

ANDRÉ SILVEIRA PINHO

**Estudo crítico da neurotização do músculo
gastrocnêmio em ratos**

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

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Marques de Faria

**São Paulo
2021**

ANDRÉ SILVEIRA PINHO

**Estudo crítico da neurotização do músculo
gastrocnêmio em ratos**

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

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Marques de Faria

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pinho, André Silveira

Estudo crítico da neurotização do músculo
gastrocnêmio em ratos / André Silveira Pinho. --
São Paulo, 2021.

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

Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: José Carlos Marques de Faria.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Nervo fibular
3.Nervo tibial 4.Neurotização muscular direta
5.Músculo esquelético 6.Regeneração nervosa

USP/FM/DBD-346/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Se enxerguei mais longe foi por estar apoiado sobre o ombro de gigantes.”

Isaac Newton

À **Deus**, origem de todo o amor e fonte permanente de vida e luz.

Aos meus pais, **Acrisio e Suzana**, berço constante de inspiração e exemplos de dedicação, responsabilidade e dignidade.

Aos meus irmãos **Cibele, Larisse e Victor**, companheiros de uma vida, apoio fraterno e seguro na jornada.

À minha esposa **Marta** e minhas filhas **Alice e Júlia**, razões de tanta dedicação e zelo, sentido de uma vida dedicada à família.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. **José Carlos Marques de Faria**, orientador desta tese, pela oportunidade, confiança e orientação, transmitindo com empenho e generosidade conhecimentos profissionais e morais que hoje fazem parte da minha história.

Ao Professor Dr. **Marcelo Rosa de Rezende** pela recepção e consentimento para a execução desta tese pelo Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (LIM 41).

Aos professores **Reinaldo Nóbrega de Almeida**, **Liana Clébia de Moraes Pordeus** e **Carlos Roberto Carvalho Leite**, responsáveis por apresentar a nobre trajetória da evolução acadêmica, ensinando, incentivando e direcionando o então jovem pesquisador no caminho correto da ciência.

Ao amigo e colega Dr. **André Coelho Nepomuceno**, pelo imprescindível apoio desde o início da tese e orientações durante a qualificação, compartilhando experiências e ensinamentos fundamentais na elaboração e condução deste estudo.

À Dra. **Raquel Salomone**, pelo auxílio e parceria na elaboração das práticas laboratoriais relacionadas aos estudos eletrofisiológicos através da eletromiografia.

À secretária da Pós-graduação do Programa de Clínica Cirúrgica **Eliane Falconi Monico Gazetto** que com empenho, eficiência e paciência colaborou no seguimento esta tese.

Ao médico veterinário **Gustavo Bispo dos Santos** pela assistência na viabilização e execução dos experimentos.

À Dra **Elia Tamasso Espin Garcia Caldini** pela oportunidade de avaliação dos resultados no Laboratório de Biologia Molecular (LIM 59).

Ao funcionário **Dione Ribeiro** pela ajuda no manuseio e cuidado com os ratos nas fases experimentais do projeto.

À bióloga **Nilsa Regina Damasceno Rodrigues** e ao funcionário **Adão Caetano Sobrinho** pela disposição e assistência no andamento final da tese.

Ao amigo **Rodrigo Tonan** pela contribuição artística que ampliou o entendimento da tese.

À funcionária **Vânia Cardoso Ambrosio** pelo apoio administrativo no desenvolvimento do projeto.

Aos colegas médicos, professores, funcionários e todos que, de algum modo, contribuíram para concretizar este projeto.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 Nervo Periférico.....	9
3.1.1 Anatomia do nervo periférico	9
3.1.2 Lesões do nervo periférico.....	11
3.1.3 Regeneração do nervo periférico	12
3.1.4 Tratamento cirúrgico do nervo periférico	16
3.2 Neurotização Muscular Direta	18
3.3 Aplicação Clínica da Neurotização Muscular Direta	23
4 MÉTODOS.....	29
4.1 Normatizações	30
4.1.1 Manejo dos animais	30
4.1.2 Comissão de Ética.....	31
4.2 Animais.....	31
4.2.1 Caracterização da Amostra	31
4.2.2 Ambiente da Experimentação	32
4.3 Delineamento Experimental	32
4.4 Procedimento Cirúrgico.....	35
4.5 Manutenção Pós-Operatória	38
4.6 Avaliações I (Funcional e Fisiológica).....	39
4.6.1 Massa corporal	39
4.6.2 Avaliação funcional: Teste da Marcha (<i>Walking Track</i>)	39
4.6.3 Avaliação fisiológica: eletromiografia.....	42
4.7 Avaliação II (Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio)	46
4.8 Eutanásia.....	48
4.9 Descarte das Carcaças e Materiais.....	48
4.10 Análise Estatística.....	48
4.11 Local de Trabalho	49

5	RESULTADOS.....	50
5.1	Massa Corporal.....	51
5.2	Resultados das Avaliações I (Funcional e Fisiológica).....	52
5.2.1	Avaliação funcional: Teste da Marcha (<i>Walking Track</i>).....	52
5.2.2	Avaliação fisiológica: eletromiografia.....	57
5.3	Resultados da Avaliação II (Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio).....	62
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÃO.....	75
8	ANEXOS	77
9	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Por cento
©	- Direitos autorais
®	- Marca registrada
CEP	- Comissão de Ética e Pesquisa em Animais
CEUA	- Comissões de Ética no Uso de Animais
cm	- Centímetro
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DDIE	- Distância entre os Dedos Intermediários da Pegada Experimental
DDIN	- Distância entre os Dedos Intermediários da Pegada Normal
EMG	- Eletromiografia
EPE	- Extensão da Pegada Experimental
EPN	- Extensão da Pegada Normal
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	- Grama
Hz	- Hertz
IBM	- <i>International Business Machines Corporation</i>
ICB/USP	- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IFT	- Índice de Função Tibial
IOT	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia
kg	- Quilograma
kHz	- Quilo-hertz
LIM	- Laboratório de Investigação Médica
LPN	- Largura da Pegada Experimental
LPN	- Largura da Pegada Normal
Ltda.	- Limitada
mA	- Miliampere
mg	- Miligrama
MG	- Músculo Gastrocnêmio
mm	- Milímetro
ms	- Milissegundo
mV	- Milivolts
NC	- Nervo Ciático
NF	- Nervo Fibular
NS	- Nervo Sural

NT	-	Nervo Tibial
°C	-	Grau Celsius
p	-	Nível de significância
PAMC	-	Potencial de Ação Muscular Composto
Pós-op	-	Pós-operatório
Pré-op	-	Pré-operatório
sem	-	Semana
SPSS	-	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
USB	-	<i>Universal Serial Bus</i> (entrada de computador)
USP	-	Universidade de São Paulo
μV	-	Microvolts
Ω	-	Ohms (medida de impedância)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Rattus norvegicus albinus</i>	31
Figura 2 -	Grupos experimentais: grupo controle (C); nervo tibial seccionado (S); neurotização muscular direta com o nervo fibular, mantendo íntegro o nervo tibial (ND/TI); neurotização muscular direta com o nervo fibular associado à secção do nervo tibial (ND/TS); neurotização muscular direta com o nervo fibular e secção do nervo tibial seguido de reparo por neurorrafia primária término-terminal (ND/TR)	34
Figura 3 -	Sistema de anestesia inalatória digital da marca Bonther	35
Figura 4 -	Rato em decúbito ventral para o procedimento	36
Figura 5 -	Exposição do Nervo Ciático (NC), Nervo Sural (NS), Nervo Tibial (NT), Nervo Fibular (NF) e Músculo Gastrocnêmio (MG)	37
Figura 6 -	Microscópio cirúrgico DF Vasconcellos	38
Figura 7 -	Plataforma de avaliação	39
Figura 8 -	Visão frontal da execução do Teste da Marcha	40
Figura 9 -	Visão vertical da execução do Teste da Marcha	40
Figura 10 -	Medidas de extensão, largura e distância na pegada para cálculo do IFT	41
Figura 11 -	Pegada normal da pata traseira direita do rato	42
Figura 12 -	Computador portátil Samsung [®] , modelo ExpertX50 500R5H [®]	43
Figura 13 -	Eletromiógrafo portátil Neurosoft [®] , modelo Neuro-MEP-Micro [®]	43
Figura 14 -	Eletrodo de estimulação posicionado no nervo ciático isolado, 10 mm proximais à trifurcação	45
Figura 15 -	Eletrodo de captação no músculo gastrocnêmio posicionado 15 mm distalmente a trifurcação do nervo ciático	45
Figura 16 -	Eletrodo de estimulação no nervo ciático e de captação no músculo gastrocnêmio, inervado primariamente pelo nervo tibial	46

Figura 17 -	Pesagem em balança analítica de alta precisão.....	47
Figura 18 -	Avaliação do peso do músculo gastrocnêmio.....	47
Figura 19 -	Pegadas da pata traseira direita de ratos de cada grupo experimental após 12 semanas de pós-operatório.....	57
Figura 20 -	Músculo gastrocnêmio da pata traseira direita do rato após 12 semanas de pós-operatório.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Massa corporal em gramas dos cinco grupos no pré-operatório e após 12 semanas (média e desvio padrão)	51
Tabela 2 -	Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos quatro momentos de observação	53
Tabela 3 -	Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os grupos experimentais nos quatro momentos de observação	54
Tabela 4 -	Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os quatro momentos de observação em cada grupo experimental	55
Tabela 5 -	Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos	59
Tabela 6 -	Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos	61
Tabela 7 -	Índice de peso do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Evolução da massa corporal dos animais nos cinco grupos.....	52
Gráfico 2 -	<i>Box plot</i> do Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação.....	56
Gráfico 3 -	Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação em que as medianas dos valores foram representadas por linhas coloridas	56
Gráfico 4 -	Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12 ^a semana do período pós-operatório, medida em microvolts (μV)	58
Gráfico 5 -	Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12 ^a semana do período pós-operatório, medida em milissegundos (ms).....	60
Gráfico 6 -	Índice de peso do músculo gastrocnêmio dos cinco grupos experimentais.....	62

RESUMO

Pinho AS. *Estudo crítico da neurotização do músculo gastrocnêmio em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A lesão de nervos motores e consequente denervação ocasionam perda de função dos músculos correspondentes. Nesses casos o reparo cirúrgico está indicado, porém o número de axônios recuperados pode não ser suficiente para o restabelecimento pleno da função original. Tal fato é particularmente observado em casos de paralisia facial, na qual cada axônio do nervo facial controla apenas pequena porção de fibras musculares. Nos demais músculos esqueléticos, os axônios inervam grandes porções de fibras musculares. Assim, a possibilidade de obter melhora funcional mais completa com a adição de axônios por meio de neurotização muscular direta surge como alternativa técnica interessante em casos selecionados de lesão nervosa, particularmente na face. O objetivo desta tese foi analisar e comparar a recuperação neuromuscular no contexto da neurotização direta do músculo gastrocnêmio a partir da reprodução experimental em ratos. Cinquenta ratos Wistar adultos, após secção do nervo fibular direito, foram divididos em cinco grupos conforme procedimento nos nervos fibular, tibial e no músculo gastrocnêmio: grupo controle (C); nervo tibial seccionado (S); neurotização muscular direta com o nervo fibular, mantendo íntegro o nervo tibial (ND/TI); neurotização muscular direta com o nervo fibular associado à secção do nervo tibial (ND/TS); neurotização muscular direta com o nervo fibular e secção do nervo tibial seguido de reparo por neurorrafia primária término-terminal (ND/TR). Os resultados foram avaliados 12 semanas após o experimento por meio do teste da marcha, eletromiografia e índice de massa do músculo gastrocnêmio. O resultado funcional do grupo ND/TR revelou não haver diferença significativa em relação aos grupos ND/TI e ND/TS após 12 semanas. O grupo ND/TI não apresentou diferenças significativas na amplitude e latência em comparação ao grupo ND/TR. O grupo ND/TS apresentou amplitude maior ($p < 0,001$) que o grupo S e semelhante ao grupo ND/TR ($p = 0,086$). Em relação ao índice de massa muscular, apenas o grupo ND/TI manteve equivalência com o grupo C. Todas as demais comparações par a par apresentaram diferenças significativas do índice ($p \leq 0,002$). Ambos os grupos ND/TI e ND/TR revelaram recuperação funcional, fisiológica e anatômica do músculo gastrocnêmio significativamente maiores quando comparados ao grupo S.

Descritores: Ratos Wistar; Nervo fibular; Nervo tibial; Neurotização muscular direta; Músculo esquelético; Regeneração nervosa.

ABSTRACT

Pinho AS. *Critical study of gastrocnemius muscle neurotization in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Motor nerve damage and consequent denervation cause loss of function of the corresponding muscles. In these cases, surgical repair is indicated, but the number of recovered axons may not be sufficient to fully restore the original function. This fact is observed in cases of facial paralysis, in which each facial nerve axon controls only a small portion of muscle fibers. In other skeletal muscles, axons innervate large portions of muscle fibers. Thus, the possibility of obtaining a more complete functional improvement with the addition of axons through direct muscle neurotization appears as an interesting technical alternative in selected cases of nerve injury, particularly in the face. The purpose of this thesis was to analyze and compare neuromuscular recovery in the context of direct muscle neurotization from experimental reproduction in rats. Fifty adult Wistar rats, after transection of their right peroneal nerve, were divided into five groups according to the procedure in peroneal, tibial nerve and gastrocnemius muscle: the control group (C); nerve tibial transection group (S); direct muscle neurotization with the peroneal nerve, preserving the tibial nerve (ND/TI); direct muscular neurotization with the peroneal nerve associated with tibial nerve transection (ND/TS); direct muscle neurotization with the peroneal nerve and tibial nerve transection followed by end-to-end primary neurorrhaphy repair (ND/TR). The outcomes were assessed 12 weeks after the experiment by use of a walking track, electromyography and gastrocnemius muscle mass index. The functional result of the ND/TR group showed no significant difference compared to the ND/TI and ND/TS groups after 12 weeks. The ND/TI group does not revealed significant difference in amplitude and latency compared to the ND/TR group. The ND/TS group has a greater amplitude ($p < 0.001$) than the S group and similar to the ND/TR group ($p = 0.086$). Regarding the muscle mass index, only the ND/TI group maintained the equivalence with the control group (C). All the others muscle mass index comparisons had significant differences ($p \leq 0.002$). Both ND/TI and ND/TR groups revealed increase of functional, physiological and anatomical recovery of the gastrocnemius muscle when compared to the S group.

Descriptors: Wistar rats; Peroneal nerve; Tibial nerve; Direct muscle neurotization; Skeletal muscle; Nerve regeneration.

1 INTRODUÇÃO

A função esquelética e a integridade estrutural muscular dependem de inervação intacta. Lesões de nervo periférico levam ao déficit funcional da unidade motora, comprometendo de maneira global a qualidade de vida do paciente, como no caso de agravos relacionados à paralisia facial e lesão de plexo braquial (Terzis e Karypidis, 2009; Faria *et al.*, 2010; Zuckerman *et al.*, 2014; Cárdenas-Mejía *et al.*, 2017; Bassilios *et al.*, 2019; Zaizi *et al.*, 2020).

Traumas periféricos podem acarretar denervação completa, com imediata perda da função e progressiva atrofia muscular (Fu e Gordon, 1995; Hynes *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Bain *et al.*, 2001). Quando se observa perda completa da continuidade nervosa, o reparo cirúrgico está indicado (Siemionow e Brzezicki, 2009).

A recuperação morfológica e funcional, além da indicação cirúrgica de reparo, geralmente dependem de inúmeros fatores como a natureza da lesão, nível do acometimento, tempo de instalação do agravo, diâmetro e tipo de fibra nervosa afetada, idade do paciente e outras variáveis individuais (Sunderland, 1978; Mendonça *et al.*, 2003).

Caso não ocorra perda de substância, a neurografia terminoterminal permite regeneração axonal a partir do coto proximal para o coto distal (Siemionow e Brzezicki, 2009), sendo esta o tratamento padrão ouro para secção nervosa periférica (Haninec *et al.*, 2007; Fagotti de Almeida *et al.*, 2015).

Em casos de ausência de segmento nervoso distal para sutura, seja por perda importante do nervo ou do músculo na junção neuromuscular, a neurotização muscular direta está indicada (Noordin *et al.*, 2008; Swanson *et al.*, 2008).

O conceito de neurotização muscular direta, ou seja, de implantação do coto proximal remanescente diretamente no músculo denervado, foi introduzido no relato clínico de 1908 em que uma paciente jovem foi submetida a implante de coto proximal no músculo trapézio paralisado (Hacker, 1908).

Na ocorrência de desnervação muscular, as fibras do músculo sofrem processo de sensibilização à acetilcolina e, caso novas fibras motoras proximais sejam inseridas no músculo desnervado, estas provocariam uma adaptação funcional no ponto de contato das fibras com o tecido muscular a fim de constituir novas placas motoras terminais, possibilitando o procedimento de neurotização (Erlacher, 1915; Elsberg, 1917; Guth e Zalewski, 1963; Katz e Miledi, 1964; McNamara *et al.*, 1987; Tada *et al.*, 1991).

Alguns estudos e aplicações clínicas subsequentes apresentaram resultados inconsistentes, entretanto é possível que tais resultados insatisfatórios iniciais tenham sido causados pela baixa qualidade dos equipamentos da época e pela inadequada técnica cirúrgica associada a severa atrofia muscular dos casos clínicos (Guth e Zalewski, 1963; Gutman e Hanzlíková, 1967).

A técnica de neurotização tem como principal objetivo a formação de novas junções neuromusculares e/ou a expansão e ativação de zonas da antiga placa neuromuscular após o implante de brotos axonais (Tuturov, 2019).

Pesquisas mais recentemente têm estudado a fisiologia axonal (Normand e Rasband, 2015; Nepomuceno, 2017) e os efeitos do nervo diretamente na superfície

ou dentro do músculo denervado, tanto no nível experimental (Loeb *et al.*, 2002; Steinhorsdottir *et al.*, 2004; Jacobson *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2020) quanto clínico (Zuckerman *et al.*, 2014; Cárdenas-Mejía *et al.*, 2017; Bassilios *et al.*, 2019; Nassif e Yung Chia, 2019; Zaizi *et al.*, 2020; Djohan *et al.*, 2020), enfatizando o expressivo papel dos brotos axonais ectópicos em regeneração no controle da ativação muscular a partir de novas unidades motoras.

A qualidade da inervação e a recuperação da função muscular dependem da relação entre o número de axônios e fibras musculares disponíveis (Urso-Baiarda *et al.* 2007). Aspectos como o reduzido número de axônios em contato com as placas terminais e o direcionamento inadequado dos axônios em regeneração podem prejudicar a reinervação muscular (Bertelli *et al.*, 2005).

Após a reconstrução do nervo, o número de axônios recuperados pode não ser suficiente para o restabelecimento pleno da função original. Tal fato é particularmente observado em casos de paralisia facial, na qual cada axônio do nervo facial controla apenas pequena porção de fibras musculares. Nos demais músculos esqueléticos, os axônios inervam grandes porções de fibras musculares. Assim, a possibilidade de obter melhora funcional mais completa com a adição de axônios por meio de neurotização muscular direta surge como alternativa técnica interessante em casos selecionados de lesão nervosa, particularmente na face.

A capacidade do músculo de responder a impulsos elétricos originados de duas fontes nervosas distintas é controversa (Ladak e Spinner, 2013). Sunderland, em 1990, observou que em musculatura cuja inervação primária e conexões terminais estão preservadas, há uma incapacidade de formação de conexões funcionais com um segundo nervo associado. Entretanto, quando ocorre desnervação muscular, este

pode recuperar a função recebendo simultaneamente estímulos de nervos ortotópicos e heterotópicos (Furukawa *et al.*, 2008).

Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia das lesões nervosas e do advento das técnicas microcirúrgicas, os resultados do reparo ainda não atingiram seu auge. Pesquisas atuais envolvendo lesão nervosa são um desafio e novas modalidades estão em progresso a fim de melhorar ainda mais os resultados da reconstrução clínica do nervo e conseqüentemente da qualidade de vida do paciente (Bhandari, 2019).

A melhora no ato de falar, deglutir, movimentar as pálpebras, sorrir e mobilizar membros antes paralisados restabelecem a capacidade de se relacionar socialmente e renovam a esperança do retorno as atividades habituais e a resolução de problemas psicológicos tão comuns neste grupo de pacientes que, na impossibilidade de reparo, muitos desenvolvem algum quadro depressivo e possível isolamento social e afetivo (Dobel *et al.*, 2013).

A reprodução experimental de condições clínicas encontradas no tratamento das lesões nervosas, como no caso desta tese, objetiva apresentar diferentes casos em que a técnica de neurotização possa ser realizada e avaliar comparativamente o processo de reinervação muscular a fim de obter esclarecimentos sobre a metodologia mais adequada para o tratamento cirúrgico da denervação muscular.

2 OBJETIVO

Analisar e comparar a recuperação neuromuscular no contexto da neurotização direta do músculo gastrocnêmio em modelo experimental de ratos por meio dos seguintes parâmetros: funcional, eletromiográfico e trofismo muscular.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Três tópicos principais dividem a revisão da literatura:

- 1) Nervo periferico.
- 2) Neurotização muscular direta.
- 3) Aplicação clínica da neurotização muscular direta.

3.1 Nervo Periférico

3.1.1 Anatomia do nervo periférico

O sistema nervoso periférico transmite sinais entre a medula espinhal e o restante do corpo, sendo composto por células neuronais, gliais e estromais. Os nervos são compostos de várias combinações de neurônios motores e autônomos (eferentes) sensoriais (aferentes). Estes neurônios enviam sinais ao sistema nervoso central a fim de fornecer informações sensoriais à medula espinhal (resposta reflexa) e ao cérebro (Jobe e Martinez, 2013).

O sistema nervoso periférico dos mamíferos possui a mesma conformação anatômica em que fibras nervosas são cobertas por células de Schwann justapostas, formando uma bainha de mielina por axônio (no caso das fibras mielínicas) ou em grupos envolvendo grande número de axônios, formando a membrana basal das fibras amielínicas (Bercury e Macklin, 2015).

A mielina possibilita a propagação mais rápida do potencial de ação a partir da melhora da velocidade de condução ao limitar os locais de transferência iônica ao longo do axônio para os nódulos de Ranvier (Berde e Strichartz, 2009; Miner *et al.*, 2010).

As células de Schwann se originam da crista neural e desempenham importante papel na homeostasia tecidual, produção da bainha de mielina e da lâmina basal, possuindo função primordial no processo de regeneração dos nervos periféricos, fornecendo fatores tróficos e substratos que permitirão o crescimento das células nervosas lesionadas (Mirsky e Jessen, 1996; Mirsky e Jessen, 1999).

Os compartimentos do tecido conjuntivo são subdivididos em: endoneuro, camada mais interna de tecido conjuntivo frouxo de colágeno tipo III que recobre e nutre os axônios; perineuro, camada de tecido conjuntivo denso composta por colágenos tipos I e III que recobrem e dividem as fibras nervosas em fascículos; epineuro, constituído por tecido conjuntivo denso de colágeno tipo I, fibroblastos e fibrócitos que circunda e protege, além de nutrir os fascículos a partir de vasos sanguíneos presentes no tecido (Mackinnon, 1989).

3.1.2 Lesões do nervo periférico

As lesões nervosas foram classificadas inicialmente por Seddon, em 1942, a partir de artigo científico em que dividia as lesões nervosas em três grupos:

- Neuropraxia, situação em que ocorre apenas deficiência da condução dos estímulos elétricos, ocasionando paralisia temporária, mas não ocorrendo degeneração Walleriana. Observado geralmente secundário à compressão.
- Axonotmese, caracterizado pelo comprometimento parcial da continuidade dos axônios e da bainha de mielina com preservação da integridade do perineuro e epineuro, produzindo degeneração Walleriana na porção distal.
- Neurotmese, injúria mais severa em que há disruptura completa do nervo.

Sunderland, em 1951, reclassificou as lesões nervosas baseado na gravidade da injúria tecidual, subdividindo a axonotmese de Seddon (1942) em três situações a depender da cobertura fascicular, totalizando cinco categorias. O tipo 1 de Sunderland equivale à neuropraxia de Seddon em que apenas é observado lesão parcial da bainha de mielina.

No tipo 2 de Sunderland o endoneuro e o epineuro seguem intactos, podendo haver recuperação axonal completa. O tipo 3 observa-se a descontinuidade do endoneuro com continuidade do peri e epineuro, com menor chance de recuperação completa pela possibilidade de fibrose do endoneuro. Quando há descontinuidade tanto do endoneuro quanto do perineuro, mas permanência do epineuro, a classificação de Sunderland é do tipo 4. Quando há ruptura completa de todas as camadas do nervo como ocorre na neurotmese de Seddon (1942), a lesão é classificada como tipo 5 de Sunderland.

3.1.3 Regeneração do nervo periférico

A capacidade dos axônios em regenerar e recuperar conexões funcionais, após lesão de nervo periférico, depende do tipo e localização da lesão. Além da distância que os axônios devem crescer novamente para atingir a área a ser reinervada (Navarro *et al.*, 2018).

Nas neuropraxias, como relatado acima, ocorre apenas deficiência da condução dos impulsos elétricos por dano restrito à bainha de mielina, gerando paralisia temporária e reversível, sem degeneração Walleriana. Nas lesões classificadas como axonotmese, com comprometimento parcial da continuidade dos axônios e da bainha de mielina e preservação da integridade do perineuro e epineuro, ocorre degeneração Walleriana e regeneração nervosa (Seddon, 1942).

Waller, em 1851, descreveu as alterações degenerativas observadas após a transecção nervosa. A degeneração Walleriana inicia logo após o trauma nervoso, havendo decomposição mielínica, de axônio distal e proximal até o primeiro nó de Ranvier, além de remoção fagocitária por macrófagos e células de Schwann, processo que ocorre de uma semana a vários meses. Dependendo da gravidade da lesão e da proximidade com o corpo celular, mudanças semelhantes podem se estender além do primeiro nó de Ranvier e causar morte neuronal (Glenn e Talbot, 2013).

A degeneração Walleriana atua criando microambiente distal ao local da lesão que favorece novo crescimento axonal dos neurônios sobreviventes. O corpo celular de neurônios lesados sofre reação neuronal com redução da função de síntese das substâncias relacionadas à transmissão sináptica e alteração para um estado de promoção de crescimento. Este estado promove mudanças metabólicas reversíveis necessárias para a regeneração e alongamento axonal (Gordon e Fu, 1997; Makwana e Raivich, 2005; Allodi *et al.*, 2012).

As mudanças são representadas pela cromatólise central, caracterizada pela tumefação do corpo celular, desaparecimento dos corpúsculos de Nissl da porção central da célula e deslocamento do núcleo para a periferia; aumento na produção de tubulina, actina, GAP-43 e de múltiplos neuropeptídeos e citocinas associadas ao crescimento neuronal a partir de alterações no perfil de transcrição do RNA mensageiro (Gordon e Fu, 1997; Bejrowski *et al.*, 2005).

As células de Schwann, mediadores primários fundamentais no desencadeamento de diferentes eventos na degeneração Walleriana, tornam-se ativas 24 horas após a lesão, apresentando aumento nuclear, citoplasmático e da taxa mitótica. Elas atraem macrófagos que juntos atuam na produção de substâncias associadas ao processo de regeneração (neurotrofina 3, proteína ácida das fibras gliais, fator neurotrófico derivado da glia e do cérebro, fatores de crescimento nervoso e fibroblástico básico), além de promover a formação da nova matriz extracelular rica em colágeno, fibrina, fibronectina, capilares e células endoteliais que auxiliarão na migração, estruturação e desenvolvimento dos novos prolongamentos axonais (de Luca *et al.*, 2014; Faroni *et al.*, 2015).

As células de Schwann desdiferenciadas, após eliminar os resíduos de mielina, proliferam nos tubos endoneurais remanescentes da matriz extracelular no segmento distal e se organizam em canais conhecidos como Bandas de Bungner, tubos ricos em fatores tróficos ao crescimento axonal que auxiliarão na condução e preservação dos brotos axonais em regeneração (Stoll e Müller, 1999).

Os brotos axonais são finos prolongamentos que advém do nó de Ranvier mais proximal a lesão e avançam em direção distal. No caminho para o coto do nervo distal, os brotos são inicialmente orientados de forma aleatória, mas a partir da

regulação da expressão positiva de actina e miosina dentro do corpo celular, apresentam direção definida (Marx, 1995; Costigan *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2009).

Esses brotos são inicialmente amielínicos e, conforme o avanço do processo de regeneração, tornam-se mielinizados, iniciando a recuperação funcional. Caso as fibras em regeneração sejam incapazes de encontrar apropriadamente os tubos na região distal, elas podem sofrer remissão ou formar um neuroma a partir de axônios ectópicos, fonte de dor neurogênica pelo acúmulo de canais de sódio no local (Mackinnon e Dellon, 1988; Mackinnon, 1989; Lunn *et al.*, 1990).

A taxa de regeneração axonal pode variar dependendo da localização ao longo do neurônio. Os segmentos mais distais podem variar na faixa de 1 a 2 milímetros por dia e os proximais podem progredir na velocidade de 2 a 3 milímetros por dia. O caminho de crescimento pode ser interrompido por tecido cicatricial ou interações célula-célula ou célula-matriz de células não neuronais. Os brotos então liberam proteases e ativadores do plasminogênio a fim de permitir a continuidade da regeneração (Geraldo *et al.*, 2009).

O objetivo final do processo de regeneração consiste no restabelecimento das junções neuromusculares e reinervação de órgãos alvo com restituição das funções correspondentes, logo este restabelecimento depende da interação entre os axônios em regeneração e das membranas basais das miofibrilas (Gordon e Fu, 1997; Makwana e Raivich, 2005; Allodi *et al.*, 2012).

A divisão pós-sináptica segue inalterada com a denervação aguda, mas observa-se aumento na sensibilidade dos receptores de acetilcolina (Gorio *et al.*, 1981) e já ocorre a degeneração de fibras musculares. Estas fibras progridem para atrofia, tornando-se evidente após semanas da lesão. Ocorre acréscimo do influxo de

cálcio na musculatura, causando perda das proteínas contráteis e metabólicas, evoluindo para atrofia muscular (Lieber, 2002). Histologicamente, a presença de células em alvo constitui sinal patognomônico desta atrofia neurogênica, mas é possível observar também fibras musculares atroficas ingurgitadas com núcleo centralizado (Cancilla, 1984).

Após denervação, placas neuromusculares permanecem intactas por até 12 meses, sendo possível a tentativa de reinervação neste período (Sulaiman e Gordon, 2013). Não ocorrendo regeneração nervosa e consequente reinervação muscular, as fibras musculares são substituídas por tecido gorduroso e conjuntivo fibroso em 12 a 24 meses, tornando o músculo progressivamente mais atrofiado e refratário à reinervação (Campbell, 2008).

Em casos de ruptura completa de nervo periférico, é necessário prosseguir com o reparo cirúrgico dos cotos nervosos lesados através da sutura direta terminoterminal, terminolateral ou por interposição de nervo autólogo em caso de impossibilidade de sutura primária (Navarro *et al.*, 2018).

Atualmente não existem técnicas de reparo que possam garantir a recuperação total das funções motoras e sensitivas normais de pacientes adultos após lesões nervosas graves (Lundborg, 2000).

3.1.4 Tratamento cirúrgico do nervo periférico

O restabelecimento da continuidade nervosa visando a permanência da função motora e sensitiva da área inervada constitui procedimento básico a ser realizado no tratamento cirúrgico do nervo periférico, podendo ser obtido através de sutura direta entre cotos, interposição de enxerto de nervo nervosa ou neurotização muscular direta (Dvali e Mckinnon, 2007).

O adequado manejo cirúrgico das lesões nervosas periféricas demanda conhecimento detalhado da anatomia da região a ser operada, familiaridade com as técnicas de reparo e microcirurgia, além de disponibilidade de materiais e equipamentos específicos para o correto manejo cirúrgico (Harris e Tindall, 1991). O progressivo entendimento da biologia neuronal e os fatores envolvidos na regeneração nervosa aliados ao desenvolvimento de técnicas de microcirurgia tem resultado em significativa melhora do reparo nervoso (Brandt e Mackinnon, 1997).

As técnicas de reparo evoluíram ao longo de séculos, tendo início com William de Saliceto no século XIII, apresentando a primeira sutura entre cotos de nervo transecionado (Meals e Nelissen, 1995). Estudos com animais em meados de 1820 demonstraram contração muscular ocorrida após meses da secção e reparo nervoso imediato com nervo heterotópico. Baudens (1836) *apud* Létievant (1873), realizou pela primeira vez o reparo de nervo periférico em humanos, restaurando um nervo ulnar e um mediano.

James Paget, em 1847, apresentou um caso de reparo primário de nervo mediano após laceração em paciente de 11 anos de idade, observando completo restabelecimento da função, seguido de Waller que demonstrou em 1850 a natureza da degeneração neural periférica e posterior recuperação (*apud* Wilgis, 1982).

O tratamento das perdas extensas de tecido neural também foi campo de diferentes estudos a fim de preencher o distanciamento entre os cotos e atuar como guia para o crescimento axonal, tornando-se progressivamente importante técnica para tratar grandes falhas de tecido neural (Terzis *et al.*, 1975; Millesi, 1981).

Albert, em 1878, elaborou a primeira experiência clínica com enxertia de nervo e Glück relatou, em 1880, o que seria o início da utilização de enxerto em anastomose, interpondo ossos descalcificados para regeneração axonal.

Em 1947, Seddon propôs o enxerto de nervo autógeno para tratar lesões com ampla perda nervosa tecidual. Desde então diferentes estudos evoluíram na técnica do tratamento de falhas nervosas a partir do uso de enxertos e materiais, como a utilização de nervo alógeno em associação com imunossupressores (Tuma Jr., 1997).

Técnicas envolvendo substâncias preservadoras, como tubo de ácido poliglicólico, nervo alógeno preservado em glicerol e veias preservadas em glicerol (Costa *et al.*, 2006; Lemos *et al.*, 2008; Cunha, 2013) evoluíram no âmbito experimental.

Outras técnicas como a transferência nervosa, conduto de fibrina e o pedículo muscular inervado também progrediram (Longo *et al.*, 2016; Merrell *et al.*, 2001; Tóth *et al.*, 2005). Entretanto, o tratamento com enxerto de nervo autógeno segue como escolha principal no tratamento de defeitos nervosos (Griffin *et al.*, 2013).

Estas técnicas descritas requerem que o paciente possua adequados cotos a serem suturados diretamente ou através de um condutor. Nos casos clínicos em que o reparo primário não é possível, surge a necessidade de estudo e aprimoramento de diferentes técnicas capazes de prover condições de reparo total ou parcial do nervo lesado. Circunstâncias em que nenhum coto de nervo distal está disponível para

coaptação neural e em ocasiões em que há perda de nervo ou músculo no nível da junção neuromuscular, o implante do coto proximal seccionado ou avulsionado no músculo denervado, chamado de neurotização muscular direta, é indicada (Noordin *et al.*, 2008; Swanson *et al.*, 2008).

Faz-se necessário lembrar que a denervação neural causa diversas mudanças nas funções morfológicas da musculatura esquelética pela interrupção do controle motor e regulatório pelo nervo (Gutmann, 1962). O músculo desnervado geralmente perde a capacidade de atingir o estado estrutural e funcional completo, mesmo após a regeneração neural ocorrer, estando relacionado a falha dos nervos em alcançar as fibras musculares atroficas e desenvolver o contato integrado entre músculo e nervo (Fu e Gordon, 1995; Carlson *et al.*, 1996). Quanto maior o tempo de denervação, maior a progressão fibrótica local e menor será a melhora funcional após neurotização muscular (Terzis e Karypidis, 2009).

3.2 Neurotização Muscular Direta

Uma definição aceita sobre o termo neurotização é descrita como reinervação muscular após injúria nervosa quando a porção distal do nervo se encontra indisponível para reparo ou enxertia. Terminologias similares podem ser encontradas em diversos artigos sobre o tema, como “transferência de nervo para músculo”, “sutura nervosa heterotópica” e “cruzamento de nervo” por exemplo (Meals e Nelissen, 1995).

O conceito de neurotização direta do músculo foi introduzido por Hacker, em 1908, ao relatar o caso clínico bem-sucedido de implante do coto proximal do XI nervo craniano associado à um ramo motor do plexo cervical no músculo trapézio

paralisado de menina de 12 anos. Já os estudos experimentais iniciais sobre neurotização muscular direta, datado do século XX, foram projetados a fim de determinar efeitos da neurotização dos músculos paralisados. Heineke, em 1914, iniciou a técnica cirúrgica experimental baseada em implantar diretamente nervo motor em músculo paralisado.

Em 1915, Steindler, usando modelo experimental para cães, e Erlacher (1915), usando modelo de coelho, relataram bons resultados no processo de neurotização muscular direta. Entretanto Steindler, em 1916 e Elsberg, em 1917, ambos utilizando modelos experimental de cães, relataram em diferentes trabalhos que nenhuma conexão funcional foi estabelecida entre os nervos implantados e os músculos.

Aitken, em 1950, avaliou o processo de neurotização dos diferentes ramos do nervo fibular implantando-os na porção lateral do gastrocnêmio e no músculo bíceps de coelhos e, após 100 dias, obteve resposta muscular a estimulação nervosa local e análise histológica. Os experimentos mostraram, como descrito por Hoffman (1951) que pode haver reinervação do músculo desnervado por um nervo implantado e as novas placas motoras terminais neste experimento foram encontradas na região do implante e não sobre ampla área do músculo. Os autores atribuíram este fato à curta duração do período regenerativo e afirmaram que a implantação de vários nervos pequenos ou os fascículos de um nervo maior teriam melhores chances de reinervar todo o músculo paralisado.

Katz e Miledi, em 1964, mostraram que os receptores de acetilcolina em músculos denervados se espalham por todo o músculo em vez de permanecerem agrupados na placa motora terminal que, após a denervação, desaparece como resultado da degeneração Walleriana. Esta sensibilidade à acetilcolina espalhada pela

fibra muscular, após a denervação, possibilita a implantação do coto proximal no músculo afetado, entretanto o resultado funcional não se assemelha ao obtido após reparo ou enxerto de nervo motor próprio (McNamara *et al.*, 1987).

O nervo, após implantado, influencia o desenvolvimento de junções neuromusculares ectópicas, induzindo alterações locais nas fibras musculares, transformando-as em ambientes propícios para o aparecimento subsequente de acetilcolinesterase (Sanes *et al.*, 1978; Gaillard e Horvat, 1993; Zimmermann *et al.*, 2008). Ocorre também a indução da atividade muscular, importante fator para a formação, manutenção, distribuição e metabolismo adicional da acetilcolinesterase nas junções neuromusculares (Guth *et al.*, 1966; Giacobini *et al.*, 1973; Howard *et al.*, 1973; Hartzell *et al.*, 1975; Bouma *et al.*, 1977).

Quando ocorre a neurotização muscular direta, o novo suprimento motor leva ao rearranjo enzimático e dos padrões histoquímicos das fibras musculares afetadas (Dubowitz, 1967; Burke *et al.*, 1973). Estas mudanças ocorrem com algum atraso após o estabelecimento de conexões neuromusculares funcionais pela regeneração de axônios (Grigoriadis *et al.*, 2004).

Seguindo os estudos sobre neurotização, em 1969, Sorbie e Porter realizaram estudo com 10 cães neurotizando, no ventre muscular dos músculos flexores radial do carpo, um fascículo motor da musculatura flexora ulnar do carpo e relatando ampla gama (44%-95%) de resultados funcionais em diferentes semanas de reinervação. Eles então sugeriram que resultados funcionais após o procedimento podem ser influenciados pelo tempo decorrido entre desnervação e implantação, número de fibras motoras em funcionamento e qualidade da recuperação alcançada nos sistemas aferente e eferente do eixo.

Em 1972, Sakellarides *et al.* realizaram experimento com cães, neurotizando diferentes nervos separados em dois ou três fascículos em seis diferentes grupos musculares de membros superior e inferior, resultando em retorno de 60% a 75% da função muscular original.

Brunelli *et al.*, em 1976, reinervaram porções musculares conhecidas como desprovidas de terminações nervosas, implantando o nervo fibular na região. Foram obtidas respostas musculares fisiológicas, sendo observada a formação de novas placas terminais motoras em zonas aneurais do músculo em questão.

Seguindo experimentos em animais, Brunelli e Brunelli relataram, em 1993, o retorno da função e formação da placa motora final após 4 semanas da neurotização do músculo gastrocnêmio utilizando o ramo motor do nervo fibular em coelhos, cujo nervo tibial foi removido. Sugeriu-se que a sensibilidade à acetilcolina do músculo normalmente innervado é limitada e confinada às placas motoras terminais. Quando novas fibras nervosas são inseridas no músculo normal, eles não são aceitos. Entretanto, o músculo desnervado é sensível a acetilcolina ao longo de suas fibras, então novas fibras nervosas inseridas no músculo desnervado são aceitos, provocando uma adaptação funcional que ocorre no ponto de contato da fibra nervosa com o músculo e nova placa motora final é formada.

Esta adaptação pode ocorrer através do “fenômeno de adoção” em que cada axônio motor reinerva duas a três fibras musculares, levando a formação de placas terminais motores gigantes, resultado do apelo quimiotático exercido pelas fibras musculares. O fenômeno depende do fato de axônios saudáveis ou regenerados, perto de fibras musculares desnervadas, enviarem brotos que se tornam ramos axonais. Os ramos então passam a reinervar fibras musculares desnervadas “órfãs” vizinhas, cuja sensibilidade à acetilcolina está espalhada pelas fibras (Brunelli e Brunelli, 1993).

Análise quantitativa da reinervação solear em ratos foi realizada, em 1997, por Payne e Brushart. O artigo discutiu a influência da distância entre o implante de nervo e a placa motora terminal original na formação de placas motoras terminais ectópicas e também no número total de placas reinervadas. Eles sugeriram que a distância entre o nervo implantado e a zona da placa motora original influenciam na morfologia da reinervação.

Askar *et al.*, em 2001, realizaram estudo comparativo entre técnicas de neurotização do músculo gastrocnêmio em coelhos, constatando que entre a neurotização direta com o nervo fibular e a neurotização associada a reparo primário do nervo tibial não há superioridade entre os métodos e que ambos podem ser úteis em caso de impossibilidade de reinervação muscular pela neurorafia e enxerto nervoso.

Em relação ao tempo de denervação, o estudo em ratos de Keilhoff e Fansa, em 2005 observaram melhores respostas da técnica de neurotização muscular direta quanto mais precoce for o reparo, relatando resultados superiores no reparo imediato e após 2 semanas de denervação e progressivamente inferiores, mas presentes, após 4 e 6 semanas.

Em estudos com modelo de rato de denervação crônica, observou-se melhores resultados de recuperação funcional no grupo de neurotização muscular direta em relação ao de reparo microcirúrgico, indicando a neurotização como possível alternativa cirúrgica em casos de denervação muscular prolongada (Swanson *et al.*, 2008).

Kang *et al.*, em 2012, investigaram se o músculo pode ser reinervado e recuperar a função muscular a partir de modelo *in vivo* de desnervação seguida de neurotização direta. Os resultados sugeriram que o músculo desnervado pode ser inervado e se tornar funcional *in vivo* se estiver devidamente integrado ao nervo hospedeiro.

Seguindo os estudos, Kang *et al.*, em 2015, propuseram técnica combinada de prolongamento da região do nervo proximal com o auxílio de conduto de silicone preenchido com gel de colágeno e posterior neurotização com o intuito de avaliar a restauração das funções na musculatura denervada. Concluiu-se pelo estudo que a técnica combinada apresentada pode levar a restauração completa das funções, mas é necessário utilizar um conduto mais sofisticado no ambiente regenerativo do estudo.

Estas pesquisas, visando o desenvolvimento de técnicas e tecnologias de reinervação de tecidos, constitui elemento necessário para o progresso da reabilitação de pacientes após denervação grave e perda de tecido. A tarefa prioritária é fornecer função motora aos músculos. Essa linha de pesquisa para a recuperação de nervos periféricos e reposição de perda de inervação dos tecidos constitui passo importante no desenvolvimento da neurociência moderna (Tuturov, 2019).

3.3 Aplicação Clínica da Neurotização Muscular Direta

Lesões de nervos periféricos não são em regra causas de desfechos fatais, mas podem causar declínio considerável na qualidade de vida do paciente (Stassart *et al.*, 2013).

A paralisia muscular facial, condição que desnuda todas as emoções e expressões do rosto humano, constitui exemplo clássico de deformidade com grave sequela social, mas passivo de reconstrução total ou parcial. O prognóstico da paralisia facial pode ser determinado pela função clínica do esfíncter do olho, elevador *anguli oris*, esfíncter oral e função do complexo depressor (Niparko, 1994; Terzis e Konofaos, 2013).

A neurotização muscular direta é utilizada quando há descontinuidade completa do nervo, ou seja, em casos de neurotmeose ou lesões nervosas de grau V (Zochodne e Levy, 2005). Avulsões com o nervo ainda próximo da junção neuromuscular como em acidentes com veículos automotores, desnervação muscular recente com musculatura trófica sem possibilidade de reparo primário, como em grandes cirurgias oncológicas, são exemplos de aplicações clínicas desta técnica (Brunelli *et al.*, 1976).

Nos primeiros relatos clínicos de neurotização muscular, o nervo lesado foi implantado no músculo como unidade única. A falta de equipamentos adequados disponíveis na época e a possível limitação dos axônios em alcançar áreas denervadas mais distantes da zona de implantação nervosa produziu resultado inferior ao esperado (Guth e Zalewski, 1963; Frey *et al.*, 1982).

Diferentes estudos avaliaram a neurotização em diversas situações clínicas. Em 1985, Millesi, em estudo de seis pacientes com paralisia unilateral de longa data do músculo orbicular da boca submetidos à neurotização da parte muscular inervada para a parte denervada, observou axônios mielinizados no enxerto, sugerindo que os enxertos de nervo foram neurotizados a partir do músculo orbicular da boca inervado.

Brunelli (1981), Brunelli e Monini (1985) e Brunelli (1989) relataram 47 casos de neurotização muscular direta em extremidades dos membros superiores, membros inferiores, e da cabeça e pescoço, com recuperação bem-sucedida da função motora em 42 casos.

Francel e Dellon, em 1992, apresentaram caso clínico em que a estratégia de salvamento do membro afetado foi bem-sucedida após ruptura completa do nervo

tibial proximal e compressão do nervo peroneal comum na fossa poplítea, neurotizando o músculo gastrocnêmio com enxerto nervoso da região proximal do coto do nervo tibial. Foi possível demonstrar boa função motora muscular e sensibilidade protetora na superfície plantar 18 meses após a reconstrução.

Relato de caso abordando neurotização direta do nervo tibial no gastrocnêmio após lesão no nervo tibial posterior observou função muscular apropriada, sugerindo a neurotização direta como técnica de resgate caso o coto do nervo distal não estiver disponível ou transferências de tendões e artrodese sejam inadequadas (Mackinnon *et al.*, 1993).

Chuang *et al.* (1995), em análise de 99 pacientes em restauração de abdução de ombro por transferência nervosa após avulsão de plexo braquial, apontaram os primeiros 5 meses após a lesão como o melhor período para reativar o músculo paralisado ou grupos musculares de forma eficaz.

Outro estudo de caso observou que os melhores resultados funcionais poderiam ser obtidos após neurotização ou nos primeiros 3 a 6 meses de desnervação, embora resultados promissores tenham sido relatados até 10 meses de tempo de desnervação (Dy *et al.*, 2013).

Não apenas o tempo de denervação, mas a idade do paciente são os principais fatores determinantes para o sucesso da neurotização muscular direta. Outros elementos também são relevantes como a qualidade e a quantidade de massa muscular não afetada, o uso dos fatores neurotróficos e da técnica cirúrgica utilizada (Konofaos *et al.*, 2015).

Para o bom reparo cirúrgico, certos princípios básicos devem ser seguidos, como adequada iluminação, campo exangue, instrumentação microcirúrgica

adequada com material de sutura e/ou cola de tecido, além de dissecação, tratamento e coaptação do nervo realizados sob ampliação de lupa e/ou microscópio operacional. Importante também que a incisão seja estendida proximalmente e distalmente para obter efetiva exposição das extremidades nervosas (Bhandari, 2019).

Atualmente a neurotização é utilizada na prática clínica de reconstruções por traumatismos de membros inferiores e também de plexo braquial, região com anatomia susceptível às lesões pela deficiente proteção osteomuscular local e pela relação com regiões de ampla mobilidade, como a região escapuloumeral e cervical (Flores, 2006).

Estas lesões agressivas acometem geralmente pacientes adultos jovens e acarretam comprometimento significativo da capacidade laborativa pelas sequelas adquiridas (Cales e Trunkey, 1985). A frequência crescente nos últimos anos é observada principalmente por acidentes de trânsito, com destaque para os acidentes motociclísticos (Li *et al.*, 2019).

Até a década de 1960, poucas opções de tratamento estavam disponíveis, mas atualmente a ciência dispõe de importante arsenal terapêutico que fornece melhor probabilidade de recuperação funcional do membro superior (Narakas, 1985).

Os avanços nas técnicas microcirúrgicas permitiram melhores resultados após a neurólise e possibilitaram a neurotização que se tornou o maior diferencial no tratamento das lesões do plexo braquial (Rezende *et al.*, 2013), como em casos específicos de transferência de nervo preservado na lesão para outro músculo com função mais importante, ampliando assim as possibilidades terapêuticas (Narakas e Hentz, 1988).

Procedimentos associados à neurotização podem melhorar resultados clínicos. A neurotização de fascículos do nervo ulnar associados à transferência livre do

músculo grácil para recuperação do movimento de flexão do cotovelo em pacientes com dano crônico do plexo braquial são exemplos de procedimentos associados com satisfatórios resultados clínicos (Rezende *et al.*, 2021).

A técnica, no entanto, apresenta resultados clínicos irrelevantes em casos de longo tempo de desnervação em que não se observa fibrilação à eletromiografia (EMG), em casos associados à significativa ressecção muscular ou com massa muscular inadequada para uma função eficaz, sendo contraindicado nestas situações clínicas (Brunelli, 2005).

A neurotização muscular direta é utilizada também em diferentes cenários clínicos da face, como em pacientes com paralisia facial a fim de restaurar o ato de piscar os olhos a partir da neurotização no músculo *orbicularis oculi*, sorrir ou até reanimar o lábio inferior a partir da neurotização de parte do nervo hipoglosso por exemplo (Terzis e Karypidis, 2009; Terzis e Tzafetta, 2009).

A técnica é utilizada em associação com outras abordagens, como na estratégia de neurotização direta do músculo elevador da pálpebra superior a partir de ramos terminais do nervo frontal integrando outra neurotização via enxerto de nervo sural conectado ao tronco principal do nervo frontal, associação que visa maximizar o resultado pós-operatório de movimentação palpebral (Cárdenas-Mejía *et al.*, 2017).

Nassif e Yung Chia, em 2019, descreveram série de casos clínicos com resultados adequados de reanimação palpebral em dois tempos a partir de enxertia nervosa cruzada contralateral via nervo sural e, após 6 a 9 meses, enxertia de músculo platisma nas áreas receptoras palpebrais e subsequente neurotização direta dos nervos surais nas faixas de músculo recém enxertadas.

Chang *et al.* (2021) relataram que a paralisia do músculo frontal unilateral pode ser reanimada pelo músculo frontal contralateral por meio também de enxerto de nervo sural conectando os dois músculos, técnica de neurotização músculo-nervo-músculo.

Diante do exposto, as pesquisas experimentais e clínicas alinhadas ao conhecimento das diferentes possibilidades cirúrgicas pelo cirurgião reconstrutor são de importância fundamental para a evolução da restauração nervosa e consequente progresso da qualidade de vida e convívio social dos pacientes tratados.

4 MÉTODOS

4.1 Normatizações

Estudo experimental, longitudinal, prospectivo, aleatório, controlado e não cego.

4.1.1 Manejo dos animais

Respeitou-se, em todas as fases experimentais do trabalho, os princípios éticos relacionados à experimentação animal desenvolvidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os artigos do COBEA contemplam os três fundamentos básicos de sensibilidade, bom senso e boa ciência (Schneider e Souza, 2003).

Cumpriram-se as deliberações da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, em 15 de julho de 2009, que determina a formação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA), além de estabelecer os procedimentos e responsabilidades para uso de animais de laboratório.

4.1.2 Comissão de Ética

O presente estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com animais da FMUSP, obtendo aprovação da CEUA.

Protocolo de pesquisa de número 093/16.

4.2 Animais

4.2.1 Caracterização da Amostra

Composta por 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), heterogênicos da linhagem Wistar, idades entre 9 e 10 semanas de vida e peso corporal entre 300 e 350 gramas (Figura 1). Os animais experimentais foram obtidos do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e mantidos em gaiolas apropriadas e aprovadas para o estudo.



Figura 1 - *Rattus norvegicus albinus* [Fonte: acervo pessoal do autor]

4.2.2 Ambiente da Experimentação

Os animais foram avaliados no Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (LIM 41) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), mantidos para avaliações subseqüentes durante o prazo necessário para os experimentos (12 semanas) e posterior eutanásia no Biotério Setorial deste Laboratório.

Foram utilizadas caixas de polipropileno de medidas padronizadas (um rato por caixa), apropriadas para a espécie estudada, corretamente identificadas e com substituição de maravalha a cada 48 horas. Ambiente específico climatizado com temperatura aproximada de 22°C (± 2 °C) e umidade controlada. Ciclos de iluminação (claro/escuro) a cada 12 horas também foram regulados. Disponibilizou-se ração específica para a espécie (NUVILAB, NUVITAL[®]) e água *ad libitum* durante todo o experimento. O período de adaptação ocorreu por cinco dias.

4.3 Delineamento Experimental

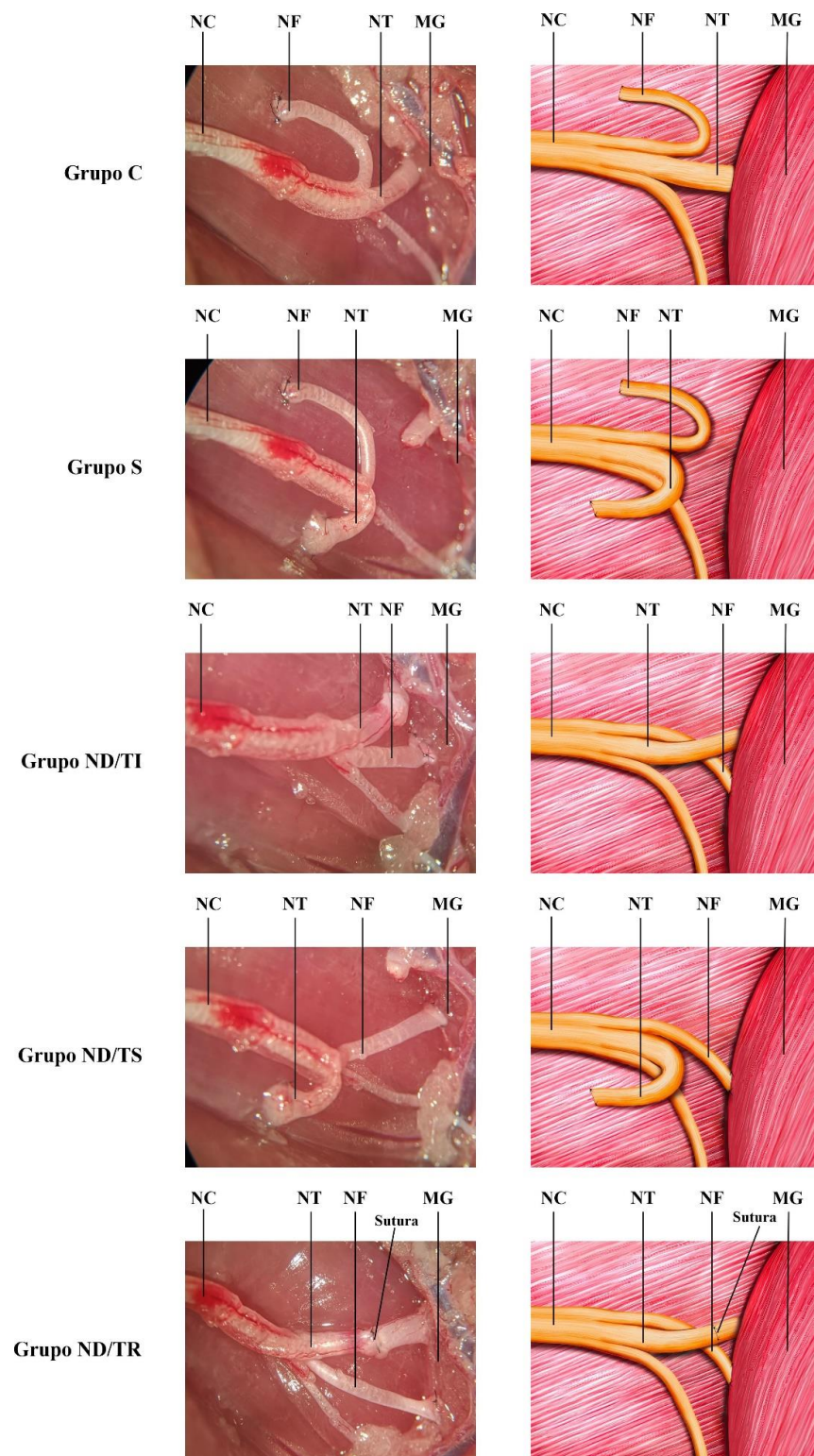
Os animais, após secção do nervo fibular direito, foram separados aleatoriamente em grupos com 10 ratos e total de 5 grupos (Junior, 2009). Estes foram identificados conforme procedimento nos nervos fibular, tibial e no músculo gastrocnêmio (Quadro 1): grupo controle (C); nervo tibial seccionado (S); neurotização muscular direta com o nervo fibular, mantendo íntegro o nervo tibial (ND/TI); neurotização muscular direta com o nervo fibular associado à secção do nervo tibial (ND/TS); neurotização muscular direta com o nervo fibular e secção do nervo tibial seguido de reparo por neurorafia primária terminoterminal (ND/TR).

Quadro 1 - Caracterização dos grupos experimentais

Grupo	Nervo Fibular	Nervo Tibial	Neurotização muscular direta	Neurorrafia
Controle (C)	Seccionado	Íntegro	Nenhuma	Nenhuma
Seccionado (S)	Seccionado	Seccionado	Nenhuma	Nenhuma
Neurotização direta e tibial íntegro (ND/TI)	Seccionado	Íntegro	Fibular	Nenhuma
Neurotização direta e tibial seccionado (ND/TS)	Seccionado	Seccionado	Fibular	Nenhuma
Neurotização direta e tibial seccionado e reparado (ND/TR)	Seccionado	Seccionado	Fibular	Primária do nervo tibial

No grupo S o coto proximal dos nervos tibial e fibular foram invertidos 180 graus, sepultados na musculatura adjacente e fixados com dois pontos de Nylon 10.0 (Microsuture® Indústria Ltda., Brasil) a fim de evitar reinervação pelos brotamentos de axônios locais. No grupo C, apenas o coto proximal fibular e no grupo ND/TS, apenas o tibial foi também invertido 180 graus, sepultado e fixado na musculatura adjacente, ambos pelo mesmo motivo supracitado.

Nos grupos em que houve neurotização muscular direta, procedeu-se a secção do nervo fibular antes da bifurcação (em ramo superficial e profundo) e introdução, sem tensão, da porção proximal do nervo no músculo gastrocnêmio (Figura 2).



NC: Nervo Ciático; NT: Nervo Tibial; NF: Nervo Fibular; MG: Músculo Gastrocnêmio.

Figura 2 - Grupos experimentais: grupo controle (C); nervo tibial seccionado (S); neurotização muscular direta com o nervo fibular, mantendo íntegro o nervo tibial (ND/TI); neurotização muscular direta com o nervo fibular associado à secção do nervo tibial (ND/TS); neurotização muscular direta com o nervo fibular e secção do nervo tibial seguido de reparo por neurorrafia primária término-terminal (ND/TR) [Fonte: acervo pessoal do autor e ilustrações de Rodrigo Tonan (desenhista)]

4.4 Procedimento Cirúrgico

Todas as intervenções cirúrgicas e avaliações foram realizadas exclusivamente pelo pesquisador, diminuindo a ocorrência de alterações técnicas e de outras variáveis.

Em todas as intervenções cirúrgicas, os ratos foram pesados e anestesiados, empregando-se anestesia inalatória com isoflurano a 3% na indução e 1% na manutenção durante o procedimento (Neves, 2013).

A forma inalatória favorece o controle mais eficiente da anestesia, além de proporcionar rápida metabolização e excreção do agente utilizado, promovendo rápida recuperação anestésica (Lapchik *et al.*, 2010).

Anestesia realizada utilizando o sistema de anestesia inalatória digital da marca Bonther disponível no LIM 41 (Figura 3).



Figura 3 - Sistema de anestesia inalatória digital da marca Bonther [Fonte: acervo pessoal do autor]

Após anestesiados, os animais foram posicionados em mesa de madeira na posição de decúbito ventral. As patas foram amarradas e a pata posterior direita foi submetida à tricotomia e antissepsia com solução tópica aquosa de Polivinil Pirrolidona a 10% (Figura 4).



Figura 4 - Rato em decúbito ventral para o procedimento [Fonte: acervo pessoal do autor]

Procedeu-se na face posterior da coxa direita, com lâmina número 11, incisão cutânea de 3 cm de comprimento, longitudinal e retilínea para exposição e dissecação romba entre os músculos glúteo máximo e bíceps femoral. Incisão efetuada desde o trocânter maior até o joelho, sendo possível expor e acessar a inervação ciática, tibial, fibular e sural, além do músculo gastrocnêmio (Figura 5).

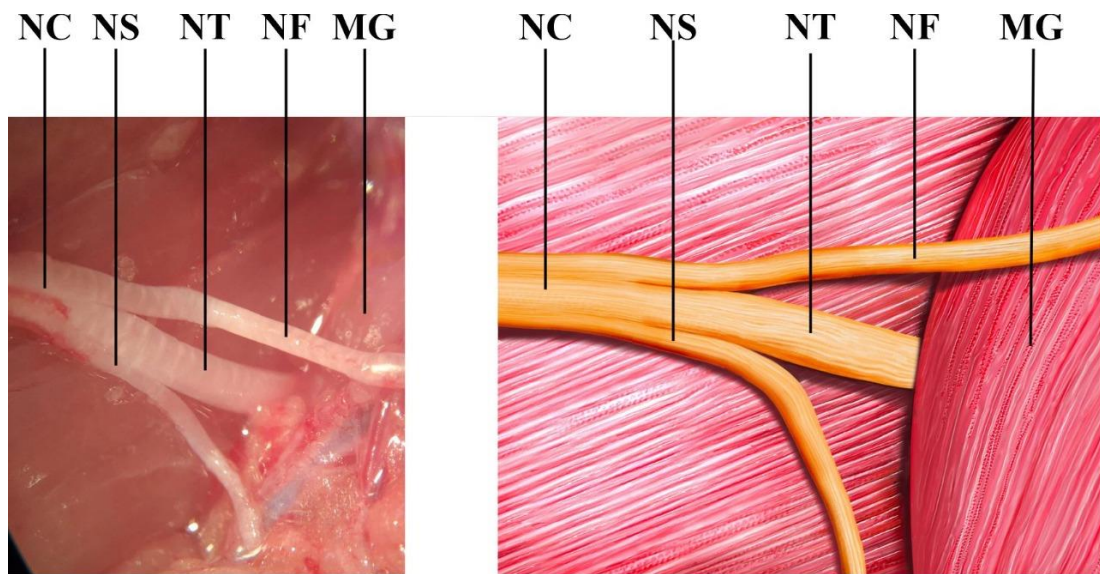


Figura 5 - Exposição do Nervo Ciático (NC), Nervo Sural (NS), Nervo Tibial (NT), Nervo Fibular (NF) e Músculo Gastrocnêmio (MG) [Fonte: acervo pessoal do autor e ilustrações de Rodrigo Tonan (desenhista)]

A sequência experimental foi realizada com auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcellos (OPMi6 Surgical Microscope, Zeiss, Germany) sob aumento de 10X (Figura 6).

Nos grupos ND/TI, ND/TR e ND/TS, procedeu-se a introdução do coto proximal do nervo fibular nas fibras musculares no ventre lateral do músculo gastrocnêmio. Realizou-se fixação de segurança entre as bordas do epineuro e o tecido muscular próximo com dois pontos de Nylon 10.0 (Microsuture® Indústria Ltda., Brasil).



Figura 6 - Microscópio cirúrgico DF Vasconcellos [Fonte: acervo pessoal do autor]

As neurorrafias do grupo ND/TR foram realizadas com quatro pontos de Nylon 10.0 (Microsuture[®] Indústria Ltda., Brasil) e com auxílio do mesmo microscópio cirúrgico, sob aumento de 10X, descrito anteriormente.

A síntese por planos das estruturas musculares e da pele foi realizada com fio de nylon 4.0 monofilamentar e agulha cortante três oitavos de 13 mm (Ethicon[®]), pontos separados.

4.5 Manutenção Pós-Operatória

Os animais permaneceram no Biotério Setorial do LIM 41, mantidos em gaiolas individuais e sob as mesmas condições especificadas anteriormente.

Utilizou-se cloridrato de tramadol 50 mg/mL, 5 mg/100g via intramuscular por 5 dias a cada 24 horas para analgesia pós-operatória.

4.6 Avaliações I (Funcional e Fisiológica)

4.6.1 Massa corporal

Os animais foram pesados no pré-operatório e após 12 semanas da intervenção cirúrgica. Utilizou-se balança analítica apropriada (Ohaus MB 35 Mettler®).

4.6.2 Avaliação funcional: Teste da Marcha (*Walking Track*)

O teste da marcha ou *Walking Track* afere as variações da marcha como efeito da lesão neural geradora de claudicação na pata experimental. Esta medida é possível através de diferentes medidas das pegadas do animal impressas na plataforma de avaliação. A análise do grau de recuperação funcional do músculo gastrocnêmio nos diferentes grupos foi realizada aplicando-se este teste.

Os ratos tiveram as patas traseiras pintadas com tinta nanquim azul da marca Acrilex®, e posicionados para caminhar sobre papel branco em corredor padronizado (8,2 cm por 42,0 cm de medida) de maneira a deixarem as pegadas registradas (Figuras 7, 8 e 9).

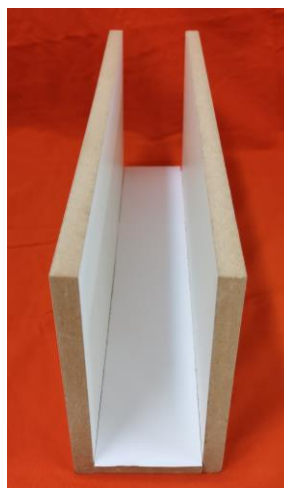


Figura 7 - Plataforma de avaliação [Fonte: acervo pessoal do autor]



Figura 8 - Visão frontal da execução do Teste da Marcha [Fonte: acervo pessoal do autor]



Figura 9 - Visão vertical da execução do Teste da Marcha [Fonte: acervo pessoal do autor]

Todos os ratos do estudo realizaram o teste antes da intervenção cirúrgica com o intuito de treinamento e para aferir valores basais do Índice de Função do Nervo Tibial (Quadro 2). Realizaram também com 4, 8 e 12 semanas de pós-operatório, sendo todas as medidas efetuadas pelo mesmo examinador que desconhecia a identidade de grupo avaliado.

Quadro 2 - Fórmula para cálculo do Índice de Função Tibial (IFT)

$$\text{IFT} = -37.2 \times [(EPE - EPN) \div (EPN)] + 104.4 \times [(LPE - LPN) \div LPN] + 45.6 \times [(DDIE - DDIN) \div DDIN] - 8.8$$

EPE: extensão da pegada experimental; EPN: extensão da pegada normal; LPE: largura da pegada experimental; LPN: largura da pegada normal; DDIE: distância entre os dedos intermediários da pegada experimental; DDIN: distância entre os dedos intermediários da pegada normal; IFT: próximo a zero ± 12 : função motora normal do nervo tibial; IFT: próximo a -100 ± 12 : completa disfunção.

O Índice de Função Tibial (de Medinaceli *et al.*, 1982; Bain *et al.*, 1989) utiliza três variáveis (considerados a partir da pata traseira do rato): extensão da pegada calculada pela distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo, largura da pegada representada pela distância entre o 1º e 5º dedos e distância entre os dedos intermediários, no caso entre o 2º e 4º dedos (Figuras 10 e 11).

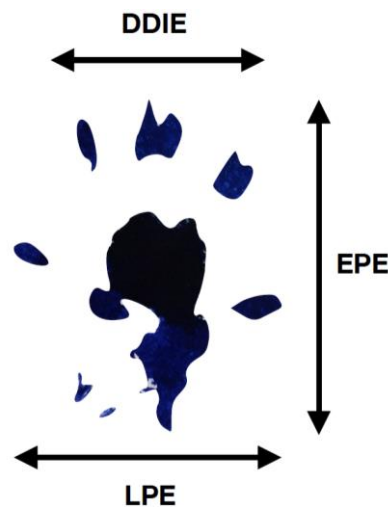


Figura 10 - Medidas de extensão, largura e distância na pegada para cálculo do IFT [Fonte: acervo pessoal do autor]



Figura 11 - Pegada normal da pata traseira direita do rato [Fonte: acervo pessoal do autor]

4.6.3 Avaliação fisiológica: eletromiografia

A avaliação da função fisiológica ocorreu na 12^a semana no pós-operatório, antes da coleta muscular. O acesso cirúrgico à musculatura local e ao nervo ciático até sua trifurcação foi realizada através de cicatriz prévia, com incisão local no membro posterior direito, após os mesmos procedimentos de anestesia inalatória, tosquia, imobilização e antissepsia local.

Em ambiente de temperatura em torno de 25 °C, o nervo ciático foi estimulado para análise do potencial de ação muscular composto (PAMC) no músculo gastrocnêmio (MG), sendo verificados os parâmetros de amplitude e latência.

O PAMC foi registrado utilizando-se um eletromiógrafo portátil Neurosoft[®], modelo Neuro-MEP-Micro[®], conectado pela entrada USB a um computador portátil Samsung[®], modelo ExpertX50 500R5H[®], dispensando a utilização de fonte externa de energia. O aparelho de eletromiografia foi configurado com filtro passa alta 10 Hz; filtro passa baixo 10 KHz; filtro notch desligado; margem de entrada do sinal de 60 mV; taxa de amostragem de 10 KHz. O estudo do potencial de ação muscular composto foi realizado pelo software Neuro-MEP.NET, versão 2.4.23.0 (Figuras 12 e 13).

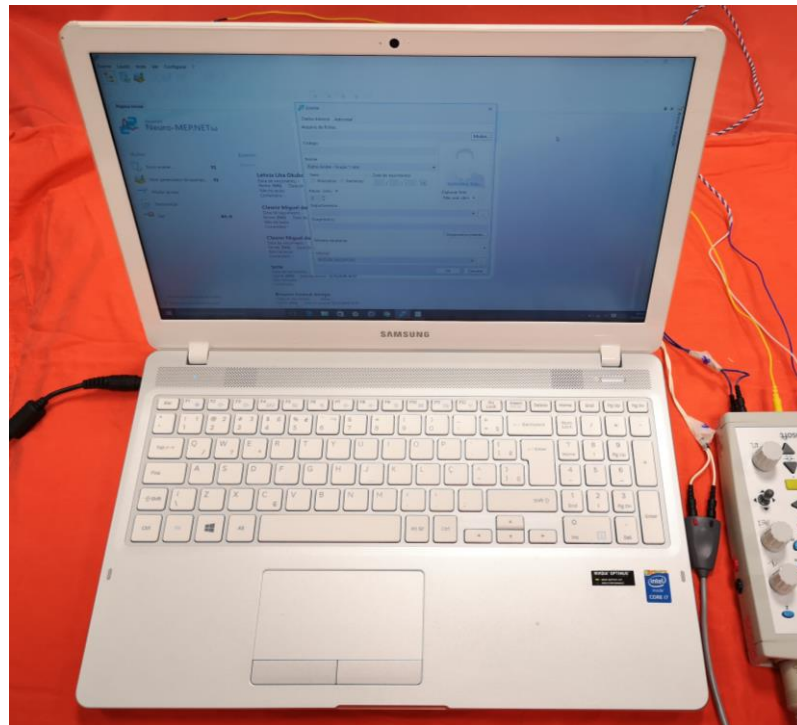


Figura 12 - Computador portátil Samsung®, modelo ExpertX50 500R5H® [Fonte: acervo pessoal do autor]



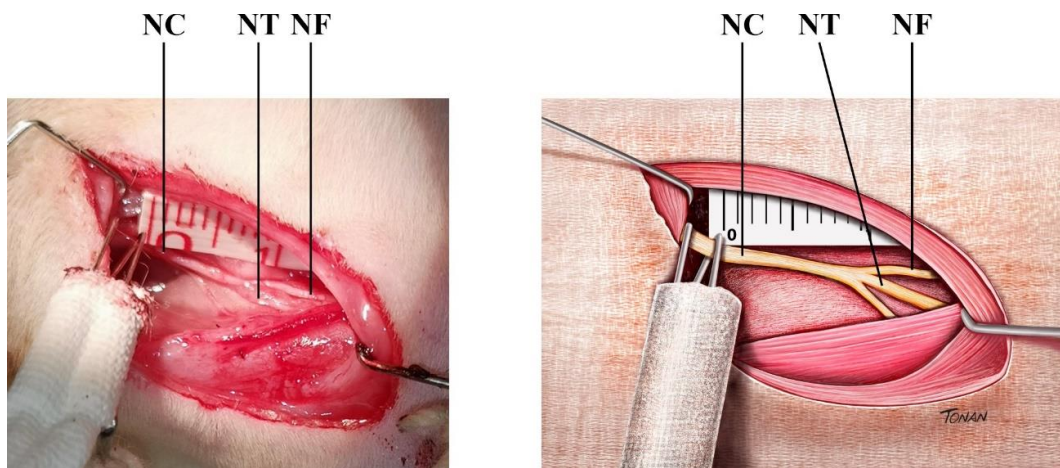
Figura 13 - Eletromiógrafo portátil Neurosoft®, modelo Neuro-MEP-Micro® [Fonte: acervo pessoal do autor]

Eletrodos de agulhas monopolares subdérmicas, não teflonados, em número de dois, medindo 12 mm de comprimento por 0,35 mm de diâmetro (Spes Medica[®]) foram utilizados para estimulação e captação elétrica, permanecendo em paralelo com 5mm de distância fixa entre si.

No eletrodo de captação foi mantido um revestimento isolante em 9 mm de extensão e permanência sem cobertura de 3 mm na porção distal. No caso do eletrodo de estimulação, as porções distais foram arqueadas a fim de melhor posicionamento no nervo, evitando lesões locais. Os eletrodos eram reposicionados ou substituídos caso a impedância excedesse 5 Ω .

Um eletrodo monopolar (Spes Medica[®]) revestido como os de captação foi disposto no ponto médio entre os eletrodos de estimulação e de captação para atuar como neutro (terra).

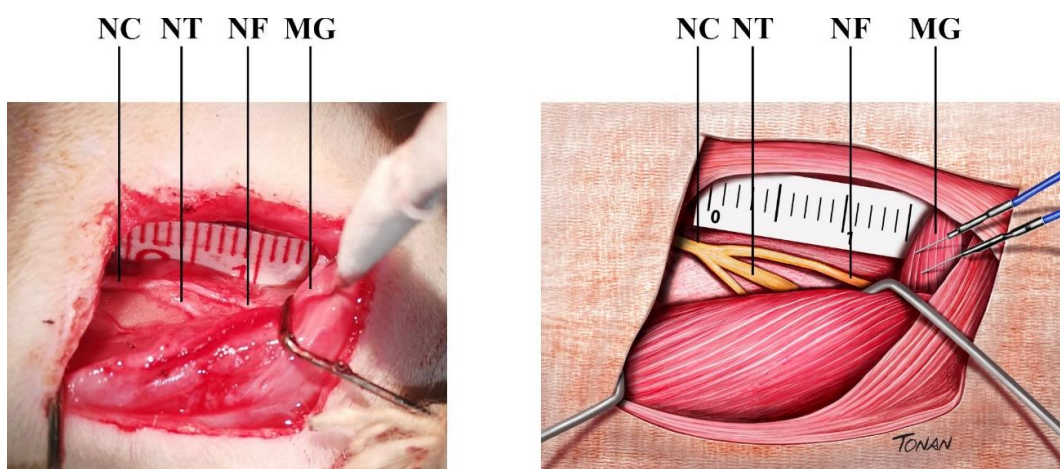
Os estímulos elétricos com duração de 0,2 ms e intensidade inicial de 0,1 mA foram aplicados a partir do eletrodo de estimulação posicionado no nervo ciático isolado a 10 mm proximais à trifurcação (Figura 14). Tais estímulos foram únicos, sem promediação, sendo intensificado gradativamente até alcançar a medida supramáxima (Nepomuceno *et al.*, 2016).



NC: Nervo Ciático; NT: Nervo Tibial; NF: Nervo Fibular.

Figura 14 - Eletrodo de estimulação posicionado no nervo ciático isolado, 10 mm proximais à trifurcação [Fonte: acervo pessoal do autor e ilustrações de Rodrigo Tonan (desenhista)]

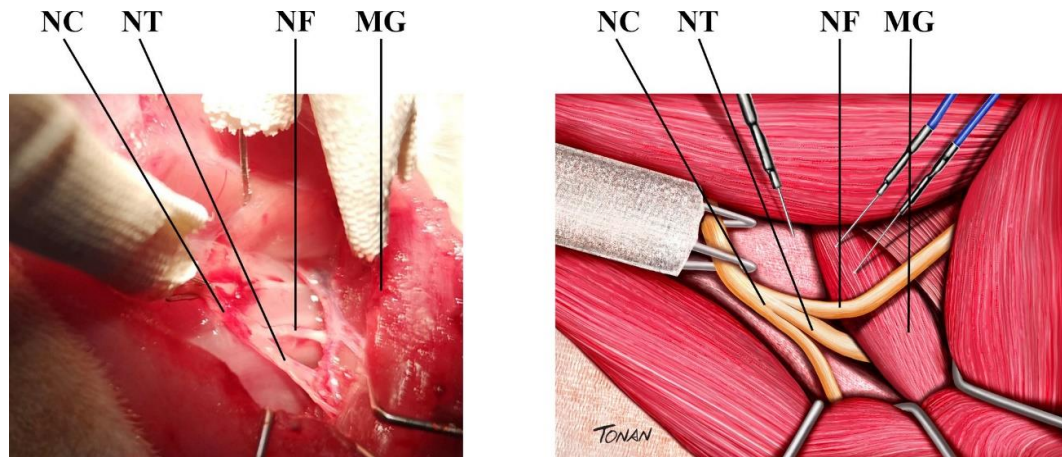
Avaliou-se a captação por meio de eletrodo inserido no ponto médio entre a porção proximal e o tendão distal do músculo gastrocnêmio, distando 15 mm da trifurcação do nervo ciático (Figura 15). Os parâmetros utilizados na varredura foram de 1,0 ms por divisão com janela total de 10 ms e ganho de 2,5 mV por divisão (Nepomuceno *et al.*, 2016).



NC: Nervo Ciático; NT: Nervo Tibial; NF: Nervo Fibular; MG: Músculo Gastrocnêmio.

Figura 15 - Eletrodo de captação no músculo gastrocnêmio posicionado 15 mm distalmente a trifurcação do nervo ciático [Fonte: acervo pessoal do autor e ilustrações de Rodrigo Tonan (desenhista)]

A Figura 16 representa os eletrodos dipostos em conjunto para o teste de eletromiografia (EMG) intraoperatória.



NC: Nervo Ciático; NT: Nervo Tibial; NF: Nervo Fibular; MG: Músculo Gastrocnêmio.

Figura 16 - Eletrodo de estimulação no nervo ciático e de captação no músculo gastrocnêmio, inervado primariamente pelo nervo tibial [Fonte: acervo pessoal do autor e ilustrações de Rodrigo Tonan (desenhista)]

4.7 Avaliação II (Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio)

Após realização da eutanásia 12ª semana de pós-operatório, os músculos gastrocnêmios do lado direito (experimental) e esquerdo (não operado), foram dissecados, soltos das demais musculaturas locais, incluindo o músculo sóleo e o tendão do calcâneo, e de suas origens e inserções para obtenção do corpo muscular completo.

Após a coleta, foi realizado a secagem manual para retirada de sangue e outros fluidos. Utilizou-se balança analítica de alta precisão (Mettler Toledo AB204®) para pesagem da musculatura do lado experimental e não operado (Salles *et al.*, 2013). Realizou-se o cálculo do índice de peso dividindo o peso do lado experimental pelo lado não operado, possibilitando a comparação entre os grupos em relação ao grau de trofismo muscular (Figuras 17 e 18).



Figura 17 - Pesagem em balança analítica de alta precisão [Fonte: acervo pessoal do autor]

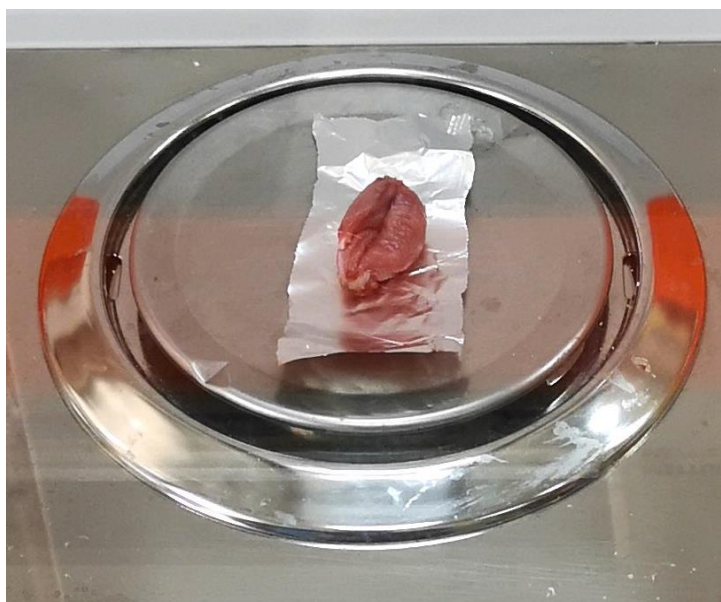


Figura 18 - Avaliação do peso do músculo gastrocnêmio [Fonte: acervo pessoal do autor]

4.8 Eutanásia

Os animais, após as avaliações descritas e coleta muscular, foram submetidos à eutanásia por injeção de dose letal do anestésico Pentobarbital Sódico (100 mg/kg), via intraperitoneal (Damy *et al.*, 2010).

4.9 Descarte das Carcaças e Materiais

As carcaças foram envolvidas e identificadas em sacos adequados, brancos, plásticos e opacos para a condução até as câmaras frias. Após, o descarte foi realizado pela empresa responsável pelo lixo biológico existente no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Os instrumentos perfurocortantes utilizados nos diferentes momentos do estudo foram separados em recipientes adequados (Descarpak[®]) e recolhidos pela empresa responsável.

4.10 Análise Estatística

Instituiu-se testes não paramétricos para estudo estatístico, uma vez que a hipótese da normalidade foi rejeitada (Rosner, 2006). As variáveis foram submetidas inicialmente à estudo descritivo. Nas variáveis quantitativas, a análise foi efetuada mediante a observação dos valores mínimos e máximos, além do cálculo de médias, desvios padrões, medianas e quartis.

Na comparação entre os cinco grupos no mesmo momento do estudo, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado, já que a hipótese da normalidade dos resultados foi descartada. Em casos de comparação dos grupos par a par, procedeu-se com o teste de Mann-Whitney, ajustado pela correção de Bonferroni.

O teste de Friedman foi aplicado para fins de comparação dos grupos nos diferentes momentos de avaliação e, quando necessária a comparação par a par, o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon, ajustado pela correção de Bonferroni foi adotado em seguida.

O nível de significância adotado para aplicação dos testes e análises estatísticas foi de 5% (0,05), com ajuste em caso de adoção da correção de Bonferroni.

Os dados foram dispostos em planilha eletrônica Microsoft Excel na versão *Microsoft Office* 2013 e analisados, visando a obtenção dos resultados, com o programa estatístico *International Business Machines Corporation / Statistical Package for Social Sciences* (IBM/SPSS) na versão 25.0.

4.11 Local de Trabalho

O Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) da FMUSP (LIM 41), localizado no 7º andar do IOT, constitui o local de realização da fase experimental, ou seja, cirurgias, testes da marcha e eletrofisiológicos, pesagem e eutanásia dos animais.

5 RESULTADOS

Cinquenta animais foram operados, ocorrendo óbito de um rato no grupo neurotização muscular direta com o nervo fibular associado à secção do nervo tibial (ND/TS) nas primeiras 4 semanas de pós-operatório, sem causa definida da morte. Os demais ratos apresentaram-se com aspecto e comportamento adequado.

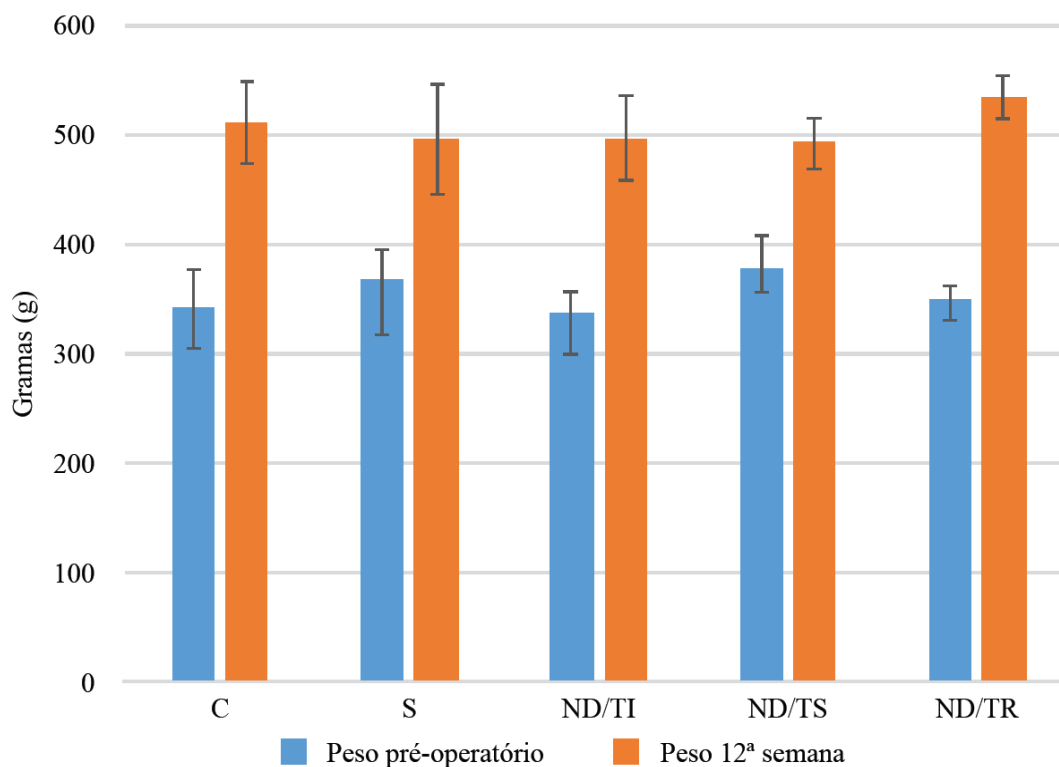
5.1 Massa Corporal

Observou-se semelhanças entre os grupos com relação a massa corporal dos animais no pré-operatório ($p = 0,219$) e no após 12 semanas ($p = 0,074$). O acréscimo de peso foi estatisticamente semelhante nos cinco grupos (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1 - Massa corporal em gramas dos cinco grupos no pré-operatório e após 12 semanas (média e desvio padrão)

Grupos	Pré-operatório	12 ^a semana
C	342,82 ± 36,04	512,02 ± 39,18
S	368,22 ± 27,60	496,10 ± 52,17
ND/TI	338,83 ± 19,67	497,18 ± 40,21
ND/TS	379,61 ± 29,23	493,07, ± 24,71
ND/TR	350,72 ± 13,75	535,18 ± 20,99
Valor de p	0,219	0,074

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Gráfico 1 - Evolução da massa corporal dos animais nos cinco grupos

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

5.2 Resultados das Avaliações I (Funcional e Fisiológica)

5.2.1 Avaliação funcional: Teste da Marcha (*Walking Track*)

A funcionalidade do músculo gastrocnêmio a partir da avaliação funcional do nervo tibial foi similar entre os grupos no momento pré-operatório, entretanto revelou variações estatísticas significativas intra e intergrupos em cada momento de observação (Tabela 2).

Tabela 2 - Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos quatro momentos de observação

	C	S	ND/TI	ND/TS	ND/TR	Valor de p
Pré-op	-10,25±9,30	-10,77±5,04	-5,00±10,04	2,55±11,63	-1,69±8,47	0,037
IFT 4ª semana	-43,00±13,33	-98,74±5,53	-60,21±14,38	-91,11±11,05	-93,09±7,26	< 0,001
IFT 8ª semana	-45,46±13,09	-99,74±5,81	-60,31±9,73	-79,10±10,59	-80,13±10,31	< 0,001
12ª semana	-44,74±14,17	-100,18±5,26	-57,15±11,40	-74,96±13,86	-67,14±9,09	< 0,001
Valor de p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

Pré-op: pré-operatório; C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Na comparação par a par entre os grupos não foram observadas diferenças significativas no IFT pré-operatório.

O grupo controle (C) apresentou IFT significativamente maior que o grupo S nos três tempos do pós-operatório.

O grupo ND/TI foi o único em que não houve diferença significativa da função tibial em relação ao grupo controle (C) nos diferentes períodos pós-operatórios.

Os grupos ND/TS e ND/TR apresentaram queda do IFT semelhante ao grupo S na 4ª semana, porém houve recuperação progressiva a partir da 8ª semana. Apresentaram também índice de função tibial inferior nas 4ª e 8ª semanas de observação pós-operatória em relação ao grupo ND/TI, com melhora na 12ª semana (Tabela 3).

Tabela 3 - Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os grupos experimentais nos quatro momentos de observação

Par de Grupos	Pré-operatório	IFT 4 ^a semana	IFT 8 ^a semana	IFT 12 ^a semana
C x S	0,940	< 0,001	< 0,001	< 0,001
C x ND/TI	0,257	0,019	0,013	0,082
C x ND/TS	0,034	< 0,001	0,001	0,001
C x ND/TR	0,096	< 0,001	0,001	0,004
S x ND/TI	0,150	< 0,001	< 0,001	< 0,001
S x ND/TS	0,019	0,060	0,001	< 0,001
S x ND/TR	0,012	0,054	0,001	< 0,001
ND/TI x ND/TS	0,191	< 0,001	0,002	0,009
ND/TI x ND/TR	0,364	< 0,001	0,001	0,034
ND/TS x ND/TR	0,438	0,041	0,870	0,041

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,005116$.

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Na comparação intragrupo par a par dos quatro momentos avaliados, todos apresentaram reduções significativas do IFT nos diferentes tempos pós-operatórios em relação ao índice pré-operatório.

O registro do IFT foi significativamente menor na 4^a semana em comparação com o pré-operatório, apontando queda funcional da pata traseira direita dos ratos após a intervenção cirúrgica.

Os grupos C, S e ND/TI apresentaram função tibial significativamente menor nas 3 medidas pós-operatórias em comparação ao pré-operatório, porém sem alterações significativas nas 4^a, 8^a e 12^a semanas de observação pós-operatória.

O grupo ND/TS apresentou tendência forte de recuperação do IFT na comparação entre a 4^a e a 12^a semana. No grupo ND/TR houve recuperação

significativa da função tibial na 12ª semana na comparação com as 4ª e 8ª semanas, porém significativamente menor que o pré-operatório (Tabela 4).

Tabela 4 - Índice de Função Tibial (IFT): comparação par a par entre os quatro momentos de observação em cada grupo experimental

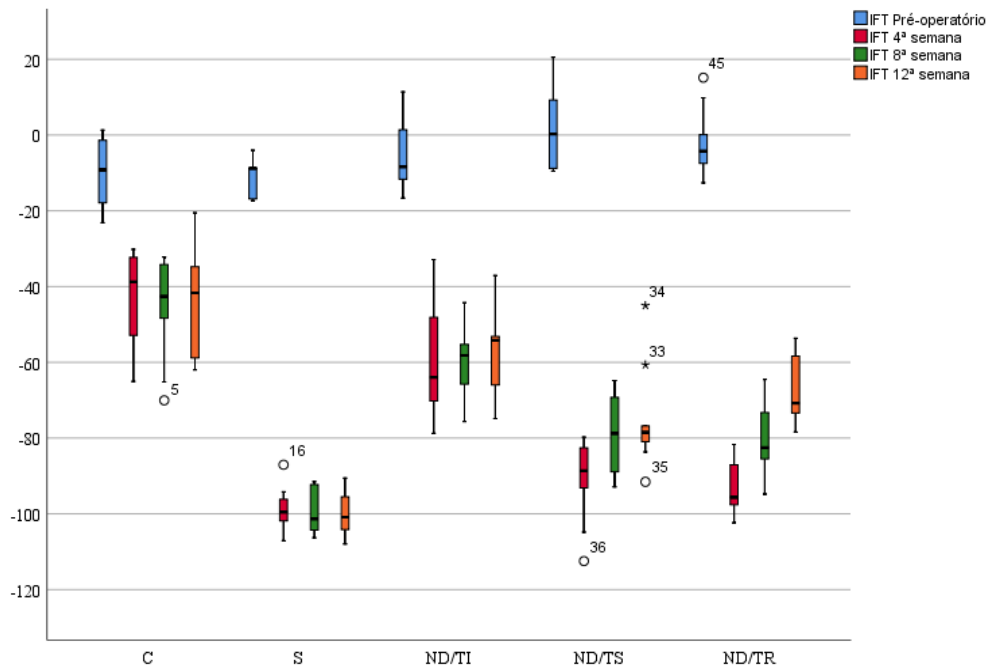
	C	S	ND/TI	ND/TS	ND/TR
IFT pré-op - IFT 4ª sem	0,005	0,005	0,005	0,008	0,005
IFT pré-op - IFT 8ª sem	0,005	0,005	0,005	0,008	0,005
IFT pré op - IFT 12ª sem	0,005	0,005	0,005	0,008	0,005
IFT 4ª sem - IFT 8ª sem	0,093	0,799	0,959	0,066	0,028
IFT 4ª sem - IFT 12ª sem	0,799	0,799	0,646	0,011	0,005
IFT 8ª sem - IFT 12ª sem	0,878	0,878	0,386	0,173	0,005

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni $\leq 0,008512$.

pré-op: pré-operatório; sem: semana; C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

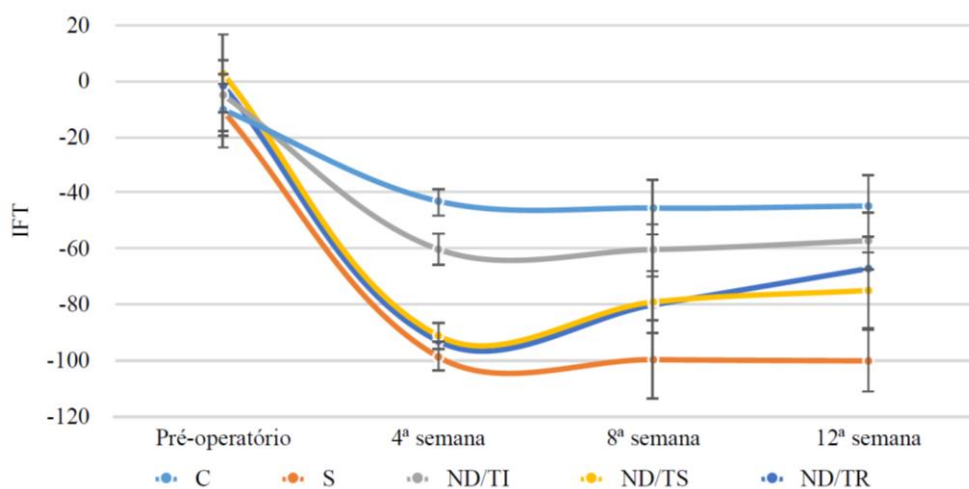
Os gráficos do IFT ilustram as análises estatísticas dos resultados dos cinco grupos do estudo, nos quatro tempos avaliados (Gráficos 2 e 3).

Gráfico 2 - Box plot do Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação



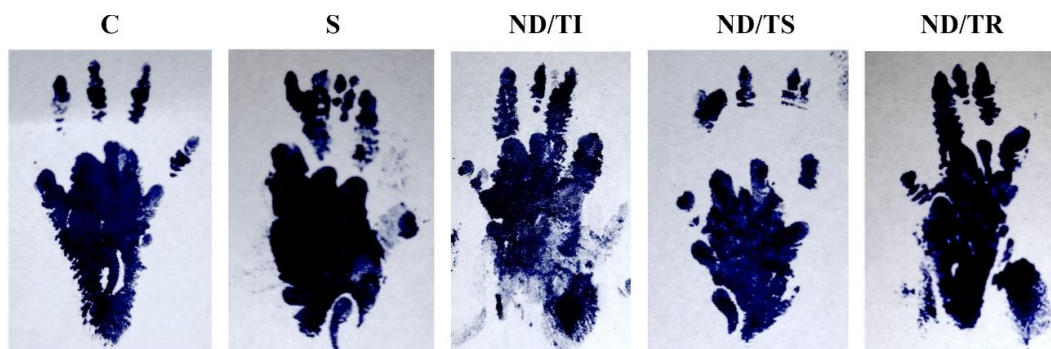
C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Gráfico 3 - Índice de Função Tibial (IFT) dos cinco grupos experimentais nos diferentes momentos de avaliação em que as medianas dos valores foram representadas por linhas coloridas



C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

A Figura 19 apresenta as diferentes pegadas das patas traseiras direita com 12 semanas de pós-operatório.



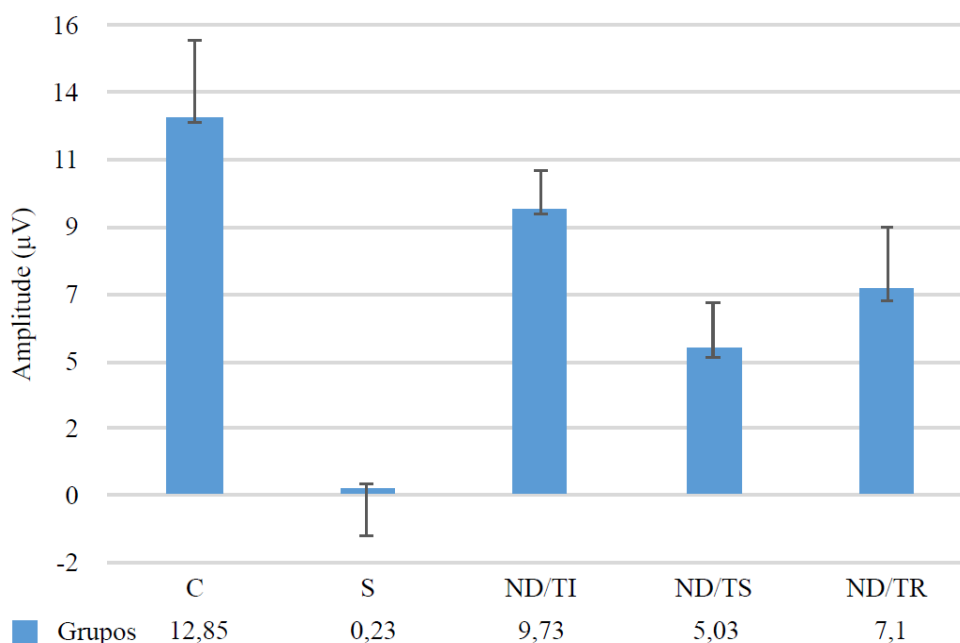
C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Figura 19 - Pegadas da pata traseira direita de ratos de cada grupo experimental após 12 semanas de pós-operatório

5.2.2 Avaliação fisiológica: eletromiografia

Os resultados encontrados para a amplitude na eletromiografia estão apresentados no Gráfico 4. Os dados refletem as médias e desvios-padrões dos valores das amplitudes, expressas em microvolts (μV), dos potenciais de ação muscular compostos em cada grupo.

Gráfico 4 - Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12ª semana do período pós-operatório, medida em microvolts (μV)



$p < 0,001$

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Foram observadas diferenças entre os valores das amplitudes, logo os cinco grupos foram comparados par a par. Em relação ao grupo S, relacionado à secção do nervo tibial, este apresentou amplitude significativamente menor em relação aos demais grupos. O grupo ND/TI apresentou medida de amplitude estatisticamente superior à do grupo ND/TS e semelhante à dos grupos C e ND/TR. No grupo ND/TS não observou-se diferença significativa da amplitude em relação ao grupo ND/TR (Tabela 5).

Tabela 5 - Amplitude do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos

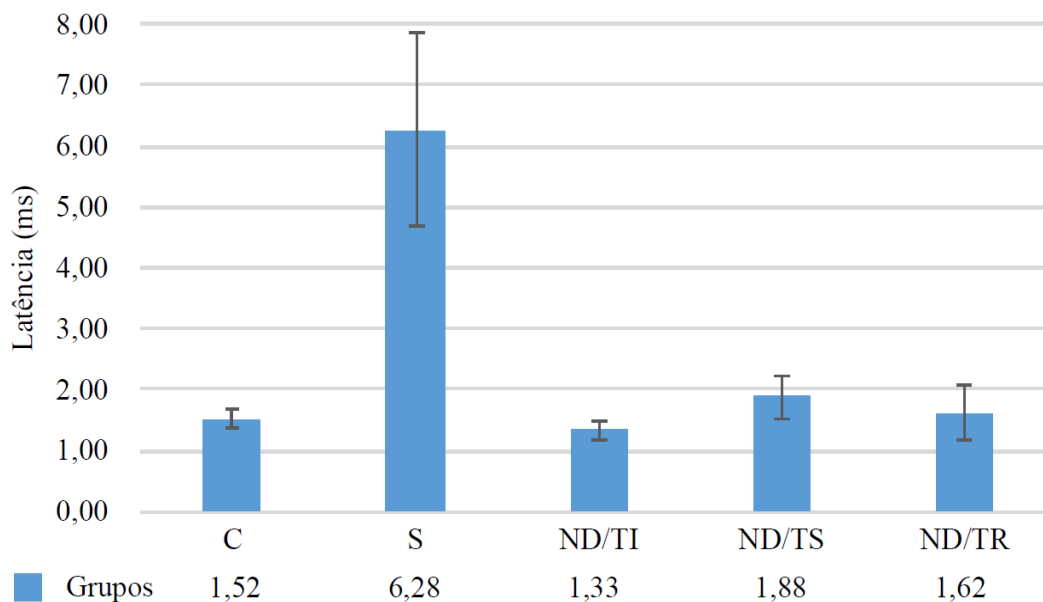
Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	< 0,001
C x ND/TI	0,096
C x ND/TS	0,003
C x ND/TR	0,016
S x ND/TI	< 0,001
S x ND/TS	< 0,001
S x ND/TR	< 0,001
ND/TI x ND/TS	0,003
ND/TI x ND/TR	0,096
ND/TS x ND/TR	0,086

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni \leq 0,005116.

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Os resultados encontrados para a latência na eletromiografia estão apresentados no Gráfico 5. Os dados refletem as médias e desvios-padrões dos valores das latências, expressas em milissegundos (ms), dos potenciais de ação muscular compostos em cada grupo.

Gráfico 5 - Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio na 12ª semana do período pós-operatório, medida em milissegundos (ms)



$p < 0,001$

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Foram observadas diferenças entre os valores das latências, logo os cinco grupos foram comparados par a par. O grupo relacionado à secção do nervo tibial (S) apresentou latência significativamente maior em relação aos grupos C, ND/TI e ND/TR, mas não em comparação ao grupo ND/TS. O grupos de neurotização não apresentaram diferenças significativas na comparação par a par ou entre o grupo C (Tabela 6).

Tabela 6 - Latência do potencial de ação muscular composto do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos

Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	0,004
C x ND/TI	0,271
C x ND/TS	0,190
C x ND/TR	0,820
S x ND/TI	0,002
S x ND/TS	0,015
S x ND/TR	0,004
ND/TI x ND/TS	0,110
ND/TI x ND/TR	0,820
ND/TS x ND/TR	0,805

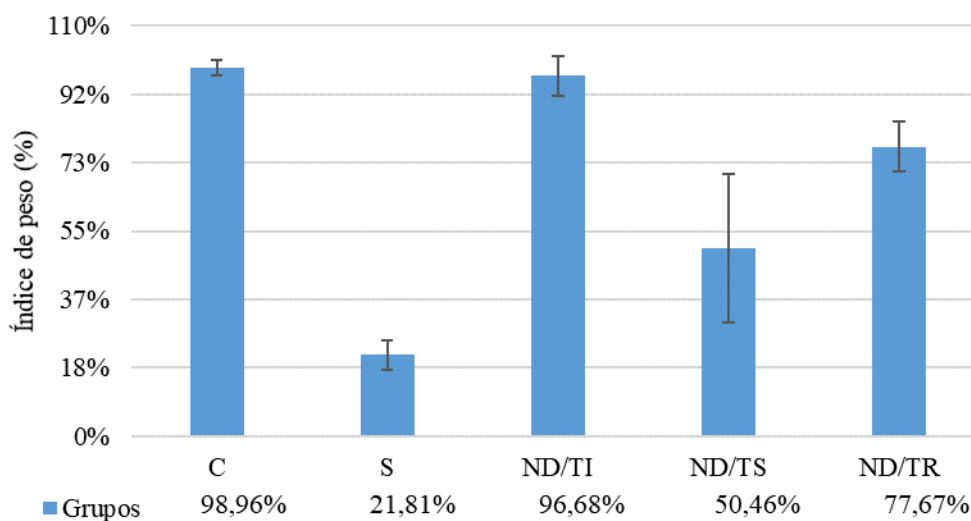
Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni \leq 0,005116.

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

5.3 Resultados da Avaliação II (Anatômica: Peso do Músculo Gastrocnêmio)

O resultado do índice de peso do músculo gastrocnêmio avaliado na 12^a semana de pós-operatório está expresso em porcentagem no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Índice de peso do músculo gastrocnêmio dos cinco grupos experimentais



C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Foram observadas diferenças entre os índices de peso, logo os grupos foram comparados par a par. O maior índice foi observado no grupo controle (C), enquanto o grupo S apresentou o menor índice de peso. Observaram-se diferenças significativas entre os grupos, exceto entre o grupo controle e o grupo ND/TI (Tabela 7).

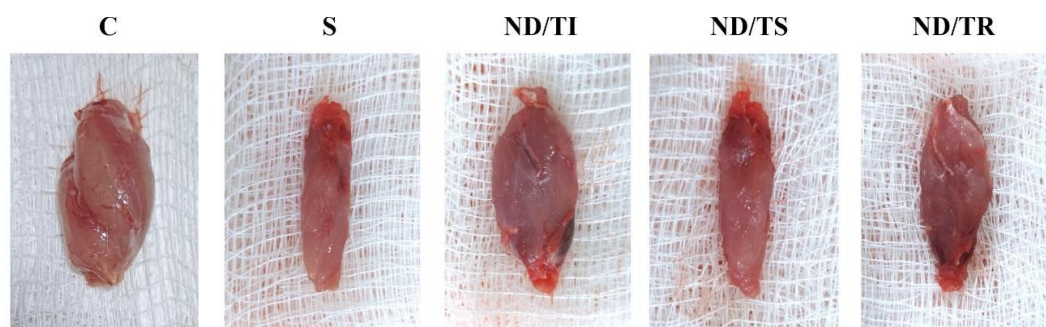
Tabela 7 - Índice de peso do músculo gastrocnêmio: comparação par a par entre os grupos

Par de Grupos	Alfa de Bonferroni
C x S	< 0,001
C x ND/TI	0,151
C x ND/TS	< 0001
C x ND/TR	< 0,001
S x ND/TI	< 0,001
S x ND/TS	0,002
S x ND/TR	< 0,001
ND/TI x ND/TS	< 0,001
ND/TI x ND/TR	< 0,001
ND/TS x ND/TR	0,001

Diferenças significativas representadas por Alfa de Bonferroni \leq 0,005116.

C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

O músculo gastrocnêmio dissecado da pata experimental em cada grupo está representado na Figura 20.



C: Controle; S: Nervo tibial seccionado; ND/TI: Neurotização direta e nervo tibial íntegro; ND/TS: Neurotização direta e nervo tibial seccionado; ND/TR: Neurotização direta e nervo tibial seccionado e reparado.

Figura 20 - Músculo gastrocnêmio da pata traseira direita do rato após 12 semanas de pós-operatório

6 DISCUSSÃO

Nervos periféricos são partes do corpo particularmente susceptíveis a lesões por traumas, compressão ou esmagamento (Isaacs, 2013) que se manifestam como anormalidades na comunicação do cérebro com órgãos e músculos alvo (Satya Prakash e Bidkar, 2016). Apesar de geralmente não ameaçarem a vida do paciente, estas lesões afetam a atividade motora e também podem causar perda de sensibilidade locoregional (Kouyoumdjian *et al.*, 2017), representando laboriosa obrigação social em termos de incapacidade de longo prazo e expensas econômicas (Asplund *et al.*, 2009; Rosberg *et al.*, 2013).

Em razão destes desfechos adversos, esforços são constantemente destinados ao desenvolvimento de técnicas capazes de aumentar a regeneração tecidual e a recuperação funcional periférica, possivelmente concretizados em melhora clínica dos pacientes (Griffin *et al.*, 2013; Tos *et al.*, 2013).

A importância da restauração da função muscular engloba não apenas fatores econômicos e funcionais, mas aspectos emocionais ligados a diferentes elementos da vida do paciente, uma vez que tais lesões podem causar declínio considerável na qualidade de vida do paciente (Stassart *et al.*, 2013). O simples ato de se expressar adequadamente com sorrisos voluntários e olhar focado, caminhar sem auxílio de terceiros e possuir melhor percepção da autoimagem são importantes aliados psicológicos no convívio social de pacientes que sofreram comprometimento da inervação motora e/ou sensitiva em diferentes partes do corpo.

Isolamento, depressão, desenvolvimento deturpado da autoimagem, atraso no aprendizado e na comunicação, dificuldade de ressocialização e vulnerabilidade das relações familiares são exemplos de sequelas sociais e psicológicas que podem ser amenizadas após cirurgias reconstrutoras relacionadas à reanimação muscular.

A utilização de modelos animais para fins científicos deve respeitar e cumprir o conceito ético sobre o uso animal em pesquisa preconizado por Tannenbaum e Bennett, em 2015, que versa sobre três princípios bioéticos: substituição, redução e refinamento.

A adoção preferencial de métodos que não utilizem animais para atingir o objetivo científico embasa o princípio da substituição. Já a adesão preferencial de critérios que permitem obter informações comparáveis com menos animais ou mais informações com o mesmo número de animais definem o ideal da redução. Utilizar métodos que minimizem o impacto no bem-estar animal e/ou aumentem este conforto das espécimes que não podem ser substituídas, elucidada o preceito do refinamento (Geuna *et al.*, 2016).

Os experimentos com modelos animais costumam apresentar significância estatística e atender aos princípios bioéticos com oito espécimes por grupo, visto que a variabilidade é muito pequena (Puopolo, 2004).

Seguindo tais princípios éticos com grupos de significância estatística e entendendo que a utilização de modelos animais é necessária durante testes pré-clínicos finais de novas estratégias para aprimorar o reparo e a regeneração nervosa periférica (Geuna *et al.*, 2016), foram selecionados cinco grupos com 10 animais cada, totalizando 50 ratos alocados nos diferentes grupos por sorteio a fim de evitar a tendenciosidade (Berkuo *et al.*, 1981).

Ratos da linhagem Wistar foram escolhidos por apresentarem estudos experimentais prévios em que foram separados em grupos de oito a 10 animais e apresentaram resultados com distribuição simétrica, próximos à média e com pouca variação do desvio-padrão, comprovando significância estatística (Scheibe, 2008).

Segundo Nichols *et al.* (2005) e Savastano *et al.* (2014), o modelo experimental padrão de lesão do nervo ciático tem sido usado há mais de um século para investigar o processo de lesão nervosa, avaliando a capacidade absoluta e relativa dos sistemas nervosos central e periférico de recuperar-se após a axotomia, sendo o mais utilizado para investigação pré-clínica de regeneração nervosa periférica.

O amplo tamanho do nervo ciático em ratos, o acesso cirúrgico facilitado e a pesquisa por dados de pesquisas anteriores que possam comparar e validar estudos em curso são motivos importantes que podem explicar a preponderância do emprego da inervação ciática nos estudos sobre nervo periférico (Geuna, 2015). Importante considerar também, além da favorável estrutura anatômica, o reduzido tamanho, baixo custo, facilidade de obtenção, manipulação e manutenção, facilitando projetos de longa duração (Toia *et al.*, 2015; Gordon e Borschel, 2017).

O modelo de lesão do nervo ciático em ratos apresenta facilidade quanto à avaliação histológica, eletromiográfica e muscular, além de funcional pelo teste da marcha (Bain *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 2011), sendo os nervos tibial e fibular, predominantemente motores e com inervação muscular distintas, utilizados em estudos experimentais sobre neurotização muscular (Swanson *et al.*, 2008; Yazici *et al.*, 2008).

Duchen, em 1971, descreveu que o músculo gastrocnêmio de ratos pode ser utilizado em estudos experimentais de neurotização muscular direta, observando que as placas terminais motoras são amplamente distribuídas ao longo do músculo e nenhuma zona nativa clara poderia ser definida.

Askar e Sabuncuoglu, em 2002, compararam a profundidade de implantação do nervo tibial na zona aneural da cabeça lateral do músculo gastrocnêmio em modelo animal e constataram o desenvolvimento de placas motoras dispersas em ambos os grupos, entretanto com densidade maior no grupo de implantação superficial comparado ao grupo de implantação profunda.

Em razão destes estudos, visto que as placas terminais motoras não estão restritas a um único ponto dentro do músculo (Prodanov, 2006), foi optado pela realização preferencial da neurotização nas fibras musculares superficiais do ventre lateral do músculo gastrocnêmio.

Para o correto delineamento experimental dos diferentes modelos de avaliação intergrupos, todos os animais foram submetidos à transecção do nervo fibular. Os grupos controle (grupo C) e secção tibial com ausência de estimulação nervosa muscular (grupo S) foram desenvolvidos a fim de melhorar a avaliação dos resultados. Nos três grupos experimentais em que a neurotização foi realizada, o músculo gastrocnêmio foi diretamente neurotizado com o nervo fibular. A diferenciação técnica destes três grupos está na conduta cirúrgica no nervo tibial para que seja possível observar os reflexos das diferentes intervenções no processo de neurotização pelo fibular e na atividade do músculo gastrocnêmio, avaliando a possível melhora da função por meio da dupla inervação em diferentes condições técnicas.

No grupo neurotização muscular direta com o nervo fibular (grupo ND/TI), o nervo tibial foi mantido intacto, enquanto no grupo ND/TS o nervo tibial foi seccionado e não reparado. No grupo em que houve secção e reparo do nervo tibial (grupo ND/TR), o mesmo foi reparado primariamente terminoterminal logo após a secção.

O processo de regeneração espontânea de nervos ocorre com relativa frequência em pequenos animais, como ratos (Jung *et al.*, 2009), logo medidas de inversão de 180 graus do coto proximal e sepultamento do mesmo na musculatura adjacente foram realizados a fim de evitar reinervação espontânea pelos brotamentos de axônios à porção distal do nervo seccionado.

O intuito deste estudo foi avaliar a resposta do músculo gastrocnêmio ao processo de neurotização muscular direta diante da presença, ausência e reparo imediato do nervoso primário (nervo tibial) e compará-los entre si e aos resultados dos grupos controle (grupo C) e secção com ausência de estímulo nervoso (grupo S).

A ideia desta avaliação foi esclarecer sobre a possibilidade de propiciar melhor atividade funcional a partir de dupla inervação conferida pela neurotização de nervo secundário em músculo com inervação primária íntegra ou reparada agudamente.

A premissa do estudo parte do princípio da disposição das placas terminais e sensibilidade muscular à acetilcolina. Segundo Guth e Zalewski (1963) as fibras musculares esqueléticas são normalmente inervadas por um único nervo, e a presença da inervação primária impede a formação de sinapses por implantação nervosa secundária.

Caso o nervo original seja seccionado, a implantação de axônios secundários iria reinervar o músculo recém denervado. Na situação de implantação cirúrgica de um nervo motor em musculatura já inervada, estudos mostram que possivelmente não ocorreria formação de placas terminais motoras pela ideia de que o músculo normal é sensibilizado à acetilcolina apenas na área da placa terminal do motor (Guth e Zalewski, 1963; Lømo e Slater, 1980).

Nassif e Chang Yung, em 2019, confirmaram a viabilidade e eficiência da neurotização muscular pela evidência de regeneração funcional de fibras do músculo platisma enxertado e, através da eletroneuromiografia, confirmação de atividade sob o controle do nervo facial contralateral neurotizado via nervo sural.

O teste da marcha (*walking track*) foi utilizado para avaliação funcional do estudo. Desde a década de 1980 este teste vem sendo empregado para descrever o déficit funcional da pata traseira do rato em trabalhos experimentais (de Medinaceli *et al.*, 1982). A função tanto do nervo ciático quanto de cada um de seus ramos isoladamente pode ser inferida pela análise de regressão, sendo a função muscular do gastrocnêmio, músculo analisado neste estudo, representada pelo índice de função do nervo tibial (Bain *et al.*, 1989).

Pelo fato do nervo fibular ter sido seccionado em todos os espécimes do estudo, os ratos do grupo controle apresentaram pegadas distintas das observadas em ratos sem lesão nervosa. O IFT significativamente menor na 4ª semana, em comparação a análise pré-operatória, indica queda na função da pata traseira direita dos ratos após a cirurgia.

Os grupos C e S apresentaram IFT constantes nas 3 medidas pós-operatórias em comparação ao pré-operatório e entre os diferentes momentos, evidenciando ausência de reinervação dos nervos seccionados em cada grupo.

O grupo ND/TI apresentou resultados sem diferenças significativas em relação ao grupo controle (C) e no comparativo dos três tempos de avaliação pós-operatória, evidenciando ausência de interferência do processo de neurotização direta na melhora da função muscular do gastrocnêmio neste teste.

O grupo ND/TR apresentou resultado funcional estatisticamente inferior nas 4^a e 8^a semanas e melhora de função na 12^a semana de avaliação na comparação intragrupo, possivelmente explicado pelo comprometimento inicial da função muscular pela associação de nervos que antagonizam no processo de recuperação e subsequente prevalência da adaptação cortical e plasticidade cerebral, permitindo a melhora funcional do músculo gastrocnêmio reinervado por fontes nervosas distintas (Rodriguez *et al.*, 2011; Socolovsky *et al.*, 2017).

No grupo neurotização muscular direta com secção tibial (ND/TS) houve recuperação significativa do índice da função tibial em relação ao grupo S nas 8^a e 12^a semanas, mas, como previsto, significativamente menor que o grupo C nos três momentos pós-operatórios, fato esperado pelo processo de neurotização muscular direta de nervo secundário. O grupo S, já esperado, apresentou disfunção muscular completa no pós-operatório.

Ambos os grupos ND/TS e ND/TR apresentaram função tibial reduzida em relação ao grupo ND/TI nas 4^a a 8^a semanas de observação pós-operatória, mas com melhora na 12^a semana, fato possivelmente explicado por Mackinnon *et al.* (1991) que observaram a reinervação das unidades motoras pelo nervo periférico em processo de regeneração e a eliminação dos brotamentos axonais sem conexão muscular ocorrendo em 12 semanas.

O músculo gastrocnêmio de ratos é constantemente empregado em estudos na área eletrofisiológica e funcional a fim de avaliar a recuperação muscular durante o período de regeneração neuronal periférica (Liu *et al.*, 2003; Rafiuddin Ahmed e Jayakumar, 2003; Thomas *et al.*, 2003; Valero-Cabre *et al.*, 2004; Varejão *et al.*, 2004).

O exame da eletromiografia foi realizado após 12 semanas, seguindo os estudos de English *et al.* (2007) que demonstraram a recuperação eletromiográfica gradativa a partir de 8 semanas da transecção e reparo cirúrgico do nervo ciático em ratos.

O teste EMG avaliou a eletrofisiologia do músculo gastrocnêmio a partir de dois parâmetros específicos. A amplitude, informação que representa a quantidade de fibras musculares responsáveis ao estímulo elétrico, e a latência, dado relacionado ao tempo de condução do axônio mielinizado, são as variáveis que formam o teste (Robinson e Snyder-Mackler, 2001). A determinação da amplitude constitui informação essencial para a quantificação das fibras musculares efetivamente reinervadas (Robinson, 2015).

Não observou-se diferença significativa da amplitude em relação ao grupo controle (C) nos ratos submetidos à neurotização muscular direta mantendo o nervo tibial íntegro (ND/TI), possivelmente pela permanência intacta da inervação primária e capacidade de contração já existente. Já o grupo S em que houve denervação do músculo gastrocnêmio sem reparo ou neurotização, apresentou a menor resposta ao estímulo elétrico, refletida em menor amplitude e maior latência que os demais grupos.

O grupo ND/TR apresentou amplitude com tendência próxima do grupo controle (C), fato justificado pela possível regeneração neuronal com reinervação de parte das fibras musculares após o reparo primário do nervo tibial e neurotização direta com o nervo fibular.

Dados do grupo ND/TS, em que a amplitude foi significativamente menor que o grupo C e significativamente maior que o grupo S, demonstram possível recuperação incompleta das fibras musculares após secção do nervo tibial e

neurotização com o nervo fibular (Wilgis e Brushart, 1993). Este grupo de neurotização apresentou, também, amplitude similar ao grupo ND/TR, resultado que pode ser fundamentado pela teoria que versa sobre axônios em regeneração, na razão de 20% do número original de fibras, serem capazes de reinervar até cinco vezes mais fibras musculares, exibindo importante capacidade de compensação da unidade motora, conceito conhecido como *bottle-neck theory* (Urso-Baiarda *et al.*, 2007).

Os tempos de latência dos grupos ND/TI e ND/TR não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle (C) e entre si possivelmente pelo fato da inervação tibial estar preservadas no ND/TI e reparada no ND/TR, além da presença das possíveis fibras fibulares mielinizadas auxiliando na condução adequada do estímulo elétrico.

O tempo de latência do grupo ND/TS não apresentou aumento significativo na comparação com demais grupos de neurotização, possivelmente pela compensação parcial do tempo de condução axonal pelas fibras fibulares mielinizadas. Observou-se tendência de menor latência em relação ao grupo S, provavelmente pela proximidade entre região de estímulo e captação elétrica.

A avaliação do peso do músculo gastrocnêmio está fundamentado no conceito de recuperação do trofismo e da massa muscular após quadro de atrofia ocasionada por denervação transitória (Wood *et al.*, 2011). Para reduzir o viés de diferença entre as massas corporais das espécimes, adotou-se a relação entre o peso muscular operado (experimental) e o peso do músculo contralateral (não operado), também conhecido como índice de peso do músculo gastrocnêmio (Wu *et al.*, 2014).

Os grupos C e ND/TI apresentaram índices de peso do músculo gastrocnêmio semelhantes, fato esperado em razão da inervação nativa não ter sido lesada, preservando a integridade e função neuronal durante todo o experimento.

Observa-se no grupo ND/TI que o músculo com inervação nativa intacta e integridade na junção neuromuscular não é favorecido pelo aporte extra de axônios, uma vez que o ambiente é inadequado para o crescimento regenerativo de novos axônios (Stipp-Brambilla *et al.*, 2012).

Já o índice no grupo relacionado à secção tibial sem reparo (ND/TS) exibiu resultado estatisticamente menor na comparação par a par com os grupos C, ND/TI e ND/TR, possivelmente pelo processo de reinervação incompleta que evoluiu com atrofia muscular parcial e unilateral.

Os grupos ND/TR e ND/TS apresentaram índices de peso do músculo gastrocnêmio significativamente maiores que o grupo S. Já o índice do grupo ND/TR também foi significativamente maior que o ND/TS na comparação par a par, resultado observado por possível manutenção do trofismo muscular pela dupla inervação.

Tais resultados corroboram com muitos estudos sobre técnicas de reinervação muscular presentes na literatura em que modelos experimentais demonstraram reabilitação motora parcial com a técnica de neurotização muscular direta, maior resposta funcional, eletrofisiológica e trófica da inervação dupla em comparação à neurotização direta apenas e ausência de resultados superiores da inervação dupla em relação à grupos controle. (Erlacher, 1915; Aitken, 1950; Sorbie e Porter, 1969; Frey *et al.*, 1982; McNamara *et al.*, 1987; Brunelli e Brunelli, 1993; Cheng *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1998; Askar *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 2008)

7 CONCLUSÃO

A neurotização do músculo gastrocnêmio em ratos ocorreu nas três situações: com o nervo tibial intacto, com o nervo tibial seccionado e com o mesmo seccionado e reparado. No entanto, no grupo em que o nervo tibial permaneceu íntegro, a neurotização direta foi menos exuberante do ponto de vista funcional (teste da marcha), análise eletromiográfica e do peso do músculo gastrocnêmio. Nos outros dois grupos, em que a lesão tibial ocorreu, esta neurotização direta foi mais eficiente. Os resultados deste estudo sugerem que é possível supor que exista a presença de placas motoras inervadas, trabalhando em regime de competição com o reestabelecimento de conexões terminais de fibras nervosas diretamente implantadas no músculo. A denervação temporária observada no grupo com secção e reparo tibial pode ser benéfica para o reestabelecimento da funcionalidade da neurotização direta pela possível dupla inervação em que há a adição da neurotização à recuperação dos axônios originais.

8 ANEXOS

Anexo A - Documento de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo experimental comparativo entre técnicas de neurotização do músculo gastrocnêmio em ratos**”, registrada com o nº **093/16**, sob a responsabilidade de **Jose Carlos Marques de Faria** e **André Silveira Pinho**, apresentado pelo Departamento de Cirurgia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 10.08.16

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-09-2016 Término: 31-08-2017
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	9 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 10 de Agosto de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B - Documento de aprovação do protocolo de mudança de anestesia pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 01.11.18 **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **093/16** intitulado “**Estudo experimental comparativo entre técnicas de neurotização do músculo gastrocnêmio em ratos**” apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

- Alteração do protocolo de anestesia passando de anestesia injetável para inalatória. Isoflurano a 3% com aparelho digital Bonther.

Pesquisador Responsável: **Jose Carlos Marques de Faria**

CEUA-FMUSP, 01 de Novembro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9 REFERÊNCIAS

Aitken JT. Growth of nerve implants in voluntary muscle. *J Anat.* 1950;84(Pt 1):38-49.

Albert E. Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Vereins in Innsbruck.1878; 9: 97-121.

Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol.* 2012;98(1):16-37.

Askar I, Sabuncuoglu BT, Yormuk E, Saray A. The fate of neurotization techniques on reinnervation after denervation of the gastrocnemius muscle: an experimental study. *J Reconstr Microsurg.* 2001;17(5):347-55; discussion 355-6.

Askar I, Sabuncuoglu BT. Superficial or deep implantation of motor nerve after denervation: an experimental study--superficial or deep implantation of motor nerve. *Microsurgery.* 2002;22(6):242-8.

Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, von Holst H. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology.* 2009;32(3):217-28.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989 Jan;83(1):129-38.

- Bain JR, Veltri KL, Chamberlain D, Fahnestock M. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. *Neuroscience*. 2001;103(2):503-10.
- Bassilios Habre S, Googe BJ, Depew JB, Wallace RD, Konofaos P. Depressor Reanimation After Facial Nerve Paralysis. *Ann Plast Surg*. 2019;82(5):582-590.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wlds) nerves. *BMC Neurosci*. 2005;6:6.
- Bercury KK, Macklin WB. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell*. 2015;32(4):447-58.
- Berde CB, Strichartz GR. Local Anesthetics. In: Eriksson I, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL, editors. *Miller's anesthesia*. 7th ed. Churchill Livingstone: Elsevier; 2009.
- Berkuo ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. 2. ed. São Paulo: EPU; 1981.
- Bertelli JA, Taleb M, Mira JC, Ghizoni MF. Variation in nerve autograft length increases fibre misdirection and decreases pruning effectiveness: an experimental study in the rat median nerve. *Neurol Res*. 2005;27(6):657-65.
- Bhandari PS. Management of peripheral nerve injury. *J Clin Orthop Trauma*. 2019;10(5):862-866.
- Bouma SR, Drislane FW, Huestis WH. Selective extraction of membrane-bound proteins by phospholipid vesicles. *J Biol Chem*. 1977;252(19):6759-63.

- Brandt KE, Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne, editors. *Grabb and Smith's plastic surgery*. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1997.
- Brunelli G, Monini L, Antonucci A, et al. Neurotizzazione in zona aneurale di muscoli denervati. *Policlinico* 1976;83:611-6.
- Brunelli G, Monini L. Direct muscular neurotization. *J Hand Surg Am*. 1985;10(6 Pt 2):993-7.
- Brunelli G. Direct neurotization of denervated muscles. In Gorio A, Millesi H, Mingrino S (eds): *Posttumatic peripheral nerve regeneration- experimental basis and clinical implication*. New York: Raven Press, 1981, p. 523-527.
- Brunelli G. Les neurotisations musculaires directes. *Ann Chir Main*. 1989;8(4):324-8.
- Brunelli GA, Brunelli GR. Direct muscle neurotization. *J Reconstr Microsurg*. 1993;9(2):81-90; discussion 89-90.
- Brunelli GA. Direct Muscular Neurotization. *J Am Soc Surg Hand*. 2005;5(4):193-200.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE 3rd. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol*. 1973;234(3):723-48.
- Cales RH, Trunkey DD. Preventable trauma deaths. A review of trauma care systems development. *JAMA*. 1985;254(8):1059-63.
- Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(9):1951-65.

Cancilla PA. General reactions of muscle to injury. In Heffner, R.R. ed: *Muscle Pathology. Contemporary Issues in Surgical Pathology*. New York: Churchill Livingstone; 1984.

Cárdenas-Mejía A, Palafox D, Téllez-Palacios D, Contreras-Merida S, Maza-Krzepowsky L, López R, Hernández T. Levator Palpebrae Superioris Muscle Direct Neurotization. *J Craniofac Surg*. 2017;28(8):e747-8.

Carlson BM, Billington L, Faulkner J. Studies on the regenerative recovery of long-term denervated muscle in rats. *Restor Neurol Neurosci*. 1996;10(2):77-84.

Chang YC, Vanz RL, Aurenção JC, Burgues T, Schanaider A. Unilateral frontalis muscle paralysis reanimated by contralateral frontalis muscle through sural nerve graft connecting the two muscles (muscle-nerve-muscle neurotization technique)-A case report. *Microsurgery*. 2021;41(2):181-5.

Cheng N, Li X, Huang A. Experimental comparison of muscle contractility after three methods of reinnervation. *Ann Plast Surg*. 1994;33(2):166-90.

Chuang DC, Lee GW, Hashem F, Wei FC. Restoration of shoulder abduction by nerve transfer in avulsed brachial plexus injury: evaluation of 99 patients with various nerve transfers. *Plast Reconstr Surg*. 1995;96(1):122-8.

Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros TEP, Ferreira MC. Utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2006;14(1):25-9.

Costigan M, Mannion RJ, Kendall G, Lewis SE, Campagna JA, Coggeshall RE, Meridith-Middleton J, Tate S, Woolf CJ. Heat shock protein 27: developmental regulation and expression after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 1998;18(15):5891-900.

Cunha, AS. *Reconstrução de defeito de nervo fibular em ratos com veia glicerolada: análise histológica e funcional* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2013.

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LF. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2010;56(1):103-11.

de Luca AC, Lacour SP, Raffoul W, di Summa PG. Extracellular matrix components in peripheral nerve repair: how to affect neural cellular response and nerve regeneration? *Neural Regen Res.* 2014;9(22):1943-8.

de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77(3):634-43.

Djohan R, Scomacao I, Knackstedt R, Cakmakoglu C, Grobmyer SR. Neurotization of the Nipple-Areola Complex during Implant-Based Reconstruction: Evaluation of Early Sensation Recovery. *Plast Reconstr Surg.* 2020;146(2):250-4.

Dobel C, Miltner WH, Witte OW, Volk GF, Guntinas-Lichius O. Emotionale Auswirkungen einer Fazialisparese. *Laryngorhinootologie.* 2013;92(1):9-23.

Dubowitz V. Cross-innervated mammalian skeletal muscle: histochemical, physiological and biochemical observations. *J Physiol*. 1967;193(3):481-496.3.

Duchen LW. An electron microscopic comparison of motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J Neurol Sci*. 1971;14(1):37-45.

Dvali L, Mackinnon S. The role of microsurgery in nerve repair and nerve grafting. *Hand Clin*. 2007;23(1):73-81.

Dy CJ, Kitay A, Garg R, Kang L, Feinberg JH, Wolfe SW. Neurotization to innervate the deltoid and biceps: 3 cases. *J Hand Surg Am*. 2013;38(2):237-40.

Elsberg CA. Experiments on motor nerve regeneration and the direct neurotization of paralyzed muscles by their own and by foreign nerves. *Science*. 1917;45(1161):318-20.

English AW, Chen Y, Carp JS, Wolpaw JR, Chen XY. Recovery of electromyographic activity after transection and surgical repair of the rat sciatic nerve. *J Neurophysiol*. 2007;97(2):1127-34.

Erlacher P. Direct and muscular neurotization of paralyzed muscles. *Am J Orthop Surg*. 1915;13:22-32.

Fagotti de Almeida CE, Farina Junior JA, Colli BO. Morphometric and Functional Analysis of Axonal Regeneration after End-to-end and End-to-side Neurotization in Rats. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2015;3(3):e326.

Faria JC, Scopel GP, Ferreira MC. Facial reanimation with masseteric nerve: babysitter or permanent procedure? Preliminary results. *Ann Plast Surg*. 2010;64(1):31-4.

Faroni A, Mobasseri SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;82-83:160-7.

Flores LP. Estudo epidemiológico das lesões traumáticas de plexo braquial em adultos. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64(1):88-94.

Francel TJ, Dellon AL. Functional limb salvage combining gastrocnemius neurotization and posterior tibial nerve grafting: a case report. *J Reconstr Microsurg.* 1992;8(3):209-13; discussion 213-4.

Frey M, Gruber H, Holle J, Freilinger G. An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization. *Plast Reconstr Surg.* 1982;69(4):656-69.

Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J Neurosci.* 1995 May;15(5 Pt 2):3886-95.

Furukawa H, Saito A, Mol W, Sekido M, Sasaki S, Yamamoto Y. Double innervation occurs in the facial mimetic muscles after facial-hypoglossal end-to-side neural repair: rat model for neural supercharge concept. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008;61(3):257-64.

Gaillard S, Horvat JC. Modèle de greffe "pont" entre la moëlle épinière cervicale et le muscle biceps à l'aide d'un autogreffon de nerf périphérique. Etude chez le rat adulte. *Chirurgie.* 1993-1994;119(10):649-56.

- Geraldo S, Gordon-Weeks PR. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3595-604.
- Geuna S, Raimondo S, Fregnan F, Haastert-Talini K, Grothe C. In vitro models for peripheral nerve regeneration. *Eur J Neurosci.* 2016;43(3):287-96.
- Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods.* 2015;243:39-46.
- Giacobini G, Filogamo G, Weber M, Boquet P, Changeux JP. Effects of a snake alpha-neurotoxin on the development of innervated skeletal muscles in chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(6):1708-12.
- Glenn TD, Talbot WS. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol.* 2013;23(6):1041-8.
- Glück T. Ueber Neuroplastik auf dem Wege der Transplantation. *Archivium Klinik Chirurgie.* 1880; 25:606-66.
- Gordon T, Borschel GH. The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries. *Exp Neurol.* 2017;287(Pt 3):331-47.
- Gordon T, Fu SY. Long-term response to nerve injury. *Adv Neurol.* 1997;72:185-99.
- Gorio A, Millesi H, Mingrino S, eds: Posttraumatic Peripheral Nerve Regeneration. New York: Raven Press; 1981:229-239.

Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(23):2144-51.

Grigoriadis N, Albani M, Simeonidou C, Guiba-Tziampiri O. Recovery, innervation profile, and contractile properties of reinnervating fast muscles following postnatal nerve crush and administration of L-Dopa. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004;153(1):79-87.

Guth L, Zalewski AA, Brown WC. Quantitative changes in cholinesterase activity of denervated sole plates following implantation of nerve into muscle. *Exp Neurol.* 1966;16(2):136-47.

Guth L, Zalewski AA. Disposition of cholinesterase following implantation of nerve into innervated and denervated muscle. *Exp Neurol.* 1963 ;7:316-26.

Gutmann E, Hanzlíková V. Effects of accessory nerve supply to muscle achieved by implantation into muscle during regeneration of its nerve. *Physiol Bohemoslov.* 1967;16(3):244-50.

Gutmann E. Denervation and disuse atrophy in crosstriated muscle. *Rev Can Biol.* 1962;21:353-65.

Hacker V. Erfolgreich operativ behandelte cucullarislähmung. *Wien Klin Wehnschr.* 1908;21(2):1314.

Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(10):1309-19.

Haninec P, Sámal F, Tomás R, Houstava L, Dubovský P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, and end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury. *J Neurosurg*. 2007;106(3):391-9.

Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am*. 1991;2(1):93-104.

Hartzell HC, Kuffler SW, Yoshikami D. Post-synaptic potentiation: interaction between quanta of acetylcholine at the skeletal neuromuscular synapse. *J Physiol*. 1975;251(2):427-63.

Heineke H. Die direkte Einpflanzung der Nerven in den Muskel. *Zentralbl Chir*. 1914;41:465-6.

Hoffman H. A study of the factors influencing innervation of muscles by nerves implanted. *Aust Exp Biol Med Sci*. 1951;29:289-308.

Howard RO, Wilson WS, Dunn BJ. Quantitative determination of choline acetylase, acetylcholine, and acetylcholinesterase in the developing rabbit cornea. *Invest Ophthalmol*. 1973;12(6):418-25.

Hynes NM, Bain JR, Thoma A, Veltri K, Maguire JA. Preservation of denervated muscle by sensory protection in rats. *J Reconstr Microsurg*. 1997;13(5):337-43.

Isaacs J. Major peripheral nerve injuries. *Hand Clin*. 2013;29(3):371-82.

Jacobson C, Duggan D, Fischbach G. Neuregulin induces the expression of transcription factors and myosin heavy chains typical of muscle spindles in cultured human muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(33):12218-23.

- Jin LQ, Zhang G, Jamison C Jr, Takano H, Haydon PG, Selzer ME. Axon regeneration in the absence of growth cones: acceleration by cyclic AMP. *J Comp Neurol*. 2009;515(3):295-312.
- Jobe MT, Martinez SF. *Canale & Beaty: Campbell's Operative Orthopaedics*. 12th ed. Elsevier; Philadelphia: 2013. Peripheral Nerve Injuries. pp. 3063-3065. Ch 62D.
- Jung JM, Chung MS, Kim MB, Baek GH. Contribution of the proximal nerve stump in end-to-side nerve repair: in a rat model. *Clin Orthop Surg*. 2009;1(2):90-5.
- Junior CAM. Questões em bioestatística: o tamanho da amostra. *Rev Interdisc Est Exper*. 2009;1(1):26-28.
- Kang SB, Ju YM, Lee SJ, Atala A, Yoo JJ. Functional recovery of denervated muscle by neurotization using nerve guidance channels. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(7):838-46.
- Kang SB, Olson JL, Atala A, Yoo JJ. Functional recovery of completely denervated muscle: implications for innervation of tissue-engineered muscle. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(17-18):1912-20.
- Katz B, Miledi R. The development of acetylcholine sensitivity in nerve free segments of skeletal muscle. *J Physiol*. 1964;170(2):389-96.
- Keilhoff G, Fansa H. Successful intramuscular neurotization is dependent on the denervation period. A histomorphological study of the gracilis muscle in rats. *Muscle Nerve*. 2005;31(2):221-8.

Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM Jr. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):858-66.

Konofaos P, Wallace RD. Basic Science of Muscle Neurotization: A Review. *J Reconstr Microsurg*. 2015;31(7):481-6.

Kouyoumdjian JA, Graça CR, Ferreira VFM. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 1124 cases. *Neurol India*. 2017;65(3):551-5.

Ladak A, Spinner RJ. Double fascicular nerve transfer for elbow flexion: is 2 better than 1? *Neurosurgery*. 2013;72(6):1055-6.

Lapchik VBV, Mattaraia VGM Ko GM. *Cuidados e manejos de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 551-555.

Lemos SPS, Hayashi I, Cunha AS, Silva CF, Filho TEPB, Costa MP, Ferreira MC. Glycerol-preserved allogeneous nerve: an experimental study with rats. *Acta Ortop Bras*. 2008; 16(3):133-7.

Létievant JJE. *Traité des sections nerveuses*. Paris: J.B. Bailliére et fils; 1873.

Li GY, Xue MQ, Wang JW, Zeng XY, Qin J, Sha K. Traumatic brachial plexus injury: a study of 510 surgical cases from multicenter services in Guangxi, China. *Acta Neurochir (Wien)*. 2019 May;161(5):899-906.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation*. 2 ed. San Diego: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Liu S, Damhieu P, Devanze P, Saïd G, Heard JM, Tadié M. Efficient reinnervation of hindlimb muscles by thoracic motor neurons after nerve cross-anastomosis in rats.

J Neurosurg. 2003;99(5):879-85.

Loeb JA, Hmadcha A, Fischbach GD, Land SJ, Zakarian VL. Neuregulin expression at neuromuscular synapses is modulated by synaptic activity and neurotrophic factors. *J Neurosci.* 2002;22(6):2206-14.

Lømo T, Slater CR. Acetylcholine sensitivity of developing ectopic nerve-muscle junctions in adult rat soleus muscles. *J Physiol.* 1980;303:173-89.

Longo MV, Marques de Faria JC, Isaac C, Nepomuceno AC, Teixeira NH, Gemperli R. Comparisons of the results of peripheral nerve defect repair with fibrin conduit and autologous nerve graft: An experimental study in rats. *Microsurgery.* 2016;36(1):59-65.

Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000;25(3):391-414.

Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience.* 1990;35(1):157-65.

Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve.* 1991;14(11):1116-22.

Mackinnon SE, Dellon AL. Nerve repair and nerve grafts. In: *Surgery of the Peripheral Nerve.* New York: Thieme Medical Publishers; 1988. p. 89-129.

Mackinnon SE, McLean JA, Hunter GA. Direct muscle neurotization recovers gastrocnemius muscle function. *J Reconstr Microsurg*. 1993;9(2):77-80.

Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*. 1989;22(3):257-73.

Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J*. 2005;272(11):2628-38.

Marx J. Helping neurons find their way. *Science*. 1995;268(5213):971-3.

McNamara MJ, Garrett WE Jr, Seaber AV, Goldner JL. Neurorrhaphy, nerve grafting, and neurotization: a functional comparison of nerve reconstruction techniques. *J Hand Surg Am*. 1987;12(3):354-60.

Meals RA, Nelissen RG. The origin and meaning of "neurotization". *J Hand Surg Am*. 1995;20(1):144-6.

Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Methods*. 2003;129(2):183-90.

Merrell GA, Barrie KA, Katz DL, Wolfe SW. Results of nerve transfer techniques for restoration of shoulder and elbow function in the context of a meta-analysis of the English literature. *J Hand Surg Am*. 2001;26(2):303-14.

Millesi H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. *J Reconstr Microsurg*. 1985;2(1):21-31.

Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am.* 1981;61(2):321-40.

Miner JR, Paris PM, Yealy DM. Marx, et al., editors. *Pain Management.* 7th ed. Mark: Rosen's Emergency Medicine; 2010.

Mirsky R, Jessen KR. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 1996;6(1):89-96.

Mirsky R, Jessen KR. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol.* 1999;9(2):293-311.

Narakas AO, Hentz VR. Neurotization in brachial plexus injuries. Indication and results. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 Dec;(237):43-56.

Narakas AO. The treatment of brachial plexus injuries. *Int Orthop.* 1985;9(1):29-36.

Nassif T, Yung Chia C. Neurotized Platysma Graft: A New Technique for Functional Reanimation of the Eye Sphincter in Longstanding Facial Paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 2019;144(6):1061e-1070e.

Navarro X, Geuna S, Grothe C, Haastert-Talini K. Introduction: Thematic Papers Issue on Peripheral Nerve Regeneration and Repair. *Anat Rec (Hoboken).* 2018;301(10):1614-1617.

Nepomuceno AC, Politani EL, Silva EG, Salomone R, Longo MV, Salles AG, Faria JC, Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cir Bras.* 2016;31(8):542-8.

Nepomuceno AC. *Estudo experimental de técnicas de dupla inervação muscular em ratos. Estudo experimental* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017.

Neves, Mancini Filho J, Menezes EW. *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p.

Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res*. 2005;163(2):143-58.

Niparko J. The acute facial palsies. In: Jackler RK, ed. *Neurotology*. StLouis: Mosby; 1994:1311.

Noordin S, Ahmed M, Rehman R, Ahmad T, Hashmi P. Neuronal regeneration in denervated muscle following sensory and muscular neurotization. *Acta Orthop*. 2008 Feb;79(1):126-33.

Normand EA, Rasband MN. Subcellular patterning: axonal domains with specialized structure and function. *Dev Cell*. 2015;32(4):459-68.

Payne SH Jr, Brushart TM. Neurotization of the rat soleus muscle: a quantitative analysis of reinnervation. *J Hand Surg Am*. 1997;22(4):640-3.

Prodanov, D. *Morphometric analysis of the rat lower limb nerves. Anatomical data for neural prosthesis design* [PhD thesis], The Netherlands: Twente University, Enschede; 2006.

Puopolo M. Biostatistical approaches to reducing the number of animals used in biomedical research. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40(2):157-63.

Rafiuddin Ahmed M, Jayakumar R. Peripheral nerve regeneration in RGD peptide incorporated collagen tubes. *Brain Res*. 2003;993(1-2):208-16.

Rezende MR, Silva GB, Paula EJ, Mattar Junior R, Camargo OP. What has changed in brachial plexus surgery? *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(3):411-8.

Rezende MR, Veronesi BA, Paulos RG, Cho AB, Ribak S, Junior RM. Free gracilis muscle transfer with ulnar nerve neurotization for elbow flexion restoration. *Int Orthop*. 2021;45(3):689-96.

Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.

Robinson LR. How electrodiagnosis predicts clinical outcome of focal peripheral nerve lesions. *Muscle Nerve*. 2015;52(3):321-33.

Rodriguez A, Chuang DC, Chen KT, Chen RF, Lyu RK, Ko YS. Comparative study of single-, double-, and triple-nerve transfer to a common target: experimental study of rat brachial plexus. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(3):1155-62.

Rosberg HE, Carlsson KS, Cederlund RI, Ramel E, Dahlin LB. Costs and outcome for serious hand and arm injuries during the first year after trauma - a prospective study. *BMC Public Health*. 2013;13:501.

Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 6. ed. Belmont (CA): Thomson; 2006.

Sakellarides HT, Sorbie C, James L. Reinnervation of denervated muscles by nerve transplantation. *Clin Orthop Relat Res.* 1972;83:195-201.

Salles GS Jr, Faria JC, Busnardo FF, Gemperli R, Ferreira MC. Evaluation of nerve regeneration in diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(7):509-17.

Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J Cell Biol.* 1978;78(1):176-98.

Satya Prakash MVS, Bidkar PU. Peripheral nerve injuries. *Complicat Neuroanesthesia.* 2016;3(3):359-68

Savastano LE, Laurito SR, Fitt MR, Rasmussen JA, Gonzalez Polo V, Patterson SI. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *J Neurosci Methods.* 2014;227:166-80.

Scheibe PO. Number of samples - hypothesis testing. *Nucl Med Biol.* 2008;35(1):3-9.

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

Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J.* 1942;2(4260):237-9.

Seddon HJ. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg.* 1947;35(138):151-67.

Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.

Socolovsky M, Malessy M, Lopez D, Guedes F, Flores L. Current concepts in plasticity and nerve transfers: relationship between surgical techniques and outcomes. *Neurosurg Focus*. 2017;42(3):E13.

Sorbie C, Porter TL. Reinnervation of paralysed muscles by direct motor nerve implantation. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br*. 1969;51(1):156-64.

Stassart RM, Fledrich R, Velanac V, Brinkmann BG, Schwab MH, Meijer D, Sereda MW, Nave KA. A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. *Nat Neurosci*. 2013;16(1):48-54.

Steindler A. Direct neurotisation of paralysed muscles. Further studies of the question of direct nerve implantation. *Amer J Orthop Surg*. 1916;14:707-19.

Steindler A. The method of direct neurotization of paralyzed muscles. *Am J Orthop Surg*. 1915;13:33-45.

Steinthorsdottir V, Stefansson H, Ghosh S, Birgisdottir B, Bjornsdottir S, Fasquel AC, Olafsson O, Stefansson K, Gulcher JR. Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene*. 2004;342(1):97-105.

Stipp-Brambilla EJ, Viterbo F, Labbé D, Garbino JA, Bernardelli MM. Double muscle innervation using end-to-side neurotaphy in rats. *Sao Paulo Med J*. 2012;130(6):373-9.

Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*. 1999;9(2):313-25.

Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner J.* 2013;13(1):100-8.

Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain.* 1951;74(4):491-516.

Sunderland S. *Nerve and nerve injuries.* 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 1978.

Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990;13(9):771-84.

Swanson AN, Wolfe SW, Khazzam M, Feinberg J, Ehteshami J, Doty S. Comparison of neurotization versus nerve repair in an animal model of chronically denervated muscle. *J Hand Surg Am.* 2008;33(7):1093-9.

Tada H, Hirayama T, Atsuta Y, Takemitsu Y. Experimental study of neurotization of denervated muscles with nerve-to-vein transfer. *Microsurgery.* 1991;12(6):396-401.

Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120-32.

Teixeira RKC, Calvo FC, Santos DRD, Araújo NP, Tramontin DF, Costa LVPD, Barros RSM. Criteria for assessing peripheral nerve injury. Behavioral and functional assessment in non-operated Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2020;35(7):e202000702.

Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975;56(2):166-70.

Terzis JK, Karypidis D. Outcomes of direct muscle neurotization in pediatric patients with facial paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(5):1486-98.

Terzis JK, Konofaos P. Reanimation of facial palsy following tumor extirpation in pediatric patients: our experience with 16 patients. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013;66(9):1219-29.

Terzis JK, Tzafetta K. Outcomes of mini-hypoglossal nerve transfer and direct muscle neurotization for restoration of lower lip function in facial palsy. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(6):1891-904.

Thomas CK, Sesodia S, Erb DE, Grumbles RM. Properties of medial gastrocnemius motor units and muscle fibers reinnervated by embryonic ventral spinal cord cells. *Exp Neurol*. 2003;180(1):25-31.

Toia F, Giesen T, Giovanoli P, Calcagni M. A systematic review of animal models for experimental neuroma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68(10):1447-63.

Tos P, Ronchi G, Geuna S, Battiston B. Future perspectives in nerve repair and regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2013;109:165-92.

Tóth A, Szucs A, Harasztosi C, Matesz K, Pucsok K, Mikó I, Sziklai I. Intrinsic laryngeal muscle reinnervation with nerve-muscle pedicle. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(5):701-6.

Tuma Jr. P. *Estudo comparativo da regeneração após aloenxertos de nervo, com e sem imunossupressão. Estudo experimental* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 1997.

Tuturov AO. The role of peripheral nerve surgery in a tissue reinnervation. *Chin Neurosurg J.* 2019;5:5.

Urso-Baiarda FG, MacQuillan AH, Grobbelaar AO. The bottleneck theory: accounting for clinical and experimental variability in the outcome of functional muscle transfer. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(3):1129-31.

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(1):95-108.

Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res.* 2004;26(2):186-94.

Waller A. Experiments on the Section of the Glosso-Pharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Edinb Med Surg J.* 1851;76(189):369-76.

Wilgis EFS, Brushart TM. *Nerve repair and grafting.* In: Green DP, ed. *Operative Hand Surgery*, 3rd Ed., vol 2. NY: Churchill Livingstone Inc.; 1993:1315-1334

Wilgis EFS. *Nerve repair and grafting.* In: DP Green (ed). *Operative hand surgery.* New York: Churchill Livingstone; 1982.

Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat.* 2011;193(4):321-33.

Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regen Res.* 2014;9(20):1796-809.

Yang XL, Huang YZ, Xiong WC, Mei L. Neuregulin-induced expression of the acetylcholine receptor requires endocytosis of ErbB receptors. *Mol Cell Neurosci.* 2005;28(2):335-46.

Yazici I, Ayhan S, Elmas C, Temucin C, Atabay K. Motor neurotization by segmental epineurectomy and implantation: lateral muscular neurotization. *J Reconstr Microsurg.* 2008;24(6):435-42.

Zaizi A, Dellerio O, Rouijel B, Amrani A. Neurotization of isolated axillary nerve palsy in a teenage patient. *Int J Surg Case Rep.* 2020;77:222-224.

Zheng H, Zhou S, Chen S, Li Z, Cuan Y. An experimental comparison of different kinds of laryngeal muscle reinnervation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;119(5):540-7.

Zimmermann M, Grösgen S, Westwell MS, Greenfield SA. Selective enhancement of the activity of C-terminally truncated, but not intact, acetylcholinesterase. *J Neurochem.* 2008;104(1):221-32.

Zochodne DW, Levy D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51(3):255-67.

Zuckerman SL, Eli IM, Shah MN, Bradley N, Stutz CM, Park TS, Wellons JC 3rd. Radial to axillary nerve neurotization for brachial plexus injury in children: a combined case series. *J Neurosurg Pediatr.* 2014;14(5):518-26.

APÊNDICE

Apêndice A - Submissão do artigo

De: MICR Editorial Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Data: terça-feira, 21 de setembro de 2021 08:19

Para: andrespinho@hotmail.com

Cc: andrespinho@hotmail.com, jcmfaria1967@gmail.com, andreconep@yahoo.com.br, raquelsalomone@yahoo.com.br, andrespinho90@gmail.com, martaosoriomoraes@hotmail.com, cibelespinho@gmail.com, marcelo@marcelorosaderezende.com.br

Assunto: Your manuscript has been successfully submitted online to Microsurgery

21-Sep-2021

Dear Dr. Pinho,

Your manuscript entitled "Critical study of gastrocnemius muscle neurotization in rats" by Pinho, André; Faria, Jose Carlos; Nepomuceno, Andre; Salomone, Raquel; Santos, Gustavo B.; Moraes, Marta O. de; Pinho, Cibele S.; Rezende, Marcelo, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Microsurgery.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is MICR-21-0374.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence.

Our journal is currently transitioning to Wiley's Research Exchange submission portal.

If you submitted this manuscript through our Research Exchange site, you can view the status of your manuscript by logging into the submission site at <https://wiley.atyponrex.com/journal/MICR>.

If you submitted this manuscript through ScholarOne, you can view the status of your manuscript by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/micr>

Thank you for submitting your manuscript to Microsurgery.

Yours sincerely,

Kusum Bahuguna
Microsurgery Editorial Office
microjrnl@wiley.com