RODRIGO DE GOUVEIA FRANCO

**“Estudo Comparativo com diferentes
números de pontes na neurorrafia
término-lateral em ratos”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Botucatu
2010**

RODRIGO DE GOUVEIA FRANCO

**“Estudo Comparativo com diferentes
números de pontes na neurorrafia
término-lateral em ratos”**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Mestre em Bases Gerais
da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

**Botucatu
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Franco, Rodrigo de Gouveia.

Estudo comparativo com diferentes números de pontes na
neurorrafia término-lateral em ratos / Rodrigo de Gouveia Franco. –
Botucatu : [s.n.], 2010.

One, two and three nerve grafts with end-to-side neurorrhaphy: An
experimental study.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Fausto Viterbo

Assunto CAPES: 40102017

1. Nervos - Enxerto 2. Neurorrafia

CDD 617.483

Palavras-chave: Eletrofisiologia; Histologia; Nervo periférico;
Neurorrafia término-lateral; Ratos

Dedicatória

*À minha esposa Andréa e aos meus filhos
Beatriz e Bruno.*

Agradecimientos

Ao Professor Dr. Fausto Viterbo pela dedicação e pelo espírito incansável e contagiante de pesquisador. Também pela sua gentileza e hospitalidade

Aos funcionários da Cirurgia Experimental

Aos funcionários da Seção de pós-graduação e à Símona (secretária do programa em Bases Gerais da Cirurgia)

À bióloga Dra. Elisângela Stipp Brambilla pela ajuda inestimável na contagem e análise das lâminas

Ao GAP (Grupo de Apoio à Pesquisa), em especial à Dra. Líciana pela análise estatística

Sumário

Resumo	10
Abstract	12
1. Introdução	14
2. Objetivo	27
3. Método	29
3.1 Animais	30
3.2 Cirurgia	30
3.3 Testes realizados	34
3.4 Coleta das peças histológicas e sacrifício	38
3.5 Processamento histológico do músculo tibial cranial	39
3.6 Processamento histológico dos Segmentos nervosos	41
3.7 Análise Estatística	43
4. Resultados	44
4.1. Massa Corporal	45
4.2. Massa do Músculo Tibial Cranial Direito.....	47
4.3. Índice de Massa Muscular (IMM).....	48
4.4. Teste Eletrofisiológico.....	49
4.5. Teste de avaliação da marcha.....	51
4.6. Análise morfométrica do músculo tibial cranial.....	52
4.7. Análise morfométrica dos segmentos nervosos.....	56
5. Discussão	74
5.1. Teste da Marcha	79
5.2. Teste Eletrofisiológico.....	79
5.3. Análise do músculo tibial cranial direito (MTCD).....	80
5.4. Análise dos segmentos nervosos.....	82
6. Conclusão	84
7. Referências Bibliográficas	86
Anexo	111

Resumo

A neurorrafia término-lateral é técnica consagrada em casos onde não há coto proximal após lesão de nervo periférico. O coto distal pode ser suturado na lateral de qualquer nervo ou receber enxerto de nervo unindo a sua face lateral à face lateral de outro nervo, atuando como uma ponte. O número de enxertos em ponte poderia aumentar o resultado da reinervação muscular? Para responder esta pergunta realizou-se este trabalho. Foram operados 100 ratos Wistar divididos em cinco grupos experimentais com 20 animais cada. O GN (grupo controle de normalidade) não sofreu nenhum procedimento. No GD (grupo controle de desnervação) o nervo fibular foi seccionado e ambos os cotos foram suturados em músculos adjacentes e distantes entre si. O G1 recebeu um enxerto (ponte de nervo sural) tendo uma de suas extremidades suturadas na face lateral do nervo tibial (NT) e a outra na face lateral do segmento distal do nervo fibular (NF). No G2 e no G3 foram realizados os mesmos procedimentos que no G1. O G3 com 3 e o G2 com 2 enxertos. Em todos os casos foram utilizadas neurorrafias término-laterais (NTL) tipo “embracing” sem retirada de janela de epineuro. Os animais foram sacrificados após 120 dias. Foram realizados testes de marcha (“Walking-tracks”) e testes eletrofisiológicos além de aferição da massa dos animais e dos músculos tibiais craniais direitos (MTCD). Segmentos de nervo de interesse também foram coletados. Foram realizadas análises histomorfométricas das fibras musculares e nervosas. Após análise global dos atributos do MTCD como massa, IMM (índice de massa muscular), área, menor e maior diâmetro das fibras musculares, número de fibras por campo, análise funcional (IFC –índice funcional do ciático), análise eletrofisiológica e análise morfométrica dos segmentos nervosos mais importantes, concluímos que não houve benefício com o aumento do número de pontes.

Palavras-chave: neurorrafia término-lateral, nervo periférico, ratos, histologia, eletrofisiologia.

Abstract

The end-to-side neurorrhaphy technique is enshrined in cases where there is no proximal stump after peripheral nerve injury. The distal end can be sutured to the side of any nerve. We also can use a nerve graft joining the lateral face of the distal end to the lateral face of another nerve, serving as a bridge. The number of bridges would increase the outcome of muscle reinnervation? To answer this question took place this work. Were operated on 100 rats divided into five groups with 20 animals each. GN (normal control group) received no further procedure. For GD (control group denervation) the peroneal nerve was transected and both stumps were sutured to adjacent muscles and far between. G1 received one graft (sural nerve bridge) having one end stitched on the side of the tibial nerve (NT) and the other on the side of the distal segment of the peroneal nerve (NF). In G2 and G3 were performed the same procedures as in G1. G3 with three and G2 with two grafts. In all cases were used end-to-side neurorrhaphies (NTL) performed as "embracing" without removing epineural window. The animals were sacrificed after 120 days. We performed tests of gait ("Walking-tracks") and electrophysiological tests in addition to measuring the mass of animals and also the mass of cranial tibial muscles (MTCD). Nerve segments of interest were also collected. We performed histomorphometric analysis of muscle fibers and nerves. After comprehensive analysis of attributes such as mass MTCD, IMM (body mass index), area, smaller and larger diameter of muscle fibers, number of fibers per field, functional analysis (IFC, sciatic functional index), electrophysiological and morphometric analysis of the most important nerve segments, we conclude that there was no benefit to increasing the number of bridges.

Keywords: end-to-side neurorrhaphy, peripheral nerve, rats, histology, electrophysiology.

1. Introdução

A reparação nervosa tem sido alvo de estudos desde o século IV A.C. quando Hipócrates descreveu o sistema nervoso periférico, pregando em seus ensinamentos a incapacidade dos nervos periféricos se regenerarem após uma lesão. Não houve relatos a cerca da regeneração nervosa até Galen que viveu de 131 a 201 d.C. e estudou as lesões dos nervos periféricos, relatando sua incrível capacidade de regeneração. A primeira referência de reparo cirúrgico de um nervo lesado foi feita por Rhazes (850-932) e Avicenna (980-1037). Discreta foi a evolução da cirurgia nervosa periférica durante a idade média, devido aos poucos conhecimentos da anatomia, fisiologia e capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico. Indubitavelmente a cirurgia nervosa periférica moderna apóia-se nas descobertas ocorridas durante o século XVI e XX, como a da natureza excitável dos nervos (Glisson), sua estrutura microscópica (Leewenhoek), a descrição da mielina e do axônio (Fontana) (apud Brushart & Seiler, 1987; Sunderland, 1991; Zhao et al., 1992).

As fibras nervosas são envoltas por uma cadeia de células de Schwann justapostas que existem no nervo em duas formas: as células formadoras da bainha de mielina e as não formadoras da bainha de mielina (Frostick & Kemp, 1998). Dependendo da presença ou não da bainha de mielina, as fibras nervosas são classificadas como mielínicas ou amielínicas (Hollinshead & Rose, 1991; Erhart, 1992). Nas fibras mielínicas um axônio está associado a uma célula de Schwann formadora da bainha de mielina; enquanto que, nas fibras amielínicas, uma célula de Schwann envolve grande número de axônios, sem formar a bainha de mielina.

As fibras nervosas são subdivididas em fascículos e estes são envoltos pelo perineuro (Lundborg, 1987). O perineuro é formado por tecido conjuntivo dos tipos I e III (Montes et al., 1984), e por fibroblastos dispostos em lamelas que atuam como barreira difusora e mecânica ao trauma externo, ajudando a preservar o microambiente intrafascicular (Olsson & Kristensson, 1971, 1973).

Envolvendo todos os fascículos encontramos o epineuro. Este serve como barreira protetora para os fascículos durante os movimentos corporais e os protegem de traumas externos. A quantidade de epineuro varia entre os

nervos, e é mais abundante ao redor das articulações. No epineuro estão presentes fibroblastos, macrófagos e mastócitos como em qualquer tecido conjuntivo frouxo (Lundborg, 1987).

Em 1850, August Waller descreveu o fenômeno da degeneração e a perda dos elementos distais do nervo após sua lesão, conhecida por degeneração Walleriana e que veremos adiante.

As lesões de nervos recebem diversas classificações, sendo as mais conhecidas a de Seddon (1943) e a de Sunderland (1968).

Seddon (1943) definiu três graus de lesão do nervo: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese.

A neuropraxia, ou lesão tipo I de Sunderland (1968), é caracterizada pela perda de condução sem alterações estruturais no axônio. A lesão apresenta-se exclusivamente na bainha de mielina com alta chance de recuperação funcional (Lundborg, 1987). A velocidade de condução pode estar diminuída se estiver associada à desmielinização, retornando ao normal com a remielinização (Kimura, 1987).

Axoniotmese, ou lesão tipo II de Sunderland (1968), é a perda da continuidade axonal resultando em degeneração Walleriana do segmento distal. Neste tipo de lesão os tubos endoneurais permanecem intactos, o que torna o prognóstico bom, apesar da ocorrência de degeneração axonal (Lundborg, 1987; Dimeglio, 1990). Segundo Kimura (1987), estudos de condução nervosa no local da lesão são inúteis em diferenciar neuropraxia de axoniotmese, pois o bloqueio total da condução pode ocorrer em ambas. Porém, a velocidade de condução pode permanecer normal na axoniotmese parcial, onde algumas fibras nervosas permanecem funcionais (Eyzaguirre & Fidone, 1977).

A neurotmese (Seddon, 1943) é a lesão que resulta da secção total do nervo. A regeneração é possível, porém incompleta e pobremente organizada (Kimura, 1987). Segundo Lundborg (1987), a neurotmese é a perda da continuidade de alguns ou de todos os elementos remanescentes do nervo, incluindo tubos endoneurais, perineuro e epineuro.

Sunderland (1968) propôs três subdivisões à neurotmeose de Seddon. Na lesão do tipo III o perineuro e a arquitetura da bainha são preservados, enquanto que o axônio e o tecido circundante estão danificados. A regeneração ocorre, mas é menos efetiva que na axoniotmeose. Na lesão do tipo IV o perineuro também é danificado, mas o nervo mantém sua continuidade. Neste tipo de lesão alguma regeneração pode ocorrer, porém, mal orientada e requer intervenção cirúrgica. A lesão do tipo V representa a completa separação dos cotos nervosos com perda de continuidade e o nervo deve ser suturado, frequentemente requerendo enxerto de nervo (Kimura, 1987).

Após uma lesão de nervo ocorre uma série de alterações celulares no segmento distal do nervo e em alguns nodos terminais do coto proximal (De Medinaceli & Merle, 1991; Frostick et al., 1998; Ferreira, 1999). Estas alterações foram relatadas por Waller, em 1850; futuramente, após estudos mais profundos de Ranvier, em 1878, e Ramón-y-Cajal, em 1928, foram possíveis a observação e a descrição da degeneração da bainha de mielina (Koeppen, 2004).

No segmento distal do nervo lesado ocorre proliferação de células de Schwann, porém estas não apresentam função fagocitária, que é realizada por macrófagos que migram de fora do nervo (Beuche & Friede, 1984). Além dos macrófagos, migram, em menor quantidade, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (Mueller et al., 2003). Esta resposta imunológica facilita a remoção de axônios e debris de mielina (Perrin et al., 2005) e a produção de citocinas e fatores neurotróficos que são benéficos para a regeneração axonal (Dahlin, 1995).

Após degeneração dos constituintes neurais permanecem os tubos de células de Schwann e colágeno, ou bandas de Büngner, reiniciando o processo de remielinização de brotamentos axoniais (Koeppen, 2004).

A coluna de células de Schwann é uma via indispensável para o crescimento axonal, propiciando ambiente favorável para a regeneração. O axônio em regeneração cessará de crescer caso adentre o tecido conectivo ao invés da coluna de células de Schwann (Ide, 1996).

Os axônios no coto proximal de um nervo lesado produzem grande número de brotamentos colaterais e terminais que avançam em direção ao coto distal (Lundborg, 1987).

Os brotamentos colaterais são produzidos nos nodos de Ranvier localizados próximos ao coto proximal da lesão (Hopkings & Slak, 1981; McQuarrie, 1985). Múltiplos brotamentos podem ser produzidos por nodo.

Na porção mais distal de cada brotamento há o cone de crescimento onde podem ser observadas filopodias. Estas filopodias exploram o ambiente através de movimentos constantes. Os cones de crescimento preferem substratos que apresentem adesividade, sendo que as propriedades físicas e químicas do substrato são essenciais para o desenvolvimento dos cones de crescimento (Lundborg, 1987).

Os brotamentos crescem do coto proximal do nervo em direção ao segmento distal. Devido ao grande número de brotamentos que invadem as colunas de células de Schwann no coto distal, o número total de axônios no segmento distal pode exceder, consideravelmente, o número de axônios do coto proximal. No entanto, o número de axônios diminui à medida que os brotamentos que não realizaram conexão com o órgão alvo desaparecem (Lundborg, 1987).

Quando a lesão no nervo causa interrupção da continuidade axonal, sem perda de tecido, com possibilidade de aproximação dos cotos, é utilizada neurorrafia para reaproximação direta destes cotos (Braun, 1982). Nestes casos a sutura livre de tensão é fundamental para evitar a isquemia e a fibrose (Terzis et al., 1975; Sunderland, 1978).

As técnicas de reparo cirúrgico de nervo alcançaram grande progresso após a introdução do uso do microscópio por Smith (1964), o que tornou possível a obtenção de melhores resultados funcionais.

Watchmaker & Mackinnon (1997) afirmaram que, para a obtenção de resultados satisfatórios em um reparo de nervo, é fundamental a utilização de equipamentos como lupa ou microscópios, material adequado e específico, conhecimento da técnica microcirúrgica, reparo primário sempre que possível.

Caso seja necessário, o reparo secundário deve ser realizado em até três semanas, com aproximação dos cotos livres de tensão. Se houver tensão ou perda de tecido nervoso (“gap”), deve-se realizar enxerto de nervo. A reeducação sensitiva e motora pode melhorar os resultados.

Em 1947, Seddon afirmou que o enxerto de nervo autógeno era a única alternativa eficaz no tratamento de lesões com perda de tecido nervoso, e que o diâmetro do enxerto não deveria ser maior que o do nervo receptor para evitar a necrose central.

Porém, muitos outros tecidos têm sido utilizados: enxerto de um segmento de vaso sangüíneo na posição normal (Bunnell & Boyes, 1939; Fields et al., 1989; Fawcett & Keynes, 1990), ou ao avesso (Ferrari et al., 1999); enxerto venoso preenchido com músculo esquelético (Battiston et al., 2000; Fornaro et al., 2001); tubo de pericárdio bovino (Virmond & Pereira, 2000); tubo fibrocolagenoso envolto em fáscia (Watanabe et al., 2001).

O uso de material sintético no reparo de nervo, como polietileno, silicone, metal, plástico, celulose, polímero de ácido glicólico, combinados ou não com agentes bioquímicos neurotróficos, tem sido estudado por muitos autores (Lundborg et al., 1982; Fields et al., 1989; Evans et al., 1991; Frykman, 1993; Dellon, 1994; Watchmaker & Mackinnon, 1997; Watanabe et al., 2001; Wang et al., 2005).

Em todas estas técnicas é importante a união adequada dos cotos para que o axônio em regeneração alcance a extremidade distal do nervo lesado. Esta observação levou muitos autores a estudar a regeneração nervosa através de adesivos biológicos (Cooper & Falb, 1968; Boedts & Boukaert, 1984; Boedts, 1987; Moy et al., 1988; Nishihira & McCafrey, 1989; Jin et al., 1990; Daunois & Sébille, 1991; Bertelli & Mira, 1993).

Dentre os adesivos biológicos utilizados que alcançaram boa regeneração nervosa, podemos citar a cola de fibrina derivada de veneno de serpente (Viterbo et al., 1993b; Iuan et al., 1995; Reis et al., 1998; Vicente et al., 1998; Reis & Rodrigues, 2000).

A reaproximação dos cotos através de sutura direta do nervo, ou seja, neurorrafia témino-terminal (NTT), é preferível a todas estas técnicas, pois apresenta os melhores resultados (Terzis et al., 1975; Millesi, 1982; Ide, 1983; Lundborg, 1987; Zhao et al., 1997; Santamaria et al., 1999; Yüksel et al., 1999; Rovak et al., 2001).

A NTT pode ser realizada através de suturas epineurais, perineurais ou epiperineurais.

Segundo Braun (1982), a sutura epineural é relativamente não traumática e de fácil execução, devido às características do epineuro, que permitem aproximar os cotos distais e proximais sem entrar em contato direto com os elementos neurais verdadeiros. Além disso, esta sutura preserva o tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos existentes abaixo do epineuro, de grande importância para evitar a formação de tecido cicatricial.

Evans et al. (1991) compararam a NTT realizada com os fascículos alinhados ou não. Segundo estes autores, a recuperação funcional na neurorrafia com o correto alinhamento dos fascículos foi superior, e afirmaram que o alinhamento fascicular é fator importante no reparo de um nervo. Porém, segundo Lundborg (1987, 2000), não é um fator imprescindível.

A sutura perineural foi realizada por diversos autores visando à obtenção de um perfeito alinhamento entre os fascículos de um nervo seccionado (Rosegay & Edwards, 1980; Braun, 1982; Stopiglia & Erhart, 1987).

Este tipo de sutura permite a boa orientação fascicular em nervos monofasciculares ou com poucos fascículos (Millesi, 1973; Bora et al., 1976; Orgel & Terzis, 1977; Terzis, 1979; Kline et al., 1981; Kutz et al., 1981; Millesi, 1981).

Segundo Bora (1967), esta técnica apresenta a desvantagem de causar lesões no suprimento vascular do nervo durante a dissecação dos fascículos para seu alinhamento.

Trabalhos realizados comparando as técnicas de neurorrafia epineural ou perineural não demonstraram diferença significativa entre as duas técnicas (Braun, 1982; Lundborg, 1987).

Ferreira et al. (1974) e Venault et al. (1981) afirmaram que, em nervos multifasciculares, uma melhor coaptação é obtida por meio da aproximação individual de fascículos através da associação de duas técnicas de sutura, a epineural e a perineural (fascicular). A sutura epiperineural foi proposta por Ferreira et al. (1974), aconselhando a utilização de mínima tensão na sutura.

A NTT é a forma mais compatível com o processo anatomopatológico da regeneração nervosa, ou seja, existência de um coto proximal com axônios em regeneração penetrando em um tubo endoneural vazio após degeneração Walleriana. Assim, esta técnica deve ser a técnica de escolha quando se dispõe de um coto proximal e outro distal (Viterbo, 1992a).

Em casos onde há perda do coto proximal, a opção é seccionar um nervo vizinho e suturar seu coto proximal ao coto distal do nervo lesado. Porém, esta técnica causa prejuízo funcional ao nervo doador e às estruturas por ele inervadas (Harris & Tindall, 1991; Lohman et al., 1997).

Uma opção para evitar o sacrifício do nervo doador é a neurorrafia término-lateral (NTL), onde um nervo é suturado na lateral de outro, este último servindo como nervo doador.

A NTL foi executada pela primeira vez em 1895, por Ballance (apud Ballance et al., 1903), que suturou o coto distal do nervo facial seccionado à uma incisão na lateral do nervo acessório espinhal para tratamento da paralisia facial. Estes autores observaram retorno dos movimentos faciais, porém associados aos movimentos dos ombros. Kennedy (1899) sugeriu técnica similar à de Ballance et al. (1903), entretanto, realizou incisão maior no nervo doador deixando intacto apenas o epineuro do lado oposto à NTL, obtendo os mesmos resultados (apud Papalia et al. 2007).

Sherren (1906) relatou o uso do nervo hipoglosso como doador na NTL, mas a inconveniência dos movimentos associados persistiu. Este autor

sugeriu que fosse realizada incisão longitudinal ou transversal no nervo doador para aumentar o contato entre os axônios deste e do nervo receptor.

Estes métodos apresentavam prejuízos funcionais como resultado da desnervação de músculos inervados pelos nervos doadores acessório espinhal e hipoglosso. Provavelmente, esta foi a causa que levou Babcock (1927) a sugerir o abandono desta técnica.

Desde então, houve uma interrupção no relato de utilização da NTL até a publicação de Krivolutskaia et al. (1989). Estes autores trataram alguns casos de paralisia do ramo mandibular suturando seu coto distal à lateral do ramo bucal do nervo facial. Antes da sutura estes autores realizaram ranhuras na lateral do nervo doador com uma agulha. Estes autores afirmaram ter alcançado completa recuperação funcional em quatro dos sete pacientes operados.

May et al. (1991) suturaram o coto distal do nervo facial lesado ao nervo hipoglosso parcialmente seccionado e minimizaram subsequentes danos funcionais à língua.

Em todas estas técnicas foi criada uma lesão na lateral do nervo doador no local da NTL. Tanto as incisões (Ballance et al., 1903; Sherren, 1906; May et al., 1991) ou ranhuras (Krivolutskaia et al., 1989), quebraram as barreiras de tecido conectivo permitindo o crescimento de axônios para dentro dos nervos receptores. Além disso, a secção de fibras axoniais do nervo doador no local da incisão levava a uma união término-terminal entre os tubos endoneurais do nervo doador e do nervo receptor.

Em 1992, Viterbo et al. introduziram a NTL sem lesão no nervo doador. No primeiro estudo em ratos, eles suturaram o coto distal do nervo fibular comum na lateral do nervo tibial, sem incisão ou abertura de janela epineural. Nenhum prejuízo ao nervo doador ou às estruturas por ele inervadas foi observado. Estes autores relataram um novo fenômeno, o crescimento de axônios do nervo intacto para o coto distal do nervo receptor.

Viterbo et al (1994 a, 1994 b) publicaram estudo semelhante ao anterior porém com janela de epineuro e perineuro, com e sem enxerto de nervo, unindo o nervo tibial ao coto distal do nervo fibular.

Os resultados obtidos por Viterbo et al. (1992, 1994 a, 1994 b) foram ratificados por trabalhos posteriores (Lundborg et al., 1994b; Lohman et al., 1997; Ting et al., 1998; Rovak et al., 2000; Matsuda et al., 2005).

A grande discussão passou a ser a possível contaminação motora do coto distal por axônios originários do coto proximal, pois isto invalidaria a conclusão apresentada por Viterbo et al. (1992, 1994a).

Para prevenir a contaminação do coto proximal, Viterbo et al. (1992, 1994a); e Kalliainen et al. (1999), inseriram a extremidade do coto proximal do nervo fibular comum em músculos adjacentes. Aperfeiçoando e dando mais segurança a este objetivo, Zhang et al. (1998) transfixaram o músculo logo abaixo da pele e fixaram a extremidade do coto proximal do nervo fibular à face mais externa deste músculo. Ao suturar-se a incisão muscular este coto fica localizado em outro compartimento praticamente excluindo qualquer possibilidade de contaminação motora.

Após confirmação da eficácia da NTL através de diversos estudos experimentais, que demonstraram que brotamentos colaterais, tanto de nervos sensoriais quanto de nervos motores, reinervaram nervos receptores (Noah et al., 1997b; Shah et al., 1997; Zhao et al., 1997) e que os resultados eram comparáveis aos obtidos com NTT (Lohman et al., 1997; Yüksel et al., 1999; Kalliainen et al., 1999) vários trabalhos surgiram relatando seu uso clínico.

A NTL tem sido utilizada para recuperação de lesões de nervos nos membros superiores. Viterbo et al. (1995) realizaram vários enxertos utilizando NTL para unir o nervo frênico aos troncos C5 e C6 do plexo braquial avulsionado. Os autores relataram que exames de eletromiografia revelaram o aumento de uma para três unidades motoras nos músculos tríceps, peitoral maior e infra-espinhal após um ano da cirurgia. Afirmaram que pacientes com lesões graves de plexo braquial podem esperar melhoras motoras no membro superior devido às neurotizações obtidas com NTL.

Franciosi et al. (1998) relataram o tratamento de três pacientes com rupturas das raízes C5, C6 e C7 usando NTL. O nervo musculocutâneo foi cortado e suturado à lateral do nervo ulnar. Os autores relataram o retorno de contração do músculo bíceps após período de quatro a seis meses.

No mesmo ano, Mennen (1998a) sugeriu a utilização de NTL no reparo de lesões do plexo braquial. Ele concluiu que, na maioria dos casos, esta técnica demonstrou-se simples e com bons resultados. Outros dois trabalhos publicados por Mennen, em 2003, relataram a recuperação quase total da sensibilidade e/ou da função motora (Mennen, 2003; Mennen et al., 2003).

Ogun et al. (2003) utilizaram NTL para unir o nervo mediano lateralmente ao nervo ulnar. Após 38 meses, eles obtiveram recuperação da sensibilidade em todos os pacientes. No entanto, a recuperação motora foi observada em apenas um de três pacientes. Eles concordaram que a NTL é uma boa alternativa para o enxerto de nervo em pacientes que apresentem grande distância entre as extremidades dos nervos lesados.

Voche (2005) e Voche & Ouattara (2005) trataram lesões traumáticas nas mãos e dedos utilizando NTL com janela epineural, com resultados comparados aos de enxertos de nervos ou veias, confirmando os resultados de Mennen (1998a, 2003) e Mennen et al. (2003). Millesi (2004) também utilizou NTL em trauma de plexo braquial relatando bons resultados.

A NTL também tem sido utilizada na recuperação da sensibilidade. Viterbo et al. (1993a) relataram o uso de NTL, após remoção de enxerto de nervo sural, entre o coto distal do nervo sural e a lateral do nervo fibular comum superficial. Afirmaram que, apesar da remoção do nervo sural, os pacientes não apresentaram área de anestesia naquela região, mostrando que esta técnica previne sequelas sensoriais.

Doncatto (1995) usou a mesma técnica desenvolvida por Viterbo para a reinervação do retalho transversal do músculo reto abdominal na reconstrução mamária.

Santamaria et al. (1999) compararam NTT e NTL sem remoção de janela epineural para promover a recuperação de sensibilidade ao toque, dor,

sensações térmicas após utilização de retalhos nervados pelo nervo radial para reconstrução de hemiglossectomia. Os resultados de sensibilidade à dor, obtidos com o uso de NTL, foram inferiores aos obtidos com o uso de NTT, mas a recuperação sensorial ocorreu em todos os pacientes.

Viterbo & Ripari (2002, 2008) descreveram o uso de NTL para restaurar a sensibilidade em pacientes paraplégicos. Estes autores uniram, através de enxerto de nervo sural, os nervos intercostais acima da lesão ao nervo ciático com NTL, em dois pacientes. O primeiro paciente recuperou, após quatro anos, sensibilidade de 2 g em T10 a L1 e 300 g em L2 e L3. O segundo, após três anos, recuperou sensibilidade de 2 g em T10, 4 g em T11 e 300 g em T12, e relatou que podia sentir quando a bexiga urinária estava cheia. Após a cirurgia, os pacientes não apresentaram mais úlceras de pressão.

Outra utilização clínica da NTL tem sido no tratamento da paralisia facial (Viterbo, 1993; Yoleri et al., 2000; Galli et al., 2002; Koh et al., 2002; Kumar & Hassan, 2002; Yamamoto et al., 2003; Frey et al., 2006).

Viterbo (1992b) propôs a técnica do enxerto de nervo transfacial com neurorrafia término-lateral. Nesta técnica é realizada uma incisão pré-auricular, e o enxerto de nervo sural é suturado ligando o tronco do nervo facial sadio ao tronco do nervo facial lesado através de NTL, sem seccioná-los. De acordo com o autor, a vantagem desta técnica é possibilitar uma aplicação precoce, pois não há necessidade de secção de nervos em ambos os lados, sadio e lesado, o que permitiria a utilização precoce e também de inúmeros enxertos.

Em 1993, Viterbo descreveu uma modificação desta técnica para utilização em pacientes com paralisia facial superior a um ano. Nesta técnica uma das extremidades do nervo sural é suturada à lateral intacta do nervo facial sadio através de NTL, e a outra extremidade é suturada, após secção, ao coto distal do tronco do nervo facial lesado com NTT. A vantagem desta técnica é não causar lesão no nervo facial sadio e, teoricamente, aumentar a qualidade da inervação no lado lesado.

Em 2003, Labbé et al. aperfeiçoando a técnica descrita anteriormente (2000) de alongamento do temporal adicionaram um enxerto de nervo

transfacial. A extremidade superior do nervo sural foi suturada de maneira término-terminal a um dos ramos do nervo temporal profundo, que foi seccionado. A outra extremidade foi suturada a um ramo distal do nervo facial sadio (zigomático). Esta técnica permite que o músculo temporal seja acionado precocemente, após algumas semanas, ao morder, determinando o sorriso voluntário e, tardiamente, após a regeneração dos axônios via enxerto de nervo transfacial, de forma espontânea. Labbé et al. (2003) afirmaram que o enxerto de nervo parece ajudar a transposição muscular a obter melhor função facial e, portanto, aumenta a qualidade do sorriso espontâneo. Indicaram a dupla inervação do músculo temporal para crianças, adultos jovens ou naqueles pacientes onde a realização de fisioterapia é dificultada.

Apoiados na idéia de Viterbo (1992b), poderia-se usar inúmeros enxertos com NTL para correção de paralisia facial recente, como por exemplo 2 a 3 enxertos para ramos bucais, 2 a 3 enxertos para ramos têmporo-zigomáticos. Da mesma forma, inúmeros enxertos em ponte poderiam ser utilizados em outras patologias como lesões de plexo braquial, dentre outras. Em casos de escassez de nervos doadores haveria ainda a possibilidade do uso de tubulização para a regeneração nervosa com tecidos autólogos ou materiais aloplásticos conforme citados anteriormente.

O aumento no número de pontes (enxerto de nervo) com NTL poderia trazer melhores resultados. Verificar essa possibilidade determinou a realização deste trabalho.

2. Objetivo

Avaliar se o aumento do número de pontes (enxertos nervosos) entre o nervo doador e o receptor, realizadas através de suturas término-laterais, traz benefício no resultado morfológico e funcional.

3. Método

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia (cirurgias, teste da avaliação da marcha, coleta das peças histológicas, sacrifício dos animais) e no Laboratório de Urologia (teste eletrofisiológico, e confecção das lâminas histológicas), ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

3.1. Animais

Todo o procedimento realizado esteve de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob o protocolo nº. 438 da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu (anexo 1).

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, pesando em média 187,50.g Os animais foram divididos, através de sorteio, em cinco grupos experimentais. As cirurgias foram realizadas conforme o grupo no qual o animal foi incluído. Os animais foram sacrificados após 120 dias.

3.2. Cirurgia

Todos os procedimentos cirúrgicos e de coleta foram realizados pelo pesquisador, padronizando-se o método.

Precedendo cada procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/Kg i.p.), realizada tosquia e assepsia com PVPI (polivinilperrolidona-iodo).

Em todos os animais foi realizada incisão de dois centímetros no membro posterior direito. Os nervos ciático, fibular comum, tibial e sural foram dissecados.

No grupo GN ou controle de normalidade, nenhum outro procedimento foi realizado além da dissecação nervosa (Fig. 1).

No grupo GD ou controle de desnervação, o nervo fibular comum foi seccionado e o coto proximal foi invertido 180 graus, inserido em musculatura adjacente e fixado de forma a evitar a reinervação (Fig. 2).

Os grupos G1, G2 e G3 são semelhantes ao GD porém foram realizados um, dois ou três enxertos unindo a face lateral do nervo tibial (NT) à face lateral do nervo fibular (NF), respectivamente. Os enxertos foram retirados do nervo sural (Fig. 2).

Figura 1 – Esquema da cirurgia realizada no GN. NF = nervo fibular; NT = nervo tibial; MTC = músculo tibial cranial direito.

Figura 2 – Esquema da cirurgia realizada nos grupos GD, G1, G2, G3. NF = nervo fibular; NT = nervo tibial; MTC = músculo tibial cranial direito. Os pontos N1, N2, N3, N4, N5, N6 e N7 representam os segmentos onde os nervos foram coletados para análise.

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de microscópio cirúrgico DF Vasconcelos com aumento de 16 vezes.

As neurorrafias foram realizadas com monylon 10-0, sem retirada de janela de epineuro, tipo “embracing”. Após o procedimento, a incisão foi suturada com pontos simples utilizando-se fio monofilamentar de náilon 4-0 (Fig. 3).

Figura 3 – Esquema mostrando a sutura do tipo “embracing”.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas contendo cinco animais cada, em temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, até o momento do sacrifício.

3.3. Testes realizados

Todos os testes foram realizados e os resultados analisados pelo pesquisador padronizando-se o método.

Teste de avaliação da marcha

Antes do sacrifício os animais foram submetidos ao teste de avaliação da marcha (*Walking track analysis*)

As patas traseiras foram umedecidas em tinta nanquim preta e os animais induzidos a andar por um corredor de 78 cm X 9 cm, sobre uma folha de papel branco com dimensões apropriadas (Fig. 4).

Figura 4 – Teste da marcha (walking track analysis).

As pegadas deixadas na folha de papel branco foram analisadas através das medidas da distância entre os dedos da pata experimental (E: “experimental”) e os dedos da pata normal (N: “normal”); (TOF: “to opposite foot”, à outra pata); a distância do calcanhar aos dedos (PL: “print length”, comprimento da pegada); distância entre o primeiro e quinto dedos (TS: “total spreading”, largura da pegada); distância entre o segundo e quarto dedos (IT: “intermediary toes, dedos intermediários) (Fig. 5). A partir destas medidas foram realizados os cálculos do índice funcional do nervo ciático (IFC), segundo De Medinacelli et al. (1982).

$$\text{IFC} = \frac{\text{ETO} - \text{NTO}}{\text{NTO}} + \frac{\text{NPL} - \text{EPL}}{\text{EPL}} + \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} + \frac{\text{EIT} - \text{NIT}}{\text{NIT}} \times \frac{220}{4}$$

Figura 5 – Medidas realizadas para cálculo do índice funcional do nervo ciático (IFC). NTOF, ETOF – Normal, Experimental distance to opposite foot (distância à pata oposta). PL – print length (comprimento da pegada). TS - total spreading (largura da pegada). IT - intermediary toes (dedos intermediários).

Em alguns casos, os animais caminharam sobre o dorso da pata (Fig. 6) e, portanto, nenhuma medida pôde ser feita no lado experimental. Nestes casos, atribuíram-se os seguintes valores arbitrários: ETOF = um terço da distância entre duas pegadas normais; NTOF = dois terços da mesma distância; EPL = 80 mm; ETS = 6 mm e EIT = 6 mm, conforme recomendado por De Medinacelli et al. (1982).

Figura 6 – Exemplo de teste para os quais foram atribuídos os valores arbitrários de ETOF, NTOF, EPL, ETS, EIT.

Teste eletrofisiológico

Para a realização do teste eletrofisiológico a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C.

O teste eletrofisiológico foi realizado imediatamente antes do sacrifício dos animais.

Após anestesia com pentobarbital sódico (30 mg/kg, i.p.), os animais foram imobilizados em decúbito ventral. Foi realizada tosquia, assepsia e ampla incisão no membro posterior direito permitindo acesso aos nervos ciático, fibular comum, tibial, enxertos (pontes) nervosos e músculo tibial cranial. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência. O eletrodo ativo foi implantado no centro do músculo tibial cranial, e o de referência próximo ao tendão de inserção do músculo. A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita através de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para

este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2 mm. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo ciático ou tibial, anterior à região das neurorrafias, e a estimulação foi feita proximal à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através delas. A frequência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 μ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os cinco grupos. Foi utilizado o eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME (Fig. 7).

Figura 7 – Teste eletrofisiológico. A) Estimulação bipolar acima das pontes nervosas. B) Eletrodos de captação em agulha localizados no MTCD. C) Eletromiógrafo. D) Traçado eletrofisiológico.

Nos animais que não apresentaram resposta muscular ao estímulo elétrico os valores de latência tenderam ao infinito, sendo atribuído valor de 1000 ms para efeito de cálculo.

3.4. Coleta das peças histológicas e sacrifício

Após a realização do teste eletrofisiológico, procedeu-se à coleta de segmentos dos nervos fibular comum e tibial, das pontes, assim como à coleta do músculo tibial cranial direito .

Os músculos tibiais craniais direitos foram pesados sem o tendão e mantidos imersos em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento do processamento histológico.

O IMM (Índice de Massa Muscular) foi obtido dividindo-se a massa do MTCD da massa corporal do rato.

Os segmentos de nervo coletados foram fixados e mantidos em solução de Karnovisk e refrigerados a 4°C até o momento do processamento histológico. N1 é o segmento de nervo tibial proximal à NTL; N2 é o segmento de nervo tibial distal à NTL; N3 é o segmento de nervo fibular distal à NTL; N4 é o segmento correspondente à primeira ponte nervosa; N5, à segunda ponte; N6, à terceira ponte e N7 correspondente ao local da invaginação do coto proximal do nervo fibular na musculatura adjacente com intuito de observarmos a formação do neuroma a fim de descartar contaminação do coto proximal para o distal (Fig. 2).

Após a coleta das peças histológicas de interesse, os animais receberam dose letal de pentobarbital sódico, administrado intraperitonealmente.

3.5. Processamento histológico do músculo tibial cranial

Os músculos tibiais craniais direitos, congelados em nitrogênio líquido, foram submetidos a secções transversais de 7 μm em criostato *Leica* CM1850. As secções foram realizadas na região central, transversalmente ao maior eixo do músculo. Foram realizados de 4 a 6 cortes de um mesmo músculo possibilitando a escolha de um corte com menos artefatos histológicos durante a análise. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE).

As lâminas foram identificadas com o número de registro no laboratório para que o pesquisador não soubesse a que animal ou grupo pertencia. A numeração real foi revelada apenas no momento da análise estatística.

Digitalização das imagens da lâmina histológica do músculo tibial cranial.

As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio óptico em menor aumento (50 vezes) para escolha do corte histológico com menos artefatos. Foi utilizado aumento de 200 vezes para a análise das fibras musculares.

As imagens foram capturadas por uma câmera digital *Leica* DFC 280 e salvas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1 GB DDR, HD 80 GB. Foram salvas, aleatoriamente, 10 imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico

Medidas de área, maior e menor diâmetro das fibras musculares e número de fibras por campo

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área, menor e maior diâmetro das fibras musculares.

Foi analisado também o número de fibras por campo.

As medidas foram feitas de modo semi-automático utilizando-se software Sigma Pro Image Analysis, versão 5 da Jandel Scientific Corporation.

As fibras foram medidas, aleatoriamente, tomando-se uma fibra de cada quadrante da imagem e uma central. Portanto, foram medidas 5 fibras por imagem salva (Fig. 8), ou seja, 50 fibras por lâmina, o que representa 50 fibras por MTCD.

Figura 8 – Escolha aleatória de cinco fibras musculares em uma mesma imagem.

3.6. Processamento histológico dos segmentos de nervo

Após fixação por período superior a 24 horas em solução de Karnovisk, e lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por três vezes com duração de cinco minutos cada vez, os segmentos de nervo sofreram uma pré-coloração com tetróxido de ósmio (1:1) por duas horas. Após nova lavagem com tampão fosfato, foi realizada desidratação por uma bateria de concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%). A inclusão em resina Araldite® foi realizada em duas etapas: em solução de resina e acetona (1:1), permanecendo por 24 horas em dissecador; e em resina, após 10 minutos em dissecador, permanecendo em estufa a 37°C por uma hora. O emblocamento foi realizado posicionando-se o segmento de nervo em resina Araldite® e mantido em estufa a 60°C por 48 horas para polimerização.

Antes do corte histológico os blocos foram preparados para o corte através da eliminação do excesso de resina ao redor do segmento de nervo com o auxílio de uma lupa Carl Zeiss Jema adaptada, em aumento de 1,6 x, com auxílio de uma lâmina Gillette®.

Com o bloco preparado foram realizados cortes transversais semi-finos (0,5 µm) em micrótomo *Leica* MZ6. Após o corte, a lâmina foi aquecida sobre uma chapa a 45°C para secagem e pré-aderência. A seguir a lâmina permaneceu em estufa a 60°C por 12 horas para aderência do corte à lâmina de vidro.

A coloração foi realizada manualmente, lâmina por lâmina, com azul de toluidina 1% durante 5 minutos. Após a secagem a lamínula foi colada e a lâmina identificada com o número de registro no laboratório.

Os segmentos de nervo N7 (Fig. 2) foram incluídos em parafina e corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina. Estes segmentos foram avaliados quanto à formação de neuromas de amputação.

Digitalização das imagens das lâminas histológicas de nervos

As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 100 vezes para escolha do corte histológico com menos artefatos. Foi utilizado aumento de 400 vezes para a análise das fibras nervosas.

As imagens foram capturadas por uma câmera digital *Leica DFC 280* e salvas em microcomputador Pentium IV 3.2 HT, 1 GB DDR, HD 80 GB. Foram salvas duas imagens de diferentes campos de um mesmo corte histológico.

Medidas de área, maior e menor diâmetro e contagem total das fibras nervosas

As imagens digitalizadas e salvas foram analisadas através de medidas de área e menor diâmetro dos axônios, número de axônios e espessura da bainha de mielina.

As medidas foram feitas de modo semi-automático utilizando-se software Sigma Pro Image Analysis, versão 5 da Jandel Scientific Corporation.

Foram realizadas as medidas da área e diâmetro mínimo da fibra nervosa e do axônio (Fig. 9). As medidas da espessura da bainha de mielina foram obtidas subtraindo-se a área axonal da área da fibra nervosa.

Foi realizada contagem do número total de fibras nos segmentos N1, N2, N3, N4, N5 e N6 (Fig. 2).

Os resultados obtidos de área e menor diâmetro axonal foram organizados em uma tabela e, então, calculada a média das medidas obtidas para cada animal. A partir destas médias foi realizada a análise estatística para comparação entre os grupos.

Figura 9 – Seleção das fibras axoniais para medidas de área axonal, diâmetro axonal e área da bainha de mielina. Fibras inteiras circuladas internamente (axônio) em azul e externamente (fibra nervosa) em amarelo.

3.7. Análise Estatística

Quando comparados os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de TUKEY quando detectada diferença significativa.

Em todas as análises foi utilizado nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Massa Corporal

Quando avaliadas as massas corporais iniciais dos ratos (medidas antes da cirurgia), não foi observada diferença estatística entre os grupos $G1 = G2 = G3 = GN = GD$.

Figura 10 - Massa inicial dos ratos (g). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $G1 = G2 = G3 = GN = GD$ ($p < 0,05$).

Quanto às massas finais, houve diferenças: G1 com G2; G2 com GN; G2 e G3 com GD.

Figura 11 - Massa final dos ratos (g). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $G1 = G3 = GN$; $G2 = G3$; $G1 = GD = GN$ ($p < 0,05$).

4.2 Massa do Músculo Tibial Cranial Direito

Quando avaliadas as massas do MTCD, não houve diferenças estatísticas entre G1, G2 e G3. Estes grupos foram inferiores ao GN e superiores ao GD e estes últimos foram diferentes entre si.

Figura 12 - Massa do músculo tibial cranial direito (MTCD) dos ratos (g). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $GN > G1 = G2 = G3 > GD$ ($p < 0,05$).

4.3 Índice de Massa Muscular (IMM)

Neste caso, assim como no anterior, os grupos G1, G2 e G3 não diferiram entre si, mas apresentaram diferença estatística quando comparados com o GN e o GD e estes últimos também se diferenciaram.

Figura 13 - Índice de massa muscular (IMM). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $GN > G1 = G2 = G3 > GD$ ($p < 0,05$).

4.4 Teste Eletrofisiológico

Quando avaliada a latência, o G1, G2 e G3 tiveram comportamento semelhante ao GN, apresentado apenas diferença estatística quando comparados ao GD.

Figura 14 - Latência (ms). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $GN = G1 = G2 = G3 < GD$ ($p < 0,05$).

Já no atributo amplitude, G1, G2 e G3 não apresentaram diferenças entre si, foram inferiores ao GN e superiores ao GD, Esses dois últimos apresentaram diferenças entre si.

Figura 15 - Amplitude (mV). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $GN > G1 = G2 = G3 > GD$ ($p < 0,05$).

4.5 Teste de avaliação da marcha

Para o teste de avaliação da marcha, foi realizado o índice funcional do ciático (IFC) de cada grupo, expressos como porcentagem de perda da função normal. G1, G2 e G3 não apresentaram diferença estatística entre si. Porém o G3 não teve diferença em relação ao GD; o G1 não teve diferença em relação ao GN.

Figura 16 – Índice funcional do nervo ciático. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $GN > G1 = G2 = G3$; $G3 = GD$ ($p < 0,05$).

4.6 Análise morfométrica do músculo tibial cranial

Quando avaliadas as medidas das áreas do MTCD, não houve diferenças estatísticas entre G1, G2 e G3. Estes grupos foram inferiores ao GN e superiores ao GD e estes últimos foram diferentes entre si.

Figura 17 – Área das fibras do músculo tibial cranial direito (μm²). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. GN > G1 = G2 = G3 > GD (p<0,05).

Quanto ao maior diâmetro das fibras musculares os grupos G1, G2, G3 e GN foram semelhantes e superiores ao GD.

Figura 18 – Diâmetro máximo das fibras do músculo tibial cranial direito (μm). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $GN = G1 = G2 = G3 > GD$ ($p < 0,05$).

Quanto ao menor diâmetro das fibras musculares, também não houve diferença entre G1, G2 e G3; G2 e G3 foram semelhantes ao GN; GD foi inferior de todos.

Figura 19 – Diâmetro mínimo das fibras do músculo tibial cranial direito (μm). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos desvios padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. G1 = G2 = G3; GN = G2 = G3; GD < GN, G3, G2, G1 ($p < 0,05$).

Quanto ao número de fibras musculares por campo, encontramos semelhança estatística entre G1, G2, G3 e GN. Apenas GD que se diferenciou e foi muito maior que os demais.

Figura 20 – Número de fibras do músculo tibial cranial direito por campo. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $G1 = G2 = G3 = GN < GD$ ($p < 0,05$).

4.7 Análise morfométrica dos segmentos nervosos

Na análise do segmento N2, G1e G2 foram iguais ao G3 e ao GN. Estes últimos foram diferentes entre si

Figura 21 - Número de fibras no segmento N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $G1 = G2 = G3$; $G1 = G2 = GN$; $G3 > GN$ ($p < 0,05$).

Na análise do menor diâmetro axonal, G1 e G2 foram iguais entre si e maiores que G3. GN foi maior que todos.

Figura 22 – Menor diâmetro axonal (μm) no segmento N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $\text{GN} > \text{G1} = \text{G2} > \text{G3}$ ($p < 0,05$).

Na análise da área axonal no segmento N2 todos os grupos foram diferentes.

Figura 23 – Área axonal no segmento N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. GN > G2 > G1 > G3 ($p < 0,05$).

Na análise da área da bainha de mielina no segmento N2, todos os grupos foram diferentes entre si

Figura 24 – Área da bainha de mielina (µm²) no segmento N2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. GN > G1 > G2 > G3 (p<0,05).

Resolvemos também comparar o segmento N1 com o N2 dentro do mesmo grupo. No G1, o N1 e o N2 foram diferentes. O N1 foi maior que o N2

Figura 25 – Número de fibras nos segmentos N1 e N2 no G1. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $N1 > N2$ ($p < 0,05$).

No G2 não houve diferenças entre o segmento N1 e N2.

Figura 26 – Número de fibras nos segmentos N1 e N2 no G2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $N1 = N2$ ($p < 0,05$).

No G3 também não houve diferenças entre os segmentos N1 e N2.

Figura 27 – Número de fibras nos segmentos N1 e N2 no G2. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $N1 = N2$ ($p < 0,05$).

Foi avaliado o número de fibras no segmento N3. Não houve diferença entre G1, G2 e G3. G1 foi igual ao GN e todos foram superiores ao GD.

Figura 28 - Número de fibras no segmento N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $G1 = G2 = G3 > GD$; $G1 = GN$; $GN > GD$ ($p < 0,05$).

Quando avaliado o menor diâmetro axonal no segmento N3, não houve diferença entre G2, G3 e GN. G1 foi igual ao GD.

Figura 29 – Menor diâmetro axonal (μm) no segmento N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. G1 = GD; G2 = G3 = GN ($p < 0,05$).

Quanto à área axonal no segmento N3, notamos que apenas G2 e G3 foram semelhantes. Não houve semelhança nos demais grupos.

Figura 30 – Área axonal no segmento N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. G2 = G3 ($p < 0,05$).

Quanto à área da bainha de mielina não houve semelhança entre nenhum grupo.

Figura 31 – Área da bainha de mielina (μm^2) no segmento N3. No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Quanto ao número de fibras total nas pontes (soma de N4, N5 e N6), pudemos observar que G1 que tem apenas uma ponte, foi maior que G2 e G3 com duas e três pontes respectivamente.

Figura 32 - Número de fibras (NTO = N4 + N5 + N6). No gráfico estão representadas as médias e os respectivos erros padrões. Letras diferentes indicam diferença estatística. $G1 > G2 = G3$.

Resultados obtidos nos testes funcionais e morfometria das fibras musculares.

Tabela 1 - Resultados obtidos nos testes funcionais e morfometria das fibras musculares

Letras diferentes indicam diferença estatística. IFC = índice funcional do nervo ciático; AMP = amplitude; LAT = latência; IMM = índice de massa muscular; AFM = área da fibra muscular; MDFM = maior diâmetro da fibra muscular; mDFM = menor diâmetro da fibra muscular; GD = grupo desnervado; GN = grupo normal.

GRUPO	IFC	AMP (Mv)	LAT (ms)	IMM	AFM (μm^2)	MDFM (μm)	mDFM (μm)	Nº de fibras/campo
G1	-7,46 $\pm$ 12,97 ab	7,85 $\pm$ 7,13 a	2,35 $\pm$ 0,73 a	0,0013 $\pm$ 0,0002 a	1758 $\pm$ 327 a	82 $\pm$ 6 a	47 $\pm$ 4 a	51 $\pm$ 9 a
G2	-11,15 $\pm$ 13,04 b	4,72 $\pm$ 3,46 a	1,81 $\pm$ 0,26 a	0,0013 $\pm$ 0,0003 a	2015 $\pm$ 415 ab	87 $\pm$ 8 a	50 $\pm$ 5 ab	43 $\pm$ 12 a
G3	-14,40 $\pm$ 13,82 bc	7,35 $\pm$ 6,84 a	1,78 $\pm$ 0,26 a	0,0011 $\pm$ 0,0005 a	1875 $\pm$ 308 ab	84 $\pm$ 5 a	49 $\pm$ 4 ab	43 $\pm$ 9 a
GD	-22,99 $\pm$ 11,02 c	1,28 $\pm$ 5,34 c	>1000 b	0,0004 $\pm$ 0,0001 c	363 $\pm$ 380 d	36 $\pm$ 15 b	20 $\pm$ 8 c	319 $\pm$ 163 b
GN	0,33 $\pm$ 8,51 a	21,09 $\pm$ 8,04 b	1,79 $\pm$ 0,39 a	0,0019 $\pm$ 0,0002 b	2339 $\pm$ 553 c	90 $\pm$ 11 a	54 $\pm$ 6 b	35 $\pm$ 10 a

Resultados da morfometria das fibras no segmento de nervo N3

Tabela 2 – Resultados da morfometria das fibras no segmento de nervo N3. Letras diferentes indicam diferença estatística. AAx_N3 = área axonal no N3; MDax_N3 = menor diâmetro axonal no N3; ABM_N3 = área da bainha de mielina no N3; GD = grupo desnervado; GN = grupo normal.

GRUPO	AAx_N3	MDAx_N3	ABM_N3	Nº fibras/nervo_N3
G1	2,9 ± 4,1 a	1,7 ± 1,0 a	6,1 ± 7,7 a	1915 ± 664 ac
G2	3,7 ± 5,6 b	1,9 ± 1,2 b	4,4 ± 7,1 b	2345 ± 1058 a
G3	3,7 ± 4,7 b	1,9 ± 1,1 b	4,1 ± 5,6 c	2217 ± 817 a
GD	4,1 ± 8,1 c	1,7 ± 1,5 a	6,7 ± 13,8 d	399 ± 334 b
GN	16,5 ± 13,6 d	4,2 ± 1,8 c	16,8 ± 18,9 e	1315 ± 383 c

Resultados da morfometria das fibras no segmento de nervo N2

Tabela 3 – Resultados da morfometria das fibras no segmento de nervo N2. Letras diferentes indicam diferença estatística. AAx_N2 = área axonal no N2; MDax_N2 = menor diâmetro axonal no N2; ABM_N2 = área da bainha de mielina no N2; GN = grupo normal.

GRUPO	AAx_N2	MDAx_N2	ABM_N2	Nº fibras/nervo_N2
G1	8,9 ± 7,7 a	3,0 ± 1,4 a	15,4 ± 14,5 a	3245 ± 1660 ab
G2	9,6 ± 10,9 b	3,0 ± 1,8 a	9,9 ± 14,5 b	3469 ± 2023 ab
G3	7,2 ± 9,6 c	2,6 ± 1,6 c	7,1 ± 11,0 c	5034 ± 2892 a
GN	16,5 ± 15,2 d	4,1 ± 1,9 d	19,5 ± 20,5 d	3210 ± 1139 b

Resultados da morfometria das fibras no segmento de nervo N4

Tabela 4 – Resultados da morfometria das fibras no segmento de nervo N4
 Letras diferentes indicam diferença estatística. AAx_N4 = área axonal no N4;
 MDAx_N4 = menor diâmetro axonal no N4; ABM_N4 = área da bainha de
 mielina no N4.

GRUPO	AAx_N4	MDAx_N4	ABM_N4	Nº fibras/nervo_N4
G1	4,5 ± 5,7 a	2,0 ± 1,2 a	6,8 ± 10,4 a	3333 ± 1357 a
G2	8,9 ± 14,7 b	2,6 ± 2,1 b	6,6 ± 10,3 a	1169 ± 621 b
G3	2,7 ± 3,8 c	1,6 ± 0,9 c	3,3 ± 4,5 b	1699 ± 1018 b

Podemos perceber na figura abaixo o aspecto morfológico das fibras musculares dos grupos experimentais G1, G2 e G3 semelhantes ao GN: forma poligonal, núcleos, na maioria das fibras, em posição periférica e pouco tecido conjuntivo. Já no grupo desnervado as fibras são mais arredondadas ou ovaladas, núcleos, na maioria dos casos, aparecem centralizados e observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo.

Figura 33 - Cortes do MTCD nos diversos grupos, mostrando a semelhança de G1, G2 e G3 com GN (fibras poligonais, núcleo periférico e pouco tecido conjuntivo) e GD (fibras arredondadas com núcleos mais centralizados e bastante tecido conjuntivo permeando-as).

Na figura abaixo podemos comparar a morfologia do segmento nervoso N3. Notamos em GN, G1, G2 e G3 grande quantidade de axônios, bainha de mielina espessa e bem definida ao passo que em GD poucos axônios, bainha de mielina pouco evidente e grande quantidade de tecido conjuntivo.

Figura 34 - Cortes do segmento N3 nos diversos grupos, mostrando a semelhança de G1, G2 e G3 com GN (axônios e bainha de mielina) e GD (pouquíssimos axônios e grande quantidade de tecido conjuntivo).

Dois ratos do G3 e um rato do G2 morreram durante o experimento.

O rato de número 64, pertencente ao GD, apresentou características compatíveis com reinervação espontânea. Isso foi visto tanto na análise do MTCD como no segmento nervoso N3.

Figura 35 – Fotos do rato 64 que pertencia ao grupo desnervado, mas apresentava características de reinervação. A) aspecto morfométrico do MTCD. B) aspecto morfométrico do segmento N3.

5. Discussão

Segundo Pereira et al. (1998), na escolha do animal de experimentação deve-se considerar a espécie mais utilizada na literatura e em quantidade mínima para obtenção de resultados válidos.

Várias espécies animais são utilizadas no estudo de regeneração do nervo, entre eles primatas (Mennen, 1998b; Auba et al., 2006), cães (Sundine et al., 2003), gatos (Moldovan et al., 2006), coelhos (Askar et al., 2001; Jabery et al., 2003), ratos (Akeda et al., 2006; Bertelli et al., 2006) e camundongos (Myckatyn et al., 2004).

Neste trabalho foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar por serem de fácil obtenção, manipulação e manutenção.

Além disso, são animais que ocupam pouco espaço, facilitando estudos de longa duração (Ellis & McCaffrey, 1984). Segundo Viterbo (1992a), estes animais apresentam estruturas anatômicas adequadas para estudos sobre neurorrafias e regeneração muscular. Ratos Wistar têm sido utilizados em muitos estudos experimentais com neurorrafia término-lateral (Viterbo et al., 1992; Lundborg et al., 1994b; Viterbo et al., 1994a, 1998; Schultes et al., 2001; Papalia et al., 2001; Gravvanis et al., 2004; Hayashi et al., 2004; Okuyama et al., 2004; Manasseri et al., 2007).

Ratos do sexo masculino são mais fáceis de adquirir, pois as fêmeas são utilizadas como matrizes. Além disso, estas são mais suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e hormônios gonadais, como o estrógeno e a progesterona (Lincoln, 1980; Carandente et al., 1989). Conforme Kovacic et al. (2003), pesquisas têm mostrado que os hormônios sexuais exercem efeitos neurotróficos em várias regiões do sistema nervoso adulto, incluindo aquelas não especificamente envolvidas com reprodução, como o brotamento de axônios sensoriais mielínicos. Por isto, neste trabalho, optou-se por utilizar todos os animais do sexo masculino.

Não encontramos na literatura nenhum trabalho semelhante para que pudéssemos comparar aos nossos resultados.

Um fato interessante é que em três ratos do G3, uma das três pontes não foi encontrada na hora do sacrifício, sugerindo absorção, talvez pela proximidade entre elas ou algum mecanismo de exaustão ainda desconhecido.

Os animais utilizados não diferiram quanto à massa inicial, demonstrando homogeneidade nas amostras, como recomendado por Vieira & Hossne (2001). Especificamente em trabalhos que avaliam a massa do músculo tibial cranial, é importante que as amostras sejam homogêneas, pois certamente a massa do animal repercutirá na massa muscular.

Quando isso aconteceu, por exemplo, na massa final dos ratos, em que houve diferença entre os grupos, utilizamos o IMM (índice de massa muscular). Dessa forma, se houvesse algum viés na massa do MTCD, em decorrência da alteração da massa do rato, isso ficaria corrigido através desse índice. O IMM não mostrou diferença em relação à massa do MTCD demonstrando que, neste trabalho, a diferença da massa do rato não repercutiu na massa do MTCD.

Houve aumento de massa significativo em todos os ratos observados quando comparadas massas iniciais e finais. Portanto, a cirurgia não alterou o desenvolvimento normal dos animais.

Os nervos fibular comum e tibial foram escolhidos por serem de fácil acesso, apresentarem-se anatomicamente próximos e por inervarem músculos distintos, respectivamente, músculo tibial cranial e músculo gastrocnêmio (Hebel & Stromberg, 1976).

O nervo fibular comum atuou como receptor por ser o único a inervar o músculo tibial cranial. Este modelo experimental, utilizando o nervo fibular comum e o músculo tibial cranial, foi proposto por Viterbo (1992a) para o estudo da NTL a partir de então, tem sido utilizado em diversos trabalhos (Viterbo et al., 1994a,b, 1998; McCallister et al., 1999; Goheen-Robillard et al., 2002; De Sá et al., 2004; Stipp et al., 2007). O nervo fibular comum apresenta importante vantagem por ser único na inervação do MTCD. Assim qualquer alteração neste nervo repercutira no MTCD. .

O nervo sural é utilizado como nervo doador por ser sensorial não trazendo prejuízos locomotores ao animal (Swett et al., 1991).

Foram utilizados dois grupos controle: o GN (grupo controle de normalidade e o GD (grupo controle de desnervação) para que pudéssemos ter os níveis maiores e menores em todos os atributos estudados e assim comparar aos demais grupos (G1, G2 e G3).

Os cotos proximais dos nervos fibulares seccionados foram invertidos e inseridos em musculatura adjacente com o objetivo de evitar regeneração espontânea e consequente reinervação muscular, conforme recomendação de Frey et al. (1982). Apesar disso, o rato 64 que pertencia ao grupo desnervado apresentou sinais de reinervação muscular e que foram confirmados na análise morfométrica do MTCD e no segmento nervoso N3. Isso provavelmente deveu-se a uma inervação espontânea mesmo com todos os cuidados citados anteriormente. Se tivéssemos utilizado a técnica descrita por Zhang (1998) em que o coto proximal do nervo seccionado fica em compartimento diferente do compartimento do coto distal, provavelmente não teríamos tido esse achado. Em trabalhos futuros talvez essa técnica deva ser padronizada.

Os enxertos (pontes) foram fixados com suturas tipo “embracing” (Viterbo, 1997). Essa sutura permite que, com um único ponto, seja fixado o nervo receptor à lateral do nervo doador sem nenhuma lesão neste último. Ela é especialmente indicada em situações de nervos muito finos onde fica difícil aplicar vários pontos. Um exemplo desta situação é a sutura de enxerto de nervo sural na face lateral do ramo bucal em crianças. Outra indicação desse tipo de sutura seria em locais profundos como a sutura de nervos do TRAM (retalho transversal de reto-abdominal) a nervos intercostais. Como a cola de fibrina não funciona tão bem na neurografia término lateral, pois acredita-se que é necessária certa tensão do nervo receptor sobre o nervo doador, a sutura tipo “embracing” substitui esse adesivo de forma satisfatória. Optamos por utilizar esse tipo de sutura neste trabalho para ampliarmos a experiência da mesma em situações experimentais. Essa sutura tem a vantagem de ser mais rápida e de fácil execução, mas tem a desvantagem de exigir do cirurgião grande

cuidado para não apertar muito o ponto e determinar estenose no nervo doador. Talvez este fato explique a relação entre N1 e N2 no G1.

As NTL foram realizadas sem retirada de epineuro, já que este detalhe não influencia no resultado final para nervos finos (Viterbo et al., 1992; Viterbo et al., 1994 a, b; Viterbo et al., 1998; Lundborg, 1994), mostrando que as fibras regeneradas após a NTL têm a capacidade de transpor o endoneuro, perineuro e epineuro, já que essas estruturas são absorvidas (Zhao et al., 1997). Em nervos mais espessos, alguns autores recomendam que se retire a janela epiperineural pois não existem estudos experimentais que demonstrem o contrário (Viterbo et al., 1998).

O prazo de 120 dias para sacrificar os animais nos pareceu adequado para avaliação dos atributos estudados. É importante quando se estuda o músculo que este prazo seja suficiente para que ocorra brotamento axonal, o amadurecimento dos axônios e que estes alcancem a placa motora e essa se desenvolva e permita a reinervação das fibras musculares. Neste estudo o número de fibras nervosas no segmento N3 mostrou não haver diferença entre G1, G2 e G3. Os atributos do MTCD também não mostraram diferença entre os três grupos experimentais. Isso demonstra que o tempo utilizado neste trabalho foi suficiente para permitir a regeneração axonal e a reinervação muscular de uma forma efetiva.

O número de 20 ratos em cada grupo nos pareceu adequado quando delineamos o trabalho. Na literatura esse número é muito variável, de 10 a 40 animais (McCallister et al., 1999; Goheen-Robillard et al., 2002; De Sá et al., 2004). Na análise estatística, entretanto, observamos que especialmente os atributos relacionados à morfometria dos segmentos de nervos apresentaram alta variabilidade e conseqüente alto desvio padrão. Talvez, em trabalhos futuros, esse número possa ser aumentado.

5.1. Teste da Marcha

O teste da marcha analisa o modo de andar do animal através do cálculo do IFC, expresso como porcentagem de perda da função normal (De Medinaceli et al., 1982). Segundo Monte-Raso et al. (2008) o IFC parece ser o mais versátil e, apesar de apresentar alguns inconvenientes, é um teste de baixo custo e facilmente aplicável.

O modelo experimental utilizado neste trabalho e introduzido por Viterbo et al. (1992) apresenta reinervação muscular através de nervos que inervam músculos antagônicos. Por isso esse teste pode não ser muito fidedigno. Em nossos resultados não encontramos diferença estatística entre G1, G2 e G3, mostrando que o número de pontes não alterou o resultado funcional. Isso talvez se deva à plasticidade cerebral.

5.2. Teste Eletrofisiológico

Outro teste funcional é o teste eletrofisiológico. Este fornece dados de latência e amplitude. A latência nos fornece informações sobre a condução nervosa, ou seja, o número de fibras mielinizadas. Já, a amplitude, nos informa o número de fibras musculares que respondem ao estímulo elétrico e, conseqüentemente, ao número de axônios excitáveis (Robinson & Snyder-Mackler, 2001).

Para a realização do teste eletrofisiológico optou-se pela utilização de eletrodos de captação em agulhas, pois, apesar do eletrodo de agulha registrar apenas uma parte do potencial de ação muscular, com ele a interferência dos músculos vizinhos é menos visível, sendo preferível no registro do potencial de ação composto de pequenos músculos e músculos atroficos (Kimura, 1987). A frequência, duração e intensidade do estímulo foram constantes para que a única variável fosse o grupo experimental. O estímulo era dado antes do início dos enxertos (proximalmente), ou seja, no nervo tibial.

Em nossos resultados, no atributo latência, G1, G2 e G3 não apresentaram diferenças em relação ao GN, mas todos esses se diferenciaram do GD que apresentava valores elevados, demonstrando que a desnervação foi efetiva.

Quando avaliamos a amplitude, G1, G2 e G3 não apresentaram diferenças entre si, mas se diferenciaram do GN e do GD, demonstrando que o número de fibras excitáveis diminuiu em todos os grupos, não alterando à medida que aumentou-se o número de pontes.

5.3. Análise do músculo tibial cranial direito (MTCD)

Os MTCD forma pesados sem o tendão já que este não sofre alteração da desnervação e pode alterar o resultado (Yan et al., 2002a; Yan et al, 2002b).

O MTCD foi corado por HE, pois esta coloração evidencia bem a fibra muscular, permitindo as análises morfométricas desejadas. Além disso, é um método extremamente barato.

É importante destacar que a medida de diâmetro mínimo é mais confiável que a medida de área ou de diâmetro máximo, pois o mesmo não sofre alteração da inclinação da navalha durante o corte histológico, conforme ressaltado por Romão et al., 2007.

Quanto à massa do MTCD observou-se não haver diferença entre os grupos experimentais, que foram inferiores ao GN. Já a massa do GD demonstrou a atrofia do MTCD e a efetividade da desnervação. Ficou evidente também não haver diferença nesse atributo ao aumentar-se o número de pontes. Talvez se o nervo doador fosse mais calibroso, poderíamos ter encontrado diferença entre os grupos G1, G2 e G3. Outra possibilidade a ser pensada seria a posição dos enxertos em diferentes faces nervo doador e não apenas na face lateral como fizemos. Talvez, pudéssemos ter obtido resultados diferentes com brotamentos laterais em mais de uma superfície do nervo doador, por exemplo, posterior, anterior e lateral oposta.

Como houve diferença na massa final dos ratos entre os grupos, ficamos preocupados e utilizamos IMM (índice de massa muscular) que nada mais é que a massa do MTCD dividida pela massa do rato. Dessa forma, se houvesse algum viés na massa do músculo tibial cranial em decorrência da alteração da massa do rato, isso ficaria corrigido através desse índice. Isso foi uma segurança a mais, mas não houve diferença dos resultados obtidos apenas com a massa do MTCD.

Quando comparada a área do MTCD, o G1, G2 e G3 não apresentaram diferença entre si apesar de se diferenciarem do GN. A área do GD foi bem inferior devido, obviamente, à atrofia muscular. Esse atributo também confirmou não ter havido diferença entre o número de pontes.

Quanto às fibras musculares, o menor diâmetro, o maior diâmetro e o número de fibras por campo, G1, G2 e G3 não foram diferentes do GN. Este dado causou-nos surpresa e revela a boa qualidade da reinervação obtida. Demonstra também não ter havido diferença no número de pontes entre os três grupos. Entretanto, quando analisamos estes dados em relação à massa do MTCD, observamos que os grupos G1, G2 e G3 foram inferiores ao GN. Isso demonstra que o número de fibras musculares reinervadas foi menor nos três grupos experimentais em relação ao GN embora a qualidade das fibras reinervadas tenha sido semelhante às fibras do GN. Talvez o número de axônios brotados tenha sido insuficiente para reinervar mais fibras musculares. Novamente frisamos que talvez, se o calibre do nervo doador fosse maior ou o número de fibras no nervo doador fosse maior, poderíamos ter tido resultado diferente. Conforme o esperado, os músculos desnervados apresentaram fibras mais finas, mais ovaladas ou arredondadas, núcleos centralizados e grande quantidade de tecido conjuntivo que as permeava. As fibras musculares do GN, G1, G2 e G3 apresentaram aspectos morfológicos muito semelhantes: poligonais, núcleos periféricos e pouco tecido conjuntivo ao redor.

5.4 Análise dos segmentos nervosos

Quanto ao número de fibras no N2 (segmento de nervo doador logo abaixo das neurorrafias), não houve diferença entre G1, G2 e G3, mostrando que o aumento do número de pontes não espolia o nervo doador no que se refere ao número de fibras. Já no aspecto qualitativo notamos menor diâmetro axonal, menor área axonal, menor área da bainha de mielina nos grupos com mais pontes. Isso talvez se possa explicar pela estenose no nervo doador em decorrência do “embracing”, devido à ausência de uma maneira precisa de controlar a tensão nesse tipo de neurorrafia. Quanto ao menor diâmetro das fibras no N2, o G3 foi estatisticamente diferente dos grupos G1 e G2. Isso provavelmente se deve ao número de animais por grupo, refletindo também em desvio padrão alto. Em trabalhos futuros talvez devamos aumentar a nossa amostra para evitar tais problemas.

O número de fibras no N3 é menor no GN e é maior nos outros grupos (G1, G2 e G3) provavelmente porque, no nervo em regeneração, o coto distal tem número maior de fibras com menor diâmetro (Lundborg, 1987) Por outro lado, quanto ao menor diâmetro axonal, GN tem valores maiores, apesar do menor número de fibras, existindo, portanto uma correlação. Quanto à área da bainha de mielina, tivemos um decréscimo nos grupos com maior número de pontes, assim como na análise do segmento N2. Isso também poderia ser explicado da mesma forma, ou seja, o “embracing” causando algum grau de estenose no nervo receptor. GD apresentou valores elevados no menor diâmetro axonal e na área da bainha de mielina provavelmente devido à pequena amostra e, principalmente, ao rato 64 que apresentava-se com aspecto normal. Esse resultado poderia ser diferente se tivéssemos uma amostra maior.

A análise do N4 foi muito interessante, pois a contagem do número de fibras foi maior no G1. O menor diâmetro axonal foi maior no G2. Esse resultado não era esperado. O esperado seria $G1 > G2 > G3$. O valor encontrado em G3 foi menor e era esperado. Quanto à bainha de mielina, G1 e G2 foram

iguais e maiores que G3. Talvez com uma amostra maior isso não teria acontecido.

Quando analisamos o NTO ($N_{\text{total}} = N4 + N5 + N6$), notamos que G1 que tem apenas uma ponte é maior que G2 e G3. Isso demonstra que, neste trabalho, não adiantou aumentarmos o número de pontes, ao contrário, isso pareceu diminuir o número total de fibras de G1 para G2 e G3 e, nesses últimos, não mudou em nada a contagem total.

Após análise global dos atributos do MTCD como massa, IMM, área, menor e maior diâmetro das fibras musculares, número de fibras por campo, análise funcional (IFC), análise eletrofisiológica e análise morfométrica da maioria dos segmentos nervosos mais importantes como o N3, percebemos não haver benefício com o aumento do número de pontes. Talvez para nervos com maior calibre esse resultado possa ser diferente.

6. Conclusão

Baseados no modelo experimental utilizado pudemos concluir que não houve diferença entre G1, G2 e G3 e, portanto, o aumento no número de pontes não trouxe benefício.

7. Referências Bibliográficas

Agência Câmara da Folha Online. Câmara aprova projeto que regulamenta uso de cobaias no Brasil, 20/05/2008. Acesso em 08/jul/2008.

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

Alix T, Carluet L, Bénateau H, Labbé D. Lês troubles cinétiques labiaux. *Ann Chir Plast Esthét.* 2002; 47:390-401.

Al-Qattan MM. Prevention and treatment of painful neuromas of the superficial radial nerve by the end-to-side nerve repair concept: an experimental study and preliminary clinical experience. *Microsurg.* 2000; 20:99-104.

Anderl H. Reconstruction of the face through cross-face nerve transplantation in facial paralysis. *Chir. Plast.* 1973, 2:17-46.

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

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

Aszmann OC, Korak KJ, Rab M, Grünbeck M, Lassmann H, Frey M. Neuroma prevention by end-to-side neurorrhaphy: an experimental Study in rats. *J Hand Surg.* 2003; 28A(6):1022-8.

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

- Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps. *Surg. Gynecol. Obstetr.* 1927; 45:364-78.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconst Surg.* 1989; 83(1):129-136.
- Baker DC, Conley J. Regional muscle transposition for rehabilitation of the paralysed face. *Clin Plast Surg.* 1979, 6:317-31.
- Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J.* 1903; 2:1009-13.
- Bascom DA, Schaitkin BM, May M, Klein S. Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast Surg.* 2000; 16(4):309-13.
- Battista A, Cravioto H, Budzilovich G. Painful neuroma: changes produced in peripheral nerve after fascicle ligation. Case reports. *Neurosurg.* 1981; 9(5):589-600.
- Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. I. Clinical results. *Microsurg.* 2000; 20(1):32-6.
- Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wld^s) nerves. *BMC Neurosc.* 2005, 6(1):6.
- Berkuo ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. 2.ed. São Paulo: EPU, 1981.
- Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurg.* 1993; 14:135-40.
-

- Bertelli JA, Taleb M, Mira JC, Ghizoni MF. Functional recovery improvement is related to aberrant reinnervation trimming. A comparative study using fresh or predegenerated nerve grafts. *Acta Neuropathol.* 2006; 111: 601–9.
- Beuche W, Friede RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol.* 1984;13:767–96.
- Bharalli LA, Lisney SJW. Success of regeneration of peripheral nerve axons in the rats after injury at different postnatal ages. *J Neurol Sci.* 1990; 100:203-10.
- Blundon JA, Sheller RA, Moehlenbruck JW, Bittner GD. Effect of temperature on long-term survival of anucleate giant axons in crayfish and goldfish. *J Comp Neurol.* 1990; 297:377-91.
- Boedts D, Bouckaert JI. Nerve anastomoses. Sutures or fibrinogenic glue? Preliminary results. *Acta Otorhinolaryngol.* 1984; 38:107-12.
- Boedts D. A comparative experimental study on nerve repair. *Arch. Otorhinolaryngol.* 1987; 244(1):1-6.
- Bora FW, Pleasure DE, Didizian NA. A study of nerve regeneration and neuroma formation after suture by various techniques. *J. Hand Surg. [Am].* 1976; 1:138-43.
- Bora W. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1967; 49:659-66.
- Bouldin TW, Cavanagh JB. Organophosphorous neuropathy. I. A teased-fiber study of the spatio-temporal spread of axonal degeneration. *Am J Pathol.* 1979; 94:241-52.
- Braun RM. Epineural nerve suture. *Clin Orthop.* 1982; 163:50-6.
- Breidahl AF, Morrison WA, Donato RR, Riccio M, Theile DR. A modified surgical technique for temporalis transfer. *Brit J Plast Surg.* 1996; 49:46-51.
-

- Brushart TME, Seiler WA. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*. 1987; 97:289-300.
- Buncke HJ, Buncke GM, Kind GM, Buntic RF, Brooks D, Chin BT. Cross-facial and functional microvascular muscle transplantation for longstanding facial paralysis. *Clin Plast Surg*. 2002; 29:551–66.
- Bunnell S, Boyes JH. Nerve grafts. *Am J Surg*. 1939; 44(1):64-75.
- Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK. Efeitos do IGF-H em novo modelo termino-lateral (Effects of IGF-H in new end-to-side model). *J Reconstr Microsurg*. 1999; 15:351-8.
- Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammascco F, De-Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiol*. 1989; 16(4):353-63.
- Cederna PS, Kalliainen LK, Urbanchek MG, Rovak JM, Kuzon WM. “Donor” muscle structure and function after end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconst Surg*. 2001; 107:789-96.
- Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW. Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin*. 1992; 10:613-27.
- Chuang DC, Wei FC, Noordhoff MS. “Smile” reconstruction in facial paralysis. *Ann Plast Surg*. 1989; 23:56–65.
- Conley J, Baker DC. Hypoglossal-facial nerve anastomosis for reinnervation of the paralyzed face. *Plast Reconstruct Surg*. 1979; 63(1):63-72.
- Cooper CW, Falb RD. Surgical Adhesives. *Ann NY Acad Sci*. 1968; 146:214-24.
- Correia PC, Zani R. Masseter muscle rotation in the treatment of inferior facial paralysis. *Plast Reconst Surg*. 1973; 52:370.
-

- Dahlin LB. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve grafts. *Brain Res.* 1995; 679:274–80.
- Da–Silva C. *Biologia Celular e Molecular da regeneração do sistema nervoso periférico.* Atualiz Neurociênc. 1995b; 1-16.
- Da-Silva CF. Fatores Neurotróficos: estrutura, função e aplicações clínicas. *Atual. Neurociênc.* 1995a; 1:1-20.
- Daunois O, Sébille A. Amélioration de la réinnervation musculaire par utilisation de colle biologique enrichie chez le rat. *Ann Chir Main.* 1991; 10:113-118.
- De Medinaceli L, Freed W, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77:634-43.
- De Medinaceli L, Merle M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by “cell surgery”. *J Hand Surg.* 1991; 16(5):495-8.
- De Sá JMR, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosc Meth.* 2004; 136(1):45-53.
- Dellon AL. Alternatives to nerve grafting. Bioabsorbable conduits. Vienna Nerve Symposium. *J Reconstr Microsurg.* 1994; 10(5):356-7.
- Dimeglio A. *Ortopedia pediátrica.* São Paulo: Santos, 1990.
- Edgerton MT, Tuerk DB, Fisher JC. Surgical treatment of Moebius syndrome by palsy and temporalis muscle transfers. *Plast Reconstr Surg.* 1975; 55:305.
- Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Sur.* 1984; 92(5):546-50.
- Erhart EA. *Elementos de anatomia Humana.* 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
-

- Evans P J, Bain J R, Mackinnon SE, Makino AP, Hunter DA. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Microsurg.* 1991; 15:502-5.
- Eyzaguirre C, Fidone SJ. *Fisiologia do sistema nervoso*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 398p.
- Falcioni M, Taibah A, Russo A, Piccirillo E, Sanna M. Facial nerve grafting. *Otol Neurotol.* 2003; 24:486–9.
- Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral Nerve Regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990; 13:43-60.
- Fawcett, J.W. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *Trends Neurosci.* 1992; 15(1):5-8.
- Ferrari F, Rodrigues AC, Malvezzi CK, Silva MDP, Padovani CR. Inside-out vs. Standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. *Anat Rec.* 1999; 256:227-32.
- Ferreira AS. *Lesões nervosas periféricas*. Santos: Livraria Editorial Santos, 1999. 253p.
- Ferreira MC, Erhart EA, Tedesco-Marchese A. Microcirurgia de nervo periférico. Novas técnicas. *Rev Paul Med.* 1974; 84:52-3.
- Ferreira MC, Marques de Faria JC. Result of microvascular gracilis transplantation for facial paralysis-personal series. *Clin Plast Surg.* 2002; 29:515–22.
- Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989; 33:87-134.
- Fornaro M, Tos P, Geuna S, Giacobini-Robecchi MAG, Battiston B. Confocal imaging of Schwann-cell migration along muscle-vein combined grafts used to bridge nerve defects in the rat. *Microsurg.* 2001; 21:153-5.
-

- Franciosi LF, Modestti C, Mueller SF. Neurotization of the biceps muscle by end-to-side neurorrhaphy between ulnar and musculocutaneous nerves. A series of five cases. *Ann Hand Surg.* 1998; 17(4):362-7.
- Frey M, Giovanoli P, Michaelidou M. Functional upgrading of partially recovered facial palsy by cross-face nerve grafting with distal end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(2):597-608.
- Frey M, Gruber H, Holle J, Freilinger G. An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization. *Plast Reconstr Surg.* 1982; 69:656-69.
- Frostick SP; Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurg.* 1998 18:397-405.
- Frykman GK. The quest for better recovery from peripheral nerve injury: current status of nerve regeneration research. *J Hand Ther.* 1993; 6(2):83-8.
- Furukawa H, Saito A, Mol W, Sekido M, Sasaki S, Yamamoto Y. Double innervation occurs in the facial mimetic muscles after facial-hypoglossal end-to-side neural repair: rat model for neural supercharge concept. *J Plast Reconstr Aesth Surg.* 2008; 61:257-64.
- Gagnon NB, Molina-Negro P. Facial reinnervation after facial paralysis: is it ever too late? *Arch Otorhinolaryngol.* 1989; 246:303–7.
- Galli SK, Valauri F, Komisar A. Facial reanimation by cross-facial nerve grafting: report of five cases. *Ear Nose Throat J.* 2002; 81(1):25-9.
- Gilles HD. Experiences with facia lata grafts in the operative treatment of facial paralysis. *Proc R Soc Med.* 1934; 27:1372-8.
-

- Giovanoli P, Koller R, Meuli-Simmen C, Rab M, Haslik W, Mittlböck M, Meyer Ve, Frey M. Functional and morphometric evaluation of end-to-side neurorrhaphy for muscle reinnervation. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(2):383-92.
- Girolami U, Anthony DC, Frosch MP. Nervo periférico e músculo esquelético. In: Cotran RS, Kuman V, Collins T, Robbins. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.1135-54.
- Goheen-Robilard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model. *Laringosc*. 2002; 112:899-905.
- Gold BG, Griffin JW, Price DL. Somatofugal axonal atrophy precedes development of axonal degeneration in acrylamide neuropathy. *Arch Toxicol*. 1992; 66:57-66.
- Gousheh J, Hosseinnian MA, Saadatian Fard E. Reconstruction of chronic facial paralysis by free gracilis muscle transfer. Apropos of 59 cases. *Ann Chir Plast Esthet*. 1995; 40:121–129.
- Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis C, Ionomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurg*. 2004; 24:408-15.
- Griffin JW, George R, Ho T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993; 52:553–60.
- Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstruc Surg*. 1992; 89(2):251-8.
-

- Harii K, Asato H, Yoshimura K, Sugawara Y, Nakatsuka T, Ueda K. One-stage transfer of the latissimus dorsi muscle for reanimation of a paralyzed face: a new alternative. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102:941–51.
- Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin North Am*. 1991; 2:93-104.
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast reconstr surg* 2004; 114:129-37.
- Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy of the laboratory rat*. The Williams & Wilkins Company: Baltimore, 1976.
- Hollinshead WH, Rose S. *Anatomia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991.
- Hopkins WG, Slack JR. The sequential development of nodal sprouts in mouse muscles in response to nerve degeneration. *J Neurocytol*. 1981; 10:537-56.
- Ide C, Kato S. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res (Suppl)*. 1990; 13:S157-S164.
- Ide C. Nerve regeneration and Schwann cell basal lamina: observations of the long-term regeneration. *Arch Histol Jap*. 1983; 46:243-57.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res*. 1996; 25:101-21.
- Iuan FC, Thomazini IA, Gianini MJ, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, Barravieira B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. *Sao Paulo Med J*. 1995;113(5):1000-2.
- Jaberi FM, Abbas BP, Nezhad ST, Tanideh N. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurg*. 2003; 23:359-62.
- Jergovic D, Stål P, Lidman D, Lindvall B, Hildebrand C. Changes in a rat facial muscle after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve*. 2001; 24:1202-12.
-

- Jiang H, Guo ET, Ji ZL, Zhang ML, Lu V. One-stage microneurovascular free abductor hallucis muscle transplantation for reanimation of facial paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1995; 96:78–85.
- Jin T, Dehesdin D, Hemet J, Bagot D'Arc C, Creissard P, Tadie M. Comparative experimental study of nerve repairs by classical suture or biological adhesive. *Neuroch.* 1990; 36:378-82.
- Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103:1919-27.
- Kimura J. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice.* F.A.Davis Company 1987.
- Kline DG, Hudson AR, Bratton BR. Experimental study of fascicular nerve repair with and without epineural closure. *J Neurosurg.* 1981; 54:513-20.
- Koeppen AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Scienc.* 2004; 220:115–7.
- Koh KS, Kim JK, Kim CJ, Kwun BD, Kim SY. Hypoglossal-facial crossover in facial-nerve palsy: pure end-to-side anastomosis technique. *Brit J Plast Surg.* 2002; 55(1):25-31.
- Koshima I, Moriguchi T, Soeda S, Hamanaka T, Tanaka H, Ohta S. Free rectus femoris muscle transfer for one-stage reconstruction of established facial paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 94:421–30.
- Koshima I, Tsuda K, Hamanaka T, Moriguchi T. One-stage reconstruction of established facial paralysis using a rectus abdominis muscle transfer. *Plast Reconstr Surg.* 1997a; 99:234–8.
-

- Koshima I, Umeda N, Handa T, Moriguchi T, Orita Y. A double muscle transfer using a divided rectus femoris muscle for facial paralysis reconstruction. *J Reconstr Microsurg*. 1997b; 13:157–62.
- Kovačič U, Sketelj J, Bajrović FF. Sex-related difference in collateral sprouting of nociceptive axons after peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol*. 2003; 184:479-88.
- Krivolutskaia EG, Chumasov EI, Matina VN, Mel'tsova GM, Kirillov AL. End-to-side type of plastic repair of the facial nerve branches. *Stomatol (Mosk)*. 1989; 68(6):35-8.
- Kumar PA, Hassan KM. Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralysed face: a comparative study of the single stage and two-stage procedures. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109(2):451-62.
- Kutz JE, Shealy G, Lubbers L. Interfascicular nerve repair. *Orthop Clin North Am*. 1981; 9:277-86.
- Labbé D, Bénateau H, Hamel M. Myoplastie d'allongement du muscle temporal et greffe nerveuse transfaciale (VII-V). Note technique. *Ann Chir Plast Esthét*. 2003; 48(1):31-5.
- Labbé D, Huault M. Lengthening temporalis myoplasty and lip reanimation. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 105:1289-97.
- Lenert JJ, Viterbo F, Johnson PC. Pediatric facial paralysis. In: BENTZ ML. *Ped Plast Surg*. 1.ed. Pittsburgh: Appleton & Lange, 1998. p. 427-61.
- Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Reprod. Prog. Horm. Res*. 1980; 36:1-52.
- Lohman R, Bullock F, Mcnaughton T, Siemionow M. End-to-end vs. end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13:135.
- Lubinska L. On axoplasmic flow. *Int Rev Neurobiol*. 1975; 17:241-96.
-

- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol*. 1982; 76:361-75.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J. Reconstr. Microsurg*. 1994a; 10(5):345-54.
- Lundborg G, Dhalin LB, Danielsen N, Nachemson AK. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconst Surg*. 1986; 20:279-83.
- Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danlelsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg (Brit Europ Vol)*. 1994b, 19B:277-82.
- Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. *J. Hand Surg. [Am.]*. 2000; 25:391-413.
- Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop. Scan*. 1987; 58:145-69.
- Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann. Plast. Surg*. 1989; 22(3):257-73.
- Manasseri B, Raimondo S, Geuna S, Risitano G, D'Alcontres FS. Ulnar nerve repair by end-to-side neurorrhaphy on the median nerve with interposition of a vein: an experimental study. *Microsurg*. 2007; 27:27-31.
- Marques RG, Miranda ML, Caetano CER, Biondo-Simões MLP. Rumor à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cirúrg Bras*. 2005; 20(3):262-7.
- Martinez AM, Canavarró S. Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33:1477-82.
-

- Matsuda K, Kakibuchi M, Fukuda K, Kubo T, Madura T, Kawai K, Yano K, Hosokawa K. End-to-side nerve grafts: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2005; 21(8):581-91.
- Matsumoto M, Hirata H, Nishiyama M, Morita A, Sasaki H, Uchida A. Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15:281-6.
- May M, Drucker C. Temporalis muscle for facial reanimation. A 13 year experience with 224 procedures. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 119:378–82.
- May M, Sobol SM, Mester SJ. Hypoglossal-facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991; 104(6):818-25.
- May M. Muscle transposition for facial reanimation. *Arch Otolaryngol.* 1984; 110:184-9.
- McCallister WV, Tang P, Trumble TE. Is end-to-side neurorrhaphy effective? A study of axonal sprouting stimulated from intact nerves. *J Reconstr Microsurg.* 1999; 15(8):597-603.
- McDonald WI. The time course of conduction failure during degeneration of a central tract. *Exp Brain Res.* 1972; 14:550-6.
- McLaughlin CR. Surgical support in permanent facial paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1953; 11:302-14.
- McQuarrie GI. Effect of a conditioning lesion on axonal sprout formation of nodes of Ranvier. *J Comp Neurol.* 1985; 231:239-49.
- Mennen U, Van Der Westhuizen MJ, Eggers IM. Re-innervation of M. biceps by end-to-side nerve suture. *Hand Surg.* 2003; 8(1):25-31.
-

- Mennen U. End-to-side nerve suture in clinical practice. *Hand Surg.* 2003; 8(1):33-42.
- Mennen U. End-to-side nerve suture in primate (Chacma Baboon). *Hand Surgery*, 21:1-6, 1998b.
- Mennen U. End-to-side nerve suture in the human patient. *Hand Surgery* 3(1):7-15, 1998a.
- Millesi H. Microsurgery of peripheral nerve repair. *Hand.* 1973; 5:157-60.
- Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1982; 19:25-37.
- Millesi H. Peripheral nerve surgery today: turning point or continuous development? (Review article). *J Hand Surg [Am.]*. 1990; 15:281-287.
- Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am.* 1981; 61:321-40.
- Millesi H. Surgery of post-traumatic brachial plexus lesions (personal approach in 2003). *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2004; 36(1):29-36.
- Moldovan M, Sorensen J, Krarup C. Comparison of the fastest regenerating motor and sensory myelinated axons in the same peripheral nerve. *Brain.* 2006; 129:2471–83.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the sciatic functional index always reliable and reproducible? *J Neurosc Meth.* 2008; 170:255-61.
- Montes GS, Cotta-Pereira G, Junqueira LCU. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Adv. Cell Neurobiol.* 1984; 5:177-218.
-

- Moy OJ, Peimer C A, Koniuch MP, Howard C, Zielesny M, Katikaneni DR. Fibrin seal adhesive versus nonabsorbable microsuture in peripheral nerve repair. *J Hand Surg [Am]*. 1988;13:273-8.
- Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab. Invest.* 2003; 83:175–85.
- Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadanian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(7):533-44.
- Nahas FX, Ferreira LM. Análise dos itens de um trabalho científico. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(Supl.):13-6.
- Nishihira S, Mccaffrey T. Repair of motor nerve defects: Comparison of suture and fibrin adhesive techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989; 100:17-21.
- Noah EM, Williams A, Fortes W, Terzis JK. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1997a; 13:317-25.
- Noah EM, Williams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorrhaphy: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve grafts. *J Reconstr Microsurg.* 1997b; 13:99-106.
- Ogun TC, Ozdemir M, Senaran H, Ustun ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. Technical note. *J Neurosurg.* 2003; 99(1):180-5.
- Okuyama N, Nakao Y, Takayama S, Toyama Y. Effect on number of fascicle on axonal regeneration in cable grafts. *Microsurg.* 2004; 24:400-7.
-

- Olsson Y, Kristensson K. Permeability of blood vessels and connective tissue sheaths in the peripheral nervous system to exogenous proteins. *Acta Neuropathol Berlin Suppl.* 1971; 5:61-9.
- Olsson Y, Kristensson K. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers following trauma to nerves. *Acta Neuropathol.* 1973; 23:105-11.
- Orgel MG, Terzis JK. Epineurial vs perineurial repair: Na ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1977; 61:80-91.
- Ozmen S, Latifoglu O, Ayhan S, Yavuzer R, Nurlu G, Sezer C, Atabay K. Impact of epineural excision of the distal recipient nerve in terminolateral neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 2004; 20(5):385-97.
- Papalia I, Geuna S, D'Alcontres FS, Tos P. Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. *Microsurg.* 2007; 27(1):56-61.
- Papalia I, Lacroix C, Brunelli F, D'alcontres FS. Direct muscle neurotization after end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(4):237-46.
- Payne CE, Hunt S P, Lamberty GH. Primary sciatic nerve repair using titanium staples. *Br J Plast Surg.* 2002; 55:330-4.
- Pereira CEM, Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras*, [serial online]. 1998; 13(2) [cited 2008 set 20]. Available from: [HTTP://probe.br/science.html](http://probe.br/science.html).
- Perrin FE, Lacroix S, Aviles-Trigueros M, David S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain.* 2005; 128:854–66.
- Perry VH, Brown MC, Tsao JW. The effectiveness of the gene which slows the rate of wallerian degeneration in C57BL/Ola mice declines with age. *Eur J Neurosc.* 1992; 4:1000-2.
-

- Perry VH, Lunn ER, Brown MC, Cahusac S, Gordon S. Evidence that the rate of Wallerian degeneration is controlled by a single autosomal dominant gene. *Eur J Neurosci.* 1990; 2:408-13.
- Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982; 253:1-12.
- Rab M, Koller R, Haslik W, Kamolz LP, Beck H, Meggeneder J, Frey M. The influence of timing on the functional and morphological result after nerve grafting: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg.* 2002; 55:628-34.
- Ramón Y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford University Press, 1928.
- Reis FA, Rodrigues AC, Vicente EJD, Eleutério ML, Dal Pai Silva M. Study of collateral sprouting from intact vagus nerve into a autologous nerve graft by using two different techniques: neuroraphy and coaptation with fibrin glue derivated of the snake venom. In: Congresso Pan-Americano de Anatomia 1998 São Paulo: SBA; 1998. n.130.
- Reis FA, Rodrigues AC. Comparative Study of Axonal Sprouting from the Vagus Nerve in Autologous Nerve Graft. *J Venom Anim Toxins.* 2000; 6(1):120 -120.
- Robinson AJ, Snyder-Mackler L. Eletrofisiologia Clínica: Eletroterapia e teste eletrofisiológico. 2 ed – Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- Romão AM, Viterbo F; Stipp EJ, Garbino JA, Rodrigues JA. Muscle electro stimulation of the cranial tibial muscle after crushing of the common fibular nerve: neurophysiologic and morphometric study in rats. *Rev Bras Ortop.* 2007; 42(3):41-6.
-

- Rosegay H, Edwards MS. The language of neurorrhaphy. *J Neurosurg.* 1980; 52:143-4.
- Rovak JM, Cederna PA, Kuzon WM. Terminolateral neurorrhaphy: a review of literature. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(8): 615-24.
- Rovak JM, Cederna PS, Macionis V, Urbanchek MS, Van Der Meulen JH, Kuzon WM. Termino-lateral neurorrhaphy: the functional axonal anatomy. *Microsurg.* 2000; 20:6-14.
- Santamaria E, Wei F, Chen I, Chuang DC. Sensation recovery on innervated radial forearm flap for hemiglossectomy reconstruction by using different recipient nerves. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 105:450.
- Scaramella L. L'anastomosi tra i due nervi facciali. *Arch Otolaryngol.* 1971; 82:209.
- Scevola S, Cowan J, Harrison DH. Does the removal of pectoralis minor impair the function of pectoralis major? *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112:1266–73.
- Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras* [serial online]. 2004 jul-Ag; 19(4). Disponível em URL: [HTTP://www.Scielo.br/acb](http://www.Scielo.br/acb).
- Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53(2): 278 – 85.
- Schottstaedt EK, Larsen LG, Bost TC. Complete muscle transposition. *J Bone Joint Surg.* 1955; 37A:897.
- Schultes G, Gagli A, Kleinert R, Kärcher H. Vascularized vs non-vascularized nerve transfers : histologic study in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(8):637-42.
- Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943; 66:237.
-

- Seddon, H.J. Use of autogenous grafts for repair of large nerve gaps in peripheral nerves. *Br J Surg.* 1947; 35:151-67.
- Shah MH, Kasabian AK, Karp NS, Kolker AR, Dublin BA, Zhang L, Sakuma J. Axonal regeneration through an autogenous nerve bypass: an experimental study in the rat. *Ann Plast Surg.* 1997; 38(4):408-14:discussion 414-5.
- Sherren J. Some points in the surgery of the peripheral nerves. *Edinb Med J.* 1906; 20:297-332.
- Smith JN. A new technique of facial animation. In: *International Congress Of Plastic And Reconstructive Surgery*, 5, 1971, Chatswood. Transactions. Chatswood, 1971. p. 83.
- Smith JW. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg.* 1964; 33:317.
- Stipp EJ, Viterbo F, Labbé D; Garbino JA. Analysis of tibial cranial muscle after muscular Double innervation with end-to-side neurorrhaphy. *J Venom Anim Toxins Trop Dis.* 2007; 13(4):911.
- Stopiglia AJ, Erhart EA. Utilização de técnica microcirúrgica na neurorrafia de animais domésticos. Estudo experimental da reparação fascicular no nervo ulnar de cão (*canis familiaris*). *Rev Fac Méd Vet Zootec Univ S Paulo, São Paulo.* 1987; 24(2):193-208.
- Sunderland S. Nerve injuries and their repair: a critical appraisal. NY:Churchill Livingstone, 1991.
- Sunderland S. Nerves and nerves injuries. Edinburg: Churchill Livingstone, 1978. p.483-650.
- Sunderland, S. Nerves and nerves injuries. Baltimore: Williams and Wilins Co., 1968. p.5, 26, 58,200-202.
-

- Sundine MJ, Quan EE, Saglam O, Dhawan V, Quesada PM, Ogden L, Harralson TG, Gossman MD, Maldonado CJ, Barker JH. The use of end-to-side nerve grafts to reinervate the paralyzed orbicularis oculi muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(7):2255-64.
- Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1991; 114:82-103.
- Tate JR; Tollefson TT. Advances in facial reanimation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 14:242-8.
- Terzis J, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap, suture under tension versus graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975; 56:166-70.
- Terzis J. Clinical microsurgery of the peripheral nerve: the state of the art. *Clin Plast Surg.* 1979; 6:247-67.
- Terzis JK. Pectoralis minor: a unique muscle for correction of facial palsy. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83(5):767-76.
- Tham SKY, Morrison WA. Motor collateral sprouting through an end-to-side nerve repair. *J Hand Surg.* 1998; 23A(5):844-51.
- Tiangco DA, Papakonstantinou KC, Mullinax KA, Terzis, JK. IGF-I and end-to-side nerve repair: a dose-response study. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17:247-56.
- Ting J, Huo G, Marin V, Rogers L, Gorlick N, Ascherman J, Chiu DTW. End-to-side neurorrhaphy using autogenous vein nerve conduits. *Surgical forum XLIX*:637-638, 1998.
- Vaughan DW. Effects of advancing age on peripheral nerve regeneration. *J Comp Neurol.* 1992; 323:219-37.
-

- Vedung S, Hakelius L, Stalberg E. Cross-face nerve grafting followed by free muscle transplantation in young patients with longstanding facial paralysis. Reanimation of the cheek and the angle of the mouth. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1984; 18:201–8.
- Venault B, Roffe JL, Magalon G, Chrestian M, Bureau H. Régénération nerveuse. Etude expérimentale chez Le chien. Trois techniques de suture nerveuse. *Ann Chir*. 1981; 35(6):441-6.
- Veronesi B, Boyes WK. Morphometric and electrophysiological evidence for a diameter-based rate of degeneration in the optic nerve of the rat. *Exp Neurol*. 1988; 101:176-89.
- Vicente EJD, Rodrigues AC, Gallacci M. Avaliação funcional da regeneração de nervo periférico induzida pela cola de fibrina derivada do veneno de serpente e pela neurorrafia. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 13., 1998, Caxambu. *Anais. Caxambu*, 1998a. p.190-1.
- Vieira S, Hossne WS. Metodologia científica para a área de saúde. Rio de Janeiro: Campus, 2001. 192p.
- Virmond M, Pereira HR. Tubular repair of the sciatic nerve in the rat with preserved bovine pericardium. In: Workshop Internacional de Microcirurgia e Cirurgia de Mão, 17., 2000, Botucatu. *Anais. São Paulo: UNESP*, 2000. p.27.
- Viterbo F, Faleiros HRP. Transposição ortodrômica do músculo temporal para tratamento da paralisia facial. Contribuição para melhor resultado estético. XXXVI Congresso Brasileiro de Cirurgia Plástica, Rio de Janeiro, 16 de novembro de 1999.
- Viterbo F, Franciosi LF, Palhares A. Nerve grafting and end-to-side neurorrhaphies connecting the phrenic nerve to the brachial plexus. *Plast Reconstruct Surg*. 1995; 96(2):494-5.
-

- Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restauration of sensitivity after removal of the sural nerve – a new application of lateral-terminal neurorrhaphy (Case Report). *Rev Soc Bras Cir Plást Est Reconstr.* 1993a; 8:85-7.
- Viterbo F, Ripari WT. Nerve grafts prevent paraplegic pressure ulcers. *J Reconstruct Microsurg.* 2008; 24(4):251-3.
- Viterbo F, Ripari WT. Sensation recovery in paraplegics – a new way, apresentado no 71th ASPRS/PSEF/ASMA Annual Scientific Meeting (Congresso Americano de Cirurgia Plástica) – San Antonio, de 2 a 6 de novembro de 2002. (anais p. 181-182).
- Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Rev Paul Med.* 1998; 116:1808-14.
- Viterbo F, Tohmazini IA, Gianini MJSM. Reparação de nervos periféricos com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Resultados preliminares. *Acta Cir Bras.* 1993b; suppl.2:85.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1994a; 94:1038-47.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineurial sheath: experimental study in rats. *Rev Paul Med.* 1992; 110:267-75.
- Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Two end-to side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineurial sheath: experimental study in rats. *Brit J Plast Surg.* 1994b; 47:75-80.
- Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorrhaphy. *Rev Soc Bras Cir Plást Est Reconstr.* 1993; 8:29-35.
-

- Viterbo F. Neurorrafia Látero-terminal: Estudo experimental no rato. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1992.
- Viterbo, F. Cross-face termino-lateral neurorrhaphy: a new method for treatment of facial palsy. 61st Annual Scientific Meeting of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons, the Plastic Surgery Educational Foundation, and the American Society of Maxillofacial Surgeons, Washington, DC, Sep 20th, 1992b; p. 356-8.
- Vlastou C. Facial paralysis. *Microsurg.* 2006; 26:278-87.
- Voche P, Ouattara D. End-to-side neurorrhaphy for defects of palmar sensory digital nerves. *Brit J Plast Surg.* 2005; 58(2):239-44.
- Voche P. Notre experience de dix sutures latéroterminales de nerfs sensitifs de la main. *Ann Chir Plast Esthét.* 2005; 50(4):264-9.
- Waller AV. Experiments on the section of the glosso-pharyngeal and hypoglossal nerve of the frog and observation of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philosophical transactions. Royal Society of London.* 1850; 140:423.
- Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain.* 2005; 128:1897-910.
- Watanabe K, Tsukagoshi T, Kuroda M, Hosaka Y. Nerve conduit using fascia-wrapped fibrocollagenous tube. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(5):183-90.
- Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advances in peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg.* 1997; 24:63-73.
-

- Yamamoto Y, Sasaki S, Sekido M, Yokoyama T, Tsutsumida A, Furukawa H, Sawamura Y, Sugihara T. Alternative approach using the combined technique of nerve crossover and cross-nerve grafting for reanimation of facial palsy. *Microsurg.* 2003; 23:251-6.
- Yan JG, Matloub HS, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Jaradeh SS, Milwaukee. A modified end-to-side method for peripheral nerve repair: large epineurial window helicoids technique versus small epineurial window standard end-to-side technique. *J Hand Surg.* 2002b, 27A(3):484-92.
- Yan YH, Yan JG, Sanger JR, Zhang LL, Riley DA, Matloub HS. Nerve repair at different angles of attachment: experiment in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2002a; 18(8):703-8.
- Yoleri L, Songur E, Yoleri O, Vural T, Cagdas A. Reanimation of early facial paralysis with hypoglossal/facial end-to-side neurorrhaphy: a new approach. *J Reconstr Microsurg.* 2000; 16(5):347-55.
- Yüksel F, Karacaoglu ME, Guler M. Nerve regeneration through side-to-side neurorrhaphy sites in a rat model: a new concept in peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104:2092-9.
- Zhang F, Cheng C, Chin BT, Ho PR, Weibel TJ, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Results of termino-lateral neurorrhaphy to original and adjacent nerves. *Microsurg.* 1998; 18:276-81.
- Zhao J, Chen Z, Chen T. Nerve regeneration after termino-lateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13:31-37.
- Zhao Q, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G, Lu SB. Axonal projections and functional recovery following fascicular repair of the rat sciatic nerve with Y-tunneled silicone chambers. *Rest Neurol Neurosc.* 1992; 4(1):13-9.
-

Anexo

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

***CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 438, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Estudo comparativo com diferentes números de pontos na neurografia término lateral em ratos”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto, com a colaboração de Rodrigo de G. Franco, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os **ratos** são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.*

Projeto de pesquisa aprovado em 24/11/2004

Profª Drª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA