

MARIA FERNANDA PIOLI TORRES

**REPARAÇÃO MICROCIRÚRGICA DE NERVO PERIFÉRICO POR MEIO DE
SUTURA, COLA DE FIBRINA OU BIOFILL® EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof^a. Dominguita Lühers
Graça
Co-orientador: Prof. Édison Luiz Prisco
Farias

CURITIBA
2000



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **MARIA FERNANDA PIOLI TORRES** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“REPARAÇÃO MICROCIRÚRGICA DE NERVO PERIFÉRICO POR MEIO DE SUTURA, COLA DE FIBRINA OU BIOFILL ® EM RATOS WISTAR”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito “A” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 12 de Setembro de 2000.

Profa. Dra. DOMINGUITA LÚHERS GRAÇA
Presidente/Orientador

Prof. Dr. MURILO MENEZES
Membro

Prof. Dr. ANTONIO FELIPE PAULINO DE FIGUEREDO WOUK
Membro

Nós nos gloriamos nas tribulações, sabendo que a tribulação produz a paciência; e a paciência, a experiência; e a experiência, a esperança. E a esperança não traz confusão, porquanto o amor de Deus está derramado em nosso coração pelo Espírito Santo que nos foi dado (Romanos, 5:3-5).

AGRADECIMENTOS

À Professora Dominguita Lühers Graça, a quem sou imensamente devedora, não só por sua sábia e segura orientação, mas também pela atenção, carinho e amizade que dela recebi. Sem seu inestimável apoio, este trabalho dificilmente teria sido concluído.

Ao Professor Édison Luiz Prisco Farias, cujo apoio e colaboração sempre me foram de grande valia.

Ao Dr. Murilo Meneses, que gentilmente me proporcionou acesso ao microscópio cirúrgico da sala de experimentação do Hospital Vita, bem como aos residentes Wágner, Charles e César, pelo treinamento e colaboração durante as operações realizadas.

Ao Dr. Norton Zornig, que pronta e generosamente forneceu o fio de sutura, viabilizando, assim, o início da fase de treinamento.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, que colaboraram mediante o empréstimo de material e equipamentos: Carla Wanderer, Marco Randi, Claris Faraco e Vera Lúcia, bem como ao funcionário Herculano Salviano (Nino), pelo processamento de amostras e confecção de lâminas para exame histopatológico.

À Rosmarina Passos Correa, funcionária do Departamento de Patologia da UFSM, pelo primoroso serviço referente aos últimos cortes ultra-finos.

Aos funcionários do Biotério, Isele e Cândido, e do Departamento de Anatomia da UFPR, pelo apoio e amizade demonstrados.

À professora Daura, chefe do Centro de Microscopia Eletrônica e às funcionárias do mesmo, pela atenção que me dispensaram.

Ao João Paulo Ávila e à Mariel, pela doação do fio de sutura; ao Laboratório Immuno Ltda, pela doação da cola de Fibrina e, finalmente, ao Dr. Farah, pela doação das amostras de BioFill®, bem como pelo prestimoso atendimento.

À acadêmica do curso de Medicina Veterinária da UFPR, Denise Conte, pelo auxílio durante a fase experimental.

Aos talentosos e sempre bem-humorados amigos Beto (desenhista), Wágner (o “mago do computador”) e Fabiano Camargo (fotógrafo), cuja colaboração foi indispensável para realização deste trabalho.

A toda a minha família e à amiga Marlice Schneider, pelo apoio e carinho demonstrados em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Ao João Armando pelo carinho e amor demonstrados durante mais essa etapa, e pela paciência durante os momentos de total e absoluto desespero.

Ao professor Nelson Torres, meu pai, pela incansável ajuda na tradução de textos e revisão ortográfica deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ii
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Formação do sistema nervoso periférico.....	5
2.2 Histologia de nervo periférico.....	6
2.2.1 Neurônios.....	9
2.2.2 Células de Schwann.....	12
2.2.3 Matriz extracelular.....	15
2.2.4 Vascularização.....	15
2.3 Causas de lesões em nervos periféricos.....	18
2.4 Degeneração de nervos periféricos.....	19
2.5 Regeneração de nervos periféricos.....	22
2.5.1 Células envolvidas.....	26
2.5.1.1 Células de Schwann.....	26
2.5.1.2 Células perineurais.....	31
2.5.1.3 Outras células.....	31
2.6 Fatores de crescimento.....	32
2.7 Técnicas cirúrgicas para correção de defeitos nos nervos periféricos.....	34
2.7.1 Sutura.....	35

2.7.2 Tubulação.....	38
2.7.3 Cola de fibrina.....	40
2.7.4 Enxertos.....	43
2.7.5 <i>Laser</i>	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Animais utilizados.....	47
3.1.2 Distribuição dos animais em grupos e subgrupos.....	47
3.2 Técnica operatória.....	48
3.2.1 Abordagem cirúrgica.....	48
3.2.2 Técnica microcirúrgica.....	49
3.2.2.1 Grupo 01: sutura.....	51
3.2.2.2 Grupo 02: bainha de BioFill®.....	52
3.2.2.3 Grupo 03: cola de fibrina (Tissucol®).....	53
3.2.2.3.1 Método de aplicação da cola.....	53
3.2.3 Síntese.....	54
3.3 Pós-operatório.....	55
3.4 Necropsia.....	55
3.4.1 Procedimento para coleta da amostra do nervo isquiático.....	55
3.4.1.1 Tratamento das amostras para inclusão em parafina.....	56
3.4.1.2 Tratamento das amostras para inclusão em resina (fibras desfiadas e M.E.).....	58
4 RESULTADOS.....	60
4.1 Avaliação clínica.....	60
4.2 Avaliação histológica das biópsias.....	62
4.2.1 Cortes em parafina.....	62
4.2.1.1 Grupo sutura 45 dias.....	62

4.2.1.2 Grupo BioFill 45 dias.....	62
4.2.1.3 Grupo cola 45 dias.....	63
4.2.1.4 Grupo sutura 90 dias.....	63
4.2.1.5 Grupo BioFill® 90 dias.....	63
4.2.1.6 Grupo cola 90 dias.....	64
4.2.1.7 Grupo sutura 120 dias.....	64
4.2.1.8 Grupo BioFill® 120 dias.....	64
4.2.1.9 Grupo cola 120 dias.....	65
4.2.2 Fibras desfiadas.....	65
4.2.3 Cortes semifinos e ultrafinos.....	66
5 DISCUSSÃO.....	80
6 CONCLUSÃO.....	100
7 ANEXOS.....	101
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais em grupos e subgrupos e data para as necropsias.	47
Tabela 2 – Cronograma das necrópsias.	56
Tabela 3 – Número de animais que apresentaram auto-mutilação.	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura do nervo periférico.	7
Figura 2	Fotomicrografia eletrônica de raiz dorsal. Células de Schwann (S) envolvendo axônios mielinizados (A), fibra de Remak (R). Rato Wistar adulto. 9.000x. Coloração com azul de toluidina.	14
Figura 3	Posição do animal anestesiado e imobilizado durante o procedimento operatório. No detalhe, incisão de pele e tela subcutânea.	48
Figura 4	Visualização do nervo isquiático íntegro sob microscópio óptico. 6x.	49
Figura 5	Nervo isquiático visto após secção. 10x.	50
Figura 6	Realização do ponto no epineuro para aproximação dos segmentos proximal e distal do nervo. 10x.	50
Figura 7	Grupo 1. Realização do segundo ponto no epineuro. 10x.	51
Figura 8	Grupo 1. Rotação do nervo com pinça tracionando um dos pontos para aplicação do terceiro. 10x.	51
Figura 9	Grupo 2. Posicionamento da lâmina de BioFill® sobre o local de anastomose. 6x.	52
Figura 10	Grupo 2. União das bordas do BioFill® com o auxílio de pinça formando uma bainha ao redor do nervo. 6x.	52

Figura 11	Grupo3. Aplicação da cola sobre a área de anastomose. 10x.	53
Figura 12	Síntese dos planos anatômicos muscular.	54
Figura 13	Síntese do plano anatômico tegumentar.	54
Figura 14	Secção longitudinal do segmento do nervo isquiático reparado com um ponto no epineuro e cola de fibrina. A) porção proximal, fascículo desbravando o fascículo nervoso (seta); B) área de anastomose incluindo reação cicatricial; C) porção distal à anastomose. Objetiva 4. Coloração com H&E.	57
Figura 15	Rato apresentando deficiência proprioceptiva no pós-operatório imediato.	60
Figura 16	Rato com pé direito mutilado durante o período pós-operatório.	61
Figura 17	A) Segmento proximal com axônios regenerados paralelos ao eixo longitudinal do fascículo; B) Aumento da densidade celular na área da anastomose; C) Fascículo distal com inúmeras câmaras de digestão. Grupo Sutura 45 dias. Rato 4. Objetiva 10. Coloração com H & E.	67
Figura 18	A) Câmara de digestão (seta); B) Reação pio-granulomatosa ao fio de sutura (F). Grupo Sutura 45 dias. Rata 4. Objetiva 10.	68
Figura 19	A) Segmento proximal com orientação longitudinal (L) e transversal (*) dos axônios regenerados. As células de Schwann formam bulbos de cebola ao redor dos axônios transversais. Rato 5; B) Área de anastomose. Reação ao fio de sutura. Rato 3; C) Segmento distal apresenta numerosas câmaras de digestão. Rato 3. Grupo BioFill 45 dias Objetiva 10. Coloração com H & E.	69
Figura 20	A) No segmento proximal observam-se raras câmaras de digestão. Objetiva 40; B) Observa-se densidade celular aumentada na área de anastomose. Objetiva 10; C) Segmento distal com presença de numerosas	70

câmaras de digestão. Objetiva 10. Grupo Cola 45 dias. Rato 6. Coloração com H & E.

- Figura 21 A) Anastomose com vasos sanguíneos proeminentes (V), reação ao fio de sutura (F) e proliferação de células de Schwann formando bulbos de cebola (*). Objetiva 4; B) Aspecto de crescimento transversal das fibras com as células de Schwann proliferantes formando bulbos de cebola. Objetiva 40; C) Segmento distal mostrando muitas câmaras de digestão. Objetiva 10. Grupo Sutura 90 dias. Rato 5. Coloração com H & E. 71
- Figura 22 A) Segmento proximal com axônios regenerados paralelos ao eixo longitudinal. São observadas raras câmaras de digestão; B) Área de anastomose. Desalinhamento das fibras pela presença dos fios de sutura (F); C) Segmento distal com algumas câmaras de digestão remanescentes. Grupo BioFill 90 dias. Rato 12. Objetiva 10. Coloração com H & E. 72
- Figura 23 A) Fascículo estreito com todas as fibras orientadas; B) Segmento proximal. Fascículo com muitas fibras mostrando formação de neuroma; C) Fascículo distal com algumas câmaras de digestão. Grupo Cola 90 dias. Rato 9. Objetiva 10. Coloração com H & E. 73

- Figura 24 A) Segmento proximal mostrando 3 fascículos regenerados. Observa-se aumento de colágeno no perineuro (Objetiva 4). No detalhe, são observadas câmaras de digestão na colisão das fibras nervosas com o tecido conjuntivo do perineuro (Objetiva 10); B) Área de anastomose com alta densidade celular e muitos vasos sanguíneos; C) Segmento distal parcialmente reinervado onde são observadas raras câmaras de digestão e formação de bulbos de cebola pelas células de Schwann (Objetiva 10). No detalhe, é observada a formação de bulbos de cebola (Objetiva 40). Grupo Sutura 120 dias. Rato 13. Coloração com H & E. 74
- Figura 25 A) Segmento proximal com orientação paralela de todas as fibras ao eixo longitudinal. Objetiva 4; B) Reação ao fio na área de anastomose. Objetiva 10; C) Segmento distal reinervado. Objetiva 4. Grupo BioFill 120 dias. Rato 15. Coloração com H & E. 75
- Figura 26 A) Segmento proximal mostrando o crescimento oblíquo dos vasos sanguíneos e a perda de orientação longitudinal das fibras regeneradas. Objetiva 10; B) Perda da orientação longitudinal das fibras na colisão com o vaso sanguíneo. Objetiva 40; C) Anastomose e segmento distal com orientação variada das fibras. Objetiva 4. Grupo Cola 120 dias. Rato 15. Coloração com H & E. 76
- Figura 27 A) Fibra normal com nódulo de Ranvier (seta); B) Fibra em degeneração Walleriana. Objetiva 40. Coloração com tetróxido de ósmio. 65
- Figura 28 Aspecto de crescimento transversal das fibras nervosas. Grupo Sutura 45 dias. Objetiva 40. Coloração com azul de toluidina. 77
- Figura 29 Extremidade proximal do segmento proximal onde fibras normais com 77

bainhas de mielina mais espessas (N) alinham-se com fibras regeneradas (R) com bainhas de mielina mais finas. Grupo Sutura 90 dias. Objetiva 40. Coloração com azul de toluidina.

- Figura 30 A) Células de Schwann (S) associadas com fibras regeneradas. 78
Fibroblastos no interstício (F). Fibras regeneradas (R). Objetiva 40. B)
Ultra-estrutura de uma célula de Schwann (S); axônio normal (N); axônio
remielinizado (R); colágeno no interstício (C). 5.000x. Grupo Cola 120
dias. Coloração com azul de toluidina.
- Figura 31 Fibras regeneradas de aspecto sinuoso e de orientação variada imersas em 79
matriz extracelular espessa. Grupo BioFill 90 dias. Objetiva 40. Coloração
com azul de toluidina.
- Figura 32 A) Mastócito ortocromático no endoneuro (seta). Objetiva 40. B) ME do 79
mastócito (M) e célula de Schwann (S). 3.000x. Grupo Cola 120 dias.
Coloração com azul de toluidina.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNP	Sistema nervoso periférico
SNC	Sistema nervoso central
ATPase	Adenosina trifosfatase
GGF	Fator de crescimento glial
NGF	fator de crescimento neural
RNA	ácido ribonucleico
CAM	molécula de adesão celular
SAM	molécula de aderência do substrato
M	molar
pH	potencial hidrogenioiônico
H&E	hematoxilina e eosina
Gal-C	galactocerebrosídeo
MAG	glicoproteína associada à mielina
Po	principal proteína da mielina periférica
CNTF	fator neurotrófico ciliar
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro

RESUMO

Tendo em vista a alta frequência com que ocorrem traumatismos com transecções ou esmagamentos de nervos periféricos, e que, na prática veterinária, geralmente resultam em amputação, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver uma técnica capaz de promover a regeneração satisfatória das fibras nervosas. A sutura foi adotada como técnica convencional para o reparo de nervos periféricos. No entanto, a função normal do nervo suturado dificilmente é restabelecida. Neste estudo foram comparadas três técnicas, das quais duas, sutura e cola de fibrina, são amplamente discutidas na literatura, enquanto a outra, formação de bainha de BioFill® ao redor da área de anastomose, não apresenta relato até o presente momento sobre a sua eficiência na cicatrização de nervo periférico. Foram seccionados os nervos isquiáticos do membro pélvico direito de 54 ratos fêmeas da raça Wistar. Os três tratamentos foram empregados em 3 grupos constituídos por 18 animais cada um, sendo que cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos representados por 6 animais. Os subgrupos foram diferenciados de acordo com a data determinada para necropsia; 45, 90 e 120 dias. Nos três métodos foi realizado um ponto de sutura com fio mononylon 10-0 no epineuro, para aproximação dos cotos proximal e distal do nervo seccionado. Além do ponto inicial para aproximação, o grupo sutura recebeu dois pontos no epineuro. No segundo grupo, a área de anastomose foi envolvida por uma bainha de BioFill® e, no terceiro grupo, foi adicionada uma gota de cola. Constatou-se pouca diferença entre os aspectos histológicos dos três tratamentos. As alterações histológicas comuns aos três tratamentos foram representadas por degeneração Walleriana, formação de neuroma, proliferação de tecido fibroso, invasão do tecido nervoso por mastócitos e fibroblastos e presença de fibrilas de colágeno. Verificou-se que o material de sutura é responsável pelo mau direcionamento das fibras nervosas e

formação de neuroma na área de anastomose, devido à colisão das fibras nervosas em regeneração com a reação granulomatosa ao fio de sutura. Essas alterações foram observadas nos três grupos, sendo mais evidente no grupo que recebeu três pontos de sutura no epineuro. Considerando os resultados histológicos superiores obtidos com cola de fibrina e bainha de BioFill®, fica comprovada a eficiência dessas técnicas na reparação de nervos periféricos. No entanto, a utilização de bainha de BioFill® oferece vantagens sobre a utilização de cola de fibrina, como disponibilidade do material utilizado, simplicidade técnica e baixo custo.

ABSTRACT

Due to the frequent occurrence of trauma caused by transections or by the crushing of peripheral nerves, frequently resulting in amputation in veterinary practice, many studies have been carried out for the purpose of developing a technique able to bring about a satisfactory regeneration of nerve fibers. Suture has been adopted as the conventional technique for repairing peripheral nerves. However, the normal function of the sutured nerve is hardly ever re-established. In the present study, three techniques were compared, of which two – suture and fibrin glue – have been widely discussed in the literature, while the other, namely the formation of a BioFill® sheath around the area of anastomosis, has not been reported up to now, as regards its efficiency for the cicatrization of a peripheral nerve. The ischiatic nerve of the right side pelvic member of 54 female rats of the Wistar breed was sectioned. All three treatments were applied to three groups made up of 18 animals each, each group being divided into 3 subgroups of 6 animals. The subgroups were marked with the date that was set for their necropsy, namely 45, 90 and 120 days. A 10-0 mononylon suture was performed on the epineurium of all the rats, for the purpose of bringing together the proximal and distal stumps of the sectioned nerve. In addition to the initial approximating stitch, the suture group received two stitches on the epineurium. In the second group, the anastomotic area was surrounded by a BioFill® sheath, and in the third group a drop of glue was added. Little difference was observed between the histological aspects of the three treatments. The observed histological changes, common to the three treatments, were Wallerian degeneration, formation of a neuroma, proliferation of fibrous tissue, invasion of the nervous tissue by mastocytes and fibroblasts, and the presence of collagen fibrils. The suture material was found to be responsible for the poor direction of the nerve fibers and the formation of a neuroma in

the anastomotic area, due to the collision of the regenerating nerve fibers with the granulomatous reaction to the suture thread. These changes were observed in the three groups, with the most apparent one having taken place in the group that received three suture stitches on the epineurium. Considering the better histological results obtained with fibrin glue and the BioFill® sheath, the efficacy of these techniques for repairing peripheral nerves has been clearly demonstrated. However, the use of the BioFill® sheath offers advantages over the use of fibrin glue, such as availability of the material that was used, technical simplicity and low cost.

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia reparadora de nervos, visando à reabilitação funcional de pacientes cujos nervos foram lesados por acidente, vem merecendo a atenção dos especialistas. Como a reabilitação funcional ainda não é completamente satisfatória, novas técnicas para neurorrafias e novos conceitos e conhecimentos sobre a regeneração de nervos periféricos já foram desenvolvidos (MACKINNON & NOVAK, 1999).

Na prática veterinária, o uso de microscopia cirúrgica é inexpressivo e, por isso, traumatismos com transecções ou esmagamentos de nervos geralmente resultam em amputação. Tendo em vista a alta frequência com que isso acontece, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de estabelecer uma técnica que seja capaz de promover cicatrização satisfatória, com boa regeneração e orientação das fibras nervosas através da área da anastomose, e apresentar como resultado final a recuperação da função.

As pesquisas sobre regeneração do sistema nervoso periférico iniciaram com as descrições feitas por RAMÓN y CAJAL em 1905, e relatavam tanto sucessos quanto fracassos na regeneração de fibras nervosas em animais de experimentação. As tentativas de reparar nervos periféricos traumatizados foram retomadas na primeira e segunda guerras mundiais e ganharam importância proporcionando várias oportunidades de estudos.

A necessidade de se desenvolver técnicas mais eficazes para reparação de nervos que sofrem transsecção é reconhecida há vários anos. A reparação com sutura do epineuro, embora realizada com técnica meticulosa, geralmente resulta em lesões nervosas provocadas pela manipulação, com freqüente recuperação insatisfatória da função (LAUTO et al., 1997).

O emprego das suturas epineurais e perineurais tem sido questionado devido ao mau direcionamento do tecido endoneural e compressão pelo fio de sutura observados no exame histopatológico. Da mesma forma, a técnica de ancoramento fascicular é discutida quanto à

dificuldade para a sua realização, além de ser maior a possibilidade de danificar o tecido neural com o material de sutura, provocando formação de granulomas pela presença de corpo estranho. Levando em consideração esses aspectos negativos das técnicas convencionais, técnicas microcirúrgicas alternativas têm sido pesquisadas.

Por outro lado, o uso de uma técnica conhecida como tubulação, que consiste no posicionamento de um tubo ou bainha entre as duas extremidades de um nervo seccionado, favorece a regeneração axonal através do espaço existente no seu interior, pois evita a invasão de fibroblastos e a aderência de tecido cicatricial (SUEMATSU, 1989). Entretanto, algumas conseqüências negativas devido à compressão foram evidenciadas depois de algumas semanas, como redução da condutibilidade comprovada em teste eletrofisiológico, e redução do diâmetro do nervo na área correspondente à localização do tubo, observada em exame macroscópico durante a necropsia (SMAHEL et al., 1993).

Embora existam técnicas de microcirurgia disponíveis, danos aos nervos periféricos ainda constituem um problema cirúrgico (BERTELLI & MIRA, 1993). As lesões que ocorrem em nervos e em outras estruturas do corpo são diferentes quanto ao tipo de reparação. Ao contrário do que ocorre com as células nervosas, as demais conseguem reparar um tecido pela proliferação a partir das bordas da ferida, devido à sua capacidade mitótica. Dessa forma, torna-se necessário definir uma técnica ideal capaz de minimizar o trauma e reconstituir o microesqueleto do nervo (MEDINACELI & MERLE, 1991).

¹ BioFill® - BIOFILL Produtos Biotecnológicos S.A. Rua Albino Silva, 521. Curitiba – PR

² Tissucol® - Immuno Produtos Biológicos e Químicos Ltda. Rua Adolfo Lutz, 82. Rio de Janeiro-RJ.

Esta pesquisa teve como principal objetivo fazer uma análise comparativa de três técnicas microcirúrgicas (sutura convencional com fio mononylon 10-0, tubulação com BioFill®¹ e aplicação de cola de fibrina - Tissucol®²) com o auxílio de microscopia cirúrgica, para determinar as respectivas eficiências na reparação de nervos periféricos (Anexo 1).

Pretende-se verificar a capacidade da cola de fibrina de estabilizar e manter a coaptação dos segmentos proximal e distal do nervo, empregando o menor número de pontos possível para evitar trauma tecidual, bem como determinar a eficiência da bainha em orientar as fibras em regeneração a partir do segmento nervoso proximal.

Serão analisadas as vantagens e/ou desvantagens da utilização do BioFill® como material empregado na produção das bainhas utilizadas nas neuroanastomoses e compará-las com resultados obtidos com outros materiais, visto que não constam relatos sobre a utilização de BioFill® em cicatrização de tecido nervoso periférico. Assim, será possível desenvolver novas alternativas para a técnica microcirúrgica de reconstrução de nervos periféricos, uma vez que os resultados obtidos com as técnicas atualmente disponíveis não foram satisfatórios.

Portanto, com o emprego de BioFill® para a tubulação de nervos periféricos, pretende-se melhorar a orientação axonal e limitar o tamanho do neuroma, sem provocar restrição do edema normal do tecido após a reparação, e conseqüentemente, causar compressão do nervo.

As vantagens e desvantagens das técnicas empregadas neste estudo de reparação de nervos periféricos serão apresentadas com base nos resultados morfológicos obtidos através de microscopias óptica e eletrônica e técnica de fibras desfiadas.

Um avanço na microcirurgia de nervos, tornando-a mais simples, seria de grande valor para a Medicina Veterinária, principalmente na cirurgia de pequenos animais, devido à alta

freqüência de lesões de nervos periféricos em traumatologia, as quais resultam em perda da função do nervo, levando à amputação na maioria dos casos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Formação do sistema nervoso periférico

O sistema nervoso periférico (SNP) é formado pelos troncos nervosos, células ganglionares e terminações nervosas. Os troncos nervosos são formados por fibras motoras que deixam o sistema nervoso central (SNC) para inervar vários órgãos efetores, e por fibras sensoriais originadas de várias terminações nervosas espalhadas pelo corpo. A informação transportada pelos troncos nervosos pode ser aferente ou eferente ao SNC. As fibras motoras ou eferentes possuem os corpos celulares na substância cinzenta da medula espinhal ou no tronco encefálico, são responsáveis pela inervação dos órgãos efetores. As fibras sensoriais ou aferentes emergem de terminações nervosas distribuídas de forma generalizada por todo o organismo. Tais terminações recebem estímulos referentes à dor, pressão, temperatura e, quando localizadas nos músculos, tendões e cápsulas articulares, são responsáveis pela propriocepção geral. A propriocepção diz respeito a alterações da tensão e do grau de estiramento dos músculos, dos tendões e das cápsulas articulares. Esses neurônios fornecem informação sobre a posição do corpo e da posição de uma parte do corpo em relação à outra (BANKS, 1991).

Os nervos periféricos são formados pelos nervos cranianos e espinhais e seus ramos, ou seja, nervo periférico é qualquer tronco ou ramo nervoso situado fora do SNC. Representam a principal via pela qual o encéfalo e a medula espinhal estabelecem comunicação com o resto do corpo (GARTNER & HIATT, 1997; CROSSMAN & NEARY, 1997).

2.2 Histologia de nervo periférico

De acordo com BANKS (1991) os nervos periféricos são agregados de axônios que ligam o cérebro, o tronco encefálico e a medula espinhal à periferia do corpo.

Os nervos são formados por feixes de axônios ou fibras nervosas chamados fascículos, que se encontram envoltos por uma fina camada de tecido conjuntivo conhecida como perineuro (A). Existe ainda uma outra camada de tecido conjuntivo que compreende a camada mais externa e envolve o nervo completamente, chamada de epineuro (B). Normalmente, um fascículo é composto tanto por axônios motores quanto sensitivos, os quais podem ser mielinizados ou não-mielinizados. A unidade básica do nervo periférico é o axônio (C) associado às células de Schwann (D), e cada uma dessas unidades é revestida pelo endoneuro (E) (MIDGLEY & WOOLHOUSE, 1968; WISE et al., 1969; BROWN, 1972; GIBSON & DANILOFF, 1989; ARRUDA & MENESES, 1999). Conforme BANKS (1991), o endoneuro é um tecido conjuntivo que contém numerosos capilares e que se estende da superfície das células de Schwann até a camada interna das células perineurais. (Figura 1).

Considerando um nervo seccionado transversalmente, 22 a 88 % da sua área corresponde a tecido conjuntivo. Em nervos periféricos, o tecido conjuntivo está representado por três camadas: epineuro, perineuro e endoneuro (GIBSON & DANILOFF, 1989). Segundo BANKS (1991), essas camadas contribuem para a elasticidade que evita a sua ruptura durante os movimentos.

O epineuro é o revestimento encontrado externamente ao perineuro, constituído por tecido conjuntivo, fibras colágenas e vasos sanguíneos e linfáticos (CAVANAGH, 1990a). Conforme GIBSON & DANILOFF (1989), o epineuro é a camada mais externa de tecido conjuntivo que recobre todo o nervo, possui extensões que se fundem ao perineuro e separam os fascículos. O

tecido epineural é frouxamente aderido ao tecido circundante e, por isso, a mobilidade do nervo é limitada. É o tecido usado para manipular o nervo durante o seu reparo e, normalmente, é o local onde os pontos de sutura são colocados.

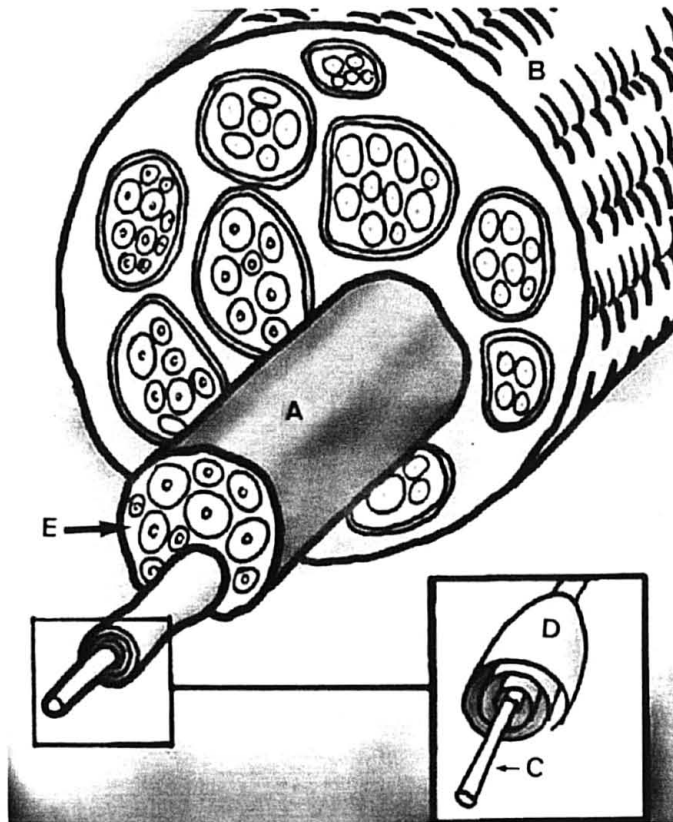


Figura 1 – Estrutura do nervo periférico.

O forame intervertebral é considerado o limite anatômico entre a pia-mater do SNC e o perineuro do SNP. Além de serem revestidas por uma membrana basal, as células perineurais são unidas por firmes junções intercelulares, conferindo ao perineuro a capacidade de atuar como uma membrana protetora e controlar o ambiente interno dos fascículos, impedindo assim a penetração de agentes tóxicos e infecciosos. Esta função protetora pode estar diretamente relacionada ao número de camadas de células e, por isso, quanto menores os nervos periféricos, mais vulneráveis serão a infecções. Além disso, foi provado que esta membrana possui enzimas de desfosforilação, principalmente a adenosina trifosfatase (ATPase), 5-nucleotidase, creatina

fosfatase e glicerofosfatase. Isso indica função de barreira hematonervosa metabolicamente ativa, visto que a ATPase fornece energia para transporte ativo, permitindo que as células assumam o controle da difusão iônica. Portanto, uma das funções fisiológicas do perineuro é manter uma concentração adequada de íons no meio onde são encontradas as fibras nervosas, mantendo o SNP em um ambiente independente dos demais fluidos tissulares, funcionando como uma barreira contra a difusão de substâncias intrafasciculares para o espaço extrafascicular e vice-versa (SHANTHAVEERAPPA & BOURNE, 1963, 1966; OLSSON & KRISTENSSON, 1973; LUNDBORG, 1975; CAVANAGH, 1990b).

Segundo GIBSON & DANILOFF (1989), o endoneuro recobre grupos de axônios não mielinizados e axônios mielinizados individualmente. Confere resistência tênsil ao nervo e à pressão axonal interna. De acordo com GARTNER & HIATT (1997), o endoneuro é um tecido conjuntivo frouxo constituído por uma fina camada de fibras reticulares, raros fibroblastos, macrófagos, capilares e mastócitos perivasculares no líquido extracelular. Está em contato com a lâmina basal das células de Schwann.

O perineuro é a camada média das túnicas de tecido conjuntivo que revestem o nervo periférico. É uma membrana formada por várias camadas de células epiteliais poligonais achatadas, que recobrem os fascículos nervosos de todo o sistema nervoso periférico (SNP) individualmente. Essa membrana é a continuação direta da pia-mater que se estende do sistema nervoso central (SNC) até as terminações nervosas motoras ou sensoriais, sendo que nas terminações dos nervos motores, o epitélio perineural forma um funil envolvendo e recobrendo a placa motora, enquanto nos nervos sensoriais o mesmo epitélio forma uma cápsula dando origem aos corpúsculos de Meissner, Paccini, Krause, etc. (SHANTHAVEERAPPA & BOURNE, 1963, 1966; GIBSON & DANILOFF, 1989; BANKS, 1991; GARTNER & HIATT, 1997).

Tanto o epineuro quanto o perineuro possuem fibras colágenas alinhadas e orientadas longitudinalmente, para evitar dano pelo estiramento exagerado do feixe nervoso (GARTNER & HIATT, 1997).

O espaço endoneural é interno ao perineuro e contém as fibras nervosas, o leito vascular, fibras colágenas com diâmetro pequeno, mastócitos e uma matriz constituída por glicoproteínas supostamente produzidas pelas células endoneurais, pelos fibroblastos ou pelas células de Schwann. Além de lubrificar as fibras nervosas para que elas deslizem durante o movimento do corpo, essa matriz é responsável pela manutenção do ambiente iônico das fibras nervosas favorável à condução do impulso nervoso (CAVANAGH, 1990b).

De acordo com MILLESI (1979), quando se observa a secção de um nervo, são distinguidas 3 formas básicas de arranjo fascicular: a) Monofascicular: quando um fascículo grande predomina na visualização de uma secção transversal do nervo, podendo existir outros fascículos minúsculos e sem importância anatômica, um exemplo é o nervo facial; b) Oligofascicular: é o nervo constituído por poucos fascículos grandes, por exemplo, nervos ulnar e radial; c) Polifascicular: este tipo de nervo pode ou não apresentar organização em agrupamentos de fascículos pequenos, constituídos por fibras com função semelhante. O número e o tamanho dos fascículos contidos em cada grupo pode variar.

2.2.1 Neurônios

Tanto a dimensão quanto a forma das células nervosas são extremamente variáveis. O tamanho do corpo celular varia dependendo da localização e da função, por exemplo, os corpos celulares de algumas células nervosas do cerebelo podem medir 4 a 5 μm de diâmetro, enquanto os corpos celulares dos neurônios motores podem medir até 150 μm de diâmetro. Igualmente, o

comprimento e a forma do prolongamento das células nervosas, conhecido como axônio ou fibra nervosa, variam. O axônio de um pequeno interneurônio pode ser muito curto e apresentar um comprimento de fração de milímetro, no entanto, um neurônio motor normalmente possui longos axônios que podem ter até 1 m de comprimento nos seres humanos (CROSSMAN & NEARY, 1997; ARRUDA, 1999).

Devido a essa grande variação, os neurônios podem ser incluídos tanto entre as maiores quanto entre as menores células do corpo. Um neurônio típico é formado por 3 porções distintas: corpo celular, dendritos e axônio (CROSSMAN & NEARY, 1997; GARTNER & HIATT, 1997).

O corpo celular, também conhecido como pericário ou soma, é a porção da célula que contém o núcleo e a maior parte do citoplasma. A sua forma varia de acordo com a sua localização. O citoplasma do corpo celular possui abundante retículo endoplasmático rugoso com muitas cisternas paralelas, o que representa uma característica dos neurônios. Juntamente com os poliribossomos, que também estão espalhados pelo citoplasma, os retículos endoplasmáticos formam aglomerados denominados corpos de Nissl. Na região do corpo celular onde é originado o axônio, chamado de cone de implantação, o retículo endoplasmático rugoso dá lugar ao retículo endoplasmático liso. Os dendritos são prolongamentos curtos que se projetam do corpo celular especializados em receber estímulos e transmiti-los ao pericário, portanto são considerados as terminações sensoriais dos neurônios. Normalmente, os dendritos possuem múltiplas ramificações com suas extremidades arborizadas que aumentam consideravelmente a superfície celular para que possam receber estímulos de vários neurônios simultaneamente. Este padrão de ramificação dendrítica é característico para cada tipo de neurônio (GARTNER & HIATT, 1997; ARRUDA, 1999).

Todos os axônios, tanto sensoriais quanto motores, mielínicos ou amielínicos, têm a mesma estrutura geral, sendo que o citoplasma do axônio é formado por 3 elementos essenciais: microtúbulos, neurofilamentos e uma rede ramificada de retículo endoplasmático liso. A relação de densidade entre microtúbulos e neurofilamentos varia de modo a aumentar a concentração relativa de neurofilamentos, à medida que o axônio se afasta do corpo. Os microtúbulos consistem em proteína tubular polimerizada, sintetizada no corpo celular. Os neurofilamentos são mais numerosos e, quanto maior a sua quantidade, mais circular será o axônio. Portanto, os axônios com maior diâmetro tendem a ser mais circulares do que os mais finos. O tamanho da circunferência interfere nas propriedades elétricas do axônio. A rede de retículo endoplasmático liso parece ser responsável pelo transporte rápido de proteínas com alto peso molecular e pelo metabolismo do axônio (CAVANAGH, 1990b).

Ao longo do neurônio, existe um movimento intracelular de organelas e substâncias, dependente de energia oxidativa, chamado de transporte ou fluxo axoplasmático. Esse fluxo pode ocorrer tanto no sentido do corpo celular para a periferia (fluxo anterógrado) quanto da periferia para o pericário (fluxo retrógrado). Pode ser interrompido por falta de oxigênio, por substâncias inibidoras da geração de ATP, pelo frio e por agentes que despolimerizam os microtúbulos. Os materiais transportados são diferentes dependendo das circunstâncias ambientais ou metabólicas, e a velocidade com que o transporte ocorre é controlada provavelmente por sinais químicos. Caso exista alguma barreira que interfira com esse movimento ao longo do axônio, os materiais transportados ficarão acumulados principalmente na porção proximal e, em menor grau, distalmente à barreira (CAVANAGH, 1990b; ARRUDA, 1999).

2.2.2 Células de Schwann

As células de Schwann são elementos essenciais para manter a regeneração dos axônios a partir do segmento proximal do nervo, o qual muitas vezes também é chamado de segmento central, pelo fato de estar conectado ao SNC. Quando um nervo periférico sofre degeneração, a célula de Schwann retém a lâmina basal original que envolvia a unidade axônio-célula de Schwann, conservando um canal, chamado de banda de Büngner, onde o axônio em regeneração deve penetrar para seguir o seu trajeto (BUNGE, 1993; 1994).

O núcleo da célula de Schwann é longo e relativamente fino e quadrado. Quando visto ao microscópio eletrônico, o citoplasma contém uma quantidade moderada de retículo endoplasmático rugoso, polirribossomos, pouca quantidade de aparelhos de Golgi e muitos microtúbulos dispostos longitudinalmente (CAVANAGH, 1990a). Além disso, de acordo com MORRIS et al. (1972), uma verdadeira célula de Schwann deve possuir uma lâmina basal e estar necessariamente associada a 1 ou 2 axônios.

As células de Schwann possuem várias funções no tecido nervoso, entre elas a mielinização, produção da matriz extracelular do SNP e regeneração dos axônios no SNP. A mielinização é regulada pelo contato com os axônios (BUNGE, 1993).

As células de Schwann são consideradas as células gliais do SNP. Durante o desenvolvimento, as células de Schwann diferenciam-se em dois grupos antigenicamente, morfológica e funcionalmente distintos, a partir de uma população comum. Quando um dos tipos de célula de Schwann entra em contato com um axônio, ela é induzida a formar o revestimento de mielina, ao passo que o outro tipo de célula de Schwann envolve frouxamente vários axônios de pequeno diâmetro. Dessa forma, serão formadas as fibras mielínicas e amielínicas respectivamente. Depois da perda de contato com o axônio, ambos os tipos de célula

de Schwann podem diferenciar-se novamente e passam a expressar marcadores característicos de um estágio inicial de desenvolvimento. Essas células são chamadas de reativas. Durante a regeneração e restauração do contato com os axônios, as células reativas podem assumir o fenótipo para mielinização ou não-mielinização. As células de Schwann, da variedade que não forma a bainha de mielina, também recobrem as junções neuromusculares, sendo então chamadas células de Schwann terminais. Estudos recentes indicam que as células de Schwann terminais participam da manutenção e da reparação das sinapses neuromusculares (SON et al., 1996).

As células de Schwann envolvem vários axônios pequenos não mielinizados. A superfície endoneural da membrana plasmática da célula de Schwann é envolvida completamente por uma lâmina basal. Embora as células de Schwann das fibras não mielinizadas sejam muito semelhantes àsquelas dos axônios mielinizados, o seu citoplasma tem uma pequena área ocupada por mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático, mas possui maior densidade de filamentos intermediários. Essas células formam as fibras de Remak, as quais formam uma bainha contínua para as fibras não mielinizadas (CAVANAGH, 1990a; SUMMERS et al., 1995) (Figura 2).

BUNGE (1993) sugere que a proliferação das células de Schwann durante a sua migração e mielinização do SNP também é controlada pelo fator de crescimento glial (GGF).

A célula de Schwann envolve uma parte do axônio de cada fibra mielinizada, formando uma cobertura espiralada conhecida como bainha de mielina. Ao longo de uma fibra mielinizada são encontrados intervalos regulares entre as células de Schwann conhecidos como nódulos de Ranvier, que consistem em pequenos intervalos na continuidade da mielina, onde o axônio é recoberto apenas pela lâmina basal da célula de Schwann., e toda a extensão de mielina que se

estende de um nódulo a outro é chamada de internodo. (GIBSON & DANILOFF, 1989; ARRUDA, 1990; CAVANAGH, 1990b)

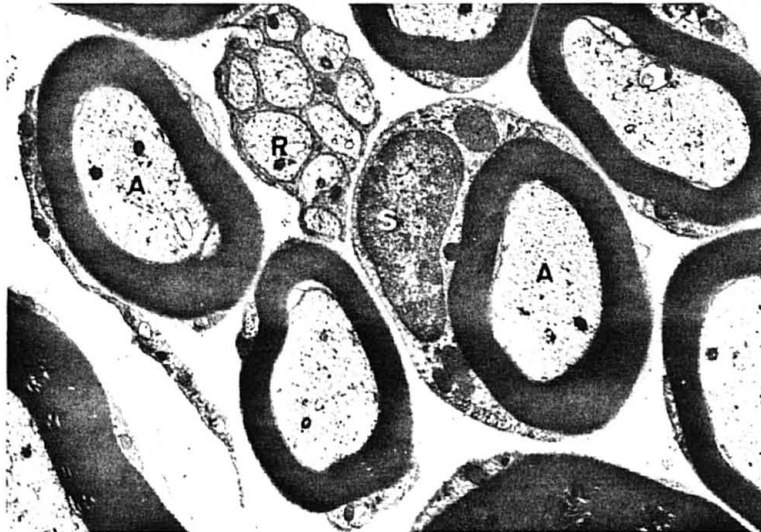


Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica de raiz dorsal. Células de Schwann (S) envolvendo axônios mielinizados (A). Fibra de Remak (R). Rato Wistar adulto. 9.000x. Gentilmente cedida pela Professora Dominguita Lühers Graça (UFSM).

Nos nódulos de Ranvier, não há isolamento pela mielina e os íons extracelulares fluem livremente através de canais concentrados nesses locais, ou seja, são os locais onde ocorrem os eventos metabólicos e iônicos responsáveis pela condução do impulso nervoso. Como o intercâmbio de íons fica limitado aos nódulos, ocorre condução saltatória do impulso nervoso ao longo do nervo, aumentando a velocidade de condução do impulso nervoso da fibra. As fibras não-mielinizadas não possuem bainha de mielina, o que torna a transmissão do impulso nervoso mais lenta. Pequenos feixes de axônios amielínicos podem ser envolvidos por uma célula de

Schwann, mas a bainha de mielina não é formada (GIBSON & DANILOFF, 1989; ARRUDA, 1990; CAVANAGH, 1990b).

Conforme CAVANAGH (1990a), a principal função das células de Schwann é produzir e manter a mielina, a qual fornece resistência elétrica, provocando aumento de 1 a 2 m/s na velocidade de condução do impulso elétrico, visto que sua propagação ocorre em saltos. Além de manter a bainha de mielina, a célula de Schwann também é responsável pela manutenção das funções iônicas envolvidas com a propagação do potencial de ação nos nódulos de Ranvier, porém essa função ainda permanece obscura. Ambas as funções, quando prejudicadas por qualquer tipo de distúrbio, resultam em grande diminuição ou até interrupção da condução do impulso nervoso. No entanto, BUNGE (1993) considera a produção dos componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I e III dentro do endoneuro dos nervos periféricos, a principal função das células de Schwann.

2.2.3 Matriz extracelular

A laminina e a fibronectina são duas proteínas bem caracterizadas presentes na matriz extracelular dos nervos periféricos, e têm a função de estimular o crescimento dos neuritos. Existe outra proteína encontrada apenas em fibras mielinizadas, concentrada nos nódulos de Ranvier, chamada de citotactina, responsável por mediar a interação neurônio-glia (UZMAN et al., 1989).

2.2.4 Vascularização

Vários estudos já foram feitos com o objetivo de explicar as características anatômicas dos *vasa nervorum*, como a sua estrutura e topografia, bem como a relação entre o suprimento

sangüíneo e função e regeneração do nervo. Esse assunto não está completamente esclarecido provavelmente pela falta de técnicas adequadas (LUNDBORG & BRANEMARK, 1968)

Um nervo periférico é uma estrutura bem vascularizada, que possui 2 sistemas microvasculares integrados mas funcionalmente independentes: um sistema microvascular extrínseco e outro intrínseco. O sistema extrínseco é composto por vasos que se originam de artérias e veias da musculatura e do periósteo adjacentes e pelos vasos epineurais, enquanto o sistema intrínseco é formado pelo plexo vascular fascicular (LUNDBORG, 1975; LUNDBORG & BRANEMARK, 1968).

Assim sendo, são distinguidos 3 tipos de vasos sangüíneos nos nervos periféricos: *vasa nutritia*, vasos epineurais e o plexo intrafascicular. Os *vasa nutritia* correspondem a vasos sangüíneos locais que quando alcançam o nervo, dividem-se em ramos proximais e distais que correm longitudinalmente no epineuro. Os vasos epineurais são numerosos e alguns deles atravessam o epineuro e emitem ramos para o tecido conjuntivo interfascicular e para o perineuro. Esses ramos dividem-se novamente, penetram nos fascículos e formam o leito capilar endoneural. As artérias responsáveis pela nutrição (*vasa nutritia*) consistem em cordões de vasos formados por uma ou mais arteríolas, vênulas e capilares, assim como o plexo vascular perineural. As arteríolas e vênulas seguem longitudinalmente estabelecendo numerosas anastomoses. Todo o plexo vascular extrafascicular está em conexão com o leito vascular intrafascicular ou endoneural, que é formado principalmente por capilares (LUNDBORG & BRANEMARK, 1968).

Quando o nervo é esmagado ou seccionado, a manutenção do fluxo sangüíneo para o segmento distal depende do sistema extrínseco, ao passo que o principal suprimento sangüíneo para o segmento proximal é fornecido pelos vasos sangüíneos intraneurais. Os vasos intraneurais

são impermeáveis ou apresentam pouca permeabilidade, porém algum tipo de trauma pode alterar a sua permeabilidade, o que permite o desenvolvimento de edema endoneural. Esse tipo de edema endoneural provoca aumento da pressão intrafascicular e retarda o fluxo sanguíneo nos vasos endoneurais, provocando anóxia com efeitos secundários nas fibras nervosas. Além disso, o edema endoneural interfere com a função do nervo, primeiramente por provocar desorganização das fibras nervosas e secundariamente por induzir fibrose e formação de tecido cicatricial (LUNDBORG, 1975).

De acordo com MELLICK & CAVANAGH (1968), a permeabilidade vascular é alterada após o trauma devido aos produtos liberados pela desintegração química dos axônios em degeneração e da mielina. Tais produtos provocam reação inflamatória contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular. Adicionalmente, o aumento do número de células de Schwann e da sua atividade metabólica, bem como o aumento da população de outras células no tecido nervoso durante a degeneração Walleriana, resulta em maior demanda metabólica e consumo de oxigênio no nervo. Diante de uma situação onde o fluxo sanguíneo torna-se insuficiente para a sua demanda metabólica, a pressão de oxigênio diminui enquanto aumenta a pressão de ácido carbônico. Essa alteração é responsável pela vasodilatação, menor resistência vascular e aumento do fluxo sanguíneo.

Assim sendo, o leito vascular do nervo deve ser preservado. Quando, porém, necessário, o nervo deve ser mobilizado e exposto, pois o comprometimento da irrigação sanguínea local não é evidente, visto que a nutrição do nervo é mantida de forma satisfatória pelo sistema colateral intrínseco bem desenvolvido. Ou seja, a vascularização extranervosa não é necessária, devido à presença de vasos interfasciculares nos segmentos nervosos capazes de supri-los. Uma das razões para evitar tensão em uma neuroanastomose é o comprometimento da microcirculação intraneural

devido ao estiramento do nervo provocado por tensão constante. Nesses casos, com o objetivo de eliminar a tensão sobre a área de anastomose, deve ser utilizado enxerto, entretanto, os enxertos de nervos requerem boa vascularização para evitar fibrose que prejudique a regeneração e a boa orientação das fibras nervosas.(LUNDBORG, 1975; MILLESI, 1979; NARAKAS, 1988).

Da mesma forma, LUNDBORG & BRANEMARK (1968) afirmam que mesmo quando o sistema intrínseco é eliminado, como ocorre em transecções do nervo, a circulação intraneural é muito pouco afetada devida à existência do sistema extrínseco intacto capaz de suprir a demanda nutricional do nervo.

2.3 Causas de lesões em nervos periféricos

A paresia de um ou ambos os membros pélvicos, devido a acidente automobilístico, é uma entidade clínica bem conhecida na prática clínica de pequenos animais (CHRISMAN, 1985; OLIVER et al., 1997). De acordo com GRIFFITHS (1974) e GRIFFITHS et al. (1974), citado por (VAN NES, 1986), a ruptura ou avulsão de uma ou mais raízes dos nervos espinhais vem sendo reconhecida na literatura veterinária como a causa mais comuns de paresia ou paralisia traumática de membro pélvico.

Segundo GIBSON & DANILOFF (1989) e GASPARI et al. (1999), lesões iatrogênicas são freqüentes e podem ser provocadas na remoção cirúrgica de tumores, na colocação de pino intramedular, injeção, *etc.* Por esse motivo, é importante que seja feita uma revisão metódica da anatomia cirúrgica.

De acordo com SEDDON (1943), as lesões traumáticas a nervos periféricos são classificadas em 3 categorias de acordo com o grau da injúria: neurapraxia, axonotmesis ou neurotmesis. Neurapraxia consiste em uma contusão que provoca interrupção transitória da

condução dos impulsos nervosos. Normalmente é causada por perda do suprimento sanguíneo como pode acontecer nos casos de aplicação de torniquete ou quando há pressão prolongada que pode ser provocada pelo próprio peso do animal durante anestesia. A neurapraxia pode estar associada com lesão da mielina mas sem evidência de degeneração Walleriana. A desmielinização pode ocorrer se os sinais persistirem por mais que alguns dias e a remielinização ocorre em um período de 3 a 4 semanas. Essa é a forma mais leve de dano. Axonotmesis, também considerada como esmagamento, denota a separação do axônio do corpo celular com subsequente degeneração da porção distal do axônio e perda da capacidade de condução de impulsos nervosos em 3 a 5 dias. A degeneração distal à área danificada pode ocorrer em vários axônios, no entanto, a arquitetura interna geral do nervo é mantida, ou seja, o endoneuro e a bainha de mielina permanecem intactos. Neurotmesis significa a completa secção do nervo onde todas as estruturas do nervo são rompidas podendo resultar em completa degeneração dos axônios e das células de Schwann distalmente à lesão. A regeneração pode ocorrer, mas a formação de neuroma é provável (GIBSON & DANILOFF, 1989; OLIVER et al., 1997). Geralmente, uma neurotmesis em cães e gatos é conseqüente à fratura pélvica, femoral ou umeral (GIBSON & DANILOFF, 1989).

2.4 Degeneração de nervos periféricos

A primeira descrição detalhada sobre degeneração de nervos periféricos foi feita em 1850 por WALLER, citado por UZMAN et al (1989), o qual relata uma sucessão de alterações que ocorrem nos axônios de um nervo seccionado e passou a ser chamada de degeneração Walleriana. De acordo com UZMAN et al. (1989), mesmo aperfeiçoados por mais de um século, os relatos de WALLER em 1850 permanecem válidos, sendo acrescentadas apenas novas informações sobre

alguns aspectos, tais como o tempo em que os eventos celulares ocorrem e as sub-estruturas celulares envolvidas.

Conforme ARRUDA (1999), quando uma fibra nervosa é lesada, ocorre uma série de alterações tanto proximais quanto distais à lesão. No corpo celular do axônio lesado ocorre cromatólise, que consiste na dissolução dos corpos de Nissl, aumento do volume do corpo celular e deslocamento do núcleo para a periferia da célula. Distalmente à lesão ocorre destruição do axônio e, no caso de fibras mielínicas, ocorre também desintegração da bainha de mielina. Esse processo é denominado de degeneração Walleriana.

Segundo BANKS (1991), uma fibra nervosa isolada da influência trófica do corpo celular, assume aspecto granuloso, rompe-se em fragmentos irregulares e se desintegra. A bainha de mielina sofre alterações semelhantes à fragmentação da fibra nervosa.

Alterações foram observadas por WALLER em 1850, a partir do segundo dia, iniciando com retração da mielina seguida por fragmentação da mielina e posteriormente dos axônios. O aumento do núcleo, espessamento do citoplasma e divisões mitóticas representam as primeiras alterações observadas nas células de Schwann. De acordo com RAMÓN y CAJAL (1928), a fragmentação da bainha de mielina começa em 24 horas após a lesão e é observada na maioria das fibras nervosas no 3º dia.

HOLTZMAN & NOVIKOFF (1965) confirmaram que a degeneração Walleriana ocorre pela degradação da mielina e de grande parte do axoplasma, no interior de vacúolos de digestão pela ação da fosfatase ácida. No citoplasma da mesma célula de Schwann são encontrados tanto vacúolos autofágicos contendo mielina, quanto vacúolos fagocíticos contendo axoplasma. Os autores acreditam que os vacúolos fagocíticos são formados a partir de invaginações de pseudópodes das células de Schwann que envolvem o axoplasma.

Foi descrito por RAMÓN y CAJAL em 1928 o aumento do citoplasma das células de Schwann e do número de nucléolos no 3º dia após a lesão, sendo observado o início das mitoses no 4º dia.

Segundo WALLER, citado por UZMAN et al. (1989), após a degeneração do axoplasma, são observadas células de Schwann proliferadas com aspecto vacuolizado, que regridem deixando um canal central com a finalidade de receber os axônios em regeneração. Esses canais formados por células de Schwann constituem as bandas de Büngner.

Lesões em nervos periféricos também provocam alterações degenerativas retrógradas nas células nervosas (BROWN, 1972; ARRUDA, 1999). CAVANAGH (1990b) descreve essas alterações degenerativas que progridem retrogradamente em direção ao corpo celular, como fenômeno *dying back*. Essas alterações retrógradas que constituem o fenômeno *dying back* são características de desordens que afetam o corpo celular e prejudicam o suprimento de energia para o axônio, como nas neuropatias tóxicas e nos distúrbios de deficiência.

Esse fenômeno recebe tal denominação porque, quando o corpo celular é lesado e passa a ser metabolicamente incompetente para manter seus longos prolongamentos, as primeiras alterações são manifestadas pela porção mais distal do axônio. Portanto, os axônios com grande diâmetro e comprimento estão mais predispostos a sofrer degeneração mais cedo, devido à sua grande demanda de energia (CAVANAGH, 1990b; SOUZA, 1993). A degeneração retrógrada foi relatada por SOUZA et al. (1996) após intoxicação por haloxon. Primariamente foram afetadas as fibras mais largas a partir da extremidade distal do nervo, até que os fascículos fossem inteiramente afetados.

No entanto, já que a porção proximal do axônio mantém a sua continuidade com o corpo celular do neurônio, logo começa a regenerar, sendo que os novos ramos do axônio, chamados de neuritos, emergem a partir do coto nervoso (BANKS, 1991).

2.5 Regeneração de nervos periféricos

Os neurônios são células permanentes, isto é, são células que não possuem capacidade de multiplicação e a destruição do corpo celular representa uma perda irreversível. Entretanto, o seu axônio pode regenerar-se. Por isso, quando um nervo é seccionado, ocorrem alterações degenerativas seguidas de uma fase de reparação. Ao contrário dos neurônios, as células de Schwann são dotadas de grande capacidade de proliferação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Uma característica excepcional dos nervos periféricos é a sua capacidade de regeneração após sofrer uma lesão. Essa propriedade é essencial para que o SNP não tenha a sua função prejudicada pelas pequenas injúrias às quais está exposto diariamente, e que devem ser reparadas. É possível distinguir duas fases durante a regeneração de um nervo periférico: a) crescimento, que consiste na chegada e conexão de axônios novos com o tecido do coto distal; b) reconstituição, quando o número, o diâmetro e a medulação das fibras são restaurados (CAVANAGH, 1990; GUTMANN & SANDERS, 1943).

A transsecção de um nervo resulta em dois segmentos ou cotos, um proximal e outro distal. O segmento proximal freqüentemente regenera porque mantém contato com o pericário, também chamado corpo celular, enquanto o segmento distal degenera totalmente e acaba por ser reabsorvido, caso não ocorra reparação. Enquanto o axônio e a bainha de mielina do segmento distal degeneram e são reabsorvidos por macrófagos, as células de Schwann proliferam formando

colunas compactas, que servem de guia para os axônios que crescem do segmento proximal. Quando o espaço entre esses dois segmentos é grande, as fibras nervosas crescem ao acaso, formando uma dilatação dolorosa conhecida como neuroma (THOMAS, 1966; UZMAN et al., 1989; CAVANAGH, 1990b).

De acordo com WISE et al. (1969), o crescimento dos axônios, motores e sensitivos, através da área anastomótica e o seu direcionamento para os respectivos canais de Schwann do segmento distal até as terminações nervosas, determina o grau de recuperação do nervo. Para SANDERS & YOUNG (1944), o processo de regeneração de um nervo será completado somente se ocorrer produção de fibras nervosas comparáveis em número e tamanho àquelas presentes em um nervo normal.

A ponta ou extremidade de um neurito em regeneração consiste em uma membrana ativa que está em constante movimento, contém mitocôndrias que fornecem energia, pequenas vesículas, citoplasma e microfilamentos. Os neurofilamentos e os microtúbulos “empurram” a ponta em progressão, favorecendo o crescimento do nervo. Essa ponta cresce aproximadamente 1 a 2 mm por dia, na mesma proporção do movimento das estruturas do citoesqueleto; no entanto, essa taxa de crescimento pode cair substancialmente em longas distâncias (ERHART, et al., 1975; CAVANAGH, 1990b).

Segundo BARRON (1989), o coto do axônio seccionado que permanece conectado ao corpo celular origina, em média, 4 a 8 processos regenerativos, sendo que normalmente, um brotamento sobrevive estendendo-se como um novo segmento axonal distal ao local da lesão.

MORRIS et al. (1972) afirmam que todos os neuritos em regeneração são ramos, colaterais ou terminais, de um axônio mielinizado original e formam grupos que seriam mais apropriadamente chamados de “unidades de regeneração”. Portanto, a atividade regenerativa de

um único axônio é expressa por grupos constituídos por vários novos axônios. Esta afirmação é confirmada pela persistência de um revestimento de lâmina basal, que envolve todo o grupo de axônios. SANDERS & YOUNG (1944) reforçam essa explicação pois constataram um aumento considerável do número de fibras no segmento periférico, indicando que as fibras nervosas centrais ramificam para preencher os tubos de Schwann e restabelecer a conexão.

Além disso, esses mesmos autores observaram que o número de lamelas de mielina em axônios regenerados aumenta progressivamente com o tempo, depois da secção de um nervo periférico. Todavia, esses axônios não chegam a apresentar o mesmo número de anéis de mielina que os axônios mielinizados de nervos normais e com o mesmo calibre possuem.

A reparação de um nervo puro (sensitivo ou motor) é mais simples que a reparação de um nervo misto e geralmente apresenta melhor recuperação funcional (BROWN, 1972; MIDGLEY & WOOLHOUSE, 1968). Conforme JUNQUEIRA & CARNEIRO (1995), “a eficiência funcional da regeneração depende de as fibras ocuparem as colunas de células de Schwann. Num nervo misto, por exemplo, se as fibras sensitivas regeneradas ocuparem colunas destinadas às placas motoras do músculo estriado e que antes estavam ocupadas por fibras motoras, a função do músculo não será restabelecida”. Daí a importância de uma precisa e estável coaptação dos fascículos de um nervo que sofreu secção, e isso é conseguido com neuroanastomose. Segundo MEDINACELI & MERLE (1991), “a substituição desorganizada de um axônio motor por um sensitivo pode restaurar alguma mobilidade rudimentar ou alguma sensibilidade não refinada”. Entretanto, a insuficiência dessas reparações torna-se óbvia quando se trata de músculos responsáveis por movimentos precisos.

Diante dessas considerações e do exposto por SANDERS & YOUNG (1944), é justificada a melhor regeneração nos casos de esmagamento de nervos, pois muitas ou todas as fibras centrais permanecem conectadas com os seus tubos periféricos correspondentes.

De acordo com UZMAN et al. (1989), para que ocorresse total restauração da função após a secção de um nervo periférico, seria necessário fazer o emparelhamento exato das extremidades de cada fibra. Por essa razão, o uso normal e coordenado de músculos reinervados por um nervo anteriormente seccionado é praticamente impossível. Para BRAUN (1966), a recuperação da função motora é variável e depende muito do local e da extensão de lesão, bem como da técnica empregada para reparação.

Além desses fatores que podem influenciar o sucesso da regeneração de nervos danificados, também são mencionados por BROWN (1972), MILLESI et al. (1972) e VUORINEN et al. (1995), o tipo de nervo, idade do paciente, presença de lesões associadas e infecção local, entre outros. De acordo com CARLSTEDT & NORÉN (1995), o fator tempo-distância influencia grandemente a regeneração do nervo. Para eles, uma distância muito longa, através da qual as fibras nervosas precisam regenerar-se, é desfavorável para a recuperação final da função.

De acordo com STENSAAS et al. (1989), o objetivo central da reparação de nervos é proporcionar a união entre fascículos correspondentes para que as fibras nervosas em regeneração consigam atravessar a área de descontinuidade endoneural sem errar o trajeto e perderem-se no epineuro da borda da lesão. Sabe-se que o crescimento extrafascicular das fibras nervosas resulta na formação de neuroma.

2.5.1 Células envolvidas

2.5.1.1 Células de Schwann

As células de Schwann circundam todos os axônios situados fora do SNC. Durante o desenvolvimento, devido ao aumento da atividade funcional, os axônios em maturação aumentam o seu diâmetro e quando atingem aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ de diâmetro, são envolvidos por uma série de células de Schwann que se dispõem em intervalos regulares, formando os internodos. Durante o desenvolvimento, cada célula de Schwann prolonga-se, formando uma espiral com dez ou mais camadas ao redor do axônio e dando origem à bainha de mielina. Cada segmento separado de mielina é conhecido como internodo, e o espaço entre dois internodos consecutivos é conhecido como nóculo de Ranvier. Este processo, que ocorre durante o crescimento, é chamado de mielinização e consiste em um processo contínuo durante muitos anos até o final do crescimento (CAVANAGH, 1990a).

De acordo com CAVANAGH (1990b), a célula de Schwann está sempre disponível para reparar uma perda de mielina, desde que o processo causal seja tratado. Estas células são raramente destruídas, apenas a sua capacidade para manter a bainha de mielina é prejudicada. Mesmo quando todo o internodo é destruído, a célula de Schwann remanescente divide-se, dando origem a um número suficiente de células para preencher o intervalo resultante da perda de mielina internodal. Porém, quando apenas uma parte do internodo degenera, deixando um intervalo maior que $15 \mu\text{m}$ de comprimento, uma nova célula é necessária para preencher o espaço, formando um pequeno internodo. Caso a falha produzida pela injúria seja inferior a $15 \mu\text{m}$, a célula de Schwann já existente é capaz de estender-se para cobrir a região paranodal danificada.

Conforme VISOZO (1950), citado por CAVANAGH (1990b), a característica que confirma remielinização durante a vida de um indivíduo é a presença de numerosos internodos pequenos que são frequentemente encontrados em nervos de indivíduos idosos, constituindo-se em forte evidência de que houve regeneração.

Essa formação da bainha de mielina foi comprovada por CAVANAGH (1990a) através de eletromicrografia de secção transversal de fibras mielinizadas, onde foi possível reconhecer a estrutura em espiral da mielina, e a existência de um mesaxônio ligando a superfície da membrana plasmática do axônio à primeira volta da bainha de mielina.

O'DALY & IMAEDA, em 1967, descreveram a regeneração do axônio quando visto ao microscópio eletrônico e revelaram que cada axônio se regenera a partir da formação de um broto axonal, que é composto por muitos processos semelhantes a dedos que pressionam ou “empurram” a superfície proximal da célula de Schwann com a suas pontas, provocando a invaginação da membrana da célula de Schwann e a formação de mesaxônios. Sendo assim, pode-se considerar que mesaxônios consistem de pregas, dobras ou invaginações dos brotamentos axonais na célula de Schwann, que ligam a superfície lateral dessas células aos axônios. Durante as voltas em espiral dos mesaxônios, as superfícies internas da membrana da célula de Schwann unem-se formando lamelas, enquanto a superfície externa da membrana dá voltas ao redor do axônio, que estará completamente envolvido por várias lamelas de mielina, constituindo dessa forma a bainha de mielina, em 3 a 4 semanas.

Segundo ARRUDA (1999), as células de Schwann encontradas no SNP formam uma goteira ou sulco inicial que contém o axônio, e o fechamento dessa goteira leva à formação do mesaxônio.

Quando um nervo sofre lesão, observa-se degeneração completa e fagocitose dos axônios e da bainha de mielina no segmento distal. Entretanto, as células de Schwann continuam a multiplicar-se, formando colunas contínuas, conhecidas como bandas de Büngner, que têm a finalidade de conduzir os axônios em regeneração para os respectivos órgãos terminais. Além disso, as bandas de Büngner servem como fonte de células para futura mielinização dos axônios regenerados. Logo que um axônio em regeneração penetra na banda de Büngner, as células de Schwann iniciam a mielinização, antes mesmo que o órgão terminal seja alcançado (WISE et al., 1969).

Segundo JURECKA et al. (1975), após a transecção de um nervo, a membrana basal remanescente forma os tubos de Schwann dentro dos quais normalmente são encontradas fileiras de células de Schwann que podem estar envolvidas por uma nova membrana basal comum. Na extremidade proximal são vistos numerosos brotamentos axonais invaginando o citoplasma das células de Schwann.

Para DAVENPORT et al. (1937), uma vez que o axônio tenha atravessado a linha da anastomose em direção ao segmento distal, o seu crescimento e a mielinização ocorrem quase simultaneamente.

No segmento proximal, ocorre um curto período de degeneração moderada e reversível dos axônios, seguido de uma fase de crescimento através da área anastomótica, numa tentativa dos axônios de penetrar nos canais de Schwann do segmento distal, também chamados de bandas de Büngner (WISE JR et al., 1969). Esses canais de Schwann são considerados por SOUZA et al. (1996), células de Schwann proliferadas que se espalham por baixo da antiga lâmina basal.

Conforme UZMAN et al. (1989), a manutenção da continuidade da lâmina basal é muito importante para guiar ou orientar os brotos axonais durante a regeneração.

Segundo O'DALY & IMAEDA (1967), o processo de regeneração caracteriza-se pela mitose das células de Schwann e pelo crescimento de brotos axonais, que atravessam essas células e ficam envolvidos por elas.

A proliferação das células de Schwann, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, pode estar sob controle do fator de crescimento neural (NGF) e de um ou mais componentes da matriz extracelular, visto que as células de Schwann apresentam uma resposta mitogênica, ou seja, a sua proliferação pode ser estimulada quando entram em contato com neuritos pertencentes a segmentos conectados ao SNC, como axolema, mielina e até alguns componentes da membrana basal (UZMAN et al., 1989).

Após completa transecção do nervo, o intervalo entre as extremidades transecionadas constitui um obstáculo para a conexão dos axônios em regeneração com as bandas de Büngner apropriadas do segmento nervoso distal, e resulta em acúmulo de neuritos e tecido conjuntivo que aumenta em tamanho e freqüentemente torna-se doloroso, chamado neuroma de amputação (AITKEN, 1949; CAVANAGH, 1990a).

Conforme estudos feitos por RAMÓN y CAJAL desde 1905 e 1913, o neuroma é um grande emaranhado encapsulado que se desenvolve na extremidade do coto proximal, devido ao trajeto tortuoso seguido pelos brotos axonais, caso não encontrem as bandas de Büngner no segmento distal. Para AITKEN (1949) e GIBSON & DANILOFF (1989), o neuroma é uma proliferação desorganizada das fibras nervosas e do tecido conjuntivo, que impede a chegada dessas fibras ao final dos tubos de Schwann. Assim sendo, o contato com o órgão periférico terminal não é estabelecido

De acordo com CAVANAGH (1990b), um neuroma ocorre quando existe um intervalo entre as extremidades de um nervo seccionado que impede a penetração dos axônios em

crescimento no segmento distal do nervo. Dessa forma, os axônios não encontram os canais formados pelas células de Schwann e perdem-se em tecido conjuntivo.

As células de Schwann são circundadas, em toda a sua extensão por uma membrana basal, e externamente a ela encontra-se uma camada de fibras colágenas com pequeno diâmetro, que forma uma bainha distinta conhecida como bainha de Plenk-Laidlaw. Esta é uma parte da matriz de colágeno do endoneuro, e o tropocolágeno necessário à sua formação provavelmente é secretado pelas células de Schwann. É por isso que em casos de esmagamento não se desenvolve neuroma, pois além da presença da membrana de Plenk-Laidlaw, a membrana basal das células de Schwann permanece íntegra, favorecendo o crescimento dos brotos axonais em direção aos canais apropriados, que os guiarão para os seus órgãos terminais (CAVANAGH, 1990a).

LUNDBORG et al. (1982b), baseados na hipótese de existir uma matriz no interior das bandas de Büngner, a qual apresenta propriedades que favorecem o alongamento axonal, são do parecer que a multiplicação das células de Schwann, a partir do coto distal, é essencial para o sucesso da regeneração dos axônios proximais.

As colunas de células de Schwann estendem-se a partir do coto distal do nervo e atravessam uma estrutura de tecido conjuntivo, provavelmente de origem perineural e endoneural, constituída principalmente por vasos sanguíneos, fibroblastos, fibrilas de colágeno e macrófagos (THOMAS, 1966).

De acordo com GUTMANN & SANDERS (1943), o tamanho final das fibras do segmento periférico é influenciado pelo tamanho dos tubos formados pelas células de Schwann. Tendo isso em vista, os autores concluíram que a reparação de nervos motores apresenta melhores resultados do que a reparação de nervos sensoriais porque os tubos dos nervos motores são mais largos. Portanto, uma fibra motora tem mais possibilidade de penetrar em um tubo

motor largo para estabelecer conexão com o seu órgão terminal e, finalmente, chegar à maturação.

Segundo SON et al. (1996), as células de Schwann formam pontes ligando as extremidades dos segmentos proximal e distal do nervo seccionado. Essas células recebem sinais de neurônios motores e fibras musculares que influenciam a sua expressão gênica e o seu comportamento. Por sua vez, as células de Schwann regulam o crescimento e a orientação dos brotamentos axonais, aspectos de fundamental importância para uma boa regeneração do nervo.

2.5.1.2 Células perineurais

Durante o estágio regenerativo, as células perineurais proliferadas aumentam as suas organelas citoplasmáticas e preenchem os intervalos deixados pela passagem dos macrófagos. Uma vez terminada a multiplicação das células de Schwann, seguida por remielinização dos axônios regenerados, as células perineurais tornam-se mais finas, os seus componentes citoplasmáticos diminuem e finalmente essas células apresentam aparência semelhante ao normal (VUORINEN et al, 1995).

2.5.1.3 Outras células

Após uma semana da ocorrência de uma lesão em nervo periférico sem tentativa de reparo, foram observados fibroblastos, macrófagos, mastócitos e células semelhantes a monócitos. Os fibroblastos representam a maioria das células encontradas na extremidade do segmento nervoso distal. Essas células são alongadas e emitem processos longos e estreitos, são distinguidas pela ausência de membrana basal e por possuírem grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, disposto paralelamente. Macrófagos também são encontrados com

freqüência. São células que não possuem membrana basal e caracterizam-se por possuírem microvilos enrugados. No seu interior, são vistos vacúolos contendo restos celulares e fragmentos de mielina. Provavelmente, os macrófagos observados após lesão de nervo periférico são derivados de leucócitos sanguíneos (THOMAS, 1966).

2.6 Fatores de Crescimento

No início do século, RAMÓN y CAJAL já supunha que os segmentos distais em regeneração liberam uma substância difundível responsável tanto pela atração quanto pela orientação de axônios em crescimento, orientando-os para as suas terminações, motoras ou sensoriais. Esses fenômenos foram denominados pelos autores de quimiotropismo e neurotropismo, respectivamente. Sendo assim, pode-se dizer que neurotropismo consiste na capacidade que o coto distal possui de influenciar favoravelmente o crescimento dos axônios a partir do coto proximal.

No entanto, YOUNG et al. (1940) acreditavam na existência de alguma influência estimuladora e atrativa exercida pelo segmento proximal do nervo sobre as células de Schwann, que proliferam a partir do segmento distal. Poucos anos depois, GUTMANN & SANDERS (1943), propuseram a existência de fatores periféricos que determinam o diâmetro final das fibras nervosas do segmento proximal. Entretanto, conforme YOUNG & MEDAWAR (1940), o diâmetro das fibras nervosas regeneradas depende do diâmetro do tubo formado pelas células de Schwann no qual penetram as fibras em regeneração.

Essa influência está relacionada à existência de fatores neurotróficos, que têm a função de atrair as fibras nervosas, e fatores neurotróficos, os quais favorecem a sobrevivência e a diferenciação dos neurônios. Além disso, o brotamento dos axônios é estimulado pelos fatores

neuritogênicos, que podem afetar eventos metabólicos ou a armação do citoesqueleto na superfície da célula. Alguns fatores neurotróficos são neuritogênicos, como o fator de crescimento neural (UZMAN et al., 1989).

O fator de crescimento neural (NGF) é o fator neurotrófico melhor caracterizado e sua importância fisiológica já foi demonstrada. Esse fator é sintetizado pela célula alvo, ou seja, pela célula que deve ser alcançada. O NGF liga-se a receptores específicos terminais do nervo em regeneração, é em seguida interiorizado e chega ao corpo celular por transporte retrógrado, para então exercer efeito direto na regeneração do nervo. A sua ação no corpo celular ainda não foi totalmente esclarecida (UZMAN et al., 1989).

São reconhecidos dois tipos de moléculas receptoras do NGF de superfície celular:

- Tipo I – apresenta alta afinidade e forma de dissociação lenta;
- Tipo II – é o tipo encontrado na célula de Schwann, possui baixa afinidade e forma de dissociação rápida.

A pesquisa desse fator de crescimento neural tem sido realizada tanto em nervos em desenvolvimento, onde HEUMANN et al. (1987) observaram que todas as células de Schwann do nervo ciático de ratos recém-nascidos expressaram o NGF, quanto em nervos transeccionados, e verificaram que, depois de transeccionadas, as células de Schwann re-expressam os receptores de NGF.

A regulação do RNA mensageiro de codificação do NGF e das suas proteínas receptoras foi analisada em nervo ciático de rato, tanto em desenvolvimento quanto em regeneração. Concluiu-se que os níveis de RNA mensageiro caem gradativamente após o nascimento, enquanto que depois de uma transecção do nervo, os níveis de RNA mensageiro, tanto para o NGF quanto para os seus receptores, aumentam no segmento distal do nervo. À medida que os

axônios em regeneração penetram no segmento distal, os níveis de RNA mensageiro para o NGF e para os seus receptores são reduzidos (HEUMANN et al., 1987).

As moléculas de adesão celular (CAM) encontradas na superfície celular normalmente são glicoproteínas que tem a função de se ligar a outra molécula de proteína igual ou semelhante. Assim sendo, essas moléculas influenciam a agregação celular e a histogênese em geral. No SNP essas moléculas favorecem o crescimento dos neuritos e a organização fascicular durante o desenvolvimento. As CAMs interagem com as moléculas de aderência do substrato (SAM), mas o mecanismo dessa interação ainda não foi esclarecido. A importância das SAMs é explicada quando se considera a existência de anticorpos específicos que podem ser marcados e dessa forma, os substratos nos quais os axônios ou as unidades axônio-célula de Schwann crescem, podem ser traçados (UZMAN et al., 1989).

2.7 Técnicas cirúrgicas para correção de defeitos nos nervos periféricos

A reparação de nervo periférico tem 2 objetivos: restabelecer a continuidade física entre fascículos correspondentes, e maximizar o crescimento axonal através da lesão. Os métodos disponíveis para neuroanastomose permitem a união dos constituintes neurais mas não asseguram o crescimento organizado através do local da lesão, podendo resultar em regeneração axonal extrafascicular constituindo um neuroma. O crescimento desordenado das fibras nervosas no tecido conjuntivo epineural, além de diminuir a eficácia da regeneração através da área lesada, resulta em parestesia e dor.

Segundo BURKE & O'BRIEN (1978), o advento do microscópio cirúrgico e o aperfeiçoamento do material de sutura proporcionou aumento do número de trabalhos experimentais e clínicos sobre reparação de nervos periféricos.

As primeiras tentativas para restaurar nervos sem utilizar sutura foram feitas com adesivo constituído por plasma. Entretanto, a resistência tênsil dos coágulos era baixa, resultando em alta frequência de deiscências. Os adesivos sintéticos testados provocavam reação inflamatória que, normalmente, resultava em necrose das fibras nervosas. A reparação satisfatória de nervos por meio do uso de adesivo foi obtido após a utilização da cola de fibrina (GIBSON & DANILOFF, 1989).

Segundo STOPIGLIA & ERHART (1987), a idéia de que lesões nervosas periféricas antigas eram irreversíveis e irreparáveis foi abolida com o uso de técnica microcirúrgica adequada. Segundo esses autores e ERHART & FERREIRA (1975), o microscópio cirúrgico permite que seja usado material de sutura muito fino e instrumental cirúrgico delicado, possibilitando assim a reconstrução cirúrgica de um nervo com o mínimo de trauma operatório. Além disso, proporciona um melhor alinhamento fascicular, favorecendo a re-inervação do segmento distal e evitando degeneração Walleriana neste segmento, o que resulta em maiores possibilidades de recuperação da função do nervo.

2.7.1 Sutura

Embora a sutura perineural ou fascicular apresente mais vantagens que a sutura epineural, como por exemplo, melhor alinhamento fascicular e formação de neuromas menores, esse procedimento é tecnicamente difícil pois, caso um ponto seja tão profundo que penetre na substância fascicular, pode ocorrer uma reação inflamatória suficiente para impedir a regeneração das fibras nervosas (GRABB et al., 1970; ORGEL & TERZIS, 1977; TUPPER et al., 1988).

A sutura epineural é um procedimento mais simples porque abrange somente o epineuro. O epineuro é a camada mais externa do nervo; assim, a técnica epineural proporciona menos

oportunidades de danificar o tecido neural e provocar a formação de granuloma por corpo estranho (STOPIGLIA & ERHART, 1987; TSUGE et al., 1975; BORA, 1967; TOPUZLU & DAVIS, 1969). Além disso, BERTELLI & MIRA (1993) relatam que tanto suturas epineurais quanto perineurais causam compressão, formação de cicatriz e mau direcionamento endoneural.

De acordo com BURKE & O'BRIEN (1978), não foram observadas diferenças significativas entre as suturas epineural, fascicular e a combinação de sutura epineural com fascicular, tanto em avaliação eletromiográfica quanto histológica, sendo impossível determinar qual das técnicas é superior. Segundo eles, a simples técnica epineural oferece a mesma chance de regeneração que as técnicas mais complicadas.

As condições recomendadas por alguns autores para que seja realizada neurorrafia primária devem ser respeitadas. Conforme BROWN (1972) e NICHOLSON & SEDDON (1957), a sutura primária deve ser realizada somente quando a ferida for provocada por um instrumento cortante, quando for possível visualizar e mobilizar os cotos proximal e distal sem tensão, quando o trauma tecidual for mínimo, quando a ferida estiver limpa e quando a sutura for realizada até 12 horas após a lesão.

NICHOLSON & SEDDON (1957) e GUNTINAS et al. (2000), sugerem que seja dada preferência à sutura secundária, visto que o epineuro recentemente lesado é excessivamente fino e depois de algumas semanas torna-se mais espesso, constituindo uma estrutura ideal para sustentar suturas finas. Por outro lado, muitos pesquisadores defendem que a regeneração axonal será inferior se a união dos cotos proximal e distal for atrasada.

Conforme MEDINACELI & SEABER (1989), condições ótimas estão presentes durante poucas horas após a lesão, posteriormente, alterações químicas e físicas levam à desintegração do

microesqueleto, passando a ser cada vez mais difícil o estabelecimento de um alinhamento axonal adequado.

MEDINACELI & SEABER (1989) adotaram a sutura secundária como uma tentativa de melhorar os resultados obtidos com sutura primária. Entretanto, nenhuma melhora foi observada após a tentativa secundária de correção. No entanto, SANDERS & YOUNG (1944) testaram a capacidade de regeneração do nervo tibial de coelho desnervado durante 15 meses e meio e posterior reinervação de 10 meses. Constataram que o segmento periférico ou distal do nervo foi preenchido por fibras nervosas mesmo depois de um longo período de desnervação, apresentando, porém, menor número e diâmetro, pois os tubos de Schwann periféricos sofrem retração. Para eles, qualquer demora que ultrapasse o primeiro mês, afetará negativamente a recuperação funcional, pois serão encontrados mais obstáculos para o processo de regeneração.

Segundo BROWN (1972), a importância do tempo que se passou desde a lesão até a reparação pode ser interpretada sob dois pontos de vista: nunca é tarde demais para reparar o nervo e, quanto mais cedo for feita a reparação, melhores serão as chances de sucesso. ABREU & ERHART (1958), acreditam que mesmo em lesões muito antigas de nervos periféricos, a neurografia deve ser indicada porque sempre oferecerá algum benefício ao paciente e baseados na sua experiência, afirmam que nas lesões traumáticas o paciente sempre se beneficia com o tratamento e mesmo lesões traumáticas muito antigas de nervos periféricos devem ser tratadas.

A maioria das técnicas de sutura provoca um alto grau de desorganização no local da neurografia, mesmo com um ótimo alinhamento fascicular. Portanto, é muito importante que os fatores responsáveis por esta desorganização sejam definidos, e que seja estabelecido um método de reparo de nervos que reduza a formação de cicatriz e assegure uma regeneração ordenada entre os cotos proximal e distal. A reparação de nervos com sutura provoca edema do nervo e

desarranjo do tecido conjuntivo, fazendo com que os axônios em regeneração sigam caminhos erráticos acompanhando o desarranjo do tecido conjuntivo na área anastomótica (LEHMAN & HAYES, 1967; MEDINACELI et al., 1983).

MEDINACELI & MERLE (1991) afirmam que tanto suturas epineurais quanto perineurais podem parecer satisfatórias externamente, enquanto internamente o resultado é catastrófico. Portanto, para eles o tipo de técnica usada para o reparo tem pouca influência no resultado funcional de lesões nervosas. Relatam que a aproximação dos cotos com cola de fibrina ou tubulação resulta em pequena interrupção da estrutura interna do nervo.

2.7.2 Tubulação

Os materiais primitivos utilizados para tubulação de nervos apresentaram algumas desvantagens, o que provocou o seu desuso na década de 60 pela maioria dos cirurgiões. Na segunda guerra mundial, o material utilizado era o Tantalum, sendo que os resultados iniciais eram satisfatórios; porém, em alguns casos ocorria fragmentação levando a fibrose local e calcificação do corpo estranho. Posteriormente, passou a ser utilizado o Miliporo. Todavia, no final dos anos 50, constatou-se que esse material, assim como o Tantalum, precisava ser removido. Depois que algumas técnicas foram tentadas e comparadas, concluiu-se que a melhor orientação axonal foi obtida com o uso de tubo de borracha siliconizada e que apresentava paredes finas e flexíveis. Além de uma boa orientação axonal, este tipo de material não permitiu acúmulo de tecido cicatricial e/ou mesenquimal, e era bem tolerado pelo corpo. O emprego desta técnica tem como objetivos: (1) imobilizar os cotos nervosos, favorecendo uma boa orientação axonal; (2) fazer com que o número de suturas seja grandemente reduzido, dessa forma

minimizando o trauma ao tecido neural e, (3) impedir a entrada de tecido conjuntivo no local da anastomose, limitando o tamanho do neuroma (SMAHEL et al., 1993).

SMAHEL et al. (1993), DUCKER & HAYES (1968), SUEMATSU (1989) e MIDGLEY & WOOLHOUSE (1968) concluíram que a colocação de tubos no local da anastomose resultava numa boa orientação das fibras nervosas em fase de regeneração, favorecendo a recuperação da função do nervo. Porém, a distância entre as extremidades proximal e distal do nervo não deve ultrapassar 1 ou 2 cm para que exista chance de reunião (WEISS & TAYLOR, 1946 citado por GARRITY, 1955). GARRITY (1955) testou esse método em nervos radiais de 3 pacientes humanos nos quais existia um intervalo de 7, 10,5 e 12 cm entre as extremidades do nervo. Mesmo não ocorrendo regeneração em nenhum dos 3 casos, permanece indicado o implante de tubos em casos onde a aproximação é impossível visto que é reduzida a formação de neuroma e, conseqüentemente, os pacientes sentem menos dor e desconforto.

Considerando que tubos inelásticos podem provocar fibrose e até necrose no local da reparação devido à compressão, MIDGLEY & WOOLHOUSE (1968) sugerem a remoção do tubo depois de algumas semanas ou a utilização de tubos feitos com material absorvível.

Segundo LEHMAN & HAYES (1967), o exame histopatológico das áreas anastomóticas de nervos que receberam tubos revelou edema reduzido e regeneração ordenada, contrastando com o observado nas neurorrafias convencionais e indicando que a restrição do edema é responsável por uma regeneração ordenada e que, quanto maior o edema, maior será a desorganização axonal. Dessa forma, um tubo colocado no local da anastomose parece assumir um papel semelhante ao desempenhado pelo perineuro em cada fascículo. Afirmam que a regeneração axonal observada após a colocação de um tubo sobre a área da anastomose pode ser devida a dois tipos de forças mecânicas sobre o local. A primeira seria tensão, que criaria o

alinhamento dos fascículos no sentido longitudinal, e a segunda seria a pressão que poderia provocar um alinhamento perpendicular.

2.7.3 Cola de fibrina

A cola de fibrina é um produto obtido a partir do sangue, conhecido por ser muito útil como hemostático local e pelas suas propriedades de adesão e selamento, que permitem a realização de anastomoses, reparos microvasculares e enxertos de nervos em procedimentos médicos e cirúrgicos (ISARANGKURA et al., 1999).

O uso da cola de fibrina como adesivo nas reparações de nervos periféricos não é recente. Foi mencionada originalmente por YOUNG & MEDAWAR (1940) e TARLOV et al. (1943). Antes desses relatos, a fibrina humana era usada devido à sua propriedade fisiológica hemostática e, quando a fibrina foi descoberta como adesivo, não era aplicada exclusivamente para unir os segmentos proximal e distal de nervos rompidos, mas passou a ser estudada também na união de enxertos, no preenchimento de defeitos osteoarticulares, no fechamento da dura-máter à prova de fluido, em anastomose arterial, etc. (EGLOFF & NARAKAS, 1983).

Diante das dificuldades encontradas na realização de sutura de nervos e da desorganização das fibras provocada pelos pontos de sutura, mesmo quando restritos ao epineuro, YOUNG & MEDAWAR (1940) criaram uma técnica capaz de manter as extremidades do nervo unidas com plasma sanguíneo concentrado coagulado e chamaram essa técnica de sutura de fibrina, a qual foi utilizada pela primeira vez no reparo de nervo ciático de coelhos, resultando em boa regeneração.

Nas décadas de 60 e 70, a Cola de Fibrina era usada por poucos cirurgiões, pois não era totalmente confiável porque às vezes ela não coagulava ou coagulava prematuramente. Por outro lado, os fios de sutura eram produzidos industrialmente e encontravam-se disponíveis quando

necessário, ao contrário do sangue, que precisava ser adquirido antecipadamente para a preparação dos componentes da cola, que posteriormente seria estocada. A microssutura ganhou ainda mais espaço entre a nova geração de cirurgiões, quando fios de sutura mais finos, com agulhas igualmente finas, tornaram-se disponíveis e quando foi introduzido o uso de microscopia cirúrgica, desta forma, a reparação fascicular foi favorecida. O uso da fibrina como um adesivo biológico na reparação de nervos foi retomado em 1972 por MATRAS et al., citado por NARAKAS (1988), com o emprego de um crioprecipitado de fibrinogênio.

A cola de fibrina Tissucol® é composta essencialmente por dois componentes:

- 1- fibrinogênio humano concentrado, ao qual são adicionados solução de aprotinina bovina, que é um agente antifibrinolítico; e cloreto de cálcio, um catalisador;
- 2- trombina bovina liofilizada responsável pela ativação do fibrinogênio.

Estes dois componentes podem ser misturados imediatamente antes do uso ou aplicados simultaneamente sobre o local usando-se uma seringa dupla chamada duploject podendo ser espalhados com um catéter ou borrifados (EGLOFF & NARAKAS, 1983).

É utilizada com o objetivo de formar um adesivo cilíndrico ao redor da anastomose dos cotos proximal e distal do nervo estabilizando e mantendo a aposição dos fascículos obtida com magnificação adequada. “Até certo ponto, a cola pode substituir pontos de sutura mas não excluí-los”, ou seja, deve-se considerar que o uso da cola de fibrina não dispensa a microneurorrafia sob alta magnificação óptica. A grande vantagem do uso da cola de fibrina sobre as microssuturas é que o alinhamento fascicular obtido pode ser mantido instantaneamente com gotas de cola, enquanto a sutura desfaz a aposição obtida deslocando os fascículos (NARAKAS, 1988).

De acordo com TARLOV et al. (1943), a neuroanastomose com coágulo de plasma não é indicada quando as extremidades do nervo não podem ser unidas sem tensão, tendo em vista o possível rompimento ou separação dos segmentos nervosos proximal e distal. Sendo assim, nos casos onde houver tensão, deverão ser empregadas suturas para aproximar as extremidades do nervo e o plasma será usado para proporcionar a adesão das superfícies das extremidades proximal e distal do nervo. EGLOFF & NARAKAS (1983) afirmam que uma neuroanastomose combinada, onde a cola é utilizada com pontos de sutura, é mais eficiente. Além disso, recomendam que seja introduzido enxerto onde há tensão sobre a área da sutura.

A cola forma um cilindro ao redor do local de reparo criando uma câmara de regeneração entre as extremidades do nervo reparado que evita a aderência do epineuro e de tecido cicatricial entre as superfícies dos fascículos que possa dificultar a aposição dos fascículos. As células de Schwann constroem uma ponte entre os cotos sobre a qual os axônios cruzam e invadem o coto distal no nervo (NARAKAS, 1988).

A penetração da cola entre as extremidades dos segmentos do nervo seccionado não representa barreira para a regeneração visto que o coágulo é em grande parte absorvido (YOUNG & MEDAWAR, 1943; NARAKAS, 1988). Para NARAKAS (1988), é preferível uma pequena distância entre os fascículos resultante da absorção da cola do que a aplicação de nós com fio de sutura.

Segundo EGLOFF & NARAKAS (1983), não existe relato de morbidade relacionada com o uso de fibrinogênio, extraído do plasma de doadores saudáveis, como hemostático em toda a literatura médica. O risco é ainda menor para a reparação de nervos periféricos se considerarmos uma quantidade muito menor do adesivo, necessária em uma neuroanastomose. Sendo assim, pode-se afirmar que é um procedimento seguro.

2.7.4 Enxertos

O enxerto normalmente é uma estrutura cilíndrica através da qual os axônios do segmento proximal do nervo regeneram e invadem o segmento distal. Muitos estudos mostram que essa estrutura cilíndrica não é necessariamente o tecido nervoso. Diversos materiais vêm sendo utilizados experimentalmente, por exemplo, fio de seda, bainha de silicone, bainha de artéria, bainha de veia, bainha formada com fibras musculares, bainha de fáscia, entre outros (SUEMATSU, 1989).

De acordo com GIBSON & DANILOFF (1989), os enxertos devem ser utilizados quando o espaço entre as duas extremidades do nervo seccionado é grande demais para permitir a sua aposição, pois, nesse caso, a área de anastomose ficaria sob grande tensão prejudicando a regeneração das fibras nervosas. Normalmente, essa situação ocorre quando há lesão com perda de tecido ou quando é necessária ressecção extensa de um neuroma.

Segundo TRUMBLE & McCALLISTER (2000), o alongamento de um nervo deve-se limitar em 8 % a 10 % do seu comprimento original para que seja evitada isquemia neural. Afirmam também que nervos reparados secundariamente são melhor vascularizados e, conseqüentemente, mais tolerantes à isquemia.

VARITIMIDIS & SOTEREANOS (2000) recomendam que o intervalo entre os segmentos proximal e distal do nervo seja inferior a 2 cm para que seja possível a aproximação e sutura desses segmentos, sem a existência de tensão excessiva sobre a área de anastomose.

Para que ocorra regeneração satisfatória através de um enxerto de nervo, esse deve conter células de Schwann viáveis. Portanto, o uso de enxertos de tecido nervoso fixados em soluções contendo álcool ou formaldeído é condenado (TARLOV et al., 1943). Além disso, GIBSON & DANILOFF (1989) recomendam a utilização de enxertos de tecido nervoso com diâmetro

pequeno, para permitir revascularização adequada e evitar necrose central. MILLESI (1979) condena o uso de enxertos muito longos, visto que o número e o tamanho dos fascículos podem alterar de acordo com a distância.

De acordo com MILLESI (1979), os enxertos de tecido nervoso podem ser: truncular, tipo cabo, setorial, fascicular ou interfascicular. O enxerto truncular corresponde a uma ponte entre as extremidades do nervo, pode sofrer isquemia e necrose central se for calibroso. O enxerto tipo cabo consiste na união de vários nervos cutâneos finos para criar um enxerto com o mesmo diâmetro do tronco nervoso a ser reparado. O enxerto setorial é assim chamado porque nervos cutâneos unem áreas correspondentes, chamadas de setores, onde predominam fibras nervosas com uma determinada função. Enxerto fascicular é usado como ponte entre fascículos individuais, enquanto enxertos interfasciculares são utilizados em nervos polifasciculares, onde o enxerto une os grupos de fascículos correspondentes.

Considerando o alto grau de especificidade dos tecidos de mamíferos, os enxertos heterólogos não fornecem bons resultados. Observações clínicas e experimentais revelam que os melhores resultados podem ser obtidos com o uso de enxertos autólogos (TARLOV et al., 1943; ATCHABAHIAN et al., 1998). Segundo GIBSON & DANILOFF (1989), os alo-enxertos incitam resposta antigênica do receptor provocada pela rejeição do epineuro ou das células de Schwann transplantadas. Para tornar mais acessível a obtenção de auto-enxertos, os nervos cutâneos podem ser coletados e implantados empregando técnica interfascicular.

Segundo MILLESI et al. (1972), MILLESI (1979), SUEMATSU (1989) e VARITIMIDIS & SOTEREANOS (2000), mesmo após a introdução das técnicas microcirúrgicas, os resultados obtidos com enxertos são inferiores àqueles observados após a união das extremidades proximal e distal por meio de sutura, ou seja, a aposição dos grupos fasciculares proximais e distais

fornece resultados superiores. Entretanto, de acordo com GIBSON & DANILOFF (1989), os resultados de estudos experimentais e clínicos indicam que enxertos interfasciculares curtos fornecem retorno funcional semelhante àquele observado após reparação mediante aposição das extremidades. Para MEDINACELI et al. (1997), a razão para os maus resultados obtidos com sutura é a tração exercida sobre os pontos, que resulta em tensão na linha da anastomose. Assim sendo, passa a ser obrigatório o uso de enxertos.

2.7.5 *Laser*

O *laser* também foi testado como técnica de reparação sem sutura. Neste caso, inicialmente as extremidades do nervo são aproximadas com um ponto de sutura no epineuro, o qual é selado em toda a circunferência do nervo com *laser* de dióxido de carbono. Os primeiros resultados revelaram uma anastomose funcional com as vantagens de reduzir o tempo de operação e facilitar a reparação em regiões de difícil acesso e exposição (GIBSON & DANILOFF, 1989).

De acordo com KORFF et al. (1992), a adesão ou selamento do epineuro dos segmentos proximal e distal de um nervo seccionado pela ação do *laser*, é uma técnica alternativa para o reparo de nervos. Nesta técnica não há introdução de material estranho na área de anastomose. O *laser* forma um selamento circunferencial pela desnaturação de proteínas e subsequente fusão do colágeno por coagulação térmica do epineuro das extremidades proximal e distal. A utilização do *laser* no reparo de nervos periféricos não foi adotada definitivamente devido à falta de informação sobre o efeito da irradiação do *laser* em nervos intactos, bem como sobre a resistência do selamento, aparentemente inferior àquela oferecida pela sutura se for considerada a alta frequência de deiscência.

Esta técnica oferece vantagens sobre as técnicas convencionais de microssutura, pois provoca menos trauma pela agulha e fio de sutura reduzindo reação por corpo estranho. Além de ser simples e rápida, a aplicação do *laser* oferece cicatrização com resultados superiores quando comparados com aqueles obtidos pela sutura, a qual provoca, inevitavelmente, fibrose tecidual ao redor do local da reparação. Em alguns casos, a reparação com *laser* é insatisfatória, recomendando-se o uso simultâneo de sutura com o objetivo de conferir maior resistência à anastomose, porém, as conseqüências negativas da sutura não são eliminadas. Além disso, a desnaturação de proteínas provocada pelo *laser* não é específica ao tecido alvo podendo atingir tecidos próximos. No caso de reparação de nervo periférico, os axônios poderão ser danificados enquanto o epineuro das extremidades dos segmentos proximal e distal é unido (LAUTO et al., 1997).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Foram utilizados 54 ratos fêmeas da raça Wistar, com peso entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Durante todo o experimento, os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*, mantidos em caixas medindo 41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de profundidade, separadas para 6 animais pertencentes a um subgrupo, e temperatura controlada com aquecedor elétrico. As caixas, forradas com maravalha, foram identificadas com o grupo e subgrupo ao qual o animal pertencia, número do animal, dias da operação e da necropsia.

3.1.2 Distribuição dos animais em grupos e subgrupos

Os ratos foram separados em 3 grupos, correspondendo ao número de técnicas empregadas no experimento. Cada grupo foi constituído por 18 animais e subdivididos em 3 subgrupos de acordo com o tempo pré-determinado para necropsia, 45, 90 e 120 dias (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos animais em Grupos e Subgrupos e data para as necropsias.

Grupos	Subgrupo Necropsia 45 dias	Subgrupo Necropsia 90 dias	Subgrupo Necropsia 120 dias
Grupo 1 Sutura	1A (n=6)	1B (n=6)	1C (n=6)
Grupo 2 Bainha de BioFill®	2A (n=6)	2B (n=6)	2C (n=6)
Grupo 3 Tissucol®	3A (n=6)	3B (n=6)	3C (n=6)

A composição da cola de fibrina e do BioFill® fornecida pelos fabricantes é encontrada nos Anexos 2 e 3 respectivamente.

3.2 Técnica operatória

3.2.1 Abordagem cirúrgica

O treinamento necessário para o adestramento e aperfeiçoamento tanto da técnica operatória - principalmente da técnica microcirúrgica - como todas as operações, foram realizados no laboratório de cirurgia experimental do Setor de Neurocirurgia do Hospital Vita.

Após anestesia intraperitoneal com cloridrato de xilazina a 2 % (20 mg/ml) e cloridrato de cetamina a 5 % (50 mg/ml). A quantidade de anestésico foi padronizada em 2 ml para cada animal, sendo 1 ml de cloridrato de xilazina e 1 ml de cloridrato de cetamina. O membro pélvico direito foi depilado e cada animal imobilizado com elástico tracionando cada membro sobre uma placa de madeira forrada com plástico. Após incisão da pele e tela subcutânea com lâmina de bisturi número 11, o músculo biceps femoral sofreu divulsão romba para permitir a visualização do nervo isquiático direito (Figura 3

Todos os atos operatórios foram realizados sob condições estéreis, diferindo apenas na etapa de microscopia cirúrgica, onde cada grupo recebeu um tratamento diferente.

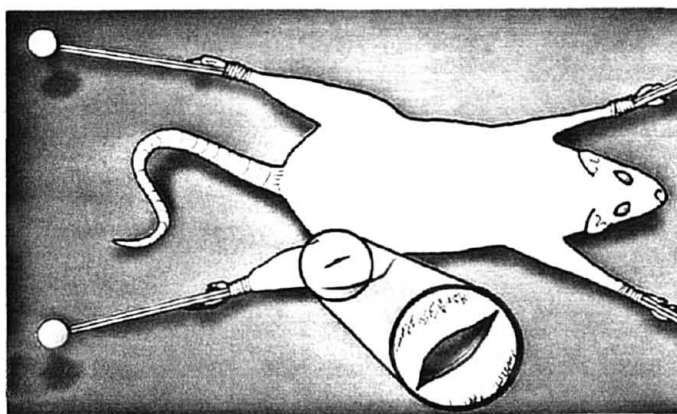


Figura 3 – Posição do animal anestesiado e imobilizado durante o procedimento operatório. No detalhe, incisão de pele e tela subcutânea.

3.2.2 Técnica microcirúrgica

Tanto o isolamento quanto a secção do nervo isquiático foram realizados da mesma forma nos 3 tipos de reconstrução do nervo. O animal foi posicionado sob o microscópio cirúrgico da marca Inami, o nervo foi focalizado e então procedeu-se à liberação dos tecidos circundantes por dissecação roma e, após o seu isolamento (Figura 4), foi seccionado com tesoura de microscopia cirúrgica da marca Codman (Figura 5). Antes da realização do ponto no epineuro para aproximar os cotos do nervo, foi feita a ressecção da substância neural que sofreu extrusão (seta), objetivando o melhor contato possível entre as superfícies das extremidades dos cotos proximal e distal do nervo. A aproximação dos cotos proximal e distal dos nervos de todos os animais foi feita com fio mononylon 10-0 mediante o emprego de 1 ponto isolado simples no epineuro (Figura 6A e 6B).

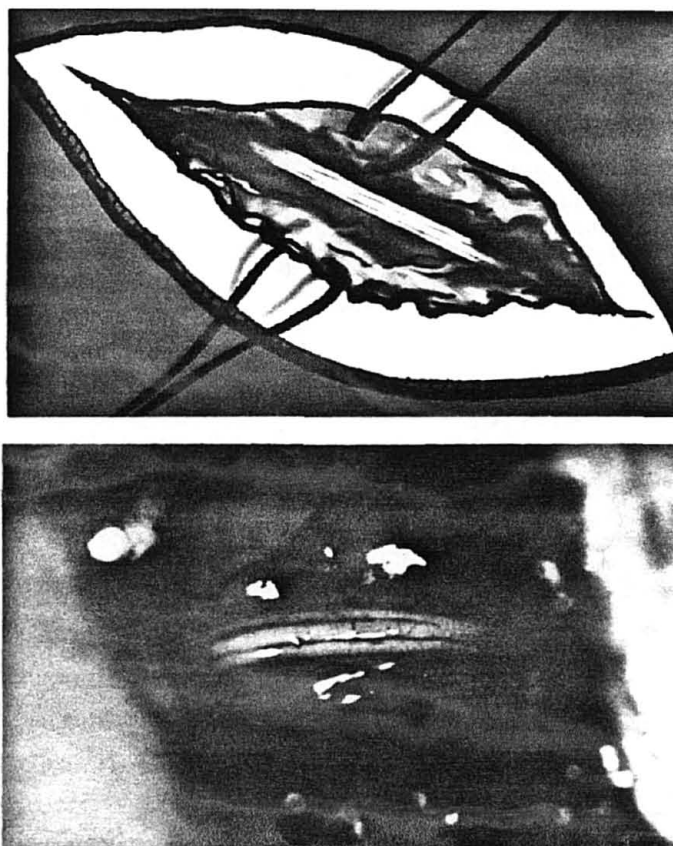


Figura 4 – Visualização do nervo isquiático íntegro sob microscópio óptico. 6x.

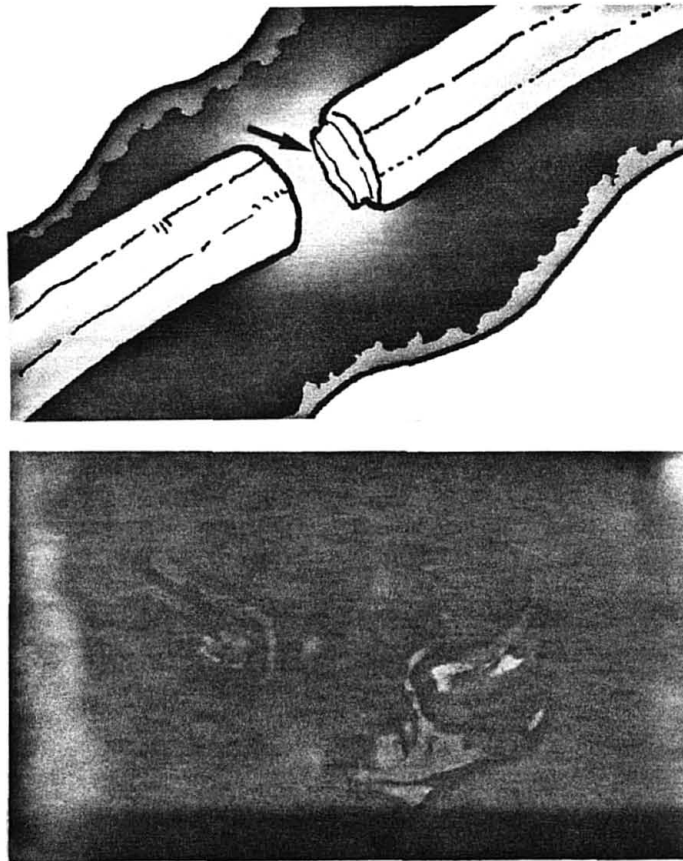


Figura 5 – Nervo isquiático visto após secção. 10x.

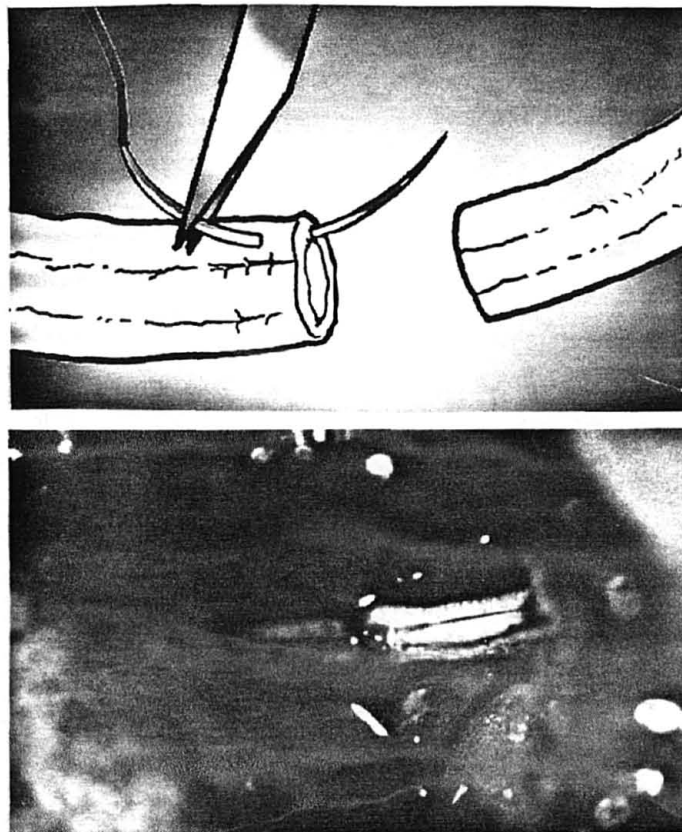


Figura 6 – A) Realização do ponto no epineuro para aproximação dos cotos proximal e distal do nervo. B) Cotos proximal e distal aproximados por meio de um ponto isolado simples no epineuro. 10x.

As técnicas microcirúrgicas serão descritas individualmente, visto que a reparação do nervo isquiático diferiu em cada um dos grupos: Sutura, Cola de Fibrina e bainha de Biofill®.

3.2.2.1 Grupo 1: Sutura

Este grupo foi submetido a reconstituição do nervo seccionado através do método convencional de neurorrafia consistindo de 2 pontos isolados simples no epineuro, além do ponto inicial para aproximação dos segmentos nervosos (Figuras 7 e 8), com o auxílio de um microscópio cirúrgico e com a utilização de fio de sutura mononylon 10-0.

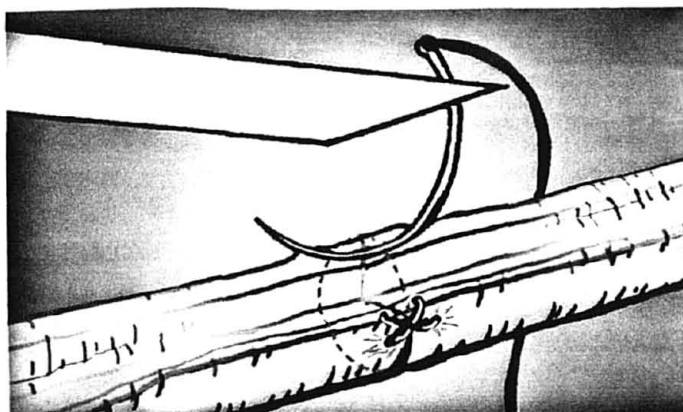


Figura 7 – Grupo 1. Realização do segundo ponto no epineuro. 10x

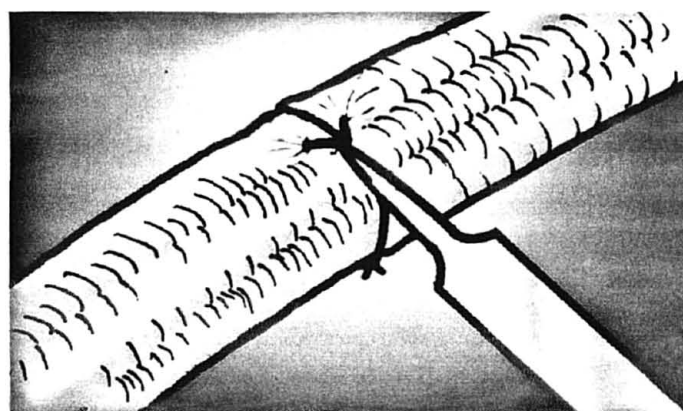


Figura 8 – Grupo 1. Rotação do nervo com pinça tracionando um dos pontos para a aplicação do terceiro. 10x.

3.2.2.2 Grupo 2: Bainha de Biofill®

Os animais desse grupo tiveram as extremidades proximal e distal aproximadas pelo ponto isolado simples inicial e envolvidos por uma lâmina de Biofill® medindo aproximadamente 8 milímetros de comprimento e 6 milímetros de largura (Figura 9). As duas bordas dessa lâmina foram unidas com colódio elástico para formar uma bainha cujo centro correspondeu à área da anastomose (Figura 10). O colódio elástico consiste em uma solução viscosa de celulose nitrada dissolvida em acetona, também conhecida como nitrocelulose.

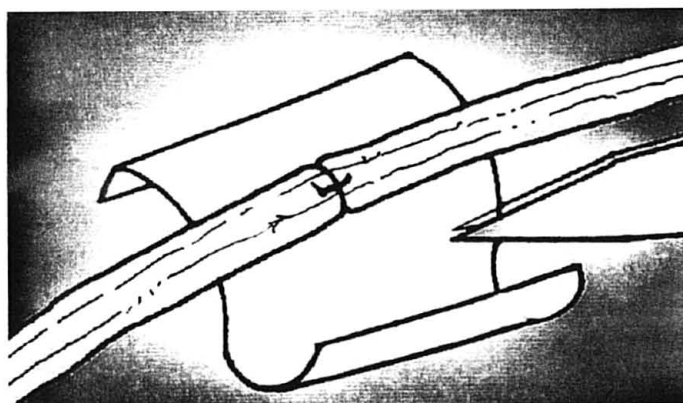


Figura 9 – Grupo 2. Posicionamento da lâmina de Biofill® sobre o local da anastomose. 6x.

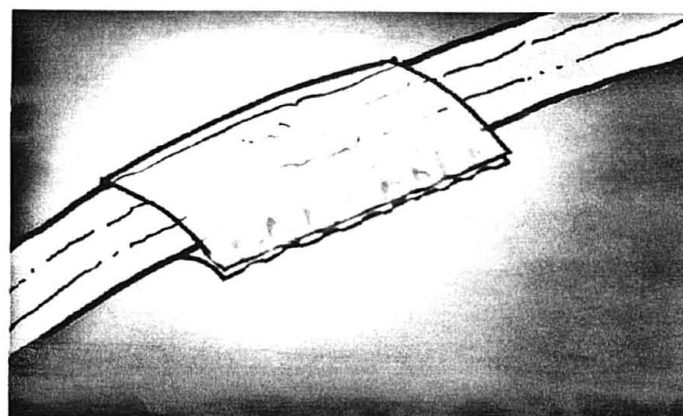


Figura 10– Grupo 2. União das bordas do BioFill® com o auxílio de pinça formando uma bainha ao redor do nervo. 6x.

3.2.2.3 Grupo 3: Cola de fibrina (Tissucol®)

Nesse grupo os cotos do nervo foram coaptados por meio de 1 ponto isolado simples no epineuro, com fio mononylon 10-0, objetivando aproximar os segmentos proximal e distal, sendo adicionada 1 gota da cola Tissucol® sobre o local da anastomose (Figura 11).

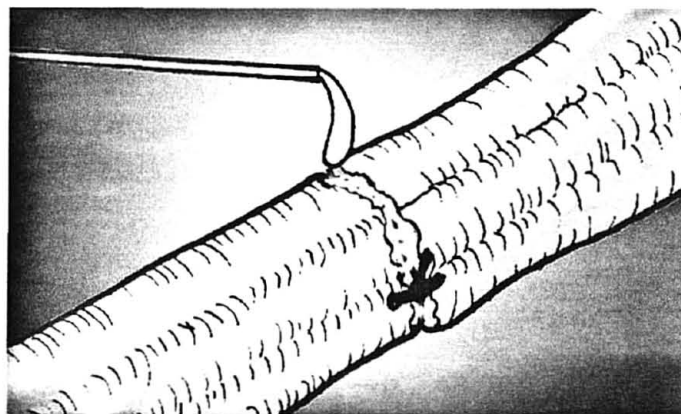


Figura 11 – Grupo 3. Aplicação da cola sobre a área da anastomose . 10x.

3.2.2.3.1 Método de Aplicação da Cola

Tissucol® é composto pelo fibrinogênio humano preparado a partir de plasmas humanos, aprotinina bovina e trombina humana (Anexo 2). A apresentação utilizada no experimento foi o kit Tissucol® 0,5 ml com duploject e agulha para aplicação simultânea. O sistema duploject estéril consiste em um aparelho capaz de receber 2 seringas descartáveis iguais, e um único êmbolo aciona as seringas simultaneamente, assegurando volumes iguais dos dois componentes, que são rápida e corretamente misturados, essencial para que o adesivo fibrínico selador ganhe resistência (Anexo 1). A cola foi utilizada dentro do período de 4 horas, conforme recomendação do laboratório fabricante.

3.2.3 Síntese

A síntese dos planos anatômicos muscular e tegumentar foi realizada igualmente para os três grupos, pela realização de pontos isolados simples com fio mononylon 2-0 e mononylon 4-0, respectivamente (Figuras 12 e 13).

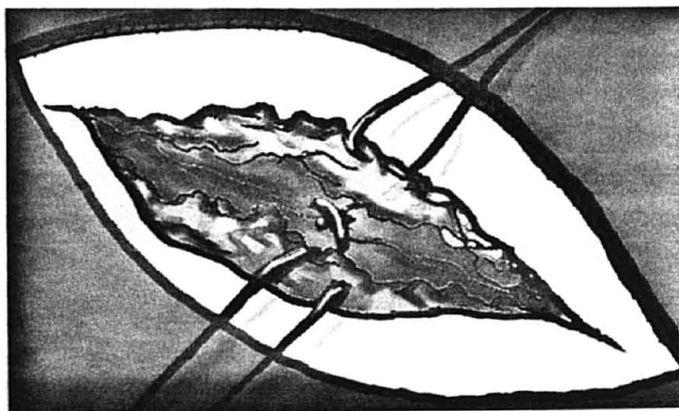


Figura 12 – Síntese do plano anatômico muscular.

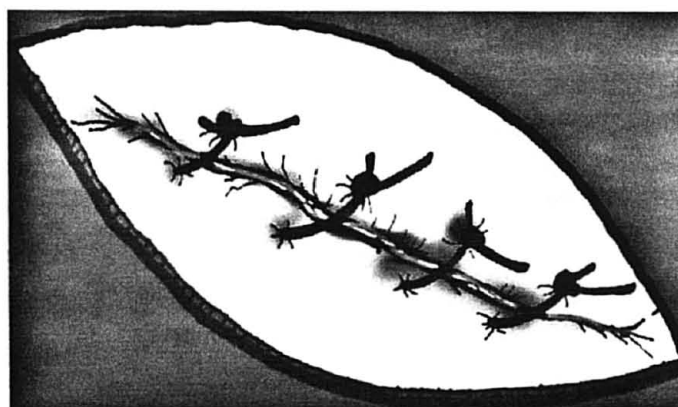


Figura 13 – Síntese do plano anatômico tegumentar.

3.3 Pós-operatório

Durante o período pós-operatório imediato, os animais foram colocados sobre bolsa de água quente para evitar hipotermia. Nas horas subsequentes, permaneceram em sala climatizada para observação até total recuperação da anestesia e, posteriormente, foram mantidos no Biotério da UFPR por 45, 90 e 120 dias, datas previamente determinadas para necropsia.

3.4 Necropsia

As necropsias foram realizadas no Laboratório do Departamento de Anatomia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram sacrificados pela colocação em um recipiente hermeticamente fechado, com chumaços de algodão embebidos em éter etílico, até indução de parada respiratória e cardíaca. O número de animais necropsiados respeitou um cronograma baseado no dia da operação a partir do qual foram contados 45, 90 e 120 dias (Tabela 2).

3.4.1 Procedimento para coleta da amostra do nervo isquiático

O material utilizado para a coleta das amostras está listado no Anexo 4.

Este procedimento foi realizado seguindo os mesmos passos para todos os grupos necropsiados, exceto os animais do grupo Biofill®, nos quais, após a retirada do segmento do nervo com a área de anastomose centralizada, a bainha foi separada do nervo com o auxílio de lâmina de bisturi sobre uma placa de cera de uso odontológico.

O membro operado foi depilado, incisado sobre a cicatriz e novamente o músculo bíceps femoral foi divulsionado, permitindo o acesso ao nervo, o qual foi cuidadosamente isolado dos tecidos circundantes. A amostra era retirada por meio de secção do nervo com

lâmina de bisturi nº 11, procurando-se centralizar a área da anastomose. Após a coleta, o segmento apresentando aproximadamente 1,5 cm de comprimento com a área de anastomose centralizada, era embebido na solução fixadora apropriada para o tipo de análise microscópica.

Tabela 2 – Cronograma das necropsias.

Dia da cirurgia	Dia da necropsia	Nº de ratos operados	Grupo	Dias
30/06/1999	30/10/1999	06	Sutura	120
03/07/1999	03/11/1999	06	Biofill	120
07/07/1999	07/10/1999	06	sutura	90
14/07/1999	14/10/1999	02*	sutura	90
27/07/1999	27/11/1999	07**	cola	120
27/07/1999	27/10/1999	06	cola	90
27/07/1999	11/09/1999	06	cola	45
14/08/1999	14/11/1999	06	biofill	90
31/08/1999	14/10/1999	06	biofill	45
30/11/1999	15/12/1999	06	sutura	45

* Ratos operados para substituir 2 animais mortos no pós-operatório.

** Rato operado como reserva (não foi incluído nos resultados finais).

3.4.1.1 Tratamento das amostras para inclusão em parafina

De cada subgrupo contendo 6 animais, 4 deles, escolhidos aleatoriamente, tinham os seus nervos processados para inclusão em parafina, com eutanásia aos 45, 90 e 120 dias.

Após a retirada do segmento do nervo que apresentava entre 1 e 1,5 cm, com o local da anastomose em posição aproximadamente central, era feita uma marcação da extremidade proximal do nervo com caneta preta. Este segmento era colocado sobre uma tira retangular de papelão deixando-se secar no ambiente por 4 a 5 minutos e, posteriormente, imerso em solução fixadora contendo paraformaldeído a 2 % e glutaraldeído a 0,5 %, diluídos em tampão cacodilato a 0,1 M (pH 7,4).

Cada amostra incluída em parafina sofreu cortes longitudinais, os quais foram colhidos em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para posterior análise em microscópio óptico (Figura 14). Dos cortes selecionados, foram feitas fotografias no fotomicroscópio da marca Meiji Techno ML 2300 do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com filme Kodak Gold 100 ASA.



Figura 14 – Secção longitudinal do segmento de nervo isquiático reparado com 1 ponto no epineuro e cola de fibrina. A) porção proximal, fascículo desbravando o tecido nervoso (seta); B) área de anastomose incluindo reação cicatricial; C) Porção distal à anastomose. Coloração com H&E. Objetiva 4.

3.4.1.2 Tratamento das amostras para inclusão em resina (fibras desfiadas e microscopia eletrônica-M.E.)

Foram utilizados 2 animais de cada sub-grupo para este tipo de avaliação, as amostras do nervo foram avaliadas através de fibras desfiadas e M.E.

Essas amostras foram retiradas e imediatamente colocadas sobre uma placa de cera, embebidas em duas ou três gotas da solução fixadora preparada pela mistura de 2 ml de glutaraldeído a 3 % e 2 ml de tampão cacodilato 0,2 M no momento da utilização, e mantida em recipiente com gelo. Com o auxílio de lupa da marca Bausch & Lomb e lâmina de bisturi nº 11, essas amostras foram divididas no sentido longitudinal (Anexo 5).

O tamanho de uma das metades era reduzido até que apenas a área da anastomose permanecesse, facilitando assim, a realização dos cortes semi-finos e ultra-finos. Este pequeno fragmento do nervo era embebido na solução fixadora, em um frasco identificado e encaminhado ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR onde a amostra sofreu pós-fixação em tetróxido de ósmio diluído em tampão cacodilato 0,2 M, desidratação e inclusão em resina Spurr para realização dos cortes em ultra-micrótomo da marca Sorval MT2-B e posterior introdução dos cortes ultra-finos em grades de cobre com 200 mesh para análise em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1200 EX II.

A outra metade do segmento retirado do nervo era desfiada submersa em 1 gota de fixador e com 2 agulhas de insulina sobre a placa de cêra. Esta parte do nervo foi desfiada dando origem a fibras que foram introduzidas em frasco contendo o fixador com o auxílio de um pincel. Os frascos contendo as fibras desfiadas também eram encaminhados para o CME para processamento, até serem coradas com tetróxido de ósmio e incluídas em resina sem acelerador, pois neste momento as fibras eram novamente desfiadas com o auxílio de lupa e, em seguida, distribuídas em lâminas histológicas sobre as quais eram colocadas algumas

gotas de Entelan e laminula para observação em Fotomicroscópio da marca Axiophot Zeiss do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Portanto, as fases do tratamento eram as mesmas tanto para as fibras desfiadas quanto para os fragmentos que foram analisados em microscopia eletrônica, diferenciando-os apenas a ausência ou presença de acelerador na resina na qual as amostras eram incluídas respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica

No pós-operatório imediato todos os animais apresentaram deficiência proprioceptiva e monoparesia (Figura 15) que deixaram de ser evidentes entre 4 e 7 dias, observando-se locomoção próxima da normalidade a partir da primeira semana em todos os animais, não havendo atraso significativo para o desaparecimento desses sinais em nenhum animal. Não foi constatada diferença na locomoção entre os grupos.

Durante o acompanhamento pós-operatório até a data em que foi realizada a eutanásia, foi observada mutilação do pé direito de alguns animais (Figura 16), porém, mesmo estes animais com lesão nos dedos se locomoviam de forma praticamente normal. Na ocasião da necropsia, tomou-se nota sobre o grupo do qual o animal mutilado fazia parte e esse foi posteriormente agrupado (Tabela 3).

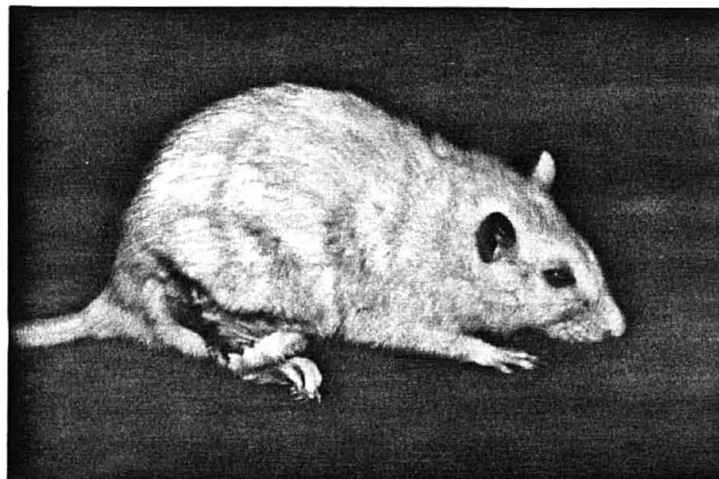


Figura 15 – Rato apresentando deficiência proprioceptiva no pós-operatório imediato.

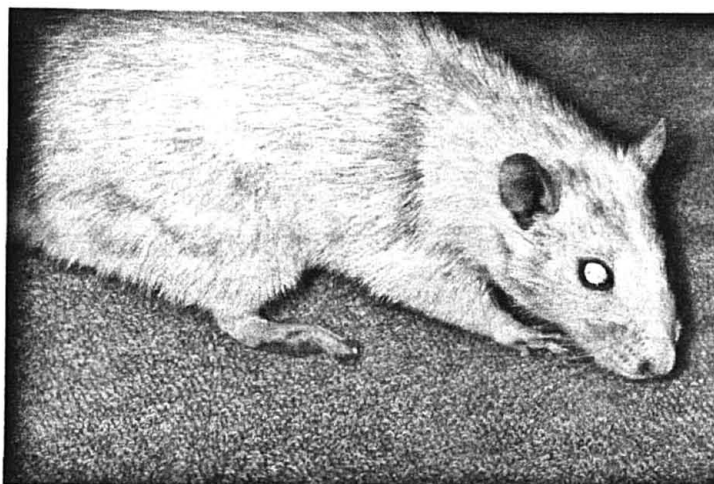


Figura 16 – Rato com pé direito mutilado durante o período pós-operatório.

Tabela 3: Número de animais que apresentaram auto-mutilação do pé direito.

Grupo	Subgrupo	Número de animais que apresentaram mutilação
Sutura	45 dias	0
	90 dias	2
	120 dias	3
BioFill	45 dias	0
	90 dias	1
	120 dias	2
Cola	45 dias	0
	90 dias	1
	120 dias	1

Assim sendo, a informação sobre o número de animais dos grupos Sutura, BioFill® e Cola que apresentaram mutilação do pé direito também pode ser representada por uma relação de 5:3:2 animais por grupo, respectivamente.

4.2 Avaliação histológica das biópsias

4.2.1 Cortes em parafina

4.2.1.1 Grupo Sutura 45 dias

Observam-se na extremidade proximal, axônios orientados no eixo longitudinal do fascículo, pouca densidade celular e raras câmaras de digestão localizadas preferencialmente na periferia do fascículo (Figura 17A). No centro do corte vemos muita densidade celular, sendo difícil distinguir os axônios individualmente (Figura 17B). Na extremidade distal há alta densidade celular e muitas câmaras de digestão (Figura 17C). Nos locais onde é encontrado o fio de sutura é observada reação piogranulomatosa (macrófagos com células gigantes e polimorfonucleares associados) envolvendo-a (Figuras 18A e 18B).

4.2.1.2 Grupo BioFill 45 dias

Na porção proximal, são observadas as fibras na sua maior parte orientadas longitudinalmente, enquanto aquelas que passam próximo ao fio estão direcionadas oblíqua ou transversalmente (Figuras 19A e 19B). Onde os axônios crescem desordenadamente, encontramos células de Schwann proliferadas formando bulbos de cebola ao redor dos axônios. Na porção distal ainda estão presentes muitas câmaras de digestão (Figura 19C). Nos cortes de tecido onde é possível observar vários fascículos, o colágeno do perineuro está aumentado.

4.2.1.3 Grupo Cola 45 dias

Na porção proximal são observadas raras câmaras de digestão e fibras orientadas longitudinalmente (Figura 20A). Ao se aproximar da área da anastomose, aumenta a densidade celular entre as fibras que continua na área da anastomose (Figura 20B) e diminui nos fascículos distais onde são observadas numerosas câmaras de digestão (Figura 20C).

4.2.1.4 Grupo Sutura 90 dias

Observam-se fibras bem alinhadas longitudinalmente com pouca densidade celular nos cotos proximal e distal, com quantidade variável de câmaras de digestão no segmento distal (Figuras 21A e 21C). Chegando na área da anastomose, há desvio das fibras na reação ao fio de sutura, os fascículos mais periféricos apresentam crescimento transversal ou oblíquo das fibras em relação ao eixo do nervo, além de proliferação das células de Schwann ao redor dessas fibras sob a forma de bulbos de cebola. (Figura 21B).

4.2.1.5 Grupo BioFill 90 dias

Observamos o crescimento das fibras no sentido longitudinal do fascículo, ocorrendo um desvio dessa orientação nas proximidades da reação ao fio de sutura. Poucas câmaras de digestão remanescentes, tanto no segmento proximal quanto no distal (Figuras 22A e 22C). A reação ao fio de sutura é exclusivamente granulomatosa. Também observamos a formação periférica de bulbos de cebola. (Figura 22B).

4.2.1.6 Grupo Cola 90 dias

O aspecto histológico depende do tamanho do fascículo: nos fascículos menores, as fibras orientam-se longitudinalmente (Figura 23A), com raras câmaras de digestão, ocorrendo somente algum tipo de desvio no redirecionamento das fibras no encontro com a reação ao fio de sutura; nos fascículos maiores o desvio das fibras é muito mais acentuado, podendo ocorrer orientação oblíqua e até transversal, com proliferação das células de Schwann associadas sob a forma de bulbos de cebola (Figura 23B). Nos fascículos distais, são evidenciadas raras câmaras de digestão (Figura 23C).

4.2.1.7 Grupo Sutura 120 dias

Observamos os fascículos proximais com as fibras orientadas longitudinalmente, com presença de algumas câmaras de digestão relacionadas à reação ao fio de sutura. Alternativamente, viam-se algumas fibras crescendo na direção transversal. A reação ao fio de sutura é proeminente e granulomatosa. Há reinervação parcial do segmento distal (Figuras 24A, 24B e 24C).

4.2.1.8 Grupo BioFill 120 dias

Nos fascículos, a maioria das fibras estão alinhadas longitudinalmente, com poucas câmaras de digestão (Figura 25A). No segmento proximal, quando essas câmaras de digestão são encontradas, o fato está associado à colisão com colágeno ou reação ao fio de sutura (Figura 25B). A presença de degeneração Walleriana no segmento distal é variável. Porém, muitas fibras apresentam aspecto normal (reinervação) (Figura 25C).

4.2.1.9 Grupo Cola 120 dias

Observam-se fascículos de orientação longitudinal com as fibras atravessando a área da anastomose sempre que não há impedimento pela deposição de colágeno, vasos sanguíneos orientados transversalmente ao fascículo ou presença de tecido fibroso com tecido adiposo (Figura 26A). Nos casos em que as fibras encontram esse impedimento, a progressão, quando possível, sofre desvio lateral (Figura 26B). Alternativamente, há degeneração Walleriana de algumas fibras de orientação transversal. O segmento distal mostra-se reinervado e há formação periférica de bulbos de cebola (Figura 26C).

4.2.2 Fibras desfiadas

Foram desfiadas 50 a 100 fibras de cada um dos 2 animais de cada grupo. Foram identificadas fibras nervosas regeneradas e fibras em processo de degeneração Walleriana (Figura 27A e 27B).

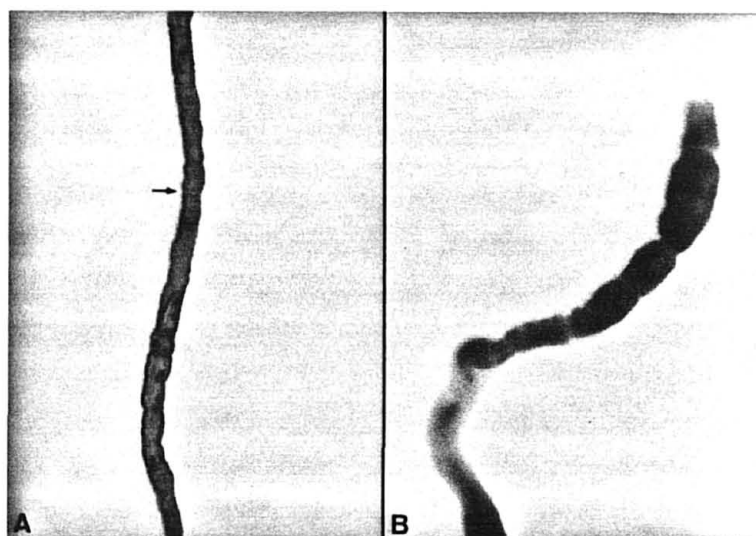


Figura 27 – A) fibra normal com nódulo de Ranvier (seta); B) fibra em degeneração Walleriana. Objetiva 40. Coloração com tetróxido de ósmio.

4.2.3 Cortes semifinos e ultrafinos

Nos cortes semi-finos é possível observar as fibras regeneradas em orientação longitudinal, transversal e oblíqua. Elas apresentam bainha de mielina fina, observa-se aumento da matriz do endoneuro e do colágeno do perineuro. Em todos os cortes detecta-se a presença de mastócitos ortocromáticos (Figuras 28 a 32).

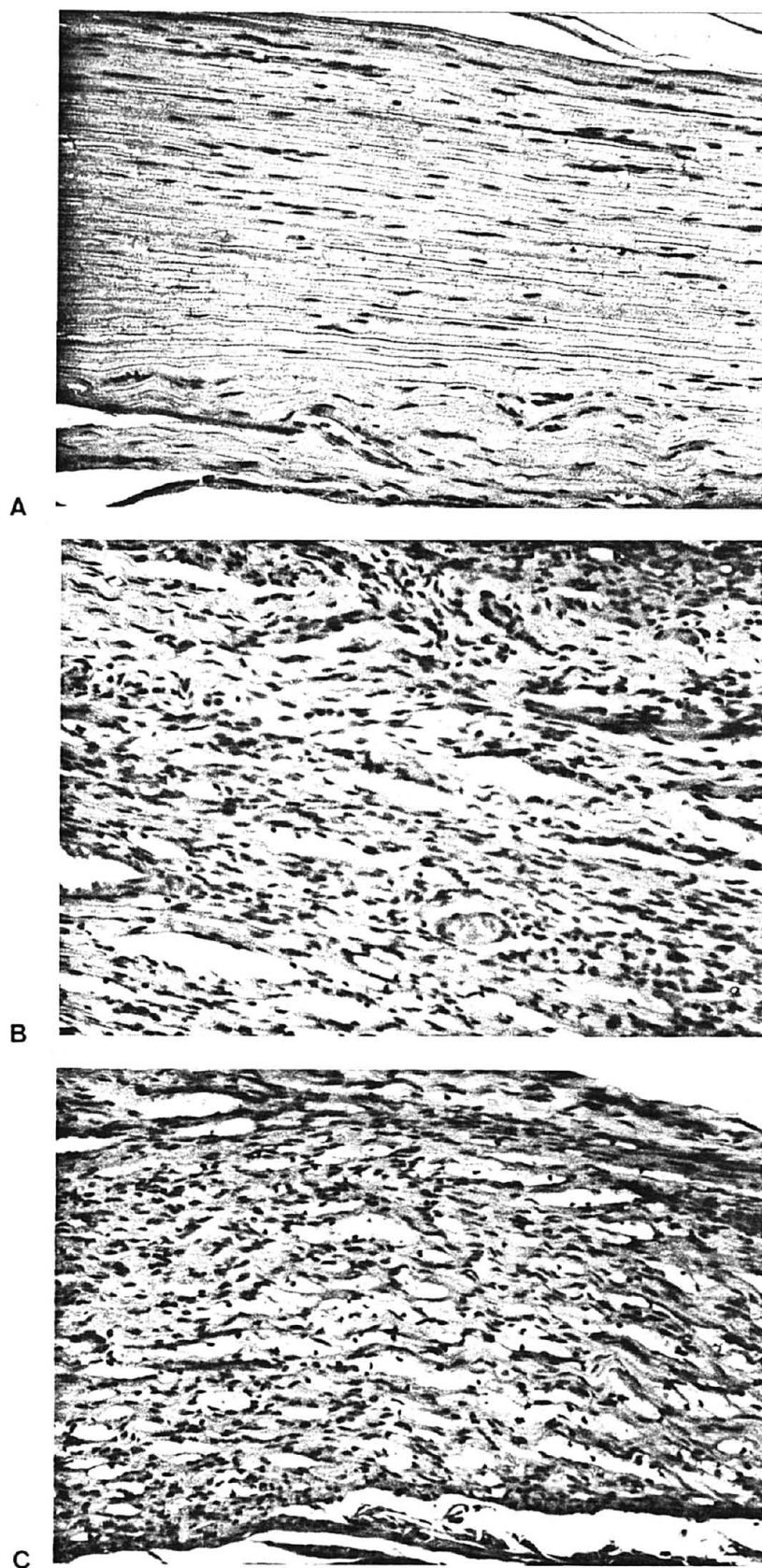


Figura 17 - A) Segmento proximal com axônios regenerados paralelos ao eixo longitudinal do fascículo; B) Aumento da densidade celular na área da anastomose; C) Fascículo distal com inúmeras câmaras de digestão. Grupo Sutura 45 dias. Rato 4. Objetiva 10. Coloração com H & E.

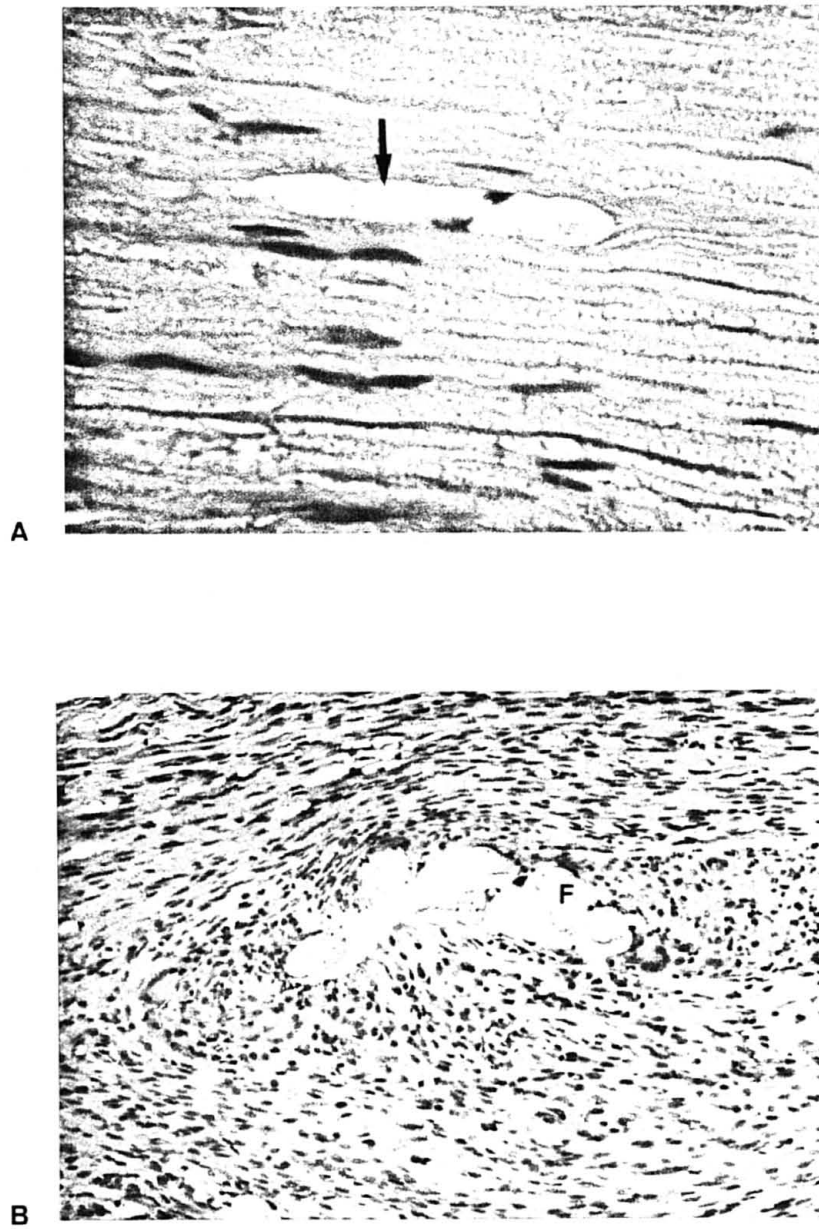


Figura 18 - A) Câmara de digestão (seta); B) Reação pio-granulomatosa ao fio de sutura (F). Grupo Sutura 45 dias. Rata 4. Objetiva 10. Coloração com H & E.

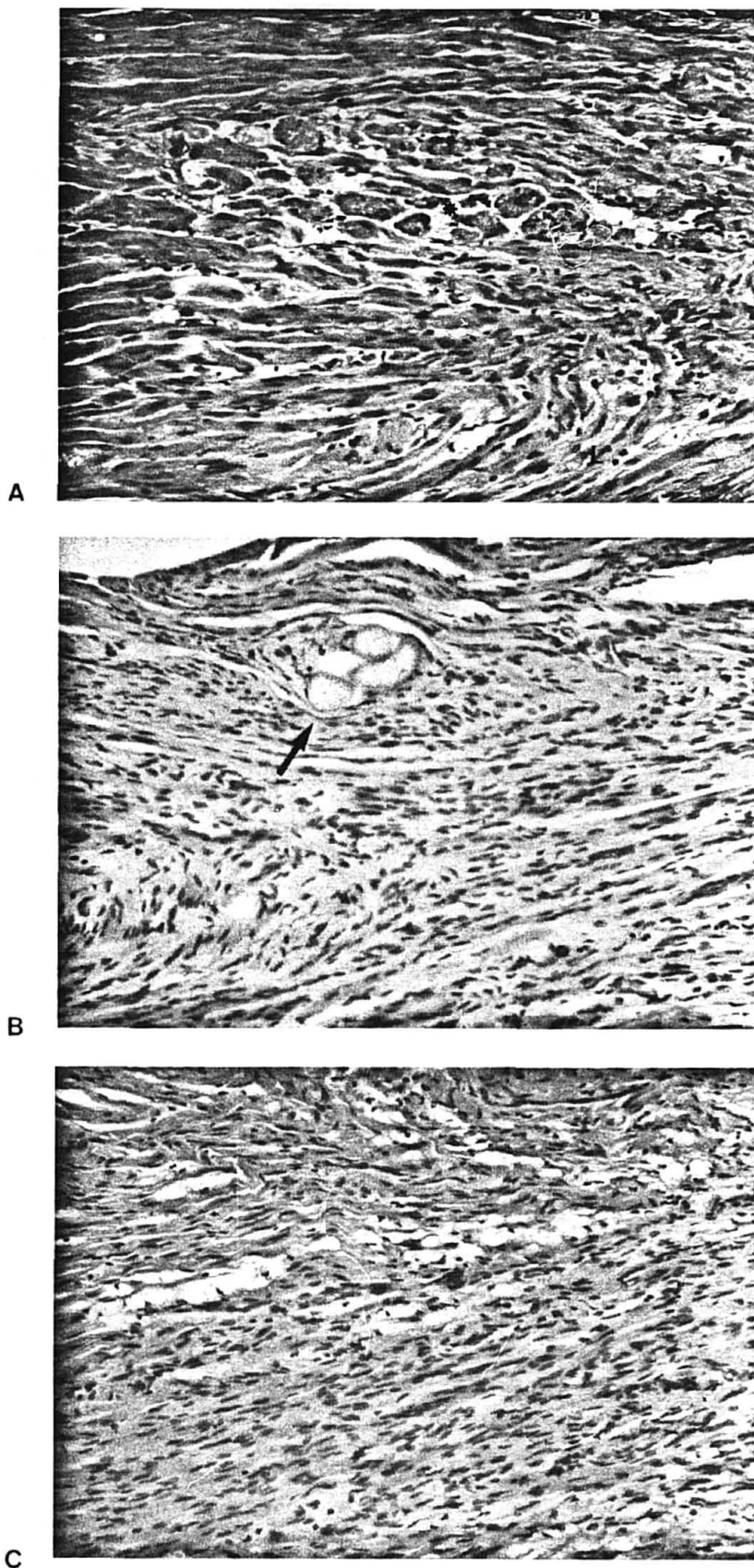


Figura 19 - A) Segmento proximal com orientação longitudinal (L) e transversal (*) dos axônios regenerados. As células de Schwann formam bulbos de cebola ao redor dos axônios transversais. Rato 5; B) Área de anastomose. Reação ao fio de sutura. Rato 3; C) Segmento distal apresenta numerosas câmaras de digestão. Rato 3. Grupo BioFill 45 dias Objetiva 10. Coloração com H & E.

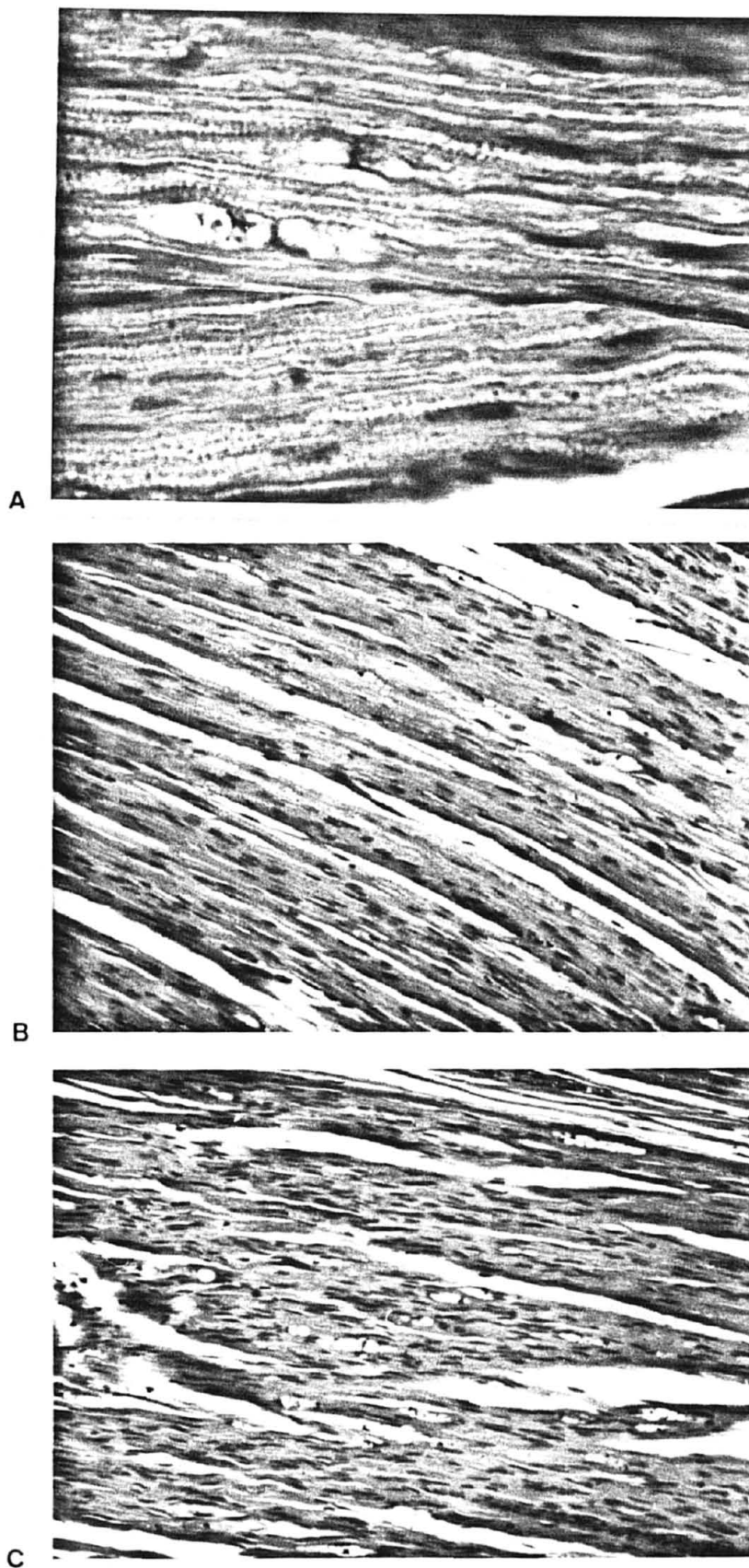


Figura 20 - A) No segmento proximal observam-se raras câmaras de digestão. Objetiva 40; B) Observa-se densidade celular aumentada na área de anastomose. Objetiva 10; C) Segmento distal com presença de numerosas câmaras de digestão. Objetiva 10. Grupo Cola 45 dias. Rato 6. Coloração com H & E.

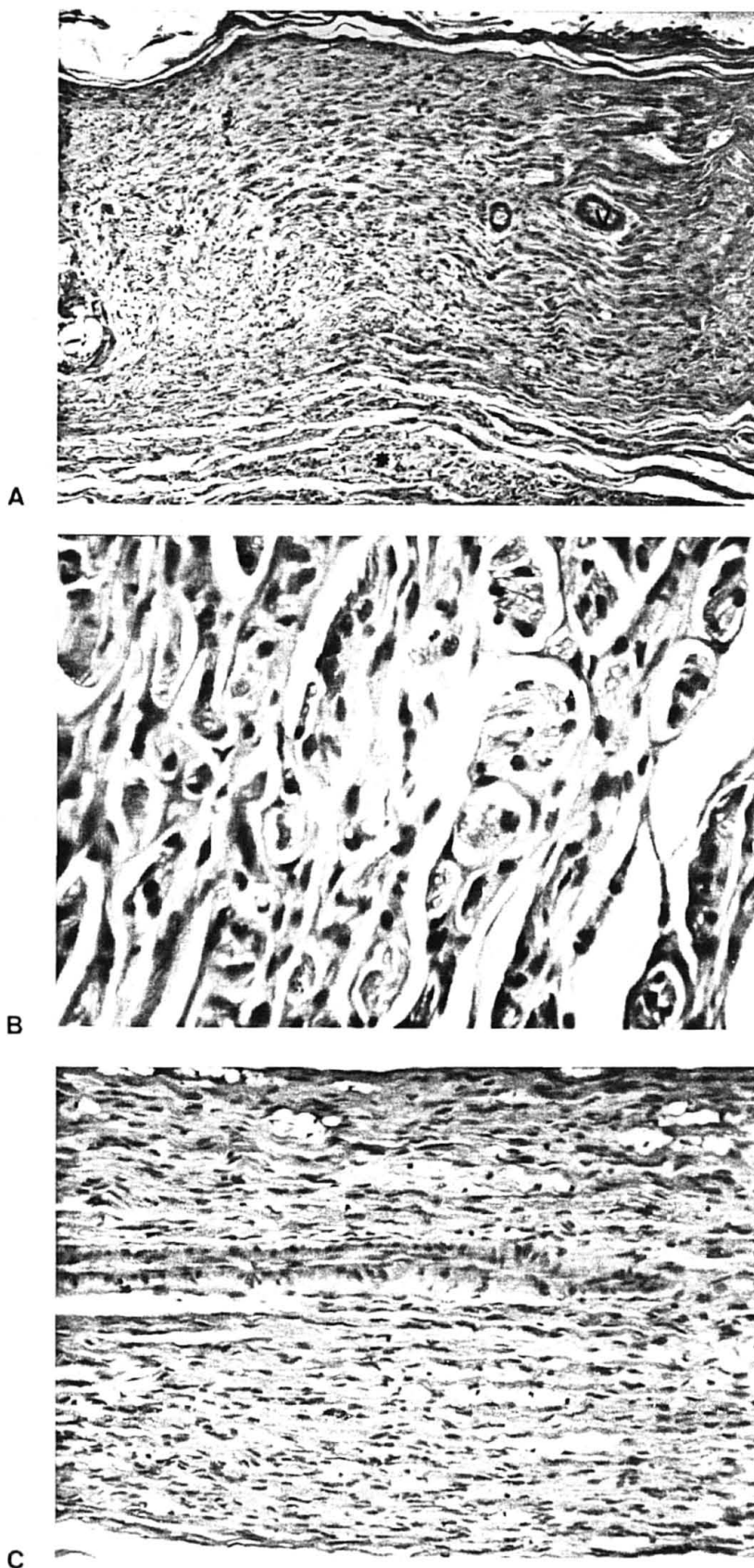


Figura 21 - A) Anastomose com vasos sangüíneos proeminentes (V), reação ao fio de sutura (F) e proliferação de células de Schwann formando bulbos de cebola (*). Objetiva 4; B) Aspecto de crescimento transversal das fibras com as células de Schwann proliferantes formando bulbos de cebola. Objetiva 40; C) Segmento distal mostrando muitas câmaras de digestão. Objetiva 10. Grupo Sutura 90 dias. Rato 5. Coloração H&E.

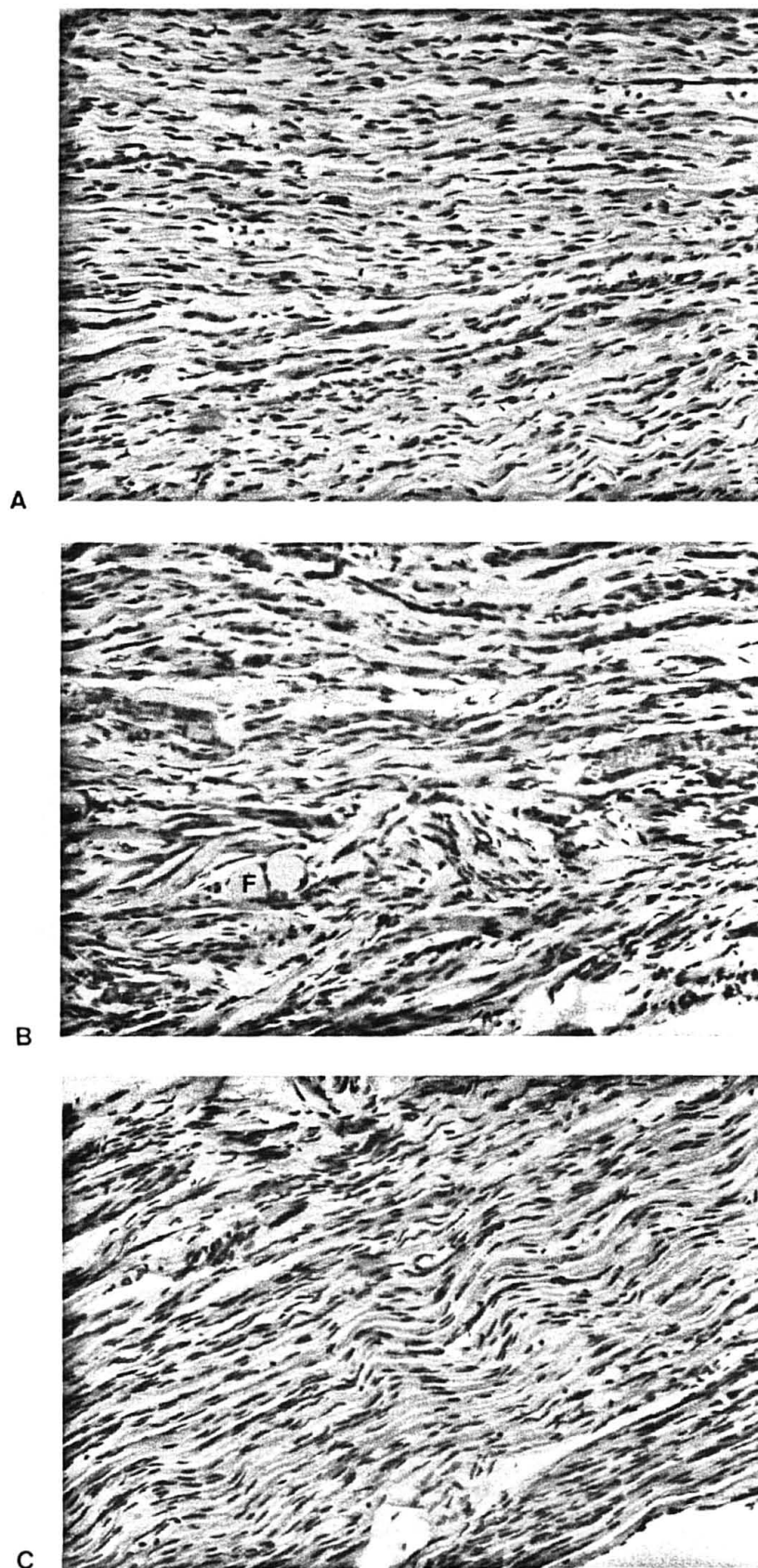


Figura 22 - A) Segmento proximal com axônios regenerados paralelos ao eixo longitudinal. São observadas raras câmaras de digestão; B) Área de anastomose mostrando desalinhamento das fibras pela presença do fio de sutura (F); C) Segmento distal com algumas câmaras de digestão remanescentes. Grupo BioFill 90 dias. Rato 12. Objetiva 10. Coloração com H & E.

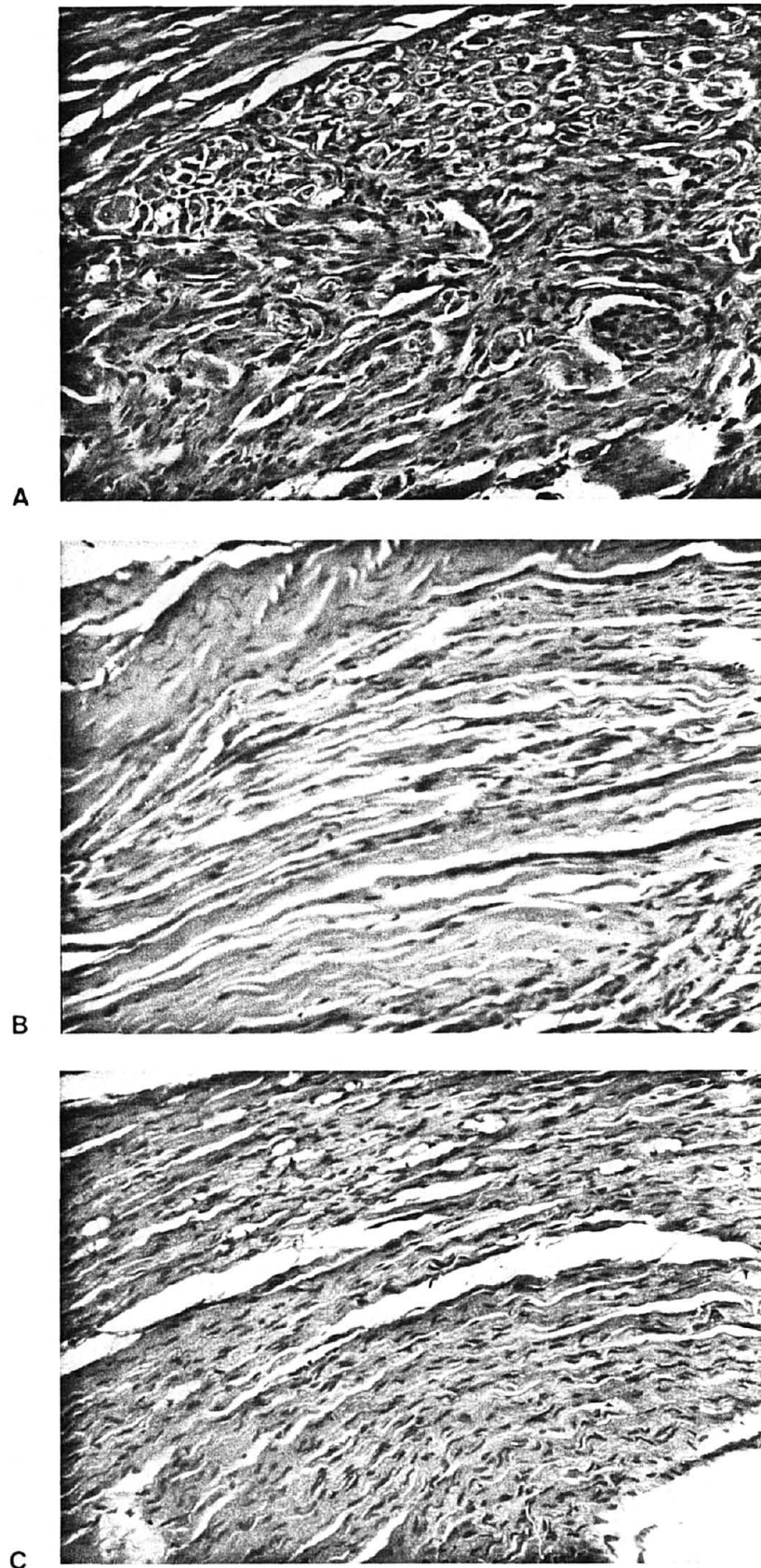


Figura 23 – A) Fascículo estreito com todas as fibras orientadas; B) Segmento proximal. Fascículo com muitas fibras mostrando formação de neuroma; C) Fascículo distal com algumas câmaras de digestão. Grupo Cola 90 dias. Rato 9. Objetiva 10. Coloração H & E.

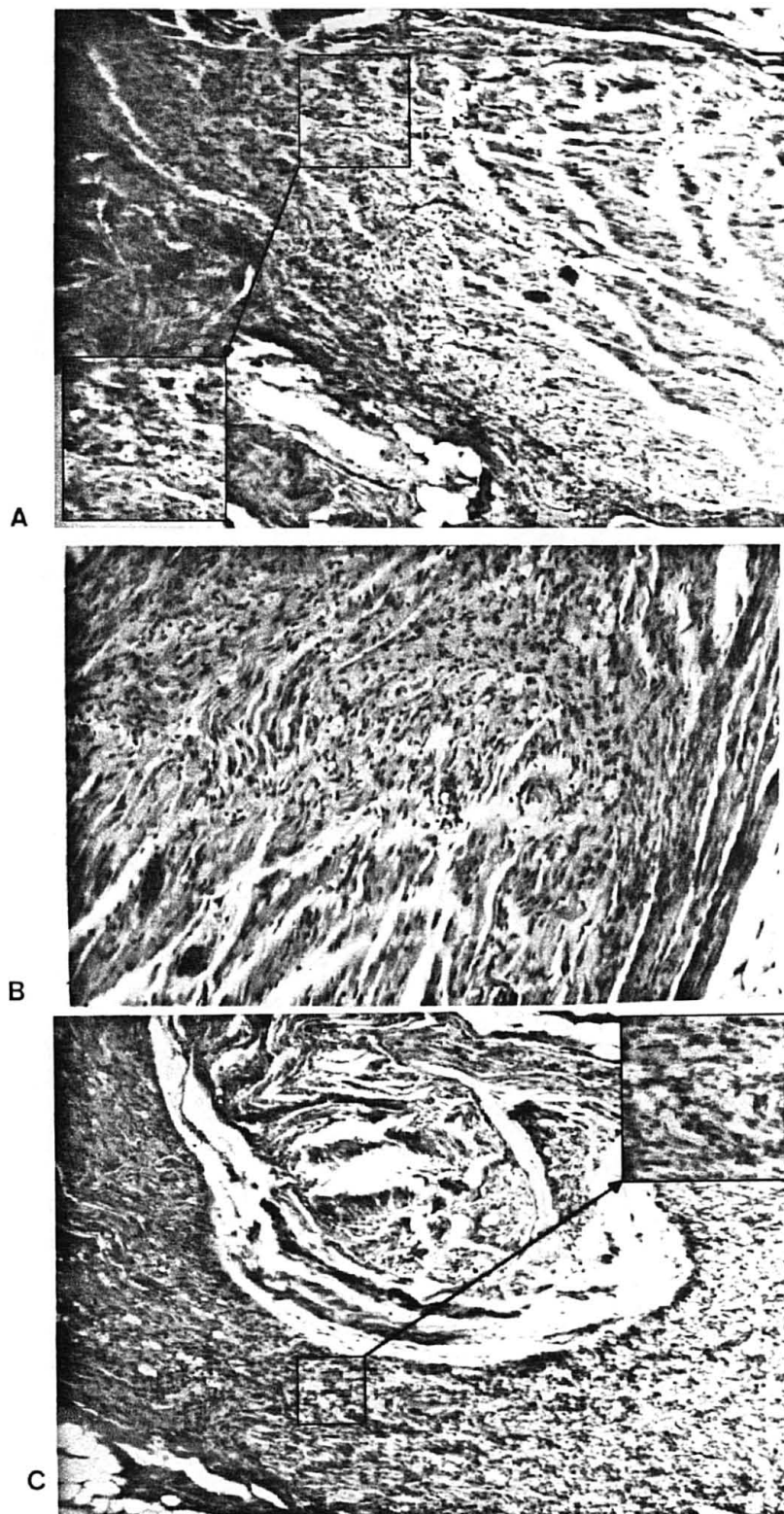


Figura 24 - A) Segmento proximal mostrando 3 fascículos regenerados. Observa-se aumento de colágeno no perineuro (Objetiva 4). No detalhe, são observadas câmaras de digestão na colisão das fibras nervosas com o tecido conjuntivo do perineuro (Objetiva 10); B) Área de anastomose com alta densidade celular e muitos vasos sangüíneos; C) Segmento distal parcialmente reinervado onde são observadas raras câmaras de digestão e formação de bulbos de cebola pelas células de Schwann (Objetiva 10). No detalhe, é observada a formação de bulbos de cebola (Objetiva 4). Grupo Sutura 120 dias. Rato 13. Coloração com H & E.

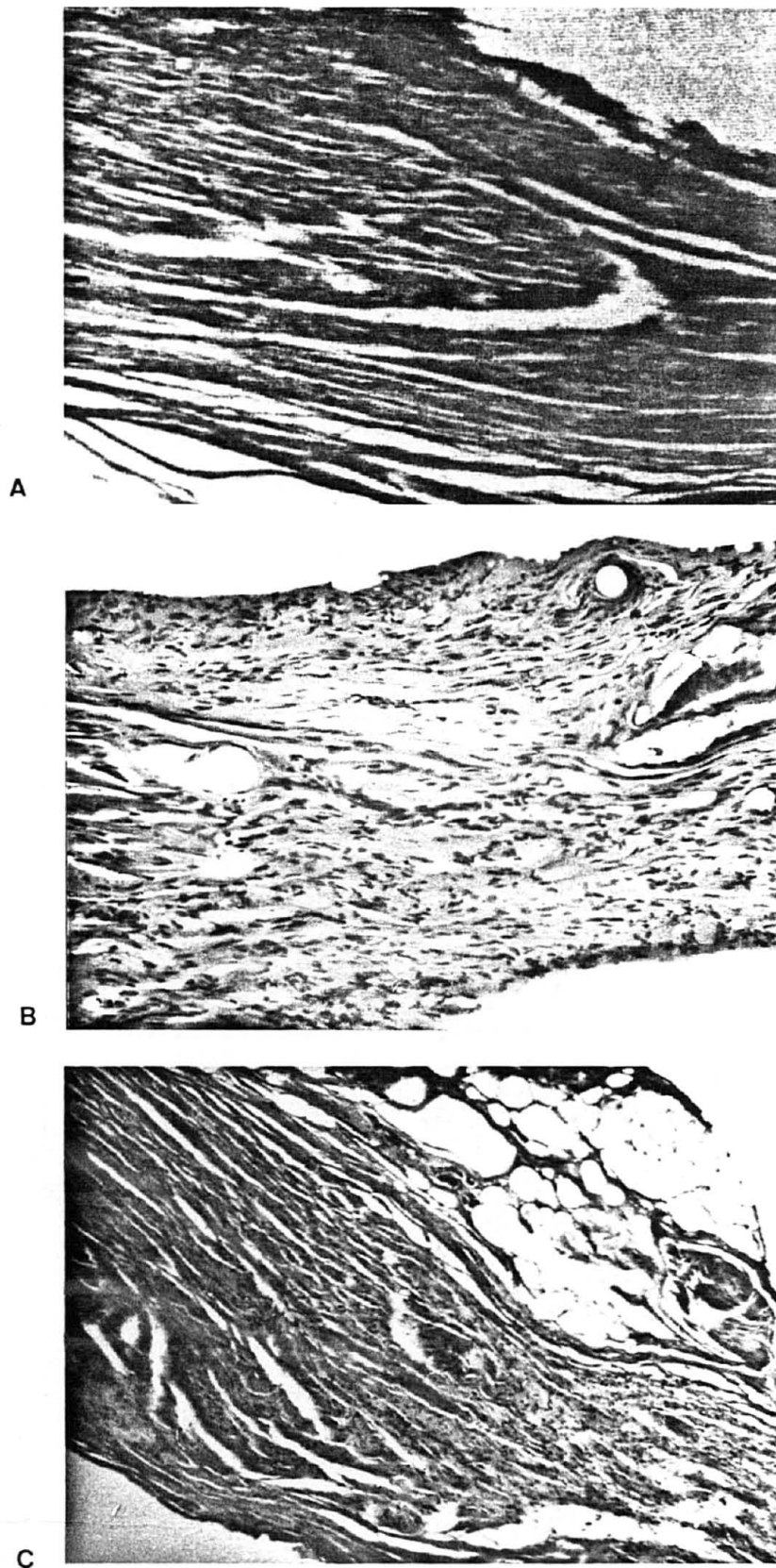


Figura 25 - A) Segmento proximal com orientação paralela de todas as fibras ao eixo longitudinal. Objetiva 4; B) Reação ao fio na área de anastomose. Objetiva 10; C) Segmento distal reinervado. Objetiva 4. Grupo BioFill 120 dias. Rato 15. Coloração com H & E.

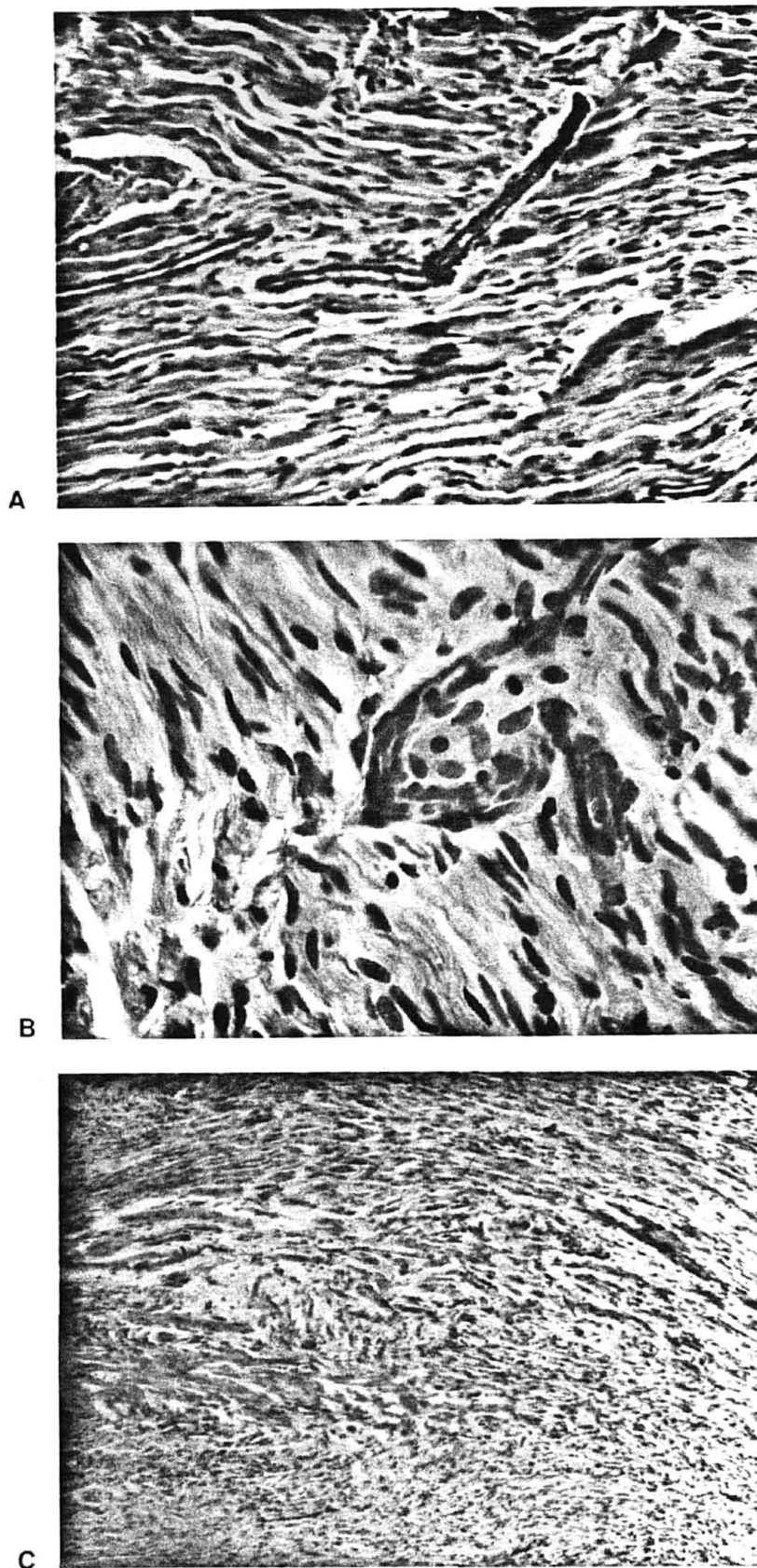


Figura 26 - A) Segmento proximal mostrando o crescimento oblíquo dos vasos sanguíneos e a perda de orientação longitudinal das fibras regeneradas. Objetiva 10; B) Perda da orientação longitudinal das fibras na colisão com o vaso sanguíneo. Objetiva 40; C) Anastomose e segmento distal com orientação variada das fibras. Objetiva 4. Grupo Cola 120 dias. Rato 15. Coloração com H & E.

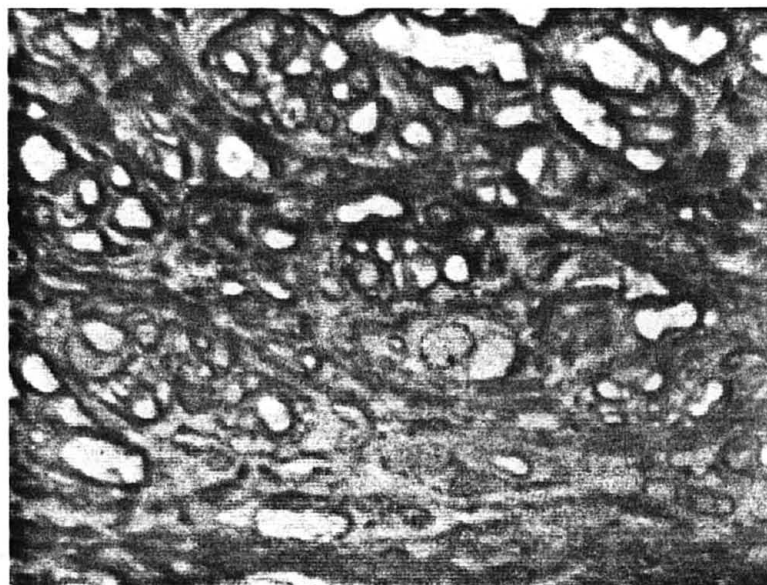


Figura 28 – Aspecto de crescimento transversal das fibras nervosas. Grupo Sutura 45 dias. Objetiva 40. Coloração com azul de toluidina.

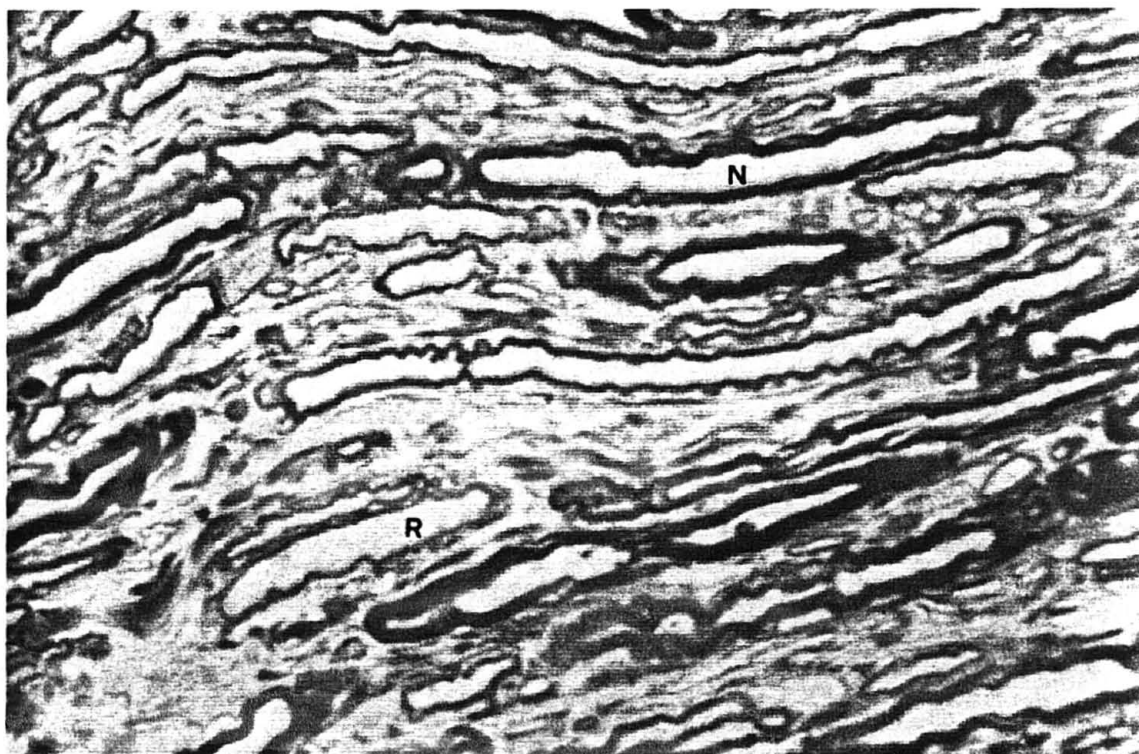


Figura 29 – Extremidade proximal do segmento proximal onde fibras normais com bainhas de mielina mais espessas (N) alinham-se com fibras regeneradas (R) com bainhas de mielina mais finas. Grupo Sutura 90 dias. Objetiva 40. Coloração com azul de toluidina.

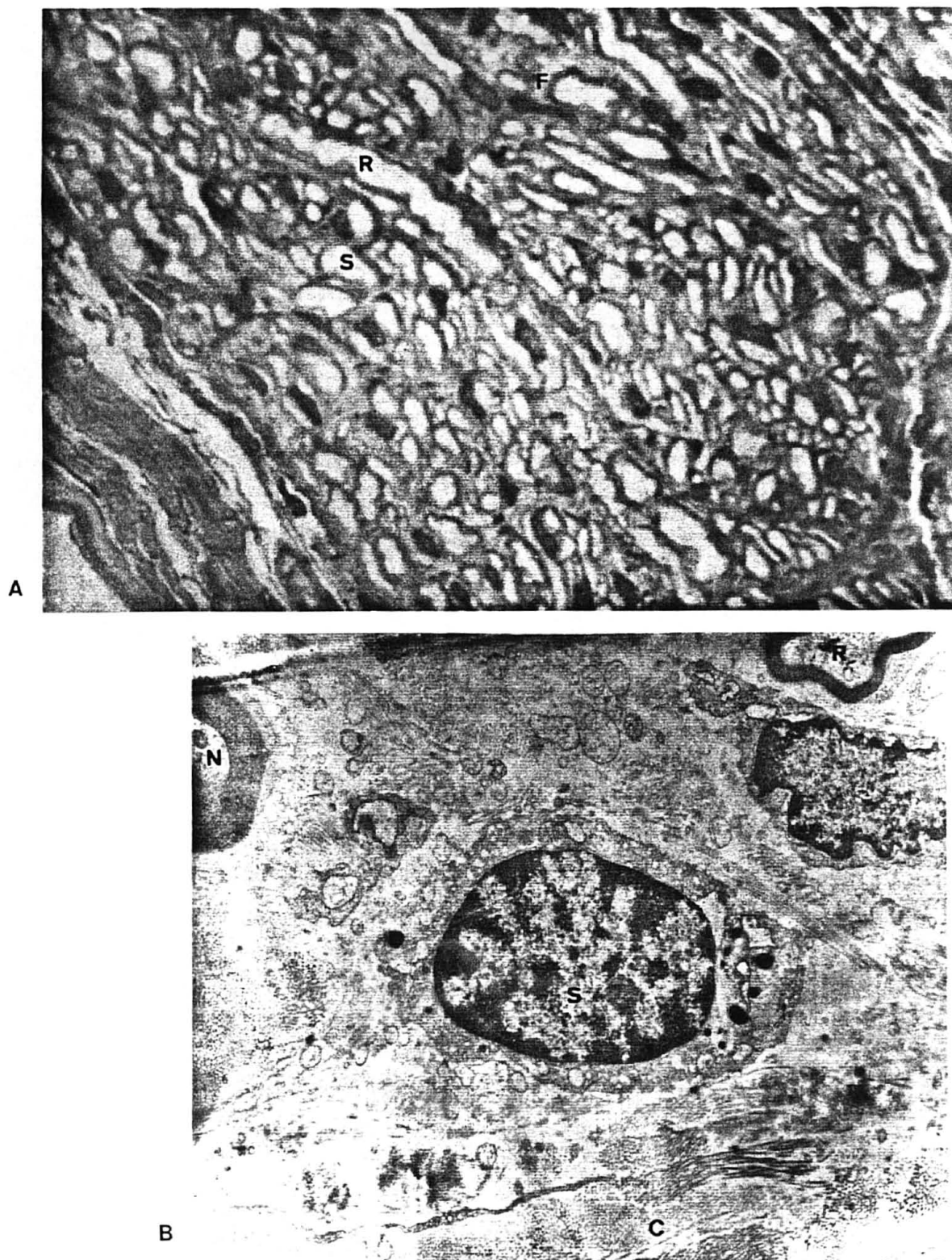


Figura 30 – A) Células de Schwann (S) associadas com fibras regeneradas (R). Fibroblastos no interstício (F). Objetiva 40. B) Ultra-estrutura de uma célula de Schwann (S); axônio normal (N); axônio remielinizado (R); colágeno no interstício (C). 5.000x. Grupo Cola 120 dias. Coloração com azul de toluidina.

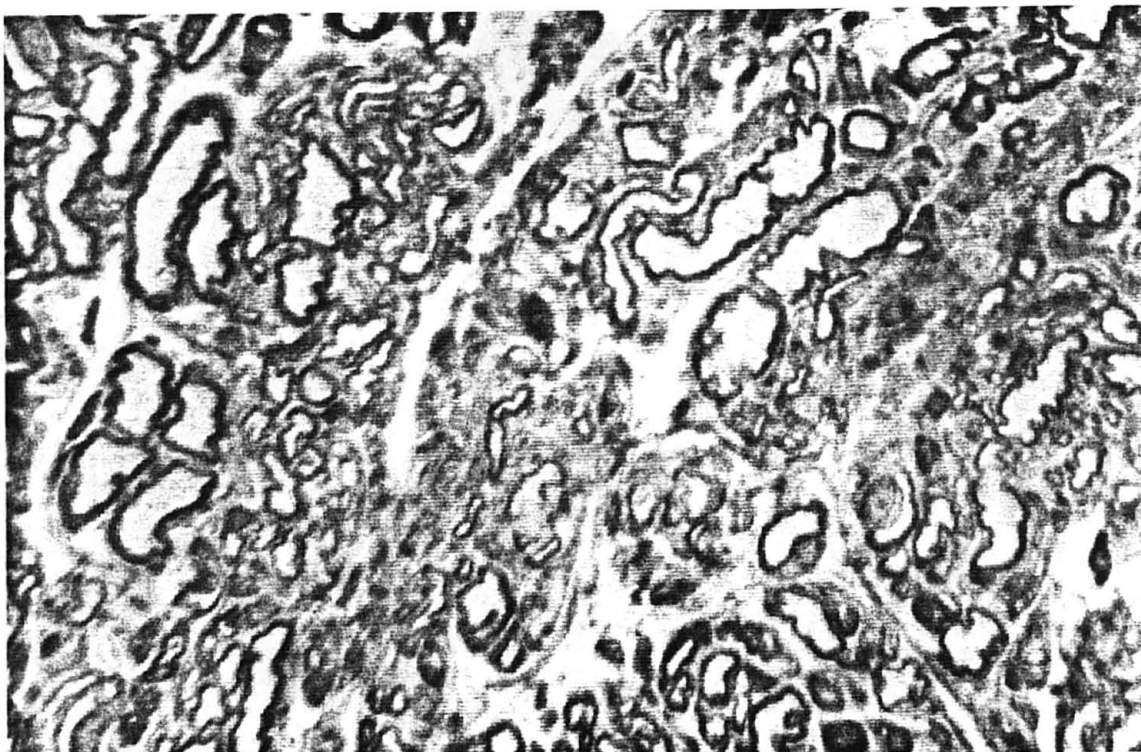


Figura 31 – Fibras regeneradas de aspecto sinuoso e de orientação variada imersas em matriz extracelular espessa. Grupo BioFill 90 dias. Objetiva 40. Coloração com azul de toluidina.

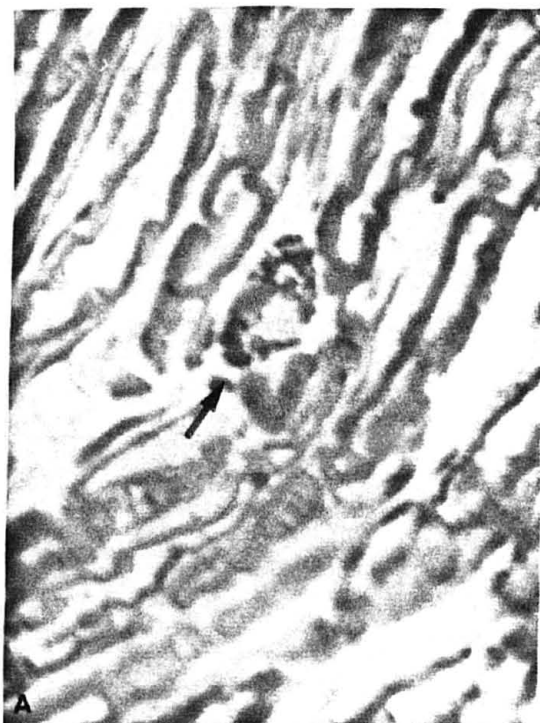


Figura 32 – A) Mastócito ortocromático no endoneuro (seta). Objetiva 40. B) ME do mastócito (M) e célula de Schwann (S). 3.000x. Grupo Cola 120 dias. Coloração com azul de toluidina.

5 DISCUSSÃO

Métodos alternativos à sutura convencional têm sido pesquisados visando desenvolver uma nova técnica para o reparo de nervos periféricos rompidos, que não utilize material de sutura. Esse interesse é justificado por duas razões principais: minimizar tanto o trauma provocado pela manipulação e pela introdução e passagem da agulha, quanto a reação por corpo estranho causada pela presença de material de sutura na área de anastomose (GRABB et al., 1970; GIBSON & DANILOFF, 1989; KORFF et al., 1992).

De acordo com UZMAN et al. (1989), muitas técnicas já foram desenvolvidas com o objetivo de proteger e melhor orientar as fibras nervosas em regeneração; porém, mesmo com novos recursos, nem todas as fibras nervosas que regeneram alcançam os alvos corretos, o que resulta em perda da função.

Uma recuperação funcional satisfatória, após lesão de nervo periférico, depende da restauração da estrutura do nervo para que o maior número possível de axônios em regeneração, a partir do segmento proximal do nervo, encontre facilmente as bandas de Büngner no segmento distal e sejam orientados por elas até as placas motoras (ERHART et al., 1975; MACKINNON & NOVAK, 1999).

Caso não seja realizada anastomose de um nervo rompido, os axônios em regeneração que partem do segmento proximal perdem a direção e crescem aleatoriamente, formando neuroma de amputação. Podem também, ser observadas outras seqüelas como alterações musculares, ósseas e articulares. As células musculares desnervadas atrofiam e degeneram rapidamente, mas essa situação é revertida quando ocorre reinervação. As articulações podem perder a mobilidade devido à contração progressiva da cápsula articular e invasão da

articulação por tecido conjuntivo intra-articular fibroso e adiposo (GIBSON & DANILOFF, 1989).

A compreensão do processo de regeneração do sistema nervoso periférico e dos fatores que influenciam o crescimento dos axônios e, conseqüentemente, da sua conexão com o órgão-alvo, é essencial para analisar a eficiência da técnica utilizada para a reparação de um nervo periférico.

No presente estudo, foram considerados os aspectos anatomopatológicos para estabelecer a comparação entre os três métodos empregados, consistindo basicamente da orientação dos axônios regenerados, presença de células inflamatórias e câmaras de digestão, formação de neuroma, presença de degeneração Walleriana no segmento distal do nervo, e quantidade de fibrilas de colágeno.

Os dados clínicos apresentados referem-se ao número de animais que apresentaram lesão por automutilação, e sugerem perda de sensibilidade no membro pélvico direito distalmente à secção do nervo ciático.

Uma avaliação clínica mediante análise funcional de ratos, cujo nervo ciático foi seccionado e suturado com 3 pontos epineurais, foi realizada por DELLON & MACKINNON (1989) e MEDINACELI & SEABER (1989). Nessa análise, os pés dos ratos foram mergulhados em revelador de filme de raio X e então permitia-se que os animais caminhassem sobre o filme de raio X para que o seu rastro fosse registrado. Porém, a partir de 18 e 24 meses de pós-operatório, a realização dessa análise deixou de ser possível devido a deformidades crônicas nos pés dos animais.

A técnica de escolha para neurorrafia deve ter como objetivo favorecer a orientação dos axônios em fase de regeneração, visto que um mau direcionamento dos axônios é um dos fatores mais comuns que impede a completa recuperação da função do nervo. O reparo ideal

para um nervo periférico é considerado aquele que permite a aposição perfeita das superfícies das extremidades proximal e distal, promovendo o íntimo contato entre elas, sem distorção e sem a presença de material estranho que possa interferir na passagem das fibras nervosas em regeneração do coto proximal para o distal (MEDINACELI & FREED, 1983; BERTELLI & MIRA, 1993).

Conforme TARLOV et al. (1943), os fatores que mais influenciam a escolha da técnica para reparar nervos são uma restauração precisa da topografia fascicular e a utilização de materiais e método que provoquem o mínimo de cicatrização na área de anastomose. Quando se trata de um nervo misto, é fundamental o alinhamento preciso das extremidades dos segmentos proximal e distal, para evitar que fibras nervosas motoras em regeneração ocupem canais de Schwann que conduzem a órgãos terminais sensoriais e vice-versa. A direção errada das fibras implica em recuperação incompleta da função do nervo.

Os resultados referentes à microssutura de nervo periférico obtidos por BRAUN (1966) e BERTELLI & MIRA (1993), baseados tanto em exames histológicos quanto eletrofisiológicos, não foram satisfatórios devido à grande desorganização das fibras nervosas provocada pela posição intraneural da sutura. Tal observação coincide com a organização confusa das fibras nervosas na área de anastomose, apresentada no presente estudo pelos nervos suturados.

De acordo com TARLOV et al. (1943) e BERTELLI & MIRA (1993), o uso de material de sutura é prejudicial porque constitui um obstáculo para as fibras nervosas em regeneração, devido à proliferação de tecido conjuntivo e conseqüente fibrose no local da sutura. Deve-se utilizar um fio de sutura fino e limitado ao epineuro para que a reação inflamatória seja minimizada. Entretanto, em nervos muito pequenos que possuem as bainhas de tecido conjuntivo muito delicadas, torna-se muito difícil incluir somente o epineuro nos

pontos de sutura e, normalmente, ocorre estrangulamento de tecido nervoso resultando em fibrose. A presença de qualquer tipo de fio de sutura estrangulando o tecido neural no local da anastomose provoca reação cicatricial, que impede uma boa orientação das fibras nervosas regeneradas. Além disso, a aplicação dos pontos requer maior manipulação do nervo, o que resulta em trauma e proliferação de tecido fibroso. Esses fatores negativos para a regeneração do nervo são evitados empregando-se uma técnica que não implique em excessiva manipulação do nervo e trauma do tecido nervoso.

Além disso, STENSAAS et al. (1989) advertem que apenas 1 ponto de sutura 10-0 é incapaz de manter as extremidades do nervo unidas. Essa estabilização inadequada da coaptação é agravada durante o movimento normal do membro. No entanto, a introdução de muitas microssuturas induz reação que favorece o escape dos axônios.

A presença de axônios ondulados e desorganizados, próximo à linha de sutura, também foi relatada por SMAHEL et al. (1993), enquanto WISE et al. (1969) observaram alto grau de fibrose entre os segmentos proximal e distal dos nervos, refletindo a continuidade perineural e epineural insatisfatória, o que permitiu a migração de fibroblastos para a área da anastomose, fato também observado durante os exames histológicos desta pesquisa.

Os resultados obtidos por MEDINACELI & FREED (1983), após utilização de sutura perineural, também foram insatisfatórios uma vez que resultou em maciça desorganização axonal em todos os locais onde existia microssutura. Esses resultados, bem como os obtidos no presente estudo, contrariam aqueles encontrados por ERHART & ERHART (1958) e STOPIGLIA & ERHART (1987), nos quais os autores relatam a presença de pequenos neuomas, pequena proliferação de tecido conjuntivo, fibrose perineuromatosa não significativa e axônios morfológicamente íntegros, paralelos, dispostos em fascículos.

Devido ao grande número de conclusões não favoráveis à utilização das técnicas disponíveis atualmente para o reparo de nervos periféricos, muitos pesquisadores estão empenhados na descoberta de uma técnica que favoreça a regeneração das fibras nervosas, sem interferir no seu trajeto ao longo do fascículo até a sua conexão com o órgão-alvo.

Diante de tantas dificuldades para recuperar a função de um nervo rompido, muitas tentativas com técnicas variadas já foram descritas e criticadas. Uma das técnicas mais valorizadas pelos seus resultados satisfatórios, quanto à orientação axonal, e que vêm ganhando importância por causa da descoberta dos fatores de crescimento, é a tubulação.

O implante de bainhas ou tubos-guia sobre o local de anastomose de nervos periféricos tem sido proposto como técnica alternativa para sutura e enxertos, onde é realizada a aproximação das extremidades proximal e distal (GIBSON & DANILOFF, 1989).

LEHMAN & HAYES (1967) afirmam que a neuroanastomose por meio de tubo oferece a possibilidade de um melhor alinhamento axonal. Por outro lado, o uso de tubos com diâmetro pequeno provocará degeneração mais extensa.

Muitos materiais empregados na tubulação de neuroanastomoses são relativamente inelásticos, podendo levar à fibrose e até necrose da área de anastomose, pois podem restringir o edema normal do tecido (MIDGLEY & WOOLHOUSE, 1968). Mesmo procurando utilizar materiais elásticos como veias, artérias, tubos de borracha, pergaminho, entre outros. BRAUN (1966) concluiu que esses materiais deveriam ser removidos devido à fibrose excessiva por eles causada. Além disso, auto-enxertos de veias e artérias não tiveram grande aceitação, tendo em vista a dificuldade de serem obtidas sem causar prejuízo ao local doador. No entanto, SUEMATSU (1989), após utilizar veia femoral como ponte entre as extremidades do nervo ciático de rato e obter bons resultados tanto eletrofisiologicamente quanto histologicamente, defende o enxerto de veia para conduzir a regeneração do nervo

devido à sua característica de possuir paredes finas, o que permite rápida difusão de nutrientes sem necessitar de preparo especial e pelo fato de ser facilmente encontrada sem causar grandes prejuízos à área doadora.

A utilização de veia para tubulação de nervos defendida por SUEMATSU (1989), devido à propriedade de difusão, é contrariada por STENSAAS et al. (1989), os quais sugerem o emprego de tubos feitos com material impermeável. Segundo STENSAAS et al. (1989), a presença de um invólucro impermeável mantém o fluido endoneural retido e os fatores de crescimento liberados a partir das células de Schwann do segmento distal. Assim sendo, a conservação do ambiente endoneural favorece a regeneração dos axônios. Além disso, um material impermeável limita a penetração de fibroblastos no fluido endoneural reduzindo a formação de tecido fibroso.

Para LUNDBORG et al. (1982a), as fibras nervosas são incapazes de regenerar apenas através de fluido; elas requerem uma superfície de material sólido ou semi-sólido, com propriedades adesivas adequadas. Os resultados por eles obtidos com a utilização de câmaras de silicone foram satisfatórios, demonstrando o crescimento ordenado das fibras nervosas em fase de regeneração.

Segundo WEISS & DAVIS (1943) e DUCKER & HAYES (1968), o sucesso da operação e a subsequente regeneração dependem, em grande parte, da forma da bainha. Uma bainha ideal deve ser tão fina quanto possível, flexível, apresentar área transversal interna 2,5 a 3 vezes maior que a do nervo, e ser relativamente curta. Bainhas com diâmetro muito pequeno podem provocar a formação de neuroma proximal e distal à própria bainha, além de compressão permanente que resulta em degeneração e perda da condutividade do impulso nervoso, interferindo assim na função do nervo. Para DUCKER & HAYES (1968), comprimento da bainha deve ser suficiente para proteger e encaixar as extremidades proximal

e distal do nervo rompido, sendo contra-indicadas bainhas muito longas, pois comprometem a irrigação sangüínea na área central correspondente à anastomose.

Seguindo essas recomendações quanto às características ideais que uma bainha deve apresentar para que seja eficiente na reparação de nervos periféricos, foram utilizados nesta pesquisa tubos ou bainhas desenvolvidos com um material semi-permeável que não causa compressão do nervo, constituído por microfibrilas de celulose pura, conhecido comercialmente como BioFill®.

STENSAAS et al. (1989) relataram maior número de axônios regenerados atravessando a área da anstomose no interior de tubos que não causavam compressão. Além disso, justificaram a falta de axônios regenerando no interior dos tubos compressivos pela sua regeneração sobre a superfície externa do tubo, o que prejudica a penetração dos axônios no segmento distal.

A escolha do BioFill® como material para a confecção dos tubos foi feita levando-se em consideração essas observações e também algumas características sugeridas por DUCKER & HAYES (1968), que devem ser encontradas nos tubos empregados em neuroanastomoses. Por exemplo, o tubo ideal deve ter paredes finas, ser flexível, possuir uma área transversal interna maior que a do nervo para evitar sua compressão e a formação de neuroma proximal e distal ao próprio tubo. Resultados positivos foram constatados com tubos que apresentavam o dobro do diâmetro daquele do nervo reparado

A técnica de tubulação normalmente descrita na literatura menciona a aproximação das extremidades dos segmentos proximal e distal do nervo, através das suas aberturas, sem o emprego de sutura, ficando um espaço vazio entre elas através do qual as fibras nervosas regeneram (WEISS & DAVIS, 1943; BRAUN, 1966; LUNDBORG et al., 1982b). Porém, para que seja possível manter os segmentos proximal e distal com suas extremidades no

interior do tubo, este deve ser adequadamente apertado, para que uma ou ambas as extremidades do nervo não escapem e ocorra formação de neuroma e invasão de tecido conjuntivo fibroso. Assim sendo, a principal desvantagem que os tubos apresentam, que vem a ser compressão, não é evitada. GARRITY (1955) relatou que em 2 de 3 casos onde o tubo foi utilizado para ligar as extremidades do nervo radial de pacientes humanos, ocorreu a saída de um dos segmentos do nervo do interior do tubo. Por esse motivo, no presente estudo foi empregado um ponto de aproximação no epineuro dos segmentos proximal e distal do nervo. Sobre este local, foi colocada uma lâmina de BioFill® envolvendo o nervo frouxamente para evitar compressão. Método semelhante foi utilizado por GIBSON & DANILOFF (1989), empregando 2 pontos de sutura para fixar o tubo ao epineuro, o que deixa um intervalo entre as extremidades do nervo.

Em razão da falta de observações anteriores sobre o uso de BioFill® em neuroanastomoses de nervos periféricos, os resultados obtidos pela utilização de BioFill® no presente estudo foram comparados com os resultados obtidos pela utilização de sutura convencional e cola de fibrina, considerando também resultados comentados pelos pesquisadores que utilizaram bainhas constituídas por outros materiais.

Durante a necrópsia e coleta do fragmento do nervo, o mesmo aspecto observado por SMAHEL et al. (1993) sobre os tubos de silicone por eles utilizados, foi observado nas bainhas de BioFill®, isto é, observou-se fixação *in situ* da bainha, e sua retirada só era possível utilizando lâmina de bisturi para desfazer a aderência da bainha sobre o nervo, mediante raspagens sobre a superfície interna da bainha.

No entanto, a membrana de BioFill® não foi recoberta por tecido conjuntivo, contrariando a observação feita por STENSAAS et al. (1989) que constataram a presença de

uma cápsula de tecido conjuntivo formada por lâminas de colágeno alternadas com fibroblastos e leucócitos, envolvendo a superfície externa dos tubos de silicone.

Os resultados obtidos nesta pesquisa conferiram com os apresentados na literatura e que revelam bom alinhamento longitudinal das fibras nervosas regeneradas (LEHMAN & HAYES, 1967; LUNDBORG, et al 1982a). No entanto, contradizem a presença de edema observada por WEISS & DAVIS (1943), WEISL & OSBORNE (1964) e SMAHEL et al. (1993). O edema foi atribuído à compressão e conseqüente obstrução dos *vasa nervorum* que provoca o acúmulo de fluido tecidual, descartando-se a hipótese original de que o edema é provocado pela obstrução do fluxo de axoplasma, visto que um nervo seccionado também pode apresentar edema proximal e distal à área de compressão. O fluido é acumulado gradualmente entre as bainhas de tecido conjuntivo do nervo, pressionando os axônios que se tornam estreitos devido ao deslocamento de substância axonal, tanto proximal quanto distal, responsável pelo aumento do seu diâmetro nessas regiões. Segundo WEISL & OSBORNE (1964), o fluido do edema é invadido por fibroblastos, que produzem uma lesão fibrosa, quando passa a ser indicada a descompressão cirúrgica.

De acordo com DUCKER & HAYES (1967), todo procedimento que consiste em revestir e proteger a área de anastomose de um nervo reparado sem provocar compressão, confere melhor aparência morfológica que aquela obtida com sutura convencional. Os resultados morfológicos e funcionais superiores são conseqüência do alinhamento longitudinal dos tecidos neural e mesenquimal, devido ao implante de um pseudo-epineuro uniforme. Segundo LEHMAN & HAYES (1967), uma bainha colocada sobre o local da anastomose parece assumir papel semelhante ao desempenhado pelo perineuro em cada fascículo.

Para GIBSON & DANILOFF (1989), o sucesso da técnica de tubulação pode ser explicado pela redução, tanto da manipulação e quantidade de material de sutura introduzido, quanto da proliferação de tecido fibroso cicatricial e formação de neuroma no local de anastomose, favorecendo a orientação dos axônios em direção ao coto distal do nervo. Além disso, as bainhas também têm a vantagem de permitir a concentração dos fatores neurotróficos, os quais favorecem o brotamento axonal e, conseqüentemente, a regeneração do nervo.

STENSAAS et al. (1989) apresentam 3 justificativas para os resultados satisfatórios por eles obtidos. A primeira é a retenção do fluido endoneural no interior do tubo que favorece a regeneração axonal através da descontinuidade do tecido; a segunda é a inibição da proliferação de tecido fibroso, e a terceira é a redução da manipulação cirúrgica do nervo preservando a integridade dos vasos sanguíneos endoneurais.

Segundo SON et al (1996), alguns pesquisadores como SCHERER & EASTER (1984), GUÉNARD et al. (1982) e DUBOVY & SVIZENSKA (1994) observaram a capacidade das células de Schwann de formar uma ponte entre as extremidades proximal e distal de um nervo seccionado e sugerem a utilização de estruturas tubulares contendo células de Schwann para servir como guia dos axônios durante a regeneração.

Com o objetivo de reduzir as dificuldades encontradas na técnica de sutura de nervos periféricos e minimizar a desorganização das fibras provocada pela presença do material de sutura, YOUNG & MEDAWAR (1940) criaram um método para unir os cotos proximal e distal de um nervo rompido, com plasma sanguíneo concentrado coagulado.

A resistência tênsil da cola de fibrina foi avaliada por EGLOFF & NARAKAS (1983) como sendo fraca e equivalente a apenas um ponto de sutura com fio 10-0 ou 11-0. Por isso, os autores declaram que, sem a aplicação dos pontos, a utilização da cola de fibrina parece

não apresentar tantas vantagens em neuroanastomoses. Assim sendo, os autores sugerem que a sutura primária de um nervo periférico não seja feita somente com adesivo de fibrina, visto que a ocorrência de deiscência foi freqüente. No entanto, os sistemas de aplicação de fibrinogênio e trombina utilizado pelos autores eram independentes e os produtos foram aplicados em seqüencia. Esse método de aplicação exige maior atenção para que o fibrinogênio seja espalhado uniforme e precisamente sobre o local desejado para que a liberação de fibrina ocorra quando a trombina é adicionada sobre o fibrinogênio. Esse problema pode ser evitado pela utilização de um sistema de aplicação simultânea dos produtos, como foi empregado no presente experimento.

O desenvolvimento da técnica para utilização da cola no presente estudo levou em consideração as recomendações de EGLOFF & NARAKAS (1983) e NARAKAS (1988) sobre as maiores vantagens que a cola oferece quando é combinada com pontos. A essa associação, os autores deram o nome de sutura combinada. Da mesma forma, TARLOV et al. (1943) já aconselhavam a associação de plasma com pontos de sutura para diminuir a tensão na linha de anastomose, tendo em vista uma reação tecidual mínima causada pela presença do fio de sutura. Nas condições onde existir uma tensão muito grande no local da sutura, as chances de sucesso para qualquer tipo de neuroanastomose são mínimas. No presente modelo, esse problema foi contornado com o uso de um ponto de aproximação.

O método empregado por YOUNG & MEDAWAR (1940) consistia na aproximação das extremidades proximal e distal com uma pinça. Entretanto, a retirada da pinça após a adesão pelo plasma prejudicava a estabilidade do coágulo, além de ser muito difícil manter a aposição das extremidades durante o tempo necessário para a completa adesão, sem executar nenhum movimento.

De acordo com ISARANGKURA et al. (1999), os resultados obtidos após a utilização de cola, tanto como adesivo e selante quanto como hemostático local, foram satisfatórios, confirmando a eficiência da cola de fibrina.

No que diz respeito à quantidade de cola necessária para promover a adesão das extremidades proximal e distal do nervo, as recomendações encontradas na literatura sugerem uma quantidade mínima para evitar a formação de um revestimento fibrótico no local da anastomose, que impeça a passagem das fibras nervosas do segmento proximal para o distal do nervo rompido (NARAKAS, 1988), portanto, foi adicionada uma gota de cola no presente estudo.

As alterações observadas nos nervos estudados que haviam sido reparados com cola de fibrina refletiram as mesmas relatadas na literatura, consistindo em boa orientação das fibras nervosas regeneradas, fibrose moderada com reinervação satisfatória do segmento distal do nervo.

O estudo histológico dos nervos que receberam cola de fibrina mostrou que a área de anastomose foi atravessada pelas fibras em regeneração, assim como foi verificado por YOUNG & MEDAWAR (1940). Os resultados histológicos provam que o método de reparar nervos com cola de fibrina proporciona anastomoses com aspectos superiores àqueles oferecidos pela sutura.

Além disso, essa técnica tem a vantagem de ser rapidamente executada, reduzindo o tempo operatório além de manter o alinhamento fascicular desejado instantaneamente, sem que ocorra rotação dos segmentos do nervo e deslocamento dos fascículos (NARAKAS, 1988).

O melhor alinhamento das fibras nervosas e a boa regeneração através da área de anastomose observados após a implantação da bainha de BioFill®, estão de acordo com os resultados obtidos por NARAKAS (1988).

As três técnicas operatórias realizadas nesta pesquisa respeitaram as etapas postuladas por MILLESI (1979), que consistem basicamente na preparação das extremidades dos cotos proximal e distal do nervo seccionado, aproximação das extremidades, coaptação e manutenção da coaptação. A preparação das extremidades implica na ressecção do tecido neural que sofreu extrusão ou foi extremamente danificado.

A aproximação das extremidades, com o mínimo de trauma, pode ser realizada por meio de um ponto simples com fio 10-0 quando não houver tensão na linha de sutura. Caso contrário, segundo BERTELLI & MIRA (1993), deverão ser realizados mais pontos de sutura ou introdução de enxerto quando a distância entre os cotos for maior que 1 cm.. A coaptação pode ser realizada por três técnicas diferentes: truncular, fascicular ou interfascicular. No presente estudo foi realizada anastomose truncular, por ser ela perfeitamente aplicada em nervos monofasciculares ou oligofasciculares, como é o caso do nervo ciático de ratos. A manutenção da coaptação é determinada pela tensão na sutura, ou seja, deve ser considerada quando o método empregado não é suficiente para aproximar as extremidades sem a presença de tensão, e passa a ser necessária a manutenção da estabilidade da anastomose.

As técnicas operatórias empregadas no presente estudo diferiram na última etapa, quando a manutenção da anastomose foi realizada de três maneiras: pela aplicação de mais pontos de sutura, pela colocação de bainha sobre a área de anastomose envolvendo o nervo e pela adição de cola de fibrina.

Nos três métodos estudados foi observado um certo grau de desorganização axonal relacionado com a colisão das fibras nervosas em regeneração com a reação ao fio de sutura, o

que determina a desorientação das fibras, fato notado por YOUNG & MEDAWAR (1940), e figuras de aprisionamento (neuroma) com as células de Schwann proliferadas concentricamente ao redor dos axônios, com aspecto de bulbos de cebola. Tal aspecto foi evidente nas biopsias já a partir de 45 dias, principalmente nos nervos reparados com sutura, demonstrando que o crescimento axonal estava respondendo aos fatores de crescimento, mas sem a orientação adequada para reencontrar as bandas de Büngner.

Da mesma forma, o estudo de BURKE & O'BRIEN (1978) também revelou formação de neuroma nos locais da sutura, fibras nervosas mielinizadas finas, proliferação de tecido conjuntivo fibroso e feixes de fibras nervosas correndo de forma confusa.

JURECKA et al. (1975) atribuíram a formação de neuroma e fibrose à proliferação lenta e constante de tecido conjuntivo epineural. Eles observaram a proliferação dessas células durante 6 semanas e consideraram uma das razões da formação de fibrose e prejuízo para a reparação do nervo.

Os nervos tubulados revelaram axônios lineares dispostos paralelamente, enquanto os suturados apresentaram maior número de axônios ondulados e desorganizados. Tais alterações também foram relatadas por SMAHEL et al. (1993).

Em qualquer tipo de lesão sofrida por um nervo periférico, a função das células de Schwann de manter a bainha de mielina é prejudicada, resultando em distúrbios nas funções iônicas envolvidas na propagação do potencial de ação (CAVANAGH, 1990a).

Igualmente ao fato observado por ERHART et al. (1975), as fibras nervosas em regeneração analisadas neste estudo eram mais finas que as normais e apresentavam uma fina bainha de mielina.

A degeneração axonal inicia a partir do momento em que uma grande porção do citoplasma é separada do corpo celular, que representa a fonte de substâncias para toda a

célula. Dessa forma, nem toda a energia necessária para as atividades vitais da célula é fornecida e, como parte isolada do citoplasma, essa porção da célula é incapaz de manter-se sozinha, ocorrendo assim, uma inevitável desintegração (CAVANAGH, 1990b).

De acordo com HOLTZMAN & NOVIKOFF (1965), após a lesão de um nervo periférico verifica-se a divisão da mielina em grandes fragmentos, os quais são desdobrados em massas pequenas, que são envolvidas e interiorizadas pelos vacúolos de digestão para que a mielina seja degradada. É dessas alterações que consiste a degeneração Walleriana, verificada melhor em nosso estudo através dos cortes semifinos e estudo de fibras desfiadas.

Conforme O'DALY & IMAEDA (1967), a degeneração do nervo começa com uma condensação do axoplasma, acúmulo de mitocôndrias e irregularidade do contorno da bainha de mielina. Quando a bainha de mielina começa a ser degradada, ocorre grande aumento do número de organelas citoplasmáticas das células de Schwann. A membrana basal separa-se da superfície da célula de Schwann, deixando um espaço onde são encontrados macrófagos que migraram dos capilares endoneurais.

Nos exames histopatológicos realizados neste estudo, foram reconhecidos os critérios mencionados por CAVANAGH (1990b), em relação a danos das fibras, que consistem em: aumento da população celular, aumento do tamanho do núcleo e nucléolo das células de Schwann e aumento do número de macrófagos e de mastócitos, uma vez que essas células ocorrem em maior número sempre que há qualquer tipo de anormalidade nos nervos periféricos.

Para MELLICK & CAVANAGH (1968), é provável que o estímulo responsável pela explosão da atividade mitótica, que ocorre no 3° ou 4° dia, seja o resultado da presença dos produtos da fragmentação das fibras nervosas, e não da fragmentação da mielina, já que a degradação química da mielina começa no final da primeira semana após a lesão. Por outro

lado, para RAMÓN y CAJAL (1928), o aumento do espaço disponível devido ao início da degeneração, pode ser o estímulo responsável. Além disso, ocorre a entrada de células vizinhas no nervo indicando um processo inflamatório.

De acordo com SOUZA et al. (1996), outras alterações que indicam degeneração Walleriana são matriz extracelular espessa formada por brotamentos axonais separados por feixes de fibras colágenas, revelada pela análise ultra-estrutural, e macrófagos com citoplasma denso e membranas de mielina fagocitadas e possivelmente degradadas a gordura neutra.

No estudo histológico dos nervos que receberam qualquer um dos tratamentos, verificou-se a presença de fibrilas de colágeno desorganizadas e dispostas obliquamente no endoneuro, tanto individualmente quanto formando feixes. Essa observação também foi feita por MORRIS et al (1972).

A fase regenerativa inicia com as divisões das células de Schwann, que formam as bandas de Büngner. Logo que um axônio penetra em uma dessas colunas, as células de Schwann iniciam a mielinização. Quando as colunas não são ocupadas por nenhum axônio, elas podem persistir por algum tempo e finalmente atrofiar. Essas alterações degenerativas também ocorrem em direção ao corpo celular, mas normalmente limitam-se a uma pequena distância proximal ao ponto do dano (CAVANAGH, 1990b).

Segundo BUNGE (1993; 1994), mesmo após cultivadas e isoladas, as células de Schwann não perdem a sua capacidade de manter a regeneração e de mielinizar neuritos apropriados, ou seja, permanecem funcionais mesmo *in vitro*. Foi observado pelo pesquisador que as células preparadas continuaram promovendo a regeneração e remielinização de nervos periféricos *in vivo*, quando implantadas em canais semi-permeáveis. Dessa forma, torna-se evidente a importância clínica de transplantes de células de Schwann cultivadas para favorecer a reparação das fibras periféricas.

Tal observação confere maior valor e importância ao material utilizado para a confecção das bainhas empregadas neste estudo, visto que o BioFill® pode ser muito útil, tanto para os transplantes de células de Schwann no SNP, quanto na pesquisa dos fatores que promovem a regeneração do mesmo.

Adicionalmente, BUNGE (1993; 1994) relata que o transplante de células de Schwann no SNC mostrou que essas células também são capazes de reparar áreas de desmielinização, restaurando a condução dos impulsos nervosos. Considerando esses achados, concluiu-se que além dos oligodendrócitos, as células de Schwann também participam da remielinização nos casos de desmielinização de axônios centrais, favorecendo a restauração da função.

Pode-se notar que as células de Schwann possuem várias funções no tecido nervoso. No presente estudo, foi avaliada histologicamente a capacidade dessas células de promover a regeneração no SNP. De acordo com BUNGE (1993), o regulador primário dessa função das células de Schwann é o axônio, pois o seu contato regula a expressão da célula de Schwann para galactocerebrosideo (Gal-C), glicoproteína associada à mielina (MAG), e para a principal proteína que constitui a mielina periférica (Po). Portanto, a capacidade dos axônios que se tornarão mielinizados de regular a expressão das células de Schwann para os componentes específicos da bainha de mielina é muito importante. Além disso, o contato da célula de Schwann com o axônio induz a orientação, diferenciação e deposição da lâmina basal ao redor de cada unidade axônio-célula de Schwann, pela célula de Schwann. A necessidade do contato com o axônio para que a lâmina basal seja formada e depositada foi demonstrada em estudos *in vitro*, assim como foi demonstrado que os fibroblastos favorecem a deposição da lâmina basal ao redor da unidade axônio-célula de Schwann, porém não são essenciais.

Segundo BUNGE (1993; 1994), a habilidade das células de Schwann para influenciar grandemente a regeneração, tanto no sistema nervoso periférico (SNP), quanto no sistema

nervoso central (SNC), deve-se em parte à extraordinária capacidade dessas células de produzir vários fatores tróficos, bem como de expressar na sua superfície moléculas de adesão celular que são conhecidas pela sua ação nas superfícies dos neuritos, influenciando o crescimento destes. Entre as moléculas neurotróficas produzidas pelas células de Schwann estão o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator neurotrófico ciliar (CNTF). Além disso, as células de Schwann também são responsáveis pela produção dos componentes da matriz extracelular como o colágeno e laminina, que é conhecida por promover a regeneração de vários tipos de neurônios.

BUNGE (1993) acredita que a proliferação das células de Schwann é induzida por diferentes razões, durante o desenvolvimento e após uma lesão. Durante o desenvolvimento do SNP, as células de Schwann originam-se da crista neural e a sua proliferação é estimulada pelo contato com os axônios. O crescimento da população de axônios, por sua vez, induz a expansão do número de células de Schwann, ou seja, o contato com axônios em desenvolvimento provoca a mitose da célula de Schwann. A proliferação das células de Schwann também é influenciada por frações isoladas de mielina, por fatores derivados dos macrófagos e por componentes da matriz extracelular que passam a ser evidentes após uma lesão.

Para SON et al. (1996), as células de Schwann que recobrem as junções neuromusculares são sensíveis à transmissão sináptica, e por essa razão são capazes de reagir a perturbações na transmissão, alterando a sua expressão gênica para estimular a produção de proteína fibrilar glial. A partir daí, as células de Schwann emitem processos ou extensões que provavelmente são atraídos por sinais emitidos pelas fibras musculares desnervadas, a fim de que a célula de Schwann ocupe a área sináptica desnervada. Esses processos são importantes, porque servem de substrato ou guia para a progressão do axônio.

Diante de tantas evidências da atuação de moléculas, algumas conhecidas e outras ainda desconhecidas, atualmente são depositadas maiores esperanças no estudo da regeneração do sistema nervoso periférico, baseado em biologia molecular e genética molecular. A biologia e a genética moleculares possibilitam a caracterização das moléculas envolvidas com a sobrevivência e com o crescimento dos axônios, que compreende um dos objetivos primordiais das pesquisas atuais na área de neurocirurgia. É provável a existência de moléculas que são enviadas por órgãos intermediários e funcionam como guia para os axônios em regeneração. Além disso, supõe-se que essas moléculas também sejam responsáveis pela manutenção da sobrevivência apenas dos axônios que seguem o trajeto correto durante o desenvolvimento do sistema nervoso, assegurando a formação das conexões neurais adequadas (FLANAGAN, 1999; WANG & TESSIER-LAVIGNE, 1999).

Segundo HOPKINS & BROWN (1984), durante o desenvolvimento embrionário, os neurônios cujas fibras não fazem conexão com os órgãos-alvo desaparecem. Esse fenômeno é chamado por RAFF et al. (1998) de apoptose ou morte celular programada, e ocorre pela falta de fatores tróficos para o axônio, principalmente do NGF. Considerando um nervo em regeneração, pode-se dizer que os neuritos que não encontrarem os tubos endoneurais desaparecem por degeneração. Tal controle da sobrevivência celular assegura que serão viáveis somente as células necessárias em uma determinada área.

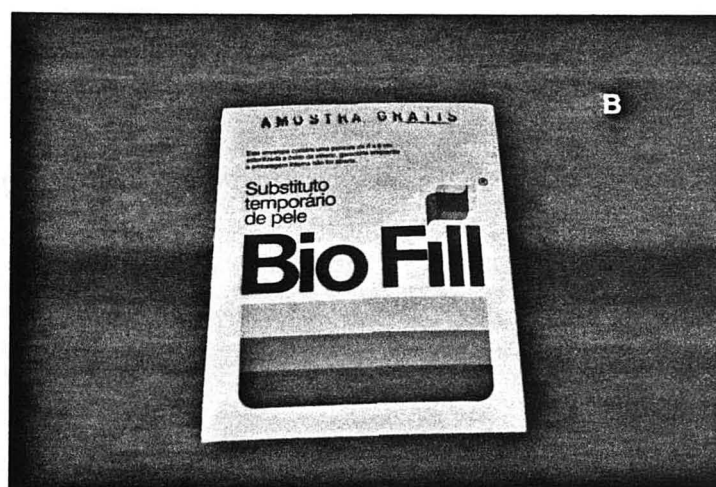
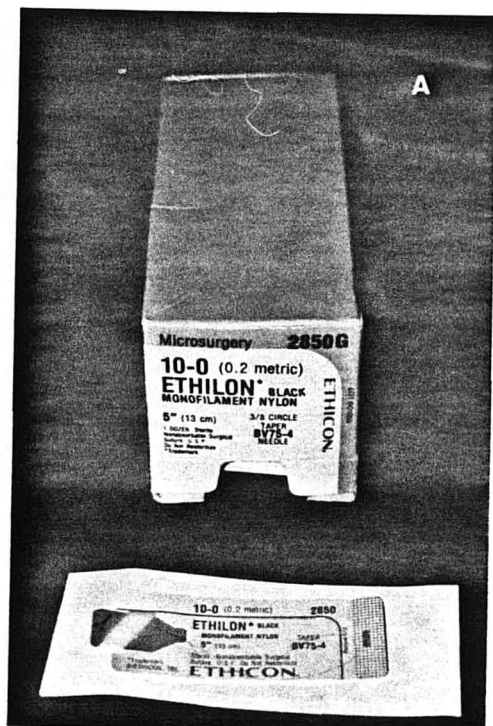
A existência de fatores tróficos na regeneração, nos três tratamentos, é comprovada pela continuidade das fibras do segmento proximal com o distal. A descontinuidade das fibras é causada pela intercalação de estruturas formadas durante a cicatrização do tecido. No presente estudo, foram detectados basicamente: reação ao fio de sutura, vasos calibrosos transversalmente orientados e excessiva colagenização do perineuro.

A ocorrência de impedimentos à progressão adequada das fibras nervosas sensitivas, traduziu-se clinicamente na mutilação secundária à perda de sensibilidade e de propriocepção, comuns àquelas condições em que, como no presente trabalho, há compressão e destruição local de fibras. Fatos clínicos semelhantes são observados em outras condições, tais como infiltração inflamatória e tumoral aos nervos periféricos e alterações metabólicas (CAVANAGH, 1990b). Alterações clínicas e histológicas nesses aspectos foram mais conspícuas nos animais que foram suturados com três pontos, com maior fibrose e reação pio-granulomatosa ao fio de sutura.

6 CONCLUSÕES

1. Apesar da formação de tecido fibroso e de degeneração Walleriana, presentes em todos os tratamentos, a cola de fibrina e a bainha de BioFill® mostraram resultados superiores à reparação mediante sutura, por possibilitarem melhor orientação axonal e menor formação de neuroma.
 2. Embora seja necessária a utilização de microssutura nos três tipos de tratamento, o número de pontos necessários é maior quando a neuroanastomose é realizada utilizando-se apenas sutura.
 3. Os três tratamentos viabilizam a reinervação. Contudo, a técnica de microssutura exige maior treinamento e equipamento especializados, enquanto a cola de fibrina é um produto de custo elevado, permanecendo, portanto, a bainha de BioFill® como a melhor alternativa por sua eficácia, facilidade de aplicação e baixo custo.
1. Sugere-se que um estudo clínico de regeneração periférica com bainha de BioFill® seja realizado em cães, por ser esta espécie mais frequentemente acometida por lesões traumáticas de nervos periféricos.

ANEXO 1 – Materiais utilizados para reparar os nervos dos grupos sutura, BioFill® e cola de fibrina (Tissucol®).



A- Fio mononylon 10-0 para micrcirurgia da marca ETHICON. B- Envelope contendo uma película de BioFill® medindo 6 x 6 cm, esterilizada a óxido de etileno. C- Kit comercial contendo 0,5 ml de Tissucol® tratado pelo vapor. Seringas compondo o sistema duploject expostas.

ANEXO 2 - Composição completa da cola de fibrina

Um mililitro de Fibrinogênio Humano (Tissucol®) contém:

Proteína Coagulável (75 - 115 mg) da qual:

Fibrinogênio	70 - 110 mg
Plasmafibronectina	2 - 9 mg
Fator XIII	10 - 50 U
Plasminogênio	40 - 120 mg
Solução de Aprotinina Bovina	3.000 KIU/ml*
Trombina 4 Humana liofilizada:	
01ml da trombina reconstituída contém	4 UI
Trombina 500 Humana liofilizada:	
01 ml da trombina reconstituída contém	500 UI
Solução de Cloreto de Cálcio	40 mmol CaCl ₂ /l

* KUI – Unidade Inativadora da Calidínogenase.

Esquema da preparação dos componentes da cola:

Trombina liofilizada + Solução de CaCl₂ → Solução de Aprotinina

Fibrinogênio Humano liofilizado + Solução de Aprotinina

→ Solução de Fibrinogênio Humano

Solução de Fibrinogênio Humano + Solução de Trombina



Solução de Tissucol®



Adesivo Selador Fibrínico Solidificado (Tissucol®)

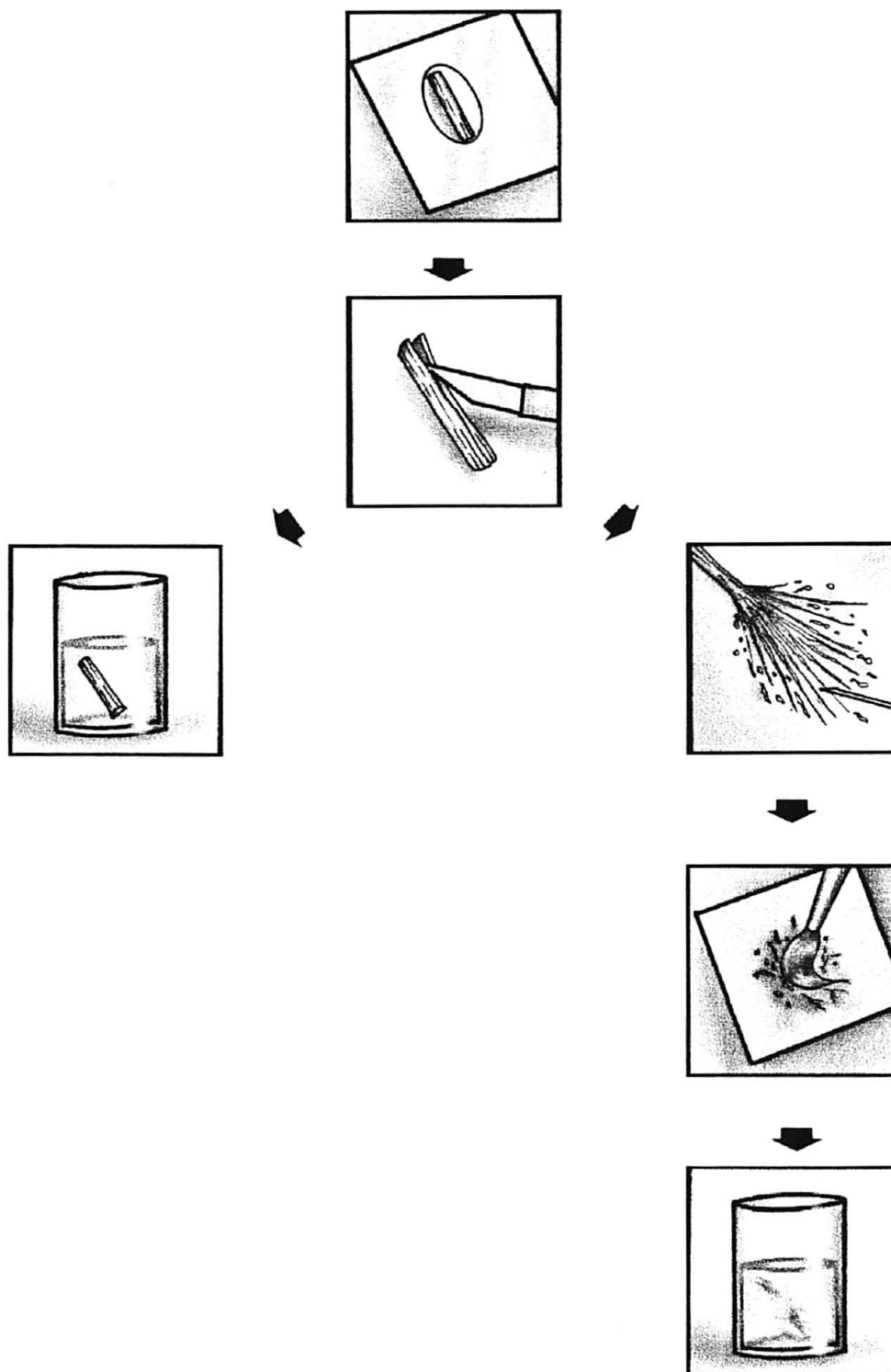
ANEXO 3 - Composição e apresentação do Biofill®

O Biofill® é uma película de celulose pura, microfibrilar biossintética obtida pela biossíntese de bactérias do gênero *Acetobacter*. Apresenta algumas características como biocompatibilidade, atoxicidade, adere-se firmemente ao local do ferimento e cria um microambiente que proporciona condições fisiológicas para uma reparação rápida quando é utilizado na substituição de pele.

ANEXO 4 - Material utilizado para a retirada da amostra do nervo isquiático

- Lupa
- Placa de Petry
- Placa de cêra de uso odontológico
- Lâmina para depilação
- Tesoura para divulsão do músculo bíceps femoral
- Lâminas de bisturi número 11 para incisão da pele e retirada do fragmento do nervo
- Pinça utilizada em microcirurgia para manipulação do nervo
- Caneta para marcação da extremidade proximal do nervo que seria incluído em parafina e analisado em microscópio óptico
- Agulhas de insulina para desfiar a metade do nervo
- Pedacos retangulares pequenos de papelão medindo aproximadamente 3 cm de comprimento por 0,5 cm de largura
- Frascos rotulados contendo paraformaldeído 2 %, glutaraldeído 0,5 % diluídos em tampão cacodilato 0,1 M para as amostras incluídas em parafina
- Frascos rotulados e mantidos no gelo contendo glutaraldeído a 3 % e tampão cacodilato a 0,2 M para fixação das amostras incluídas em resina.
- Recipiente com gelo
- Pincel com 17,5 cm para introdução das fibras desfiadas no frasco contendo solução fixadora
- Lâminas e lamínulas para histopatologia
- Entelan para inclusão das fibras desfiadas

ANEXO 5 – Seqüência do processamento das amostras para inclusão em resina.



A- segmento do nervo sobre a cêra. B- secção longitudinal do segmento. C- metade do segmento imerso em solução fixadora para inclusão em resina com acelerador. D- desfiamento da outra metade do segmento. E- retirada das fibras desfiadas da placa de cêra-fibras desfiadas em solução fixadora para inclusão em resina sem acelerador.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.B. Lesões traumáticas dos nervos periféricos no membro superior: orientação de tratamento. **Rev. Paul. Med.**, v. 63, p. 210. Julho/Dezembro. 1963.
- ABREU, L.B.; ERHART, E.A. Considerações sobre neurorrafias em lesões antigas. **Rev. Paul. Med.**, v. 52, n. 1, p. 149-150. Janeiro. 1958.
- AITKEN, J.T. The Effect of Peripheral Connexions on the Maturation of Regenerating Nerve Fibres. **J. Anat.**, v. 83, p. 32-42. Jan. 1949.
- ARRUDA, W.O. O Neurônio e o Tecido Nervoso. In: MENESES, M.S. **Neuroanatomia Aplicada**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999. p. 2-27.
- ARRUDA, W.O.; MENESES, M.S. Nervos Periféricos. In: **Neuroanatomia Aplicada**, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999. p. 50-70.
- ATCHABAHLIAN, A.; GENDEN, E. M.; MACKINNON, S. E.; DOOLABH, V.B.; HUNTER, D.A. Regeneration through long nerve grafts in the swine model. **Microsurgery**, New York, v. 18, n. 6, p. 379-372. 1998.
- BANKS, W.J. Sistema Nervoso. In: -, **Histologia Veterinária Aplicada**, Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1992. 629p.

- BARRON, K.D. Neuronal responses to axotomy: Consequences and possibilities for rescue from permanent atrophy or cell death. In: SEIL, F.J., **Neural Regeneration and Transplantation**, Ed. Alan R. Liss, New York, 1989. 294p.
- BERTELLI, A. J.; MIRA, J. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. **Microsurgery**, New York, v. 14, p. 135-140. 1993.
- BORA, F. W. Peripheral nerve repair in cats. **J. Bone Jt. Surg. Am.**, vol., Boston, v. 49-A, n. 4, p. 659-666. June. 1967.
- BRAUN, R.M. Comparative Studies of Neuroorrhaphy and Sutureless Peripheral Nerve Repair. **Surgery Gynecology and Obstetrics**, v. 122, n. 1, p. 15-18. Jan. 1966.
- BROWN, P. W. Factors influencing the success of the surgical repair of peripheral nerves. **S. Clin. North America**, v. 52, n. 5, p. 1137-1154. Oct. 1972.
- BUNGE, R.P. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 3, p. 805-809. 1993.
- BUNGE, R.P. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. **J. Neurol.**, v. 241, p. S19-S21. 1994.

- BURKE, P.F.; O'BRIEN, B.McC. A comparison of three techniques of micro nerve repairs in dogs. **Hand**, v. 10, p. 135-143. 1978.
- CAVANAGH, J.B. Normal Peripheral Nerve. In: WELLER, R.O. **Nervous System, Muscle and Eyes**. Ed. Churchill Livingstone, London, 3^a ed., v. 4, 1990a. p. 518-532.
- CAVANAGH, J.B. Reactions of Neurons and Schwann Cells to Injury. In: WELLER, R.O. **Nervous System, Muscle and Eyes**. Ed. Churchill Livingstone, London, 3^a ed., v. 4, 1990b. p. 533-543.
- CHRISMAN, C. L. Paresia ou paralisia de um membro. In -. **Neurologia dos pequenos animais**. Ed. Roca Ltda, São Paulo, p. 371 – 386, 1985.
- CROSSMAN, A. R.; NEARY, D. O sistema nervoso periférico. In -. **Neuroanatomia**. Ed. Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro, 1997, p. 23 – 30.
- DAVENPORT, H.A.; CHOR, H.; CLEVELAND, D.A. Fiber Ratios in Regenerating Nerves. II: The Status of Regrowth of the Sciatic and Nerves to the Gastrocnemius in Macacus 3 Months After Section. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 70, n. 1, p. 153-159. 1937.
- DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. **Microsurgery**, New York, v. 10, n.

3. P. 220-225. 1989.

DUCKER, T.B.; HAYES, G.J. A Comparative Study of the Technique of Nerve Repair. **Surgical Forum**, v. 18, p. 443-445. 1967.

DUCKER, T. B.; HAYES, G. J. Experimental Improvements in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 21, June. 1968.

EGLOFF, D.V.; NARAKAS, A. Nerve Anastomoses with Human Fibrin. **Ann. Chir. Main.**, v. 2, p. 101 – 115, 1983.

ERHART, E.A. Novos Conceitos sobre degeneração de fibras nervosas periféricas. **Rev. Paul. Med.**, v. 63, p. 209. Julho/Dezembro. 1963.

ERHART, M. B.; ERHART, E. A. Sobre o comportamento das fibras nervosas no coto distal de nervo fibular de “canis familiaris” após transecção total. **Folia Clinica et Biologica**, v. 28, p. 98-100. 1958.

ERHART, E. A.; FERREIRA, M. C.; TEDESCO-MARCHESE, A.; AZZE, R.J.; PUECHLEÃO, P. Suturas de nervos com técnica microcirúrgica podem evitar total degeneração Walleriana. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 21, n. 7, p. 213-217. Jul. 1975.

FERREIRA, M.C.; ERHART, E.A.; TEDESCO-MARCHESE, A.; AZZE, R.J. Microcirurgia de

Nervos Periféricos: nova técnica. **Ver. Paul. Med.**, v.84, p. 52-53. Julho/Agosto. 1974.

FLANAGAN, J.G. As nerve axons migrate during wiring of the nervous system, molecular signposts at intermediate targets show them the way. Such a target has now been found to keep axons alive – provided they're on the right track. **Nature**, v. 401, p. 747-748. 1999

GARRITY, R.W. The use of plastic and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. **Surgical Forum**, v. 6, p. 517-520. 1955.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tecido nervoso. In -. **Tratado de Histologia**. Ed. Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro, 1997, p. 147 – 175.

GASPARI, A.; RUSSO, F.; SICA, G.S.; COSCARELLA, G.; SILERI, P.; SPINA, C.; Di LORENZO, N. Microsurgical repair of iatrogenic injuries of the recurrent laryngeal nerve. **Minerva Chir.**, v. 54, n. 11, p. 795-803. 1999.

GIBSON, K.L.; DANILOFF, J.K. Peripheral Nerve Repair. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v. 11, n. 8, p. 938-944. 1989.

GRABB, W.C.; BEMENT, S.L.; KOEPKE, G.H.; GREEN, R.A. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 31-38. 1970.

GUNTINAS, L.O.; EFFENBERGER, K.; ANGELOV, D.N.; KLEIN, J.; STREPPPEL, M.; STENNERT, E.; NEISS, W.F. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definite denervation period using a cross-anastomosis paradigm. **Exp. Neurol.**, v. 162, n. 1, p. 98-111. 2000.

GUTMANN, E.; SANDERS, F.K. Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. **J. Physiol.**, London, v. 101, p. 489-518. 1943.

HEUMANN, R.; KORSCHING, S.; BANDTLOW, C.; THOEN, H. Changes of nerve growth factor synthesis in noneuronal cells in reponse to sciatic nerve transection. **The Journal of Cell Biology**, v. 104, p. 1623 – 1631. 1987.

HOLTZMAN, E.; NOVIKOFF, A.B. Lysosomes in the Rat Sciatic Nerve Following Crush. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 651-669. 1965.

HOPKINS, W. G.; BROWN, M. C. **Development of nerve cells and their connections.** Cambridge; Cambridge University Press, 137 p., 1984.

ISARANGKURA, P.; CHIEWSILP, P.; CHUANSUMRIT, A.; SUWANNURAKS, M.; KEOROCHANA, S.; ATTANAWANICH, S.; TARDTONG, P.; MARTINOWITZ, U.; HOROSZOWSKI, H. Low cost locally prepared fibrin glue for clinical applications: reported of 145 cases. **J. Med. Assoc. Thai.**, 82 Suppl 1. P. S49-56. 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Nervoso. In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 1995. p. 127-153.

JURECKA, W.; AMMERER, H.P.; LASSMANN, H. Regeneration of a transected peripheral nerve. An autoradiographic and electron microscopic study. **Acta Neuropath.**, v. 32, p. 299-312. 1975.

KORFF, M.; BENT, S. W.; HAVIG, M. T.; SCHWABER, M. K.; OSSOFF, R. H.; ZEALEAR, D. L. **Otorhynology – Head and Neck Surgery**. v. 106, p. 345 – 350. 1992.

LAUTO, A.; TRICKETT, R.; MALIK, R.; DAWES, J.M.; OWEN, E.R. Laser-activated solid protein bands for peripheral nerve repair. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 21, p. 134-141. 1997.

LEHMAN, R. A. W.; HAYES, G. J. Degeneration and regeneration in peripheral nerve. **Brain**, Boston, v. 90, p. 285-295, 1967.

LUNDBORG, G.; BRANEMARK, P.I. Microvascular structure and function of peripheral nerves. Vital microscopic studies of the tibial nerve in the rabbit. **Adv. Microcirc.**, v. 1, p. 66-88. 1968.

LUNDBORG, G. Structure and Function of the Intraneural Microvessels as Related to Trauma, Edema Formation, and Nerve Function. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 57-A,

n. 7, p. 938-948. 1975.

LUNDBORG, G.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. *In vivo* Regeneration of cut nerves encased in silicone tubes. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Lundborg, v. 41, n. 4, p. 412-422. July. 1982a.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DENIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. Nerve Regeneration in Silicone Chambers: Influence of Gap Length and of Distal Stump Components. **Experimental Neurology**, v. 76, p. 361-375. 1982b.

MACKINNON, S.E.; NOVAK, C.B. Nerve Transfers. New options for reconstruction following nerve injury. **Hand Clin.**, v. 15, n. 4, p. 643-666. 1999.

MEDINACELI, L.; FREED, W.J. Peripheral Nerve Reconnection: Immediate Histologic Consequences of Distributed Mechanical Support. **Experimental Neurology**, v. 81, p. 459-468. 1983.

MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. Peripheral Nerve Reconnection: Improvement of long-term functional effects under simulated clinical conditions in the rat. **Experimental Neurology**, v. 81, p. 488-496. 1983.

MEDINACELI, L.; SEABER, A.V. Experimental nerve reconnection: Importance of initial

- repair. **Microsurgery**, v. 10, p. 56-70. 1989.
- MEDINACELI, L.; MERLE, M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by "cell surgery". **Hand Surg.**, St. Louis, v. 16B, n.5, p. 495-498, Dec. 1991.
- MEDINACELI, L.; LEBLANC, A.; MERLE, M. Functional consequences of isolated nerve stretch: experimental long-term static loading. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 13, n. 3, p. 185-192. Apr. 1997.
- MELLICK, R.S.; CAVANGH, J.B. Changes in blood vessel permeability during degeneration and regeneration in peripheral nerves. **Brain**, v. 91, p. 141-160. 1968.
- MIDGLEY, R.D.; WOOLHOUSE, F. M. Silastic sheathing technique for the anastomoses of nerves and tendons. **Can. Med. Assoc. J.**, Ottawa, v. 98, n.16, p. 550-551, Mar. 1968.
- MILLES, H.; MEISSL, G.; BERGER, A. The Interfascicular Nerve-Grafting of the Median and Ulnar Nerves. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 54-A, n. 4, p. 727-750. June. 1972.
- MILLES, H. Microsurgery of Peripheral Nerves. **World Journal of Surgery**, v. 3, p. 67-79. 1979.

MORRIS, J.H.; HUDSON, A.R.; WEDDELL, G. A Study of Degeneration and Regeneration in the Divided Rat Sciatic Nerve Based on Electron Microscopy. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 124, p. 103-130. 1972.

NARAKAS, A. The use of Fibrin Glue in Repair of Peripheral Nerves. **Orthop. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 187-199, Jan. 1988.

NICHOLSON, O. R.; SEDDON, H. J. Nerve repair in civil practice. **Br. Med. J.**, London, v. II, p. 1065-1071. Nov. 1957.

O'DALY, J.A.; IMAEDA, T. Electron Microscopic Study of Wallerian Degeneration in Cutaneous Nerves Caused by Mechanical Injury. **Laboratory Investigation**. V. 17, n. 6, p. 744-766. 1967.

OLIVER, J. E.; LORENZ, M. D.; KORNEGAY, J. N. Paresis of one limb. In: **Handbook of veterinary neurology**. Ed. W.B. Saunders Company, 3ª edição, 1997, p.111 – 127.

OLSSON, Y.; KRISTENSSON, K. The Perineurium as a Diffusion Barrier to Protein Tracers Following Trauma to Nerves. **Acta Neuropath.**, v. 23, p. 105-111. 1973.

ORGEL, M.G.; TERZIS, J.K. Epineurial vs. Perineurial Repair. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 60, n. 1, p. 80-91. July. 1977.

- RAFF, M.; DURAND, B.; GAO, F. B. Cell number control and timing in animal development: the oligodendrocyte cell lineage. In -: **Simpósio das Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise e Biologia Celular**. São Paulo, 3 4 dezembro, 1998.
- SANDERS, F.K.; YOUNG, J.Z. The role of the peripheral stump in the control of fibre diameter in regenerating nerves. **Journal of Physiology**, v. 103, p. 119-136. 1944.
- SEDDON, H.J. The three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, p. 237. 1943.
- SHANTHAVEERAPPA, T.R.; BOURNE, G.H. The Perineural Epithelium: Nature and Significance. **Nature**, v. 199, n. 4893, p. 577-579. 1963.
- SHANTHAVEERAPPA, T.R.; BOURNE, G.H. Perineural Epithelium: A New Concept of its Role in the Integrity of the Peripheral Nervous System. **Science**, v. 154, n. 3755, p. 1464-1467. 1966.
- SMAHEL, J.; MEYER, V. E.; MORGENTHALER, W. Silicone cuffs for peripheral nerve repair: experimental findings. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 9, n. 4, p. 293-297, July. 1993.
- SON, Y-J.; TRACHTENBERG, J.T.; THOMPSON; W.J. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. **Trends Neurosci.**, v. 19, n 7, p. 280-285. 1996.

- SOUZA, M.V. **Neurotoxicidade tardia experimentalmente induzida por haloxon em ovinos.**
Santa Maria – RS, 1993. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – UFSM
- SOUZA, M.V.; GRAÇA, D.L.; FERRÃO, S.M.N.; CONTESINI, E.A. Regeneration of peripheral nerve fibres following Haloxon-induced Degeneration. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v. 33, n. 4, p. 231-234. 1996.
- STENSAAS, L.; MONTI BLOCH, L.; GARCIA, R.; SOTELO, J. Snug tubular enclosures reduce extrafascicular axonal escape at peripheral nerve repair sites. **Experimental Neurology**, v. 103, p. 135-145. 1989.
- STOPIGLIA, A. J.; ERHART, E. A. Utilização de técnica microcirúrgica na neurorrafia de animais domésticos. Estudo experimental da reparação fascicular no nervo ulnar de cão (*Canis familiaris*). **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São. Paulo**, v. 24, n. 2, p. 193-208. 1987.
- SUEMATSU, N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. **Microsurgery**, New York, v. 10, n. 1, p. 71-74. 1989.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; de LAHUNTA, A. Diseases of de peripheral nervous systems. In: -. **Veterinary neuropathology**, ed. Mosby, 1995, p. 402 – 495.

- TARLOV, I. M.; DENSLOW, C.; SWARZ, S.; PINELES, D. **Archives of surgery**, v. 47, n 44, p. 44 – 58, 1943.
- THOMAS, P.K. The cellular response to nerve injury. 1. The cellular outgrowth from the distal stump of transected nerve. **Journal of Anatomy**, v. 100, p. 287-303. 1966.
- TRUMBLE, T.E.; McCALLISTER, W.V. Repair of Peripheral Nerve Defects in the upper extremity. **Hand Clin.**, v. 16, n. 1, p. 37-52. 2000.
- TSUGE, K.; YOSHIKAZU, I.; SAKAUE, M. A new technique for nerve suture. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 496-500. Nov. 1975.
- TUPPER, J.W.; CRICK, J.C.; MATTECK, L.R. Fascicular Nerve Repairs. A Comparative Study of Epineurial and Fascicular (Perineurial) Techniques. **The Orthopedic Clinics of North America**, v. 19, n. 1, p. 57-69. January. 1988.
- UZMAN, B.G.; SNYDER, D.S.; VILLEGAS, G.M. Status of Peripheral Nerve Regeneration. In: SEIL, F.J. **Neural Regeneration and Transplantation**. New York: Alan R. Liss, 1989. 294p. p. 15-28.
- VARITIMIDIS, S.E.; SOTEREANOS, D.G. Partial Nerve Injuries in the upper extremity. **Hand Clin.**, v. 16, n. 1, p. 141-149. 2000.

- VAN NES, J.J. Electrophysiological evaluation of traumatic forelimb paralysis of the dog. **Research in Veterinary Science**, v. 40, p. 144-147. 1986.
- VUORINEN, V.; SIIRONEN, J.; RÖYTTÄ, M. Axonal regeneration into chronically denervated distal stump. **Acta Neuropathol.**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 209-218. 1995.
- WANG, H.; TESSIER-LAVIGNE, M. En passant neurotrophic action of an intermediate axonal target in the developing mammalian CNS. **Nature**, v. 401, p. 765 – 769, 1999.
- WEISL, H.; OSBORNE, G.V. The pathological changes in rats' nerves subject to moderate compression. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 46-B, n. 2, p. 297-306. May. 1964.
- WEISS, P.; DAVIS, H. Pressure Block in Nerves Provided with Arterial Sleeves. **Journal of Neurophysiology**, v. 6, p. 269-286. 1943.
- WISE JR., A. J., TOPUZLU, C., DAVIS, P.; KAYE, I.S. A comparative analysis of macro- and microsurgical neuroorrhaphy technics. **Am. J. Surg.**, Newton, v. 117, n. 1, p. 566-572. Jan. 1969.
- YOUNG, J.Z.; MEDAWAR, P.B. Fibrin Suture of Peripheral Nerves. Measurement of the rate of regeneration. **The Lancet**, v. 239, p. 126-128. 1940.

YOUNG, J.Z.; HOLMES, W.; SANDERS, F.K. Nerve Regeneration. Importance of the peripheral stump and the value of nerve grafts. **The Lancet**, v. 239, p. 128-130. 1940.