao grupo com altas doses de FGF-1. Reportam a satisfatória biotolerabilidade dos tubos de hidrogel e ressaltam a necessidade de novos estudos acerca da utilização de fatores neurotróficos.

Salzer (2003), em revisão da literatura, afirma que a progressiva diferenciação das células de Schwann resulta na organização seqüencial de distintos compartimentos em torno dos axônios, recrutando moléculas de adesão ao longo da fibra, os quais possibilitam o acúmulo de proteínas no citoesqueleto, proporcionando a formação dos canais iônicos.

Tseng et al. (2003) apresentam estudo experimental em que analisam a migração de células de Schwann e regeneração de nervos através de tubulização por veia. Descrevem o processo de regeneração do nervo em quatro fases seqüenciais, começando com a fase de hematoma, progredindo para a fase de migração celular, seguindo para a fase de avanço axonal e finalizando com a fase de mielinização e maturação. As células de Schwann, que surgem do coto distal, são importantes no processo de regeneração do nervo, presumivelmente, porque elas aprimorariam e sustentariam o crescimento axonal através de elaboração de vários fatores neurotróficos. Portanto, células de Schwann no coto do nervo distal podem secretar determinados fatores que modificariam a matriz, tornando-a adaptável ao avanço axonal. Poderiam também oferecer sua própria superfície como substrato ao crescimento axonal. Concluem que a tubulização por veia não apresenta colapso, fibrose, formação de escara, invasão por tecidos vizinhos e conteria células de Schwann que favoreceriam o crescimento axonal e maturação dos nódulos de Ranvier.

Vroemen e Weidner (2003) demonstram método de cultura e purificação de células de Schwann. Discorrem acerca da insuficiente capacidade intrínseca de regeneração das células de Schwann para promoverem a regeneração após lesão de nervo periférico. Ressaltam a possibilidade de rapidez e efetividade da regeneração através do transplante autólogo de células de Schwann. Após uma semana de degeneração em cultura, fragmentos de nervos dissociados encontram-se no mesmo meio,

contendo células de Schwann e fibroblastos. Em seguida à incubação com anticorpos específicos (anti-p75LNGFr), utiliza-se separação celular por ativação magnética, obtendo-se purificação de células de Schwann em nove dias. Após este período, solução enriquecida de células de Schwann (95%) encontra-se apta a ser utilizada em estratégias de transplantes.

Yoshii *et al.* (2003) estudam o efeito da presença do coto distal no crescimento axonal, comparando o emprego de tubos de colágeno vazio, contendo filamentos de colágeno purificado e enxerto autólogo. Em metade dos 62 ratos Wistar, a falha de 20 mm é tratado convencionalmente. Em 31 animais, a extremidade distal do tubo e do enxerto foi suturada na musculatura posterior da coxa. Avaliações realizadas em 4 e 8 semanas, demonstram resultados superiores, estatisticamente significantes, nos grupos que possuem o coto distal. Afirmam que os filamentos de colágeno promovem crescimento axonal, mesmo sem a presença do coto distal, após 8 semanas.

Belkas *et al.* (2004) elaboram estudo acerca de condutos artificiais, regeneração de nervo através deles e sobre vários materiais sintéticos que comprometeriam estes tubos em animais de experimentação. Listam e descrevem várias considerações sobre biomateriais. O maior benefício dos condutos artificiais é não criar dano secundário no reparo de dano primário. Os condutos devem ser de fácil fabricação, com o diâmetro desejado, implantado com relativa facilidade e de fácil esterilização. Eles devem ser flexíveis, mas capazes de manter sua integridade estrutural. As propriedades

elétricas de um biomaterial também influenciariam na regeneração nervosa. A incorporação de gel de colágeno dentro dos tubos apresenta vantagem na regeneração em relação à solução salina. Outra abordagem visando aprimorar a regeneração através de longos intervalos é a interposição de segmentos múltiplos de nervo entre condutos múltiplos de silicone. Este tipo de enxerto atinge a regeneração, mas é inferior ao enxerto de nervo longo e único. Conclui que a engenharia de tecido é um campo dinâmico e inovador, que permite colaboração entre cientistas, médicos e indústria com a finalidade de realizar avanços significativos no tratamento clínico.

Cai et al. (2004) estudam os efeitos da tubulização em perdas de 1,4 cm em nervo ciático de ratos, promovida por tubos absorvíveis contendo neuregulina1-beta. Padronizam 27 ratos Sprague-Dawley em quatro grupos: 32 microfilamentos, matrigel e heregulina (FMH), 32 microfilamentos e matrigel (FM), matrigel e neuregulina sem microfilamentos (MH), matrigel apenas (M). Após 10 semanas, não há diferença estatisticamente significativa na regeneração axonal entre os grupos MH e H. Os grupos contendo microfilamentos foram estatisticamente superiores aos MH e M. Embora o número de células de Schwann, obtido por imunohistoquímica, seja superior nos grupos FM e MH quando comparado ao M, não há diferença estatisticamente significativa. Essa diferença é obtida entre o FMH e os demais. Acreditam que a associação entre os microfilamentos (orientação axonal) e neuregulinas (estimulação das células de Schwann) agem sinergicamente na regeneração de nervos.

Chen et al. (2004) estudam os efeitos do bilobalide na regeneração de nervos ciáticos em ratos. Essa substância, extrato de *Ginkgo biloba*, teria efeitos neuroprotetores em doenças degenerativas do sistema nervoso central, aumentaria a velocidade regenerativa após lesões de nervos em pequenos defeitos. Pesquisam seus efeitos em lesões maiores. Utilizando 50 ratos, tubuliza-se 15 mm do nervo ciático direito, em concentrações de zero (solução salina-controle), 50, 100, 200 e 400 μM de bilobalide em solução de Vitrogen[®] (colágeno). Demostram, em oito semanas, efeitos negativos em concentrações de 50 μM , positivos em 100 e 200 μM e neutros em 400 μM . Não há regeneração na concentração de 50 μM . Concluem que a bilobalide expressa efeitos antagônicos na regeneração do sistema nervoso periférico, de promotores do crescimento à intensa inibição, havendo necessidade de novos estudos para melhor padronização.

Chiu et al. (2004) averiguam o neurotropismo promovido pelo coto distal. Utilizam ratos machos, Sprague-Dawles, dos quais são extraídos enxertos venosos do complexo cava-ilíaco, em forma de “Y” invertido, invaginando-se o nervo ciático proximal na veia cava. Dividem o material em cinco grupos: coto distal do ciático *versus* veia ilíaca aberta; *versus* ilíaca ligada; *versus* tendão; *versus* enxerto de nervo; ambos vazios. Analisam os resultados após 12 semanas, através de exame histopatológico. Demonstram a existência de importante tropismo exercido pelo coto distal do nervo lesado. Ressaltam a necessidade de novos estudos, buscando-se maior clareza do papel do sinergismo existente entre neurotropismo, funções do tubo-guia e galvanotaxia.

Corfas et al. (2004) afirmam que os receptores erbB2 e erbB3 são expressos em todos os estágios de desenvolvimento das células de Schwann, desde a crista neural até sua total diferenciação.

Fansa e Kilhoff (2004) investigam a utilização de células de Schwann obtidas através de culturas isogênicas, implantadas em matrizes acelulares autólogas. São nove grupos, contendo oito animais, divididos em tubos epineurais, nervos, veias, músculos (ambos com e sem células de Schwann) e grupo controle. Após seis semanas, avaliação histológica e morfométrica evidenciam a regeneração em todos os casos. Não demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto o que contém músculo grácil enriquecido com células de Schwann. Concluem que tais achados seriam decorrentes da presença da lâmina basal, que direcionaria os axônios em regeneração e armazenaria fatores neurotróficos produzidos pelas células de Schwann.

Geuna et al. (2004) enfatizam a possibilidade de emprego de várias técnicas de tubulização como ponte em lesões de nervo com perda de substância. Dentre os diferentes materiais em uso como alternativa para enxerto de nervo autólogo, testam os condutos confeccionados de segmento de veia preenchidos com músculo fresco. Defeitos de 10 mm em nervos ciáticos de ratos e 55 mm em coelhos são tratados com tubos formados pelo complexo “veia-músculo” e enxertos autólogos tradicionais. Os resultados não revelam diferença significativa entre os 2 grupos de nervos regenerados,

ao se avaliar número total, densidade e espessura das fibras mielinizadas. Em coelhos, o enriquecimento do segmento de veia com músculo torna possível criar uma ponte eficiente em perdas de 55 mm. Concluem que a técnica de tubulização por veia contendo músculo pode ser usada com sucesso como alternativa ao auto-enxerto convencional.

Lundborg et al. (2004) apresentam estudo realizado em 30 pacientes portadores de lesão completa do nervo mediano ou ulnar, recente, distância menor que 10 cm do punho, sem caráter segmentar ou concomitância de ambos os nervos. Os pacientes são randomizados em dois grupos: reparo com prótese de silicone ou microcirúrgico convencional, operados nas primeiras 48 horas após o trauma. Perdas segmentares de 3 a 5 mm são constituídas no grupo das próteses. Avaliações realizadas nos meses 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 60. Não há diferença, clínica e neurofisiológica, estatisticamente significativa entre os dois grupos após 60 meses, exceto menor intolerância ao frio no grupo tubulizado. Em oito casos, os tubos foram removidos. Concluem enfatizando a necessidade de novos estudos com tubos absorvíveis.

Raab et al. (2004) pesquisam a localização das isoformas da neuregulina e seus receptores erbB nas células gliais mielinizantes. Reportam a localização das duas principais isoformas, neuregulina alfa e beta, e seus receptores em células de Schwann cultivadas e em oligodendrócitos isolados em filhotes de ratos recém-nascidos. São

utilizados imunohistoquímica e Western blot para neuregulinas e receptores erbB, em frações subcelulares definidas, objetivando essa localização. Demonstram a presença de ambas, neuregulina 1-beta e neuregulina 1-alfa, no citoplasma, enquanto há maior concentração de neuregulina 1-beta no núcleo das células de Schwann. A adição de agentes mitóticos nas culturas de células de Schwann determina diferentes comportamentos das isoformas. Enquanto há baixa concentração de neuregulina 1-alfa nas proximidades do núcleo, ocorre sensível aumento da concentração e redistribuição espacial das neuregulinas 1-beta. Assim, agentes mitóticos são supressores da expressão das neuregulinas 1-alfa e estimulantes das neuregulinas 1-beta, no núcleo das células de Schwann. Os receptores erbB2 e erbB3, que traduzem o sinal das neuregulinas nas células de Schwann, são encontrados difusamente pelo citoplasma e núcleo celular.

Rabinovsky (2004) descreve as principais funções do IGF-1 no crescimento neuronal após lesão, onde atua na ativação das células de Schwann, favorecendo o brotamento axonal do coto proximal. É secretado por monócitos, músculo esquelético e capilares.

Valero-Cabré et al. (2004) investigam a reorganização de motoneurônios e contagem total de axônios mielinizados, após lesões em nervos ciáticos de 36 ratos Wistar. O primeiro grupo é formado por lesões por esmagamento, o segundo por transecção e reparo direto do ciático, o terceiro por suturas diretas do tibial e fibular separadamente, o quarto por

tubulização em falha de 4,0 mm. Avaliações eletrofisiológicas, *walking track* e histológicas são realizadas após 3 meses. A reinervação muscular é estatisticamente significativa em prol do primeiro grupo, não havendo diferença entre os demais. Não demonstram significância estatística entre os grupos, ao se analisar o número e distribuição dos motoneurônios do nível L3 a L6, embora o quarto grupo apresente resultados absolutos superiores. Verificam modificações no comprimento e distribuição desses motoneurônios em cortes longitudinais, os quais apresentam formas diferentes da elíptica convencional, em todos os grupos. Propõem que a tubulização, em pequenos defeitos, não apresenta resultados inferiores ao das técnicas convencionais de reparo.

Battiston et al. (2005) organizam revisão da literatura sobre tubulização de nervos e expõem suas experiências clínicas. Relatam os principais artigos publicados nos últimos 20 anos, apontando aplicação crescente desta técnica. Afirmam que a auto-enxertia promove dano secundário, aumentando a morbidade do procedimento, ao passo que a tubulização proporciona menor tempo cirúrgico, possui comprimento e diâmetro compatíveis aos cotos, pode conter substâncias que estimulariam a regeneração, protege o cone de crescimento, isolando-o da fibrose circunvizinha. Mencionam experiência clínica em 30 pacientes com perdas segmentares de nervos sensitivos, submetidos à tubulização por enxerto de veia contendo músculo ou tubos bioabsorvíveis. Após seguimento de 6 a 74 meses, não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Ambos apresentam 76% de bons resultados. Instituem que, apesar da tubulização ser

comumente vista como uma alternativa, não há como determinar uma técnica ideal, havendo necessidade de realização de novos estudos.

Hall (2005) elabora artigo de revisão sobre a resposta pós-traumática do sistema nervoso periférico. Danos a esse sistema, particularmente no membro superior, podem ter graves conseqüências. O resultado do trauma é determinado pela extensão da lesão celular e por variáveis que incluem o sítio da lesão, o grau de ruptura das bainhas do tecido conectivo que envolvem o nervo, a extensão dos danos associados, particularmente vasculares, idade e estado geral do paciente. Enfatiza que mesmo o reparo cirúrgico meticuloso não pode garantir recuperação funcional completa, visto que o cirurgião não pode intervir na fisiologia do nervo lesado. Salienta que intervenção terapêutica em nível molecular tem potencial para manter mais neurônios vivos, estimular seus axônios a percorrerem maiores intervalos entre os cotos, maximizando a reinervação alvo e gerenciando a dor neuropática. Atualmente, esses objetivos são aspirações. Aponta a necessidade de conhecimento detalhado das interações moleculares na fisiologia do sistema nervoso periférico após lesão traumática. Elege temas fundamentais em pesquisas experimentais que provam beneficiar os fenômenos regenerativos: degeneração e regeneração axonal, resposta inflamatória na degeneração walleriana, células de Schwann, fibrose e alternativas para auto-enxertos. Conclui que intervenção terapêutica, utilização de tecidos desenvolvidos pela bioengenharia, manipulação de eventos endoneurais em nível molecular, oferecem perspectiva em potencial ao emprego de auto-enxertos.

Johnson et al. (2005) elaboram artigo sobre regeneração e reparo de nervos. Acreditam que o reparo de nervo após lesão completa é o maior desafio para a medicina restauradora e amicrocirurgia. Reportam o progresso das técnicas cirúrgicas, nos últimos 30 anos, ainda insuficientes para restauração funcional satisfatória. Sugerem a necessidade de maior conhecimento da biologia molecular e celular, das funções específicas das células de Schwann no processo regenerativo e desenvolvimento de materiais biocompatíveis aos enxertos convencionais.

Lai (2005) pesquisa a importância dos receptores erbB na migração precoce das células de Schwann *in vivo*. Através do marcador foxd3::GFP é possível observar, por imunofluorescência, em embriões transgênicos de peixe-zebra, o deslocamento de progenitoras de células de Schwann próximo à região do tubo neural. Demonstram a redução da migração celular após o emprego de inibidor da atividade do receptor tirosina quinase erbB. Esses achados sugerem que tais receptores sinalizam o direcionamento da migração de precursores das células de Schwann. Concluem, sugerindo a necessidade de novos estudos em mamíferos.

Lyons et al. (2005) enfatizam a importância fundamental da bainha de mielina no sistema nervoso, sendo esta dependente da fisiologia das células de Schwann. Tais células requerem ativação de receptores erbB, promovidos pelas neuregulinas. Testam *in vivo* essa afirmação, suprimindo a função dos receptores erbB2 e erbB3, por mutação genética e inibição

química. Reportam, como consequência, a redução da proliferação e migração das células de Schwann. Corroboram a hipótese do papel fundamental exercido pelos receptores erbB2 e erbB3 na fisiologia das células de Schwann.

Taveggia *et al.* (2005) demonstram a necessidade de altas taxas de neuregulina para a promoção de efetiva mielinização axonal. Enfatizam a necessidade de completa mielinização para se conseguirem velocidades eficientes de condução. Alertam que as neuregulinas necessitam de extensa cadeia complementar, como moléculas de adesão celular, sinalização de matrix extracelular, neurotrofinas e GDNF. Apesar da expressão da neuregulina atuar independentemente do diâmetro axonal, a quantidade necessária é diretamente proporcional ao mesmo. Concluem, afirmando que os axônios que expressam altos níveis de neuregulina requerem maior número de células de Schwann, proporcionando mielinização de suas fibras.

Atanasoski *et al* (2006) contradizem os estudos *in vitro*, ao utilizarem animais homozigotos com supressão dos receptores erbB2 e manutenção dos demais, nos quais as células de Schwann adultas não requerem sinalização das neuregulinas para proliferação e sobrevivência após trauma. Concluem, minimizando a importância do receptor erbB2 nas funções da célula de Schwann.

Chaves Neto (2006) compara a regeneração dos axônios obtida com enxerto convencional e auto-enxerto pré-degenerado, em nervo ciático de ratos. Após 1, 2, 4 e 8 semanas, o número de fibras pré-degeneradas mielinizadas é inferior ao controle. Demonstra melhores resultados em 2 e 4 semanas de pré-degeneração.

Chen et al. (2006) demonstram que a sinalização dos receptores erbB é necessária para que ocorra a ativação das células de Schwann e conseqüente desenvolvimento e mielinização neuronal. Apontam a importância dos receptores erbB no controle do comprimento e espessura da bainha de mielina proporcionada pelas células de Schwann. Concluem que a neuregulina-1 é responsável pela ativação dos receptores erbB e que sua redução estaria relacionada à patogênese de neuropatias periféricas e dor neuropática.

Esper et al. (2006) elaboram artigo de revisão sobre neuregulinas enfocando sua versatilidade, fatores de diferenciação no desenvolvimento do sistema nervoso e sua relação com doenças em humanos. Definem neuregulinas como uma família de fatores de crescimento e de diferenciação responsáveis por ampla rede de funções no sistema nervoso. O poder e a diversidade do sistema de sinalização das neuregulinas derivam-se do grande número de isoformas. As formas solúveis de neuregulina são únicas por apresentarem um distinto domínio de heparina que direciona e potencializa suas ações. Em adição, um mecanismo bidirecional regula quando e onde a neuregulina é liberada dos neurônios em resposta aos

fatores neurotróficos produzidos pelas células gliais e neuronais. Relatam a presença de complexo sistema de sinalização celular sincronizado, localizado em distintas regiões, influenciando tanto no desenvolvimento normal, quanto na manutenção do sistema nervoso maduro. Descrevem os principais sítios de ação das neuregulinas no sistema nervoso: córtex (sinapse, regulação de canais iônicos), tálamo (desenvolvimento de oligodendrócitos, mielinização), medula (mielinização, desenvolvimento), sistema simpático (direcionamento celular, regulação de receptores nicotínicos), nervos (proliferação, diferenciação e sobrevivência de células de Schwann, mielinização), sinapse neuromuscular (indução de receptores acetilcolina). Defendem a realização de novos estudos, buscando maiores esclarecimentos sobre o papel das neuregulinas no sistema nervoso.

Kingham e Terenghi (2006) revisam os trabalhos sobre a bioengenharia, regeneração de nervos e a reinervação muscular. Examinam as respostas de nervos e músculos ao dano, focando as alterações da expressão dos fatores neurotróficos. Descrevem como os tubos artificiais tornaram-se úteis para a condução de fatores neurotróficos como agentes terapêuticos, visando à obtenção de melhores resultados no tratamento de lesões de nervos com perda de substância. Citam os principais fatores neurotróficos da atualidade, dentre eles o NGF (fator de crescimento neural), BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), NT-3 e NT-4 (neurotrofinas), CNTF (fator neurotrófico ciliar), GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) e as neuregulinas. Concluem que os resultados obtidos até o

momento são promissores, não ideais, devendo-se obter maior conhecimento sobre a relação fenótipo muscular, inervação do neurônio motor e fatores neurotróficos.

Saijilafu et al. (2006) investigam a possibilidade de alongamento de nervos. Utilizam 60 ratos Wistar, apresentando 10 mm de perda segmentar do nervo ciático. Implantam fixador externo no fêmur, correspondendo com dispositivo de tração longitudinal do coto proximal, com velocidade de distração de 1 mm por dia. Comparam os resultados ao grupo controle formado por enxerto autólogo. Demonstram melhores resultados no grupo com distração longitudinal, com diferença estatisticamente significativa. Salientam que a tração longitudinal é uma técnica promissora no tratamento de lesões de nervosas com perdas segmentares.

4. MÉTODOS

Este modelo de experimento foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia e pelos Conselhos de Ética da Faculdade de Medicina (protocolo 0057/2007) e do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo 0096/2004) da Universidade de São Paulo (ICBUSP).

4.1 MATERIAL

O modelo experimental adotado utilizou camundongos da linhagem C57BL/6J provenientes do Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Seleção dos animais

Critérios de inclusão:

- camundongos machos
- peso médio de 45g (43 a 47g)
- idade média de oito semanas
- ausência de lesões de pele

Critérios de exclusão:

- autofagia
- consupção
- morte

Critérios de suspensão ou encerramento:

- infecção em dois ou mais animais
 - reação imunológica à droga utilizada
 - complicações anestésicas recorrentes
-

4.2 METODOLOGIA

Formação dos grupos controle e de estudo

Constituíram-se 3 grupos, contendo 6 animais em cada. Foi criada uma falha de 4,0 mm entre os cotos do nervo ciático esquerdo. Por sorteio, selecionaram-se dois animais de cada grupo, onde foram ressecados um segmento do nervo ciático contralateral (direito), extraíndo-se o número total de fibras mielinizadas, denominando-se grupo Controle.

O segundo grupo denominado Colágeno, utilizaram-se tubos de polietileno (Sigma[®]) contendo apenas colágeno purificado (Vitrogen[®] neuregulina neuregulina, Collagen Corporation, Palo Alto, CA, USA).

No terceiro grupo, adicionou-se neuregulina 1-alfa ao colágeno, na diluição de 100 µg/ml, ao passo que o último grupo continha neuregulina 1- beta. Adotou-se a concentração de 250ng de neuregulina por prótese (Cai *et al.*,2004).

As neuregulinas foram adquiridas da empresa R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA.

Técnica de tubulização

A técnica de tubulização adotada (Gama, 2000) é descrita através dos passos seguintes:

1º passo: transfixação da prótese de polietileno, a 1,0mm da extremidade (Figura 1)

2º passo: exteriorização da agulha (Figura 2)

3º passo: agulha penetra o epineuro, da superfície interna para a externa (Figura 3)

4º passo: nova transfixação da prótese, de dentro para fora, lateralmente ao primeiro orifício (Figura 4)

5º passo: fase de preparação do tensionamento das extremidades do fio (Figura 5)

6º passo: tensionamento do fio e invaginação do coto proximal (Figura 6)

7º passo: ponto de sutura convencional (Figura 7)

8º passo: introdução total da extremidade da seringa de Hamilton, retirando-a gradualmente e ejetando o seu conteúdo no interior da prótese (Figura 8)

9º passo: fixação do coto distal (Figura 9)

Figura 1. Esquema que demonstra agulha transfixando a prótese de polietileno

Figura 2. Exteriorização da agulha

Figura 3. Esquema demonstrando a transfixação do epineuro, da superfície interna para a externa

Figura 4. Agulha penetrando a prótese, de dentro para fora, lateralmente ao primeiro orifício

Figura 5. Desenho reproduzindo a fase de preparação do tensionamento das extremidades do fio

Figura 6. Esquema demonstrando o nervo invaginado

Figura 7. Coto do nervo fixado à prótese por ponto de sutura convencional

Figura 8. Desenho representando a introdução do colágeno

Figura 9. Esquema do tubo implantado, contendo colágeno

Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à anestesia geral por Avertin® (500 mg de tribromoetanol e 250 mg de 2-metil-2-butanol, dissolvidos em 19,5 ml de água destilada) na dosagem de 0,02 ml/g de peso corporal (45g), via intraperitoneal, na região abdominal baixa. A seguir, os animais foram dispostos em decúbito ventral sobre tábua de dissecação, após tricotomia e lavagem da área cirúrgica com solução degermante de gluconato de clorexidina 2%. Realizou-se incisão longitudinal na face posterior da pata esquerda e, através de dissecação romba do bíceps femoral, exposição do nervo ciático (Figuras 10 e 11).

Figura 10. Exposição do nervo ciático (NC) esquerdo

Figura 11. Esquema demonstrando a exposição do nervo ciático (NC)

As figuras 12 e 13 demonstram 1,0mm do coto proximal implantado no interior do tubo de polietileno, mantido por um ponto (fio mononylon 10.0, agulha 75 µm, Ethicon®) e preparo do coto distal.

Figura 12. Coto proximal (CP) implantado no tubo de polietileno (TP) e extremidade distal da prótese transfixada pelo fio de sutura

Figura 13. Desenho esquemático da implantação do tubo de polietileno no coto proximal (CP)

O preenchimento dos tubos foi realizado empregando-se microseringa de Hamilton (10 μ l). As figuras 14 e 15 demonstram o tubo preenchido com colágeno e presença de selante de fibrina (Tissucol[®], Baxter, Immuno AG, Vienna, Austria) nas extremidades. Todo o procedimento foi realizado através de visão magnificada por microscópio óptico (Zeiss OPM 240F).

Figura 14. Tubo de polietileno contendo colágeno (C) e selante de fibrina (SF) nas extremidades

Figura 15. Esquema final do implante do tubo contendo colágeno (C) e selante de fibrina (SF) nas extremidades

Os tubos apresentavam 6,0 mm de comprimento, 0,75 mm de diâmetro interno e 1,22 mm de diâmetro externo. A distância entre os cotos após o procedimento foi de 4,0 mm.

Seguia-se a aproximação da camada muscular e sutura da pele com pontos separados (mononylon 5.0, Ethicon®). Finalizava-se esta etapa empregando-se gluconato de clorexidina 2% na área cirúrgica.

Pós-operatório

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em caixas apropriadas, três animais por gaiola, com área mínima de 200 cm², adequada quantidade de maravalha, ciclo claro-escuro de doze horas, temperatura em torno de 20°C a 25°C, quantidades adequadas de ração e água *ad libitum*.

Coleta do Material

Após quatro semanas do procedimento cirúrgico, os animais foram novamente submetidos a anestesia geral por Avertin®, iniciando-se o processo de coleta.

Realizou-se incisão longitudinal no terço médio e superior do abdômen, dissecação por planos, injeção de 0,2 ml de solução de heparina (5000 UI/ml) no baço. Procedeu-se à toracotomia, onde um catéter foi introduzido no ventrículo esquerdo, injetando-se 10 ml de solução salina (0,9%) heparinizada (5000 UI/ml), seguida por 15 ml de solução fixadora constituída por paraformaldeído (1%) e glutaraldeído (2%), em solução tampão de fostato de sódio a 0,1 M, pH 7,3 (Gama, 2000).

Procedeu-se com a exploração das próteses tubulares, que continham o cabo de regeneração (nervo regenerado) (Figuras 16 e 17), sendo estas dissecadas, removidas e mantidas em solução fixadora supracitada, à temperatura de 4°C, por 24 horas.

Figura 16. Exposição da prótese de polietileno contendo cabo de regeneração (CR).

Figura 17. Desenho que demonstra o nervo regenerado (CR)

Realizou-se a pós-fixação do material em tetróxido de ósmio (2% em tampão de fostato de sódio a 0,1 M, pH 7,3) por duas horas a 4°C. Posteriormente efetuou-se a desidratação através de série crescente de álcool etílico, clareado em óxido de propileno e incluído em resina epóxi. Foram realizados cortes transversais de 1 µm de espessura no ponto médio do regenerado tubular, corados com azul de toluidina 0,5%.

O grupo controle, formado pelo nervo ciático contralateral, foi constituído nesta fase.

Após fixação em lâminas, as imagens contendo as fibras mielinizadas foram coletadas por câmera digital, interligadas a microcomputador PC por controlador de estágio. Utilizou-se mesa digitalizadora (Summargraphics) conectada ao PC para a obtenção da imagem pelo observador.

Ao final da etapa cirúrgica, os animais foram submetidos à eutanásia, através de overdose por Avertin® (0,2ml/g), seguindo critérios estabelecidos pela Associação Americana de Medicina Veterinária (American Veterinary Medical Association – AVMA).

Estudo histológico

A contagem dos axônios mielinizados em cada lâmina (Figura 18, 19 e 20) foi realizada através da marcação, por cursor, em cada unidade axonal, impedido-se a contagem da mesma fibra. Ao final das marcações por campo, obtinham-se o número total de fibras no segmento. Utilizou-se o programa Sigma Scan Pro Image Analysis V.5.0.0 SPSS Inc. 1987-1999, para se realizar esta contagem.

Figura 18. Corte histológico do grupo Colágeno (aumento menor 100x).

Figura 19. Corte histológico do grupo Colágeno e neuregulina 1-alfa (aumento menor 100x).

Figura 20. Corte histológico do grupo Colágeno e neuregulina 1-beta (aumento menor 100x).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na composição dos grupos, os camundongos foram escolhidos e distribuídos de forma independente e aleatória, garantindo-se a imparcialidade dos resultados. Tomou-se o cuidado de reduzir as interferências (“ruídos” ou “bias”) causadas por variáveis incontroláveis, através da utilização de camundongos isogênicos (linhagem C57BL/6J) e da adoção de critérios de inclusão específicos para a homogeneização dos grupos experimentais (filtros).

As contagens de axônios, na seção transversal do nervo ciático dos camundongos, obtidas das amostras controle (nervo íntegro) e obtidas dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com vitrogen e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta, foram apresentadas na Tabela 1.

Para a descrição das amostras e análise das grandezas específicas, ou variáveis ordinais (quantitativas), realizou-se a estatística descritiva: média (M), desvio padrão (DP), erro padrão da média (EPM), valores máximo (MAX) e mínimo (MIN) e número de casos (N) (Tabelas 2 e 3).

A normalidade das distribuições foi testada pela prova de Kolmogorov-Smirnov para variáveis contínuas. Admitiu-se a distribuição paramétrica nos casos em que a prova de Kolmogorov-Smirnov (K-S) não

apresentou resultado significativo e que o coeficiente de variação de Pearson (CVP) apresentou-se inferior a 30%. Admitiram-se todas as distribuições como sendo normais (Gauss). Adotaram-se testes paramétricos.

A estatística descritiva, o resultado da prova de Kolmogorov-Smirnov (K-S) e o coeficiente de variação de Pearson (CVP) das contagens de axônios, de acordo com os grupos (amostras), foram apresentados em tabelas estatísticas (Tabelas 2 e 3). A estatística descritiva das contagens de axônios de cada amostra (grupo) foi representada na forma de gráficos de coluna (média $\pm$ erro padrão de média) (Gráfico 1).

Nas comparações entre as médias das contagens de axônios, na seção transversal dos nervos ciáticos regenerados de camundongos, das amostras obtidas dentro dos tubos preenchidos com colágeno (colágeno purificado), com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta, para a inferência sobre as diferenças das médias entre as amostras, utilizou-se a Análise de Variância (três amostras não relacionadas e com distribuição paramétrica). Comprovou-se haver diferenças significantes entre as médias das amostras (grupos). As diferenças entre as médias foram discriminadas, comparando-se as amostras, aos pares, pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (Tabela 2).

Nas comparações entre as contagens de axônios, nas seções transversais dos nervos ciáticos regenerados de camundongos, das amostras

obtidas dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta e as contagens das amostras do nervo controle (íntegro), aos pares, para a inferência da diferença das médias de axônios formada dentro de cada tipo de tubo em relação ao número de axônios normais (controle), utilizou-se o teste *t* de student (pares de amostras não relacionadas e com distribuição paramétrica) (Tabela 3).

Adotou-se o nível de confiança de 5% ($\alpha=0,05$).

Admitiu-se, previamente, que as amostras (grupos) seriam equivalentes. Utilizaram-se testes bidimensionais ou bilaterais:

$$(H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0)$$

As diferenças estatisticamente comprovadas foram evidenciadas por asteriscos (*) nas tabelas estatísticas.

Utilizou-se arredondamento científico e os resultados foram apresentados com uma casa após a vírgula nas tabelas estatísticas e com até duas casas, ou até o primeiro número significativo, nos resultados dos testes estatísticos.

Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Software, Inc.® (1996) Graphpad Prism, versão 2.01.

5. RESULTADOS

TABELA 1. Contagens de axônios, na seção transversal do nervo ciático dos camundongos, obtidas das amostras controle (nervo íntegro) e obtidas dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta.

AMOSTRA DE NERVO CIÁTICO	NÚMERO DE AXÔNIOS			
	Controle	Colágeno	Colágeno + Neuregulina 1-alfa	Colágeno + Neuregulina 1-beta
1	4330	2635	2914	2837
2	4334	2461	3107	3274
3	4401	2847	3384	3549
4	4355	2548	3402	3691
5	4291	2836	3784	3802
6	4417	2786	3812	3764

TABELA 2. Estatística descritiva do número de axônios contados na seção transversal do nervo ciático regenerado das amostras obtidas dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta (nervo regenerado). Avaliação da normalidade pelo coeficiente de variação de pearson e pela prova de Kolmogorov-Smirnov. Comparação pela análise de variância ($\alpha=0,05$).

NERVO CIÁTICO	NÚMERO DE AXÔNIOS		
	Colágeno	Colágeno + Neuregulina 1-alfa	Colágeno + Neuregulina 1-beta
M	2685,5	3400,5	3486,2
DP	161,7	357,6	371,3
EPM	66,0	146,0	151,6
MAX	2847	3812	3802
MIN	2461	2914	2837
N	6	6	6
K-S	0,23	0,19	0,23
CVP	6,0	10,5	10,6

Análise de Variância

F=11,92

p=0,0008*

Tukey

Colágeno + Neuregulina
1-alfa > ColágenoColágeno + Neuregulina
1-beta > Colágeno

TABELA 3. Estatística descritiva do número de axônios contados na seção transversal do nervo ciático das amostras controle (nervo íntegro) e obtidas dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno ou neuregulina 1-beta. Avaliação da normalidade pelo coeficiente de variação de pearson e pela prova de Kolmogorov-Smirnov. Comparação do nervo controle e cada regenerado pelo teste t de student ($\alpha=0,05$).

NERVO CIÁTICO	NÚMERO DE AXÔNIOS			
	Controle	Colágeno	Colágeno + Neuregulina 1-alfa	Colágeno + Neuregulina 1-beta
M	4354,7	2685,5	3400,5	3486,2
DP	47,2	161,7	357,6	371,3
EPM	19,3	66,0	146,0	151,6
MAX	4417	2847	3812	3802
MIN	4291	2461	2914	2837
N	6	6	6	6
K-S	0,17	0,23	0,19	0,23
CVP	1,1	6,0	10,5	10,6

t de student t=24,28 p $\leq$ 0,00*

t de student t=6,48 p $\leq$ 0,00*

t de student t=5,68 p=0,0002*

GRÁFICO 1. Contagens de axônios, na seção transversal do nervo ciático dos camundongos, obtidas das amostras controle (nervo íntegro) e dos nervos regenerados dentro dos tubos preenchidos com colágeno, com colágeno e neuregulina 1-alfa e com colágeno e neuregulina 1-beta (nervo regenerado)

6. DISCUSSÃO

As lesões que afetam o sistema nervoso consistem no maior desafio da cirurgia reconstrutiva e da microcirurgia. Sejam elas decorrentes de traumas ou neoplasias (Johnson *et al.*, 2005).

Importantes variáveis devem ser analisadas, como extensão do dano tecidual adjacente, grau de ruptura epineural, extensão de lesões associadas, especialmente vascular, idade e estado geral do paciente (Hall, 2005; Dahlin, 2001).

Os altos custos do tratamento, longo período de reabilitação e afastamento do trabalho, o acometimento, principalmente, de indivíduos em idade produtiva, associados à impossibilidade de se atingirem os padrões sensitivo-motores normais, conferem às lesões neurológicas pós-traumáticas indesejável destaque.

A complexa fisiologia do sistema nervoso periférico na reabilitação após trauma é um tema extensamente pesquisado e pouco compreendido. Inúmeros fatores estão envolvidos neste panorama, desde a degeneração walleriana do segmento distal às alterações no córtex cerebral (Lundborg, 2000; Flores *et al.*, 2000), passando pelas alterações do corpo neuronal,

migração celular, cromatólise, interações metabólicas, proliferação de células de Schwann, ativação de fatores neurotróficos (Dahlin e Lundborg, 2001; Jubran e Widenfalk, 2002).

A introdução de técnicas microcirúrgicas (Millesi, 1964, citado por Millesi, 1984) e seu desenvolvimento, nos últimos anos (Johnson *et al.*, 2005), contribui para a obtenção de melhores resultados, consistindo o tratamento ideal na fase aguda a epineurorrafia término-terminal (Zumioti, 1987), sem tensão excessiva. Tal conduta, mesmo regida por meticuloso padrão técnico, é incapaz de promover total recuperação funcional, pois o cirurgião não atua diretamente na fisiologia do nervo lesado (Hall, 2005).

Este quadro alimenta inúmeras correntes de pesquisa, como a adição de selante de fibrina à epineurorrafia (Mattar Júnior, 1989), associado aos fatores neurotróficos NGF, GDNF, aFGF (Jubran e Widenfalk, 2002).

A evolução para a fase crônica ou a impossibilidade de afrontamento dos cotos nervosos favorecem o mau prognóstico (Dadalt Filho, 2001).

A tensão excessiva condena a resultados insatisfatórios, pois o aumento da pressão intraluminal inibe a neovascularização, dificulta o fluxo axoplasmático, a atuação dos fatores neurotróficos, a migração celular e o avanço do cone de crescimento (Meek, 2002; Belkas, 2004).

O padrão-ouro de tratamento desses casos é a interposição de auto-enxerto eliminando a tensão excessiva (Millesi, 1984), cujos principais nervos doadores são o sural, o safeno, o cutâneo medial do braço e do antebraço, lateral e posterior da coxa, auricular magno, interósseo posterior distal (Meek, 2002; Johnson, 2005). Estes segmentos de tecido nervoso não atuariam simplesmente como tubos vazios, mas sim como depósitos de fatores neurotróficos e eletrólitos (Suematsu, 1989).

Apesar de largamente empregada, esta técnica propicia resultados aquém do desejado, pois o cone de crescimento (nervo em regeneração) deve transpor duas linhas de sutura em segmento hipovascularizado, há a limitação da quantidade de tecido doador. Associa-se também a situações indesejáveis, como aumento do tempo cirúrgico, a necessidade de procedimentos anestésicos adjacentes. As hemorragias, o dano a local previamente normal ocasionando parestesia, hiperestesia, anestesia, cicatrizes, neuromas e dor crônica (Henry *et al.*, 1985; Suematsu, 1989; Langone, 1995; Itoh *et al.*, 2002; Francel *et al.*, 2003; Geuna *et al.*, 2004; Battiston *et al.*, 2005).

A técnica de tubulização é uma alternativa promissora aos auto-enxertos. Consiste na invaginação das extremidades dos nervos lesados em condutos de forma cilíndrica, com o objetivo de proporcionar o microambiente favorável ao direcionamento do cone de crescimento, suporte à migração de células de Schwann, macrófagos e fibroblastos, possibilitando

ausência de tensão excessiva nos cotos, inexistência de dissecação associada e diminuindo o trauma cirúrgico (Archibald *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2002; Meek e Coert, 2002).

A presença de angiogênese no interior dos tubos, oriunda dos segmentos proximal e distal, atua como suporte biológico à migração celular e de fatores neurotróficos intrínsecos (Podhajsky *et al.*, 1994).

A capacidade de contensão proporcionada pelos tubos possibilita uma diversidade de estudos, buscando-se maior conhecimento das interações moleculares, celulares, físico-químicas, direta ou indiretamente relacionadas ao processo regenerativo.

Por meio deste método, pode-se testar substâncias que favoreceriam a regeneração como colágeno (Silva *et al.*, 1988; Archibald *et al.* 1994; Chamberlain *et al.*, 1998), laminina (Silva *et al.*, 1988), pirimidina (Ohbayashi *et al.*, 1996), IGF-1 (Rabinovsky, 2004), aFGF (Cordeiro *et al.*, 1988), BDNF e NT-3, CNTF, GGF (Terenghi, 1999; Kingham e Terenghi, 2006), GDNF, NGF (Jubran e Widenfalk , 2002), *Ginkgo biloba* (Chen *et al.*, 2004), oncostatina-M, cardiotrofina-1 (Gama, 2000), neuregulina 1-beta (Cai *et al.*, 2004), interposição segmentar de enxerto autólogo (Scherman *et al.*, 2001; Francel *et al.*, 2003), e auto-enxerto (Gulati *et al.*, 1995), enriquecidos com células de Schwann.

As pesquisas envolvendo a composição dos condutos ainda não foram capazes de elaborar os “tubos ideais”, os quais possuiriam facilidade de fabricação, diâmetro interno e espessura de parede adequados, fácil implantação e esterilização, flexibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Dunnen *et al.*, 1995; Belkas *et al.*, 2004).

Dentre os condutos mais pesquisados, encontram-se os tubos de polietileno (Bryan *et al.*, 1999; Gama, 2000), silicone (Dahlin *et al.*, 2001; Ikeguchi *et al.*, 2003), colágeno (Itoh *et al.*, 2002), artéria (Barcelos *et al.*, 2003), veia (Geuna *et al.*, 2004), âmnion humano (Mohammad *et al.*, 1999) e outros biodegradáveis (Dunnen *et al.*, 1995; Francel *et al.*, 2003).

A presença do coto distal é fator decisivo para que ocorra o brotamento do coto proximal, possivelmente decorrente do neurotropismo (Yoshii *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2004). Contudo, o volume distal não é fator determinante à regeneração (Zhang *et al.*, 1997).

Séries experimentais (Hentz *et al.*, 1991; Archibald *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1997; Stopiglia *et al.*, 1998; Geuna *et al.*, 2004; Valero-Cabré *et al.*, 2004) e clínicas (Lundborg *et al.*, 2004; Battiston *et al.*, 2005) não demonstram diferenças estatisticamente significantes entre a tubulização e a auto-enxertia convencional. Os resultados destes estudos propiciam confiabilidade ao modelo de tubulização utilizado neste experimento.

As células de Schwann possuem funções primordiais na regeneração do sistema nervoso periférico, como a migração ao local lesionado de ambos os cotos (Tseng *et al.*, 2003), produzem fatores neurotróficos (Fansa e Keilhoff, 2004), regulam o crescimento axonal, precedendo a remielinização (Kang *et al.*, 2003), conferindo sua orientação espacial (Davies, 1998), são capazes de organizar os compartimentos em torno dos axônios, recrutando moléculas de adesão e proporcionando acúmulo de proteínas e formação dos canais iônicos (Salzer, 2003), direcionando os axônios entre sinapses vizinhas (Kang *et al.*, 2003) e o favorecendo a maturação das sinapses neuromusculares (Herrera *et al.*, 2000).

Dentre as substâncias capazes de provocar estímulos às células de Schwann, as neuregulinas encontram-se em posição de destaque. Estas proteínas, ainda pouco estudadas, têm papel fundamental na estimulação de mitoses (Rosenbaun *et al.*, 1997), no desenvolvimento precoce a partir da crista neural, na sobrevivência, proliferação, crescimento, diferenciação, migração, maturação e mielinização (Garraat *et al.*, 2000; Leimeroth *et al.*, 2002; Maki, 2002; Vroemen e Weidner, 2003; Esper *et al.*, 2006).

As células de Schwann são ativadas via receptores tirosina quinase da família erbB, especialmente erbB2 e erbB3 (Grinspan *et al.*, 1996; Geuna *et al.*, 2003; Corfas *et al.*, 2004; Lai, 2005; Lyons *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

No modelo experimental adotado, utilizaram-se próteses de polietileno (Bryan *et al.*, 1999; Gama, 2000), devido à disponibilidade, segurança, facilidade de manipulação, da esterilização ao procedimento cirúrgico. Não se observou reação imunológica sistêmica ou inflamatória local exuberante, fibrose excessiva ou soltura das extremidades. Todos os casos continham o cabo de regeneração.

Adotou-se, como animal de experimentação, o camundongo C57BL/6J devido à facilidade de manipulação, disponibilidade, alta isogenicidade, conferindo padrão uniforme aos grupos pesquisados (Gama, 2000). A rotina de manejo proporcionada pela estrutura física e com técnicos experientes pertencentes ao Laboratório de Neurobiologia e do Desenvolvimento do ICBUSP, conferem facilidade de condução no pré e pós-operatório, adequado controle alimentar, ambiental e sanitário, com baixo custo operacional.

Neste estudo, foram utilizados animais machos, adultos jovens, com média de idade de oito semanas (Henry *et al.*, 1985), submetidos à implantação de prótese de polietileno em falha de 4,0 mm (Valero-Cabré *et al.*, 2004) no nervo ciático esquerdo.

Os animais foram divididos em três grupos de seis animais: grupo colágeno, colágeno associado à neuregulina 1-alfa, colágeno associado a neuregulina 1-beta.

Durante todo o período pós-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas, divididos em grupos, submetidos a ciclo circadiano de doze horas claro-escuro.

Não se observou, em nenhum exemplar, autofagia do membro operado, consupção (manutenção do peso em torno de 45g, sem alteração no exame macroscópico) ou morte.

A reintervenção cirúrgica foi realizada após quatro semanas (Silva *et al.*, 1988; Gama, 2000), visibilizando-se o cabo de regeneração envolto por fluido no interior dos tubos, como observado por Lundborg *et al.* (1982), em todos os casos.

Por meio de sorteio foram extraídos segmentos do nervo ciático contralateral de dois animais de cada grupo, formando-se o grupo controle.

O método utilizado para se obter as lâminas com os axônios mielinizados consiste na associação de paraformaldeído a 1% e glutaraldeído a 2%, e inclusão em resina epóxi (Silva *et al.*, 1988; Gama, 2000). A opção por este método foi determinada pela experiência do serviço, baixo custo, facilidade de elaboração e excelente qualidade do material final.

Padronizou-se o ponto médio do tubo para se proceder à contagem dos axônios mielinizados presentes no cabo regenerado.

Após secções transversais de 1µm de espessura e confecção final das lâminas, as imagens obtidas foram digitalizadas e armazenadas em computador, onde, através de programa específico, efetuaram-se as contagens dos axônios mielinizados (Chaves Neto, 2006).

O método de avaliação do regenerado por mensuração do número de axônios mielinizados caracteriza-se pela segurança e confiabilidade das análises diretas e objetivas das imagens estudadas (Lundborg *et al.*, 1982; Henry *et al.*, 1985; Zumioti, 1987; Silva *et al.*, 1988; Cordeiro *et al.*, 1988; Mattar Júnior, 1989; Stopiglia *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 1998; Gama, 2000; Taveggia *et al.*, 2005; Chaves Neto, 2006).

Na Tabela 1 e Gráfico 1, apresentou-se o número total de fibras regeneradas nos grupos controle, colágeno, colágeno associado a neuregulina 1-alfa e colágeno com adição de neuregulina 1-beta, após 4 semanas de evolução.

Observou-se que os grupos com adição de neuregulinas possuíam maior quantidade de fibras mielinizadas ao se comparar ao grupo contendo apenas colágeno. Já entre os grupos contendo as neuregulinas 1-alfa e 1-beta, observou-se semelhança do número total de fibras mielinizadas.

Os resultados obtidos na Tabela 2 apresentam diferença estatisticamente significativa entre o grupo colágeno e os grupos contendo neuregulinas.

Não se demonstrou diferença significativa entre os grupos contendo neuregulinas 1-alfa e 1-beta.

A Tabela 3 demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e os demais grupos. O grupo controle apresentou maior número de axônios mielinizados quando comparado aos outros grupos.

O número total de fibras mielinizadas contidas no grupo controle são similares aos trabalhos de Henry *et al.* (1985) e Gama (2000).

Cai *et al.* (2004) publicaram estudo onde tubulizaram perdas de 1,4 cm em nervo ciático de ratos em próteses contendo matrigel e microfilamentos com ou sem adição de neuregulina 1-beta. Demonstram melhores resultados nas associações entre neuregulinas e microfilamentos.

Enquanto Holmes *et al.* (1992) e Kim *et al.* (1999) sugerem que o subtipo alfa é mais potente que o beta. Jones *et al.* (1999), ao pesquisarem a especificidade e afinidade das neuregulinas aos receptores erbB, afirmam que o subtipo beta é mais potente que o alfa. Ambas as pesquisas foram realizadas *in vitro*.

No presente estudo, não se demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os subtipos 1-alfa e 1-beta. A hipótese decorrente destes resultados é que as neuregulinas estimulariam a migração e mitose das

células de Schwann, desencadeando-se maior velocidade e qualidade na regeneração nervosa. A relevância desse modelo experimental decorre do estudo de substâncias promissoras capazes de potencializar a regeneração periférica, ainda pouco estudadas *in vivo*.

As neuregulinas devem ser pesquisadas em futuros projetos, visando a corroborar a hipótese proposta através de associações a outros fatores neurotróficos pelo método de tubulização ou adição em selante de fibrina em neurorrafias término-terminal com avaliações imunohistoquímicas (Raab *et al.*, 2004) e eletrofisiológicas (Taveggia *et al.*, 2005).

7. CONCLUSÃO

As neuregulinas 1-alfa e 1-beta promovem melhora no processo de regeneração nervosa, expresso pelo número de fibras nervosas regeneradas.

8. REFERÊNCIAS

Archibald SJ, Shefner J, Krarup C, Madison RD. Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *J Neurosci.* 1994;15:4109-23.

Atanasoski S, Scherer SS, Sirkowski E, Leone D, Garratt AN, Birchmeier C, Suter U. ErbB2 signaling in Schwann cells is mostly dispensable for maintenance of myelinated peripheral nerves and proliferation of adult Schwann cells after injury. *J Neurosci.* 2006;26:2121-31.

Bahia, Antonio. Da regeneração, à tecnica a applicar na cirurgia dos nervos periphericos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1920.

Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MDP, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* 2003;23:66-71.

Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery.* 2005;25:258-67.

Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res.* 2004;26:151-160.

Bryan DJ, Wang KK, Summerhayes C. Migration of Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1999;15:591-6.

Cai J, Peng X, Nelson KD, Eberhart R, Smith GM. Synergistic improvements in cell and axonal migration across sciatic nerve lesion gaps using bioresorbable filaments and heregulin- β 1. *J Biomed Mater Res*. 2004;69A:247-58.

Chamberlain LJ, Yannas IV, Arrizabalaga A, Hsu HP, Norregaard TV, Spector M. Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: myofibroblasts and the cellular response. *Biomaterials*. 1998;19:1392-403.

Chaves Neto G. Estudo experimental comparativo entre auto-enxerto convencional e pré-degenerado na reconstrução de nervo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Chen YS, Liu CJ, Cheng CY, Yao CH. Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2004;24:509-14.

Chen S, Velardez MO, Warot X, Yu ZX, Miller SJ, Cros D, *et al*. Neuregulin1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci*. 2006;26:3079-86.

Chiu DT, Smahel Jiri, Chen L, Meyer V. Neurotropism revisited. *Neurol Res*. 2004;26:381-7.

Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg*. 1988;83:1013-9.

Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Tatner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci*. 2004;24:9250-60.

Dahlin LB, Anagnostaki L, Lundborg G. Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves. *Scan J Plast Hand Surg*. 2001;35:29-34.

Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin Nort Am*. 2001;12:341-52.

Dadalt Filho LG. Estudo experimental comparativo da reparação nervosa com sutura sob tensão, enxerto de nervo e segmento de veia para alívio da tensão: avaliação morfométrica e biomecânica [tese]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

Davies AM. Neuronal survival: early dependence on Schwann cells. *Curr Biol*. 1998;8:15-8.

Dunnen WFA, Lei BVD, Robinson PH, Holwerda A, Pennings AJ, Schakenraad JM. Biological performance of a degradable poly(lactic acid- ϵ -caprolactone) nerve guide: influence of tube dimensions. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:757-66.

Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA. Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res*. 2006;51:161-75.

Falls DL. Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *J Neurocytol*. 2003;32:619-47.

Fansa H, Keilhoff G. Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects. *Neurol Res.* 2004;26:167-73.

Ferrara G. Nuova Selva di Chirurgia Divisia tre Parti Venice. S Combi, 1608.

Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop.* 2000;29:167-73.

Francel PC, Smith KS, Stevens FA, Kim SC, Gosset J, Gosset C, *et al.* Regeneration of rat sciatic nerve across a LactoSorb bioresorbable conduit with interposed short-segment nerve grafts. *J Neurosurg.* 2003;99:549-554.

Gama SAM. Estudo experimental comparativo da ação das neuroquinas cardiotrofina-1 e oncostatina-M na regeneração nervosa periférica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.

Garratt AN, Britsch S, Biechmeier C. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell. *BioEssays.* 2000;22:987-96.

Garrity RW. The use of plastic and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. *Surg Forum.* 1955;6:517-20.

Geuna S, Raimondo S, Nicolino S, Boux E, Fornaro M, Tos P, Battiston B, Perroteau I. Schwann cell proliferation in muscle-vein combined conduits for bridging rat sciatic nerve defects. *J Reconstr Microsurg.* 2003;19:119-23.

Geuna S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi. Bridging peripheral nerve defects with muscle-vein combined guides. *Neurol Res.* 2004;26:139-144.

Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scherer SS. Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci*. 1996;19:6107-18.

Gulati AK, Raí DR, Ali AM. The influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts. *Brain Res*. 1995;705:118-24.

Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87-B:1309-19.

Henry EW, Chiu TH, Nyilas E, Brushart TM, Dikkes P, Sidman RL. Nerve regeneration through biodegradable polyester tubes. *Exp Neurol*. 1985;652-76.

Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC, Abraham G. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. *J Hand Surg*. 1991;16 A:251-61.

Herrera AA, Qiang H, Ko CP. The role of perisynaptic Schwann cells in development of neuromuscular junctions in the frog (*Xenopus leavis*). *J Neurol*. 2000;45:237-54.

Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*. 1992;256:1205-10.

Huber GC. A study of the operative treatment for loss of nerve substance in peripheral nerves. *J Morphol*. 1895;11:629-735.

Ikeguchi R, Kakinoki R, Matsumoto T, Tsuji H, Ishikawa J, Nakamura T. Rat regeneration through a silicone chamber implanted with negative carbon ions. *Develop Brain Res*. 2003;140:127-31.

Itoh S, Takakuda K, Kawabata S, Aso Y, Kasai K, Itoh H, Schinomiya K. Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 2002;23:4475-81.

Jenq CB, Coggeshall RE. Permeable tubes increase the length of the gap that regeneration axons can span. *Brain Res*. 1987;408:239-42.

Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. 2005;36:24-9.

Jones JT, Akita RW, Slwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for erbB receptors. *FEBS Lett*. 1999;447:227-31.

Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol*. 2002;181:204-12.

Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of after nerve injury. *J Neurocytol*. 2003;32:975-85.

Kim D, Chi S, Lee KH, Rhee S, Kwon YK, Chung CH, Kwon H, Kang MS. Neuregulin stimulates myogenic differentiation in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 1999;274:15395-400.

Kingham PJ, Terenghi G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat*. 2006;209:511-26.

Lai C. Peripheral glia: Schwann cells in motion. *Curr Biol*. 2005;15:332-4.

Langone F, Lora S, Veronese FM, Caliceti P, Parnigotto PP, Valenti F, et al. Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials*. 1995;16:347-53.

Leimeroth R, Lobsiger C, Lussi A, Taylor V, Suter V, Sommer L. Membrane-bound neuregulin I type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent progenitor cells. *Devel Biol.* 2002;246:245-58.

Lundborg G. Brain plasticity and hand surgery: an overview. *J Hand Surg Br.* 2000;25:242-52.

Lundborg G, Gelberman RH, Longo F, Powell HC, Varon S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1982;41:412-22.

Lundborg G, Rosén B, Dahlin L, Holmberg J, Rosén I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5 year follow-up. *J Hand Surg Br.* 2004;29:100-7.

Lyons DA, Pogoda HM, Voas MG, Woods IG, Diamond B, Nix R, Arana N, Jacobs J, Taltot WS. erbB3 and erbB2 are essential for Schwann cell migration and Myelination in zebrafish. *Curr Biol.* 2005;15:513-24.

Maki Y. Specificity in peripheral nerve regeneration: a discussion of the issues and the research. *J Orthop Sci.* 2002;7:594-600.

Mattar Júnior R. Reparação microcirurgica de nervos periféricos. Estudo comparativo entre a sutura epineural e o adesivo de fibrina [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1989.

Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2002;18:97-109.

Meyer RS, Abrams RA, Botte MJ, Davey JP, Bodine-Fowler SC. Functional recovery following neuroorrhaphy of the rat sciatic nerve by epineurial repair compared with tubulization. *J Orthop Res.* 1997;15:664-9.

Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg.* 2003;99:555-65.

Millesi H. Nerve grafting. *Clin Plast Surg.* 1984;11:105-13.

Millesi H, Ganglberger J, Berger A. Erfahrungen mit der mikrochirurgie peripher nerven. *Chir Plast Reconstr.* 1967;3:47.

Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 1999;105:660-6.

Ohbayashi K, Inoue HK, Awaya A, Kobayashi S, Hohga H, Nakamura M, Ohye C. Peripheral nerve regeneration in a silicone tube: effect of collagen sponge prosthesis, laminin and pyrimidine compound administration. *Neurol Med Chir.* 1996;36:428-33.

Podhajsky RJ, Myers RR. The vascular response to nerve transection: neovascularization in the silicone nerve regeneration chamber. *Brain Res.* 1994;662:88-94.

Raabe TD, Deadwyler G, Varga JW, Devries GH. Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia.* 2004;45:197-207.

Rabinovsky ED. The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. *Neurol Res.* 2004;26:204-10.

Ramon y Carral S. Degenerative and Regeneration of the Nervous System, vol 1. London, Oxford University Press, 1928.

Rosenbaum C, Karyala S, Marchionni MA, Kim HA, Krasnoselsky AL, Happel B, *et al.* Schwann cells express NDF and SMDF/n-ARIA mRNAs, secrete neuregulin and show constitutive activation of erbB3 receptors: evidence for a neuregulin autocrine loop. *Exp Neurol.* 1997;148:604-15.

Saijilafu YN, Yanada Y, Hara Y, Ichimura H, Yoshi Y, Ochiai N. Repair of peripheral nerve defect with direct gradual lengthening of the proximal nerve stump in rats. *J Orthop Res.* 2006;24:2246-53.

Salzer JL. Polarized domain of myelinated axonal. *Neuron.* 2003;40:297-318.

Sanders FK. The repair of large gaps in the peripheral nerves. *Brain* 1942; 65:281-337.

Scherman P, Lundborg G, Kanje M, Dahlin LB. Neural regeneration along longitudinal polyglactin sutures across short and extended defects in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg.* 2001;95:316-23.

Silva CF, Madison RD, Dikkes P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res.* 1988;325-34.

Spencer J. Surgical advances improve prognosis for patients with certain nerve injuries. *Wall Street Journal* [serial online] 2006, Fev 21. Disponível em: <http://wuphysicians.wustl.edu/newsArchive.asp?navID=1&ID=504>.

Stopiglia AJ, Lainetti RD, Pires RS, Da Silva CF. Avaliação morfológica de fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1998;35:80-3.

Suematsu N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. *Microsurgery.* 1989;10:71-4.

Sunderland, S. Degeneration of the axon and associated changes. In: Sunderland, S. Nerves and nerve injuries. Second edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1978.82-107.

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, *et al.* Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron.* 2005;47:681-94.

Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14.

Tseng CY, Hu GL, Ambron RT, Chiu DTW. Histologic analysis of Schwann cell migration an peripheral nerve regeneration in the autogenous venous nerve conduit. *J Reconstr Microsurg.* 2003;19:331-9.

Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *J Neurotrauma.* 2004;21:95-108.

Vroemen M, Weidner N. Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. *J Neurosci Methods.* 2003;124:135-43.

Wrede L. Ueberbrückung eines Nervendefektes Mittels Seidennaht and lebenden Venenstückes. *Deutsches Medizin Wochenschrift* 1909;35:1125.

Yoshii S, Shima M, Oka M, Taniguchi A, Taki Y, Akagi M. Nerve regeneration along collagen filament and the presence of distal nerve stump. *Neurol Res.* 2003;26:145-9.

Zhang W, Ochi M, Takata H, Ikuta Y. Influence of distal nerve segment volume on nerve regeneration in silicone tubes. *Exp Neurol.* 1997;146:600-3.

Zumiotti AV. Enxerto longo de nervo com emprego de técnica microcirúrgica – trabalho experimental realizado em nervo fibular de Coelho [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1987.