

Daniel Nunes e Silva

FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO ASSOCIADO À COLA DE FIBRINA NO REPARO NERVOSO TÉRMINO-LATERAL. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

**CAMPO GRANDE
2011**

Daniel Nunes e Silva

FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO ASSOCIADO À COLA DE FIBRINA NO REPARO NERVOSO TÉRMINO-LATERAL. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Andréia Brochado Antonioli da Silva

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto

**CAMPO GRANDE
2011**

DANIEL NUNES E SILVA

**FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO ASSOCIADO À COLA DE FIBRINA NO REPARO NERVOSO
TÉRMINO-LATERAL. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor.

CAMPO GRANDE, 02 DE DEZEMBRO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Andréia Brochado Antoniolli da Silva
Professora Adjunta do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS

MEMBROS EFETIVOS:

Prof. Dr. João Ricardo Filgueiras Tognini
Professor Titular do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS

Prof. Dr. Marcelo Rosseto
Professor Adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS

Prof. Dr. Pedro Bins Ely
Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica da UFCSPA

Prof. Dr. André Luis Alonso Domingos
Professor Titular do Curso de Medicina da ANHANGUERA-UNIDERP

MEMBRO SUPLENTE:

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos
Professor Adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS

Aos meus filhos
JAIME E JOANA,
razões da minha vida.

A minha esposa
CÍNTIA,
amor da minha vida.

A minha família,
SIDNEI, ROSAURA E CECÍLIA,
que a distância não afastou.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. **Andréia Brochado Antoniolli da Silva**,
minha orientadora, por seus ensinamentos,
sempre oferecidos de forma gentil, dedicada e estimulante.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. **Fausto Viterbo**,
meu co-orientador, que, não obstante a ser um dos cirurgiões plásticos
de maior importância no cenário da microcirurgia mundial, dedicou
seu precioso tempo para orientar mais um discípulo.
Meus sinceros, profundos e eternos agradecimentos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A meu pai, **Sidnei Carneiro e Silva**,
que, além de ser o maior e melhor exemplo para minha vida,
ainda foi o fotógrafo responsável pelas imagens apresentadas nesta tese.

AGRADECIMENTOS

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL (UFMS)**, pelo irrestrito apoio – tanto pessoal quanto material - na realização desta tese.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)**, que, pelo incentivo teórico inicial, gerou as bases deste estudo.

À **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – BOTUCATU - (UNESP)**, pela pronta e ampla disponibilização do seu concorrido laboratório de microcirurgia.

Ao Prof. Dr. **RICARDO DUTRA AYDOS**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, que participou decisivamente na construção deste trabalho.

À Profa. Dra. **ELENIR ROSE JARDIM CURY PONTES**, professora da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Medicina Preventiva da UFMS, pelos ensinamentos e pela orientação estatística.

Ao Dr. **JOÃO ILGENFRITZ JR**, pelas contínuas contribuições técnicas, essenciais para minha formação, e pelo incentivo para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. **ALEXANDRE NAKAO ODASHIRO**, professor Adjunto da Faculdade de Medicina da ANHANGUERA - UNIDERP, pela orientação na análise histológica do estudo.

Ao Dr. **DANILO NAKAO ODASHIRO**, responsável pelo serviço de patologia do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica (LAC), pelo apoio total na preparação das lâminas e na posterior análise morfológica.

Ao Prof. **FABRÍCIO DE OLIVEIRA FRAZÍLIO**, professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da ANHANGUERA - UNIDERP, pela orientação na realização do experimento cirúrgico.

À Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto (FUNPEC), em especial à Prof. Dra. **MARIA HELENA SOUZA GOLDMAN**, pela completa e irrestrita atenção e orientação sobre o Fator de Crescimento Nervoso em estudo.

À Profa. Dra. **REGINA MARIA PAPAIS ALVARENGA**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UNIRIO, que proporcionou as bases teóricas para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO GUEDES CORRÊA**, professor Titular da Disciplina de Neurocirurgia da UNIRIO, que, pelos seus ensinamentos, deu origem a esta tese.

Ao Dr. **RAFAEL JOSÉ DE CASTRO** e Dr. **DIOGO GOMES AUGUSTO**, futuros cirurgiões plásticos e companheiros de centro cirúrgico, pelo apoio decisivo e qualificado em todas as fases deste estudo.

Ao Dr. **FÁBIO MACIEL**, residente de microcirurgia da UNESP - BOTUCATU, pelos ensinamentos e pelo fundamental auxílio nas dissecções anatômicas dos animais.

À **ROSEANA LEITE**, técnica de laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFMS, pelo qualificado auxílio com os animais da experimentação.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS que muito colaboraram em minha formação e para a conclusão deste estudo.

“Minha vida é uma colcha de retalhos. **Todos da mesma cor**”.

Mário Quintana

RESUMO

Nunes e Silva D. FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO ASSOCIADO À COLA DE FIBRINA NO REPARO NERVOSO TÉRMINO-LATERAL. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS. Campo Grande; 2011. [Tese - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina].

Objetivo: o Fator de Crescimento Nervoso (FCN) tem sido considerado como uma possível alternativa para a potencialização de reparos nervosos. No entanto, o melhor método de administrá-lo no transoperatório ainda não foi completamente estabelecido. Recentemente, em reparos nervosos término-terminais, a cola de fibrina (CF) foi descrita como promissora alternativa para sua administração. A realização do reparo nervoso término-lateral (RNTL), apenas com CF, contendo FCN, ainda não foi testada na literatura e justificou a realização deste estudo.

Métodos: Foram utilizados 72 ratos Wistar distribuídos igualmente em seis grupos: o grupo A não foi submetido à secção nervosa (grupo controle); o grupo B foi submetido à secção do nervo fibular sem reparo nervoso; o grupo C foi submetido ao RNTL com suturas; o grupo D ao RNTL com suturas e FCN; o grupo E ao RNTL apenas com CF; o grupo F ao RNTL com CF contendo FCN. A função motora foi avaliada no pré-operatório e posteriormente com 30, 60 e 90 dias. Noventa dias após a cirurgia, foram analisadas a massa do músculo tibial cranial, o número e diâmetro médio das fibras musculares e dos axônios regenerados por campo.

Resultados: Não houve diferença entre a massa média dos animais, demonstrando a homogeneidade da amostra e confirmando as condições de padronização do estudo ($p>0,05$). As demais variáveis analisadas, não mostraram diferença entre os grupos operados, independente da técnica utilizada no reparo (sutura X CF) ($p>0,05$), bem como não mostraram influência positiva na adição do FCN no grupo F ($p>0,05$). Em todas as variáveis analisadas, os animais submetidos ao RNTL foram superiores estatisticamente ao grupo B, demonstrando o sucesso da técnica ($p<0,05$). No entanto, seus resultados foram inferiores ao grupo controle ($p>0,05$).

Conclusões: O RNTL, independente do tipo de reparo utilizado, determinou a recuperação do animal, tanto histológica quanto funcionalmente. A adição do FCN na CF não potencializou os resultados do procedimento.

Palavras-chave: Técnicas de Sutura. Adesivo Tecidual de Fibrina. Microcirurgia. Ratos.

ABSTRACT

NUNES E SILVA D. NERVE GROWTH FACTOR WITH FIBRIN GLUE IN END-TO-SIDE NERVE REPAIR, EXPERIMENTAL STUDY IN RATS.

Purpose: The Nerve Growth Factor (NGF) has been considered a possible alternative to nerve repair potentialization. However, the best way to present it in the repair has not been fully set. Recently, the fibrin glue (FG) has been described as a promising alternative to deliver NGF in end-to-end nerve repair. The excellent results stimulated its use in others kind of nerve repairs. The End-to-side nerve repair (ETS), performed with FG containing NFG, has not yet been tested and justified this study.

Methods: 72 Wistar rats were distributed into six equal groups: group A was not submitted to surgery (control group); group B was submitted to fibular section only; group C was submitted to classic ETS with sutures; group D to ETS with sutures and NGF; group E to ETS with FG only; group F to ETS with FG containing NGF. The motor function was accompanied in the preoperative and after 30, 60 e 90 days. Ninety days after the surgery, the tibial cranial muscle mass, the number and diameter of the muscular fibers and the regenerated axons were measured to compare the group results.

Results: There was no difference in the animal mass, demonstrating the homogeneity of the sample and confirming the standardization of the study ($p>0.05$). All the other analyzed variables did not show any differences among the operated groups, independent from the technique used in the repair (suture x FG) ($p>0.05$), and also did not show positive influence in the addition of NGF in group F ($p>0.05$). In all the analyzed variables the animals submitted to ETS were statistically superior to group B, showing the repair success ($p<0.05$). However their results were inferior to the control group ($p>0.05$).

Conclusions: The ETS showed the same good recovery pattern, independent from the kind of repair used. The addition of NGF in FG was not enough for the potentialization of the ETS results.

Key Words: Suture Techniques. Fibrin Tissue Adhesive. Microsurgery. Rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Massa dos animais (g) no primeiro e no último dia do estudo - 2011.....	66
Tabela 2	Análise dos índices de função obtidos no primeiro, segundo, terceiro e quarto testes de marcha, em cada grupo (x-1) - 2011.....	67
Tabela 3	Análise do número e do diâmetro dos axônios, por campo, nos grupos em estudo – 2011.....	72
Tabela 4	Análise do número e do diâmetro das fibras musculares do músculo tibial cranial direito, por campo, nos grupos em estudo – 2011.....	72
Tabela 5	Análise da massa (g) do músculo tibial cranial nos grupos em estudo – 2011.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos grupos em estudo.....	48
Figura 2	Fotografia do transoperatório de animal do Grupo A, no qual o nervo fibular não foi seccionado. De forma ilustrativa, o nervo fibular – identificado pela seta branca - está sendo tracionado pelo fio preto.....	50
Figura 3	Fotografia do transoperatório de animal do Grupo B, no qual o nervo fibular – identificado pela seta branca - foi apenas seccionado, sem a realização de reparo nervoso.....	51
Figura 4	Fotografia do transoperatório de animal do Grupo C, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se suturas (RNTL de Viterbo). De forma ilustrativa, o nervo fibular, já reparado e identificado pela seta branca, está sendo tracionado inferiormente pelo fio azul.....	52
Figura 5	Fotografia do transoperatório de animal do Grupo D, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se suturas associadas ao FCN. De forma ilustrativa, o nervo fibular, já reparado e identificado pela seta branca, está sendo tracionado inferiormente pelo fio azul.....	53
Figura 6	Fotografia do FCN utilizado no experimento.....	53
Figura 7	Fotografia da CF utilizada no estudo.....	54

Figura 8	Fotografia do transoperatório de animal do Grupo E, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se apenas CF. A seta branca identifica o reparo realizado.....	54
Figura 9	Fotografia do transoperatório de animal do Grupo F, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se CF contendo FCN. A seta branca identifica o reparo realizado.....	55
Figura 10	Fotografias ilustrativas do transoperatório de animais submetidos ao RNTL com CF, demonstrando a resistência do reparo à tração inferior realizada com o fio azul – identificado com a seta branca.....	55
Figura 11	Fotografias ilustrativas do transoperatório de animais submetidos ao experimento, identificando-se a sequência cirúrgica. 1: anatomia dos nervos em estudo; 2: identificação do nervo fibular (fio preto) e nervo sural (fio azul); 3: secção do nervo fibular com microtesoura; 4: cotos nervosos separados após a secção do nervo fibular; 5: fixação do coto nervoso proximal; 6: fixação do coto distal - grupo B; 7: RNTL com sutura – grupo C; 8: RNTL com sutura e FCN – grupo D; 9: RNTL com CF – grupo E; 10: RNTL com CF contendo FCN – grupo F.....	56
Figura 12	Grupos em estudo. A: Grupo A - grupo controle; B: Grupo B – secção do nervo fibular sem reparo; C: Grupo C – RNTL com sutura; D: Grupo D – RNTL com sutura associado com FCN; E: Grupo E – RNTL com CF; F: Grupo F – RNTL com CF contendo FCN.....	57
Figura 13	Fotografia do segundo transoperatório de animais em estudo. A: animal do grupo D, demonstrando a permanência do RNTL de Viterbo. B: animal do grupo F, também demonstrando a permanência do RNTL realizado com CF contendo FCN.....	58
Figura 14	Fotografia do segundo transoperatório de animais em estudo: A:	

animal do grupo A, com o músculo tibial cranial esquerdo (MTCE) identificado. **B:** músculos tibiais craniais direito e esquerdo (MTCD, MTCE) de animal do grupo B, identificando-se importante atrofia do MTCE após a secção nervosa..... 59

Figura 15 Representação esquemática do desenho do estudo. Legenda: **RNTL:** reparo nervoso término-lateral; **Cola:** Cola de Fibrina; **FCN:** fator de crescimento nervoso..... 60

Figura 16 Aspecto da pegada de um animal em estudo: **TP:** distância entre o tálus e a terceira falange distal (tamanho da pegada); **ATD:** distância entre a primeira e quinta falange distal (abertura total dos dedos); **APD:** distância entre a segunda e a quarta falange distal (abertura parcial dos dedos)..... 61

Figura 17 Aspecto da contagem histológica, realizada por meio do *Image Pro Plus 4.5*® – (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA)..... 63

Figura 18 Aspecto das pegadas (MPE, MPD) de animais dos grupos A a F, no primeiro (Dia 0), segundo (Dia 30), terceiro (Dia 60) e quarto (Dia 90) testes de marcha. O aspecto das pegadas do MPE do animal do grupo B demonstra que não houve recuperação motora nos três últimos testes de marcha. Os aspectos das pegadas dos MPE dos animais dos grupos C a F, no quarto teste de marcha, demonstram recuperação funcional, com retorno da abertura dos dedos..... 67

Figura 19 Fotomicrografias do nervo fibular dos animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados. (Coloração: HE; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – Media Cybernetics, Silver Spring, EUA)..... 68

Figura 20 Fotomicrografias do nervo fibular de outros animais em estudo. **A:**

animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – *Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*)..... 69

Figura 21 Fotomicrografias do MTC esquerdo dos animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de fibras musculares. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – *Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*)..... 70

Figura 22 Fotomicrografias do MTC esquerdo de outros animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de fibras musculares. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – *Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*)..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNP: Sistema Nervoso Periférico

FN: Fator Neurotrófico

FCN: Fator de Crescimento Nervoso

RNTT: Reparo Nervoso Término-Terminal

RNTL: Reparo Nervoso Término-Lateral

TrkA: Tiroquinase A

UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

LCE: Laboratório de Cirurgia Experimental

TP: Tamanho da Pegada

ATD: Abertura Total dos Dedos

IFC: Índice de Função Ciática

MPE: Membro Pélvico Esquerdo

MPD: Membro Pélvico Direito

HE: Hematoxilina-Eosina

CF: Cola de Fibrina

MTC: Músculo Tibial Cranial

MTCE: Músculo Tibial Cranial Esquerdo

MTCD: Músculo Tibial Cranial Direito

APD: Abertura Parcial dos Dedos

NGF: Nerve Growth Factor

EUA: Estados Unidos da América

DP: Desvio padrão

LAC: Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
ml	Mililitro
mmol	Milimol
UI	Unidade Internacional
%	Porcento
kg	Quilograma
g	Grama
mg	Miligrama
Mhz	Megahertz
H	horas
KIU	Inibidor de unidades da calicreína

SUMÁRIO

01 - INTRODUÇÃO.....	21
02 - OBJETIVOS.....	26
03 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
04 - MATERIAL E MÉTODO.....	46
4.1 - TESTE DE MARCHA.....	48
4.2 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO EXPERIMENTAL.....	48
4.3 - ACOMPANHAMENTO DA FUNÇÃO MOTORA.....	57
4.4 - COLETA DE NERVOS E MÚSCULOS.....	57
4.5 - ANÁLISE DA FUNÇÃO MOTORA.....	60
4.6 - ESTUDO HISTOLÓGICO.....	62
4.7 - DIGITALIZAÇÃO DA IMAGEM.....	62
4.8 – MORFOMETRIA.....	63
4.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
05 - RESULTADOS.....	65
06 - DISCUSSÃO.....	73
07 - CONCLUSÃO.....	90
08 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
09 - NORMAS ADOTADAS.....	117
10 - ANEXOS.....	119
11 - APÊNDICES.....	138

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a partir da incorporação de novas tecnologias e conhecimentos, importantes avanços foram obtidos na cirurgia dos nervos periféricos (KINGHAN, TERENCE, 2006). Apesar disso, ainda hoje, a recuperação funcional completa, após uma lesão nervosa, é difícil e complexa, permanecendo como um dos grandes desafios da medicina moderna (ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006a; HANINEC *et al.*, 2007).

A potencialização da regeneração axonal, minimizando as perdas neuronais e ampliando a capacidade de resposta do nervo ao trauma, tem sido foco de diversos estudos nos últimos anos. A descoberta de agentes que, ao serem incluídos na rotina microcirúrgica, acelerem o crescimento nervoso é considerada fundamental para que a evolução nos resultados seja obtida (LEVI-MONTALCINI, CALISSANO, 2006; DELISTOIANOV, 2007).

Neste sentido, a utilização dos fatores neurotróficos (FN) vem ganhando importante destaque na literatura (MARTINS *et al.*, 2005a). Um dos possíveis responsáveis pelos resultados insatisfatórios no pós-operatório das cirurgias de nervos periféricos é a carência local de FN (CHUNZHENG *et al.*, 2008; JUBRAN, WIDENFALK, 2003). Segundo diversos autores, a administração de FN exógenos é capaz de determinar a melhoria dos resultados microcirúrgicos, ao reduzir a degeneração axonal e promover a sobrevivência celular, permitindo consequentemente um melhor crescimento nervoso final (DERBY *et al.*, 1993; BHANG *et al.*, 2007; MARCOL *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2003; LEVI-MONTALCINI, 1987).

O FN de maior destaque na literatura é o Fator de Crescimento Nervoso (FCN), considerado um importante neuroprotetor e neuroestimulador, sendo fundamental para a sobrevivência e para a regeneração de axônios lesados (SILVA, 1995a; SILVA, 1995b; REIS, 2005; MARTINS *et al.*, 2005b). Primeiro FN a ser descoberto, o FCN é capaz de aumentar a atividade mitótica axonal, facilitando a maior incorporação de aminoácidos e a consequente maior e mais rápida regeneração celular (LEVI-MONTALCINI, 1965; LEVI-MONTALCINI, 1952; CUELLO, 1997; LEVI-MONTALCINI, CALISSANO, 2006).

No entanto, apesar de altamente desejável, a utilização do FCN exógeno em um reparo nervoso não é tarefa simples (HONDERMARCK, 2008; BHANG *et al.*, 2007;

LEE *et al.*, 2003). A administração sistêmica é inviável devido aos grandes volumes de FCN necessários para atingir-se o volume terapêutico na área reparada. Da mesma forma, a administração local - em dose única - é também pouco produtiva, visto que a meia-vida do FCN é de apenas 2,4 minutos, sendo sua ação rapidamente inativada (BHANG *et al.*, 2007).

Autores como Sjöberg e Kanje (1989) preconizaram a infusão contínua do FCN no reparo nervoso durante semanas. Outros como Santos *et al.* (1998) sugeriram a infusão diária múltipla – através de um reservatório previamente implantado. Tais alternativas, apesar dos excelentes resultados experimentais obtidos, estão longe das opções ideais para o uso clínico, visto que exigem múltiplos procedimentos e, principalmente, determinam riscos e morbidade significativa aos pacientes (TAYLOR *et al.*, 2006).

Assim, várias técnicas têm sido desenvolvidas na tentativa de aumentar a efetividade do FCN no reparo nervoso, com ênfase na identificação do método ideal de administrá-lo no transoperatório (LEE *et al.*, 2003). As alternativas existentes são de custo elevado, de difícil aplicabilidade clínica e de eficácia incerta. O método padrão-ouro ainda não foi estabelecido e segue sendo estudado (CHUNZHENG *et al.*, 2008).

Segundo diversos autores, um dos grandes desafios da microcirurgia moderna é o desenvolvimento de um método simples, rápido e barato para aplicar o FCN na localização certa, na dose correta e na frequência adequada (SUNDERLAND, 1991; LEE *et al.*, 2003; BHANG *et al.*, 2007; CHUNZHENG *et al.*, 2008).

Alguns estudos já comprovaram que a cola de fibrina (CF), de uso comercial para síntese de tecidos, pode ser utilizada como veículo carreador de substâncias diversas, como, por exemplo, antibióticos para o tratamento de infecções crônicas ou até mesmo células cultivadas artificialmente (ZENG *et al.*, 1994; HORCH *et al.*, 1998). Entre outros autores, Chunzheng *et al.* (2008) sugeriram que a CF poderia ser usada como carreadora do FCN para os reparos de nervos periféricos.

A questão discutida na literatura é se a CF manteria o FCN ativo por mais tempo, gradualmente liberando-o no reparo, permitindo sua ação potencializadora direta e prolongada (CHENG *et al.*, 1998; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; BHANG *et al.*, 2007).

Poucos estudos estão disponíveis sobre o assunto e a dúvida ainda persiste (BHANG *et al.*, 2007). Zeng *et al.* (1994), Jubran & Widenfalk (2003) e, mais recentemente, Chunzheng *et al.* (2008) referiram maiores índices de regeneração

axonal e precocidade na recuperação funcional ao realizarem neurorrafias término-terminais associadas à CF contendo FCN.

A grande expectativa gerada por estes resultados determinou a avaliação da associação da CF com o FCN, em diferentes tipos de reparos, visto que o reparo nervoso término-terminal (RNTT) não pode ser indicado em todos os casos – como, por exemplo, nas perdas do coto proximal (PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005). Para estes casos, uma alternativa técnica que vem ganhando grande destaque nos últimos anos é o reparo nervoso término-lateral (RNTL) (OGÜN *et al.*, 2003; DAHLIN *et al.*, 2007; PONDAAG, GILBERT, 2008).

Diferentemente da sua ampla aceitação no RNTT, o papel da CF ainda não foi completamente estabelecido no RNTL, sendo que a literatura sobre o tema é escassa e apresenta resultados divergentes (SATO, 2005; FARRAG *et al.*, 2007).

Os defensores da técnica acreditam que, por minimizar a formação de fibrose e de granulomas no reparo nervoso - evitando a formação de obstáculos para os axônios em regeneração - e por reduzir o trauma local, característico das neurorrafias, o RNTL realizado apenas com CF proporcionaria melhores índices de crescimento nervoso e melhores resultados no pós-operatório, quando comparado ao reparo realizado com suturas (TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003; LAGO, 2005; ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006a; ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006b; MARTINS *et al.* 2005b).

Os críticos da técnica referem altos índices de deiscência e insegurança no pós-operatório, alegando que a CF tem resistência à tração inferior à sutura nervosa (MATAR, 2003; REBOL, MILOJKOVIĆ, DIDANOVIC, 2006; MENOFSKY, VAN GULIK, WESSELING, 2002; MATTAR *et al.*, 1990). Relatos de melhores resultados com a utilização da neurorafia clássica também são frequentes na literatura (CHEM, CHEM, 2004; SHEKARRIZ, STOLLER, 2002; CHEM, 2003).

A maioria dos autores concorda, entretanto, que é necessária a definição dos reais limites da utilização da CF no RNTL (MUELLER, 2001; SATO, 2005; SAMII *et al.*, 2006). A existência de resultados contraditórios descritos na literatura, a relevância do tema e as possibilidades abertas pela sua realização justificam a realização de mais estudos sobre o assunto (SATO, 2005; SAMII *et al.*, 2006).

Nesse sentido, em 2010, foi obtida a reinervação do coto distal do nervo fibular de ratos a partir da realização do RNTL, apenas com CF, na face lateral do nervo tibial – sem a utilização de microssuturas – procedimento conhecido como RNTL protegido. O

sucesso do reparo foi confirmado em testes de função e posterior análise morfológica dos animais (NUNES E SILVA *et al.*, 2010).

Apesar do êxito do experimento, os índices de regeneração axonal ficaram abaixo dos índices obtidos no grupo controle (NUNES E SILVA *et al.*, 2010). Esse resultado – comum às técnicas microcirúrgicas disponíveis atualmente, inclusive ao RNTL clássico (Viterbo, 1992) – confirmou a necessidade do aprimoramento da técnica para a possível potencialização dos seus resultados (SANTOS *et al.*, 1998; REBOL, MILOJKOVIĆ, DIDANOVIC, 2006).

Em revisão sistemática da literatura, nas bases de dados do *Medline* e *LILACS*, não foram encontrados estudos sobre a realização do RNTL apenas com CF contendo FCN. Desta forma, o entendimento que o RNTL protegido é eficaz e desejável, mas necessita de aprimoramento em seus resultados, e que o FCN tem condições de potencializá-los, levou a experimentação, pela primeira vez, de sua inclusão na técnica.

A comprovação da obtenção de uma regeneração axonal superior determinaria um grande avanço para a microcirurgia. Se verificada sua funcionalidade, os benefícios do RNTL com CF seriam somados aos efeitos positivos determinados pela presença local e duradoura do FCN.

Diante do exposto, entende-se a relevância do assunto e a necessidade do desenvolvimento de estudos sobre o tema.

2 - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Estudar a ação do FCN, associado à CF, em um RNTL protegido, em ratos.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Estudar a função motora de ratos submetidos ao RNTL, realizado com CF contendo FCN.

2 – Estudar a morfologia do nervo fibular de ratos submetidos ao RNTL, realizado com CF contendo FCN;

3 – Estudar a morfologia do músculo tibial cranial de ratos submetidos ao RNTL, realizado com CF contendo FCN.

4 – Estudar a massa do músculo tibial cranial de ratos submetidos ao RNTL, realizado com CF contendo FCN.

3 - REFERENCIAL TEÓRICO

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

Nos grandes centros, com a transformação do trauma em problema de saúde pública, as lesões de nervos periféricos vêm se tornando cada vez mais comuns (KINGHAN, TERENCE, 2006). Apesar dos contínuos avanços obtidos na terapêutica microcirúrgica, as sequelas resultantes das lesões nervosas são muitas vezes permanentes e incapacitantes (ROMÃO *et al.*, 2007). Mesmo em lesões simples, tratadas com cirurgias bem conduzidas, a recuperação funcional satisfatória muitas vezes não é obtida (LIDA *et al.*, 2003; HAYASHI *et al.*, 2004; TOTH *et al.*, 2008).

O correto entendimento da microestrutura do SNP e das variáveis envolvidas no complexo sistema de regeneração nervosa são fundamentais para a compreensão das possíveis estratégias a serem utilizadas nas tentativas de potencializar-se a recuperação do nervo após traumas (MUELLER, 2008).

O nervo periférico é constituído basicamente por axônios, tecido conjuntivo e estruturas coadjuvantes na nutrição, proteção e preservação de seus elementos internos (SILVA, 1995a). Os axônios são recobertos pelo endoneuro, membrana de tecido conjuntivo onde se destacam os nodos de Ranvier e as células de Schwann - circundados pela membrana basal (SATO, 2005). A reunião de várias fibras nervosas forma o fascículo nervoso, envolvido pelo perineuro. Este tem a função de proteção mecânica dos fascículos, formando uma importante barreira às substâncias difusíveis e preservando o microambiente endoneural (VITERBO, FALEIROS, 2003).

O nervo periférico pode ser formado pela reunião de um ou mais fascículos nervosos, os quais são envolvidos pelo epineuro. As três estruturas de proteção citadas - o endoneuro, o perineuro e o epineuro - são unidas por trabéculas de tecido conjuntivo, mantendo a estrutura axonal firme, consistente e homogênea (SILVA, 1995b).

De modo geral, os axônios com diâmetro superior a 2 μ m são recobertos ainda por uma bainha lipídica – a bainha de mielina – sendo denominados fibras mielínicas. A bainha de mielina é formada a partir das células Schwann, sendo que cada axônio relaciona-se com apenas uma destas células (SATO, 2005).

O conhecimento das consequências determinadas pelo trauma ao nervo é fundamental para o esclarecimento das estratégias utilizadas na reparação nervosa atual. As sequelas determinadas pela lesão de um nervo periférico são classificadas de

acordo com o prejuízo estrutural determinado a ele, com a repercussão funcional estabelecida e com a capacidade ou não de regeneração final (KINGHAN, TERENCE, 2006).

A classificação do grau de lesão nervosa varia de acordo com o autor estudado e também com o nível de investigação utilizado no diagnóstico. Seddon, em 1943, segundo diversos autores, classificou as lesões nervosas em três tipos: neuropraxia, axoniotmese e neurotmeese (REIS, 2005).

A neuropraxia é caracterizada apenas pela presença de lesão na bainha de mielina, com manutenção da integridade dos demais elementos do nervo - sendo este o grau mais leve de lesão nervosa de Seddon. A condução do estímulo é temporariamente prejudicada, determinando assim desde paralisia motora completa até a perda de sensibilidade na área atingida. Como não existe lesão estrutural do axônio, as chances de recuperação são elevadas – mesmo sem intervenção cirúrgica. Nos casos de compressão prolongada, pode-se identificar, no entanto, focos de desmielinização, nos quais o prejuízo é maior (MATTAR, 2003).

Na axoniotmese há a interrupção na estrutura do axônio, determinada por uma secção pontual. Não há, no entanto, lesão no perineuro e no epineuro, os quais ficam preservados. O tubo neural permanece intacto, com manutenção da continuidade anatômica do nervo. Ocorre a degeneração walleriana, porém com um bom prognóstico, sendo a recuperação funcional possível. A velocidade de condução ainda pode ser normal, se as fibras mais calibrosas estiverem íntegras, o que pode dificultar o correto diagnóstico (MUELLER, 2008).

Na neurotmeese temos a ruptura completa das estruturas do nervo, sendo o grau mais importante de lesão nervosa de Seddon. Há interrupção total na transmissão dos impulsos nervosos. Como não existe mais a continuidade do epineuro, não há possibilidade de regeneração sem intervenção do microcirurgião. Mesmo utilizando as mais apuradas técnicas terapêuticas disponíveis atualmente, a recuperação funcional acaba sendo parcial, pois a perfeita continuidade dos feixes nervosos não é obtida e a fibrose residual no ponto de reparo acaba por dificultar a progressão do axônio em regeneração (MATTAR, 2003; JUBRAN, WIDENFALK, 2003).

Diferentemente de Seddon, Sunderland, em 1951, classificou as lesões dos nervos periféricos em cinco graus, dependendo do comprometimento anatômico-estrutural no nervo (MARTINS *et al.*, 2005c). A lesão grau I é a neuropraxia de Seddon; a lesão grau II é aquela em que ocorre a disjunção axonal completa com degeneração

axonal, sem a interrupção da lâmina basal; a lesão grau III caracteriza-se pela interrupção da lâmina basal e disjunção axonal e endoneural; a lesão grau IV é caracterizada pela disjunção axonal, endoneural e perineural; e a lesão grau V é semelhante à neurotmeose de Seddon (SATO, 2005).

Mackinnon (1989) sugeriu ainda a inclusão da lesão grau VI, na qual vários graus de lesão se combinam em um mesmo nervo.

Diferentemente do sistema nervoso central, os nervos periféricos têm, por suas características citológicas e fisiológicas, capacidade ampla de regeneração após uma reparação microcirúrgica (FROSTICK, YIN, KEMP, 1998). Este processo complexo envolve vários fatores, como por exemplo, o tipo de neurônio, tipo de lesão, tamanho do intervalo segmentar, a idade do paciente, a tensão no local do reparo microcirúrgico e o método de reparo (MUELLER, 2008).

A partir da lesão, diferentes modificações são iniciadas no corpo celular, nos segmentos proximal e distal ao trauma, no local da secção e nos órgãos inervados à distância (MARTINS *et al.*, 2005a). Há imediata retração dos cotos nervosos, derrame externo de axoplasma, colapso das membranas axonais e perda de inervação do órgão-alvo (SANTOS *et al.*, 1998).

No corpo celular, imediatamente após a lesão, identifica-se uma série de alterações com o objetivo de produzir proteínas relacionadas à regeneração do citoesqueleto axonal. O processo, conhecido como cromatólise, caracteriza-se histologicamente pelo ingurgitamento da célula, degeneração da substância de Nissl, migração do núcleo do centro para a periferia e pelo aumento no volume do citoplasma pelo incremento na produção de ácido ribonucléico (MARTINS *et al.*, 2005a). Há desta forma, o favorecimento à síntese de proteínas do citoesqueleto – tubulina e actina – fundamentais para a formação dos microtúbulos e microfilamentos, necessários para o crescimento axonal (JUNQUEIRA, 1999).

Inicia-se então um processo degenerativo complexo, descrito em 1850 por Augustus Waller e conhecido até hoje como degeneração walleriana. Tal evento tem o objetivo de estabelecer um meio adequado para a regeneração axonal e acomete os cotos distal e proximal da estrutura lesada (TERENGHI, 1999; MATTAR, 2003).

A degeneração walleriana é caracterizada sumariamente pelo recrutamento local de macrófagos, tumefação e lise mitocondrial, desintegração dos microtúbulos e neurofilamentos, intumescimento axoplasmático e progressiva fragmentação axonal (HALL, 1997; FU, GORDON, 1998).

No coto distal, a bainha de mielina é degradada e seus produtos estimulam as células de Schwann a proliferarem dentro da lâmina basal, formando as bandas de Büngner, que guiam a regeneração dos axônios em direção ao órgão-alvo. O tubo endoneural fica vazio a espera do axoplasma em regeneração (REIS, 2005).

Alterações semelhantes são evidenciadas no coto proximal: o axônio degenera retrogradamente até o nodo de Ranvier mais próximo, onde se inicia o brotamento axonal que progride em direção ao coto distal (TERENGHI, 1999; SILVA, 1995a). Em situações extremas – dependendo da agressividade do evento - o processo de degeneração pode atingir o corpo celular provocando a morte da célula por apoptose (MARTINS *et al.*, 2005a).

Nos casos em que há sobrevivência do axônio, imediatamente após a lesão, há o desencadeamento de processo de crescimento intenso, no intuito de recuperação da inervação do órgão-alvo (MUELLER, 2008). A regeneração nervosa é regida por diversos mecanismos, sendo que um dos principais é o neurotropismo - caracterizado pela habilidade de influenciar a maturação do nervo e sua regeneração direcional propriamente dita (MACKINNON, 1989).

O neurotropismo – ou quimiotaxia – explica como o coto nervoso distal, em degeneração, atrai as fibras do coto proximal em regeneração. Este processo é possível a partir da liberação dos FN capazes de atrair os axônios em regeneração em sua direção (SILVA, 1995a). Os FN, fundamentais para a regeneração axonal, são secretados por células não neuronais próximas ao foco da lesão - macrófagos, células de Schwann e o próprio órgão-alvo (SILVA, 1995b).

Sob estímulo dos FN, algumas horas após a lesão com abertura epineural, identifica-se no coto nervoso proximal a formação do cone de crescimento: foco de brotamento axonal múltiplo, em número muito superior ao número original presente no fascículo nervoso, no intuito de maximizar as chances de cada neurônio atingir seu órgão-alvo (TERENGHI, 1999). No cone, detecta-se o crescimento de 50 a 100 brotos axonais, sendo que cerca de cinco deles progridem até o órgão-alvo a uma taxa de 1-2 mm por dia (KINGHAN, TERENGHI, 2006).

A partir destas informações entende-se que o processo de regeneração do nervo periférico caracteriza-se sumariamente pela proliferação dos brotos axonais, através do tubo endoneural vazio, com posterior progressão em direção ao órgão-alvo, sendo guiados e atraídos pelo processo quimiotático regulado pelos FN (KINGHAN, TERENGHI, 2006).

Com o crescimento dos brotos axonais em regeneração e o consequente maior contato destes com as células de Schwann se inicia a formação da bainha de mielina ao redor dos axônios (FU, GORDON, 1998). Há um aumento na atividade da fosfatase lisossomal que determina a renovação acentuada no sistema de síntese protéica. Na lâmina basal pode ser identificado um aumento importante na síntese de colágeno do tipo IV, proteoglicanos, laminina e fibronectinas, sendo que estas duas últimas consideradas as responsáveis pelo alongamento axonal (MUELLER, 2008).

Para que o processo regenerativo se complete, o axônio regenerado deve reencontrar e reinervar seu órgão-alvo, que deve estar apto – livre de atrofia proveniente de desnervação prolongada (MACKINNON; 1989). Após o contato e a conclusão do processo de regeneração, apenas um dos axônios em crescimento não é reabsorvido, permanecendo em contato com seu órgão-alvo (FU, GORDON, 1998).

Com o avançar da idade e a progressiva redução na disponibilidade dos FN, as taxas de regeneração axonal vão regredindo, fato evidenciado clinicamente pelos melhores resultados após reparos nervosos em crianças e jovens (MUELLER, 2008).

A recente compreensão da importância dos FN para o processo de regeneração nervosa indica que as terapias farmacológicas, utilizando FN exógenos, têm grande potencial de sucesso terapêutico no futuro (KINGHAN, TERENCEHI, 2006). A obtenção de uma regeneração nervosa mais eficiente, com melhores resultados pós-operatórios, passará pela modulação celular através dos FN, sendo que diversas linhas de pesquisa estão sendo desenvolvidas neste sentido (MARTINS *et al.*, 2005a; LEVI-MONTALCINI, CALISSANO, 2006). A busca atual é pela descoberta de elementos que incluídos na rotina microcirúrgica utilizada corriqueiramente, potencializem ou acelerem a regeneração nervosa, facilitando a obtenção de melhores resultados no pós-operatório (KINGHAN, TERENCEHI, 2006; MARTINS *et al.*, 2005a; VITERBO *et al.*, 2009).

O reparo nervoso término-terminal clássico (RNTT), realizado com neurorrafias – utilizando fio microcirúrgico – continua sendo considerado a técnica “padrão-ouro” para tratamento de lesões de nervos periféricos. O RNTT é indicado principalmente para situações em que ocorra a interrupção total da continuidade do nervo, sem perda de tecido nervoso, tornando possível a aproximação direta dos cotos lesados sem tensão (LIU *et al.*, 1999; LAGO *et al.*, 2005).

Quando o RNTT não pode ser realizado, como, por exemplo, no trauma em que há perda de um segmento do nervo ou quando o coto nervoso proximal não está disponível ou não é identificado no transoperatório, o RNTL surge como excelente

opção (VITERBO *et al.*, 1992; MUELLER, 2001; PAPALIA *et al.*, 2001; ROVAK, CEDERNA, KUZON, 2001; BERIS *et al.*, 2007).

Desde a primeira descrição de Ballance, em 1885, o RNTL vem sendo motivo de debate e questionamentos na literatura. Ballance referiu bons resultados ao suturar o coto distal do nervo facial, na face lateral violada do nervo espinhal acessório, no intuito de tratar um paciente com paralisia facial. Ballance preconizava a confecção de uma abertura no epineuro - a janela epineural – para que o coto distal do nervo receptor tivesse contato franco com o nervo doador (BALLANCE, BALLANCE, STEWART, 1903).

Posteriormente, autores como Kennedy & Sherren sugeriram alterações na técnica, aprofundando ainda mais a incisão no nervo doador, para que o contato entre os nervos fosse ainda maior, na tentativa de potencializar os resultados da técnica (PAPALIA *et al.*, 2007).

No entanto, devido aos resultados desfavoráveis publicados nos anos seguintes e ao temor de que a confecção da janela epineural pudesse prejudicar o nervo doador, o RNTL de Ballance passou o século XX praticamente esquecido, não sendo utilizado pela maioria dos microcirurgiões (BABCOCK, 1927). Somente a partir de 1992, com as modificações propostas por Viterbo, é que o RNTL passou a ganhar novo destaque na literatura (VITERBO, 1992).

Utilizando neurorrafias, Viterbo demonstrou experimentalmente, pela primeira vez, a ocorrência de regeneração nervosa por meio de um RNTL com o epineuro intacto – sem a “janela epineural” de Ballance. Ele obteve sucesso ao suturar o coto distal de um nervo lesado (nervo receptor) à superfície lateral de outro nervo íntegro (nervo doador), comprovando que a integridade do epineuro não impedia o brotamento de axônio a partir do nervo doador (VITERBO, 1992). A técnica de Viterbo (RNTL sem janela epineural), realizada com microssuturas, transformou todos os nervos periféricos em potenciais doadores de axônios (SATO, 2005).

Ao não confeccionar a janela epineural, Viterbo diminuiu a possibilidade de lesão do nervo doador, uma das principais e recorrentes críticas ao RNTL de Ballance (VITERBO *et al.*, 1998; ZHAO, CHEN, CHEN, 1997; LUNDBORG, 1994). A morbidade do procedimento foi reduzida, as indicações foram ampliadas, a realização técnica foi facilitada e o tempo cirúrgico foi aprimorado (PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005; HANINEC *et al.*, 2007; MUELLER, 2001).

O período de recuperação também se tornou mais curto, principalmente para nervos motores, uma vez que a sutura nervosa pôde ser realizada próxima à região afetada (PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005; HANINEC *et al.*, 2007; ROBILLARD, 2002).

A literatura é rica em autores que confirmaram os achados de Viterbo e enfatizaram os benefícios da técnica (LIU *et al.*, 1999; PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005; ROBILLARD, 2002; SAMII *et al.*, 2006; MUELLER, 2001). O RNTL de Viterbo passou então a ser aplicado no cotidiano cirúrgico e atualmente faz parte do arsenal dos microcirurgiões (AL-QATTAN, AL-THUNYAN, 1998; PONDAAG, GILBERT, 2008).

Diversos autores, no entanto, não conseguiram reproduzir a técnica com tamanho sucesso, tecendo diferentes críticas ao procedimento (BERTELLI, GHIZONI, 2006; KELLY *et al.*, 2007; BERTELLI, GHIZONI, 2003; BARINI, 2002). Houve, por exemplo, questionamentos quanto à qualidade da reinervação obtida com o reparo, indicando uma obtenção de índices de recuperação inferiores aos obtidos com o RNTT (PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005; ROBILLARD, 2002; SATO, 2005; TARASIDIS *et al.*, 1997; TARASIDIS *et al.*, 1998; PONDAAG, GILBERT, 2008; BATTISTON *et al.*, 2007).

Aspectos relacionados diretamente com a origem e com o destino do estímulo nervoso também foram focos de questionamentos (HAYASHI *et al.*, 2008). Estudos também sugeriram que a área de correspondência anatômica cerebral poderia ser alterada com o procedimento, trazendo possíveis prejuízos ao paciente (BARINI, 2002; ROBILLARD, 2002; HAYASHI *et al.*, 2008; CEDERNA *et al.*, 2001).

Além disso, alguns autores ainda indicaram que o reparo de Viterbo também teria chance de determinar prejuízo ao nervo doador, por trauma direto causado pelas neurorrafias (PAPALIA *et al.*, 2007; KELLY *et al.*, 2007).

A partir destas críticas, diversos estudos afirmam que, pelos potenciais benefícios do RNTL de Viterbo e pelas dúvidas que ainda pairam sobre a técnica, pesquisas adicionais devem ser realizadas, no intuito principal de propor soluções para minimizar seus problemas e potencializar seus resultados (SAMII *et al.*, 2006; ROBILLARD, 2002; MATTAR, 2003; PONDAAG, GILBERT, 2008; BERTELLI, GHIZONI, 2003).

Neste sentido, iniciaram-se as pesquisas para definir o papel da CF no RNTL. Por exigir microneurorrafias, o RNTL de Viterbo apresenta as mesmas desvantagens referidas aos métodos que utilizam sutura no reparo nervoso: trauma local, formação de fibrose e granulomas, dificuldade técnica elevada em casos mais complexos, tempo

cirúrgico prolongado, exigência de material microcirúrgico específico e necessidade de treinamento contínuo do microcirurgião e sua equipe. Estas desvantagens, que acabam por prejudicar o brotamento axonal término-lateral, poderiam explicar os resultados insatisfatórios relatados por alguns autores e as referências de índices inferiores de regeneração axonal (MUELLER, 2001).

Atualmente a CF já está consolidada como alternativa segura no RNTT, sendo que diversos autores a preconizam como primeira-escolha (MORANDIN, ORTIZ, 1992; ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006a; ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006b; TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003; RADOSEVICH, GOUBRAN, BURNOUF, 1997).

O principal benefício da CF em relação à sutura é a redução do trauma nervoso e suas indesejáveis consequências (NISHINIRA, MCCAFFREY, 1989; LIU *et al.*, 1999; LAGO, 2005; PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005; MENOVSKY, BEEK, 2001; FARRAG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2003).

Além disso, alguns autores acreditam que a CF possibilite um maior alinhamento das fibras nervosas, com consequente melhor taxa de regeneração axonal, melhor velocidade de condução e maior amplitude de onda, determinando melhores resultados (MARTINS *et al.*, 2005a; MARTINS *et al.*, 2005b; ZENG *et al.*, 1994). Segundo vários autores a técnica é ainda mais simples, rápida, barata e requer menor treinamento do cirurgião (MENOVSKY, VAN GULIK, WESSELING, 2002; BUSATO, 2005; FARRAG *et al.*, 2007; CHUNZHENG *et al.*, 2008).

As primeiras descrições de adesivos a base de fibrina remontam do início do século XX, quando Bergel (1909) desenvolveu um selante hemostático de fibrina em pó; posteriormente Grey (1915) utilizou um adesivo de fibrina em neurocirurgias para conter hemorragias.

Os primeiros relatos experimentais da utilização de um adesivo com fibrinogênio em reparos de nervos periféricos foram de Young & Medawar (1940), no entanto, pouco se desenvolveu sobre a CF nos 30 anos seguintes, principalmente pela dificuldade de obtenção do fibrinogênio.

Matras *et al.* (1972) iniciaram a produção de CF com alto teor de fibrina em escala comercial, então, a partir da década de 1980, com o avanço nas técnicas de isolamento dos fatores de coagulação e aumento da concentração do fibrinogênio, a CF passou a ser usada clinicamente com êxito em reconstruções de nervos periféricos, passando a ser também utilizada em diversas especialidades médicas (LAGO, 2005; MENOVSKY,

VAN GULIK, WESSELING, 2002; MATRAS, DINGES, MAMOLI, 1973; BUSATO, 2005; MATTAR, CHO, GRILLO, 2005; MATTAR *et al.*, 1990).

Os adesivos biológicos utilizados atualmente são compostos concentrados de proteínas plasmáticas humanas, apresentando altos teores de fibrinogênio, fibronectina e fator XIII da coagulação (HERTER, 1989).

De acordo com a apresentação, após seu preparo, a CF contém aproximadamente 70-110mg de fibrinogênio, 2-9mg de fibronectina, 10-50UI de fator XIII, 40-120µg de plasminogênio, 3.000KIU/ml de aprotinina (bovina), 500UI de trombina e 40mmol de cloreto de cálcio (BUSATO, 2005; MATTAR, CHO, GRILLO, 2005).

Grande parte das CF comercializadas atualmente consiste em um *pool* crioprecipitado de fibrinogênio, obtido basicamente pela centrifugação do sangue de múltiplos doadores, dos quais se retira o plasma sobrenadante, rico neste componente. O emprego da CF é realizado no ponto de reparo nervoso por meio de uma seringa própria, com duplo lúmen, que reúne os compostos e ativa sua função selante (MENOVSKY, BEEK, 2001). Após sua aplicação, ocorre a formação de uma massa branca e elástica, com características semelhantes a um coágulo sanguíneo normal, que sela as estruturas envolvidas (MUELLER, 2001).

O efeito selante baseia-se na reprodução do estágio final da cascata da coagulação, onde o fibrinogênio é segmentado em monômeros de fibrina, pela ação da trombina em uma proteólise. Os monômeros de fibrina formam então ligações cruzadas entre si, pela ação do fator XIII e íon cálcio, sofrendo polimerização, formando os coágulos estáveis com propriedades adesivas (GOSK *et al.*, 2006; FARRAG *et al.*, 2007).

O processo de cicatrização tem início imediato com o depósito de fibrina e fibronectina no sítio da lesão. Em resposta, fibroblastos dos tecidos adjacentes se proliferam e migram para o local da injúria, produzindo principalmente colágeno tipo I e células da matriz extracelular, que serão depositados no local lesado (FURLAM, 1988).

Os fibroblastos se transportam, ao longo das fibrilas, pela matriz da fibronectina, influenciados pelo gradiente quimiotático (HSIEH, CHEN, 1983). Quanto melhor a conexão das fibrilas de fibronectina, maior será o número de fibroblastos atingindo o local lesado. Além disso, os queratinócitos lesionados, expostos no local, são capazes de depositar uma matriz provisória, com expressão de receptores de superfície celular, que facilitam ainda mais a migração das células (CLARK, 1990).

A fibronectina liga-se especificamente à fibrina, por meio de uma reação covalente da cadeia alfa da última com o fator XIII ativado (MATSUKA, MIGLIORINI, INGHAM, 1997). Há também um aumento da taxa de replicação e disseminação dos queratinócitos, fenômeno inibido por ação da fibrina quando não há fibronectina. O adequado padrão de conexão dessas fibrilas é fundamental para a recuperação da lesão nervosa (WEISS *et al.*, 1998).

O metabolismo fisiológico do coágulo, que ocorre em seguida, inclui a degradação da fibrina pela plasmina e sua fagocitose pelos macrófagos. Após algumas horas da formação do coágulo, ocorre a proliferação de fibroblastos e a migração de granulócitos e macrófagos. Após cerca de três dias, é iniciada a reabsorção do coágulo pelos macrófagos e a neovascularização. Transcorridos aproximadamente quatorze dias, o coágulo apresenta-se plenamente organizado (SHEKARRIZ, STOLLER, 2002).

Alguns autores relataram no passado, certa restrição ao uso da CF devido à existência teórica da possibilidade da transmissão de doenças, visto que a CF utilizada comercialmente, provém de vários doadores, sendo obtida a partir de plasma humano (MUELLER, 2001; SURI, MEHTA, SARKAR, 2002; CHEM, 2003).

Os métodos de inativação viral em uso apresentam, em estudos *in vitro*, evidências suficientes de segurança, sendo importante salientar que não há registro na literatura de transmissão viral por meio da CF (SATO, 2005; BUSATO, 2005; RADOSEVICH, GOUBRAN, BURNOUF, 1997). Greenhalgh *et al.* (1999) acompanharam 34 pacientes, vítimas de queimaduras, que foram expostos a grandes quantidades de CF. Títulos do vírus da imunodeficiência humana; hepatite A, B e C; vírus Epstein-Barr; e citomegalovírus obtidos antes e após 1 ano de tratamento foram avaliados, não sendo evidenciada a soroconversão em nenhum paciente.

A partir das ressaltadas vantagens da CF em RNTT e da necessidade do desenvolvimento de alternativas para a potencialização dos resultados do RNTL de Viterbo, passou-se a avaliar seu papel no reparo.

Como já foi ressaltado, em estudo prévio, o presente autor obteve reinervação no coto distal do nervo fibular ao realizar RNTL com CF na face lateral do nervo tibial – sem a utilização de microsuturas. O sucesso do procedimento foi confirmado em testes de função e posterior análise morfológica (NUNES E SILVA, 2008). Apesar do êxito do experimento, a contagem de axônios regenerados foi inferior a do grupo controle, evidenciando a necessidade do aprimoramento da técnica para a potencialização dos resultados (SANTOS *et al.*, 1998).

Em um estudo experimental com metodologia e delineamento semelhantes, Mueller (2001) também obteve regeneração axonal – confirmada pela histologia - após realizar RNTL com CF. A autora também comparou os índices de regeneração axonal da técnica com os índices obtidos com o RNTL de Viterbo (com microssuturas), obtendo resultados semelhantes entre eles.

Samii *et al.* (2006) utilizaram com sucesso o RNTL com CF para o tratamento de um paciente com lesão no nervo facial durante uma cirurgia de schwannoma vestibular. Reis (1999) também obteve crescimento axonal após unir enxerto de nervo sural à face lateral do nervo vago com CF.

Os questionamentos existentes quanto ao RNTL com suturas também existem quanto ao RNTL com CF. Bertelli *et al.* (1996) relataram regeneração axonal insatisfatória ao realizarem o RNTL com CF em nervos do membro superior de ratos. Sato (2005) seguindo a mesma metodologia, também não obteve sucesso com a técnica.

A existência de resultados contraditórios descritos na literatura associados à relevância do tema e às possibilidades abertas pela realização do RNTL com CF justificam a realização de mais estudos sobre o tema (SATO, 2005; SAMII *et al.*, 2006).

Uma alternativa descrita na literatura para aumentar os índices de regeneração nos reparos nervosos seria sua associação com o FCN (FU, GORDON, 1998; VITERBO *et al.*, 2009). Em RNTT, sua utilização apresenta resultados animadores, mas ainda considerados preliminares (FU, GORDON, 1998; CHUNZHENG *et al.*, 2008; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; ZENG *et al.*, 1994).

A utilização da CF como carreadora do FCN já foi descrita com sucesso (HUANG *et al.*, 2003; CHEM, 2003; BHANG *et al.*, 2007), mas a potencialização do brotamento axonal a partir do nervo doador íntegro, após um RNTL realizado com CF contendo FCN, ainda não foi testada.

Os FN formam um amplo e variado grupo de polipetídeos com ações semelhantes: a regulação neuronal positiva, incluindo o desenvolvimento, a sobrevivência, a manutenção e a regeneração axonal pós-trauma (FROSTICK, YIN, KEMP, 1998; FU, GORDON, 1998).

O trauma nervoso desencadeia uma complexa cadeia de eventos que resultarão na síntese acelerada dos FN, no intuito direto de potencialização do crescimento axonal (LEVI-MONTALCINI, 1987; HOLTZMAN, MOBLEY, 1994). A partir da degeneração walleriana e da proliferação das células de Schwann, os FN secretados

se ligam a receptores específicos na membrana axonal e são interiorizados e transportados retrogradamente pelo axônio até o corpo do neurônio, onde desempenham os já referidos efeitos de promoção à sobrevivência e à manutenção neuronal (CUI *et al.*, 2007).

De acordo com suas características, os FN são divididos em diferentes grupos: as neurotrofinas, as citocinas neuropoiéticas, o fator de crescimento tipo insulina I e II, o fator de crescimento fibroblástico ácido e básico, entre outros (CHENG *et al.*, 1995; YIN *et al.*, 2001).

Segundo diversos autores, o grupo das neurotrofinas é o mais relacionado com o desenvolvimento axonal pós-trauma (MARTINS *et al.*, 2005a). As neurotrofinas têm papel fundamental no desenvolvimento do SNP, na plasticidade sináptica no adulto e na regeneração de nervos lesados (MENOVSKY, BEEK, 2001). Por estas características, as neurotrofinas vêm sendo consideradas como potenciais alternativas terapêuticas para desordens do SNP no futuro (SONG *et al.*, 2008).

A neurotrofina de maior destaque na literatura é o FCN. Os estudos sobre a regeneração nervosa sofreram uma verdadeira revolução a partir de 1951, quando da descoberta do FCN (PU *et al.*, 1999; TERENCEHI, 1999; MARCOL *et al.*, 2004; ROSS, 1991). A primeira descrição do FCN foi realizada por Levi-Montalcini e lhe valeu o prêmio Nobel em 1986 (LEVI-MONTALCINI, 1952; LEVI-MONTALCINI, 1987).

Atualmente o FCN é considerado um importante neuroprotetor e neuroestimulador, sendo fundamental para a sobrevivência e para a regeneração de axônios sensitivos e motores após traumas (LUNDBORG, 1994). O FCN é capaz de aumentar a atividade mitótica celular, facilitando a maior incorporação de aminoácidos e a consequente maior e mais rápida regeneração das células do SNP (CUELLO, 1997).

Como as demais neurotrofinas, a síntese do FCN é muito alta durante o desenvolvimento e cai de forma abrupta com a maturidade. Entretanto, após a lesão nervosa, a produção eleva-se consideravelmente, atingindo o pico máximo em 24hs e mantendo-se elevada por pelo menos quinze dias (KINGHAN, TERENCEHI, 2006).

A síntese do FCN é realizada principalmente pelas células de Schwann próximas à zona afetada pelo trauma, sendo regulada principalmente pela perda de contato entre os cotos axonais (SANTOS *et al.*, 1998). O aumento da secreção do FCN estimula, por contrarregulação positiva, a própria multiplicação das células de Schwann,

desencadeando um processo cíclico que potencializa temporariamente a regeneração axonal (TERENGHI, 1999).

O FCN liga-se a receptores neuronais específicos e é apresentado ao corpo axonal via transporte retrógrado, onde exerce influência trófica e de sobrevivência (ROSS, 1991). No corpo celular, esta neurotrofina também inibe a ação das enzimas denominadas caspases e proteínas pró-apoptóticas, promotoras da apoptose neuronal, mediante reações de fosforilação (LEVI-MONTALCINI, 1987).

O FCN contribui ainda para o influxo de elementos não neuronais nas fases iniciais do processo de regeneração, facilitando, desta forma, a formação das pontes de fibrina, que guiam a progressão axonal e sua posterior mielinização (DERBY *et al.*, 1993).

O FCN tem também a capacidade de atrair os axônios em regeneração em direção ao coto distal por quimiotaxia ou neurotropismo, constituindo-se como elemento decisivo no processo de crescimento nervoso pós-trauma (SILVA, 1995a). Holtzman & Mobley (1994) referiram que o mecanismo real de propagação retrógrada do FCN – do axônio terminal ao corpo do neurônio – ainda está por ser completamente estabelecido. Cui *et al.* (2007) fizeram considerações semelhantes e estimularam a realização de mais estudos sobre o tema.

O FCN é um polipeptídeo com 118 aminoácidos, com proteínas de três subunidades, sendo a forma ativa a subunidade beta. Sua ação é dada a partir da afinidade por pelo menos dois receptores da superfície do axônio, principalmente na região do cone de crescimento no processo de regeneração pós-trauma: o p75 e o tirosinaquinase A (trkA) (SANTOS *et al.*, 1998; PU *et al.*, 1999).

O receptor específico p75 se liga ao FCN em baixa afinidade, modulando sua ação sem que seu mecanismo de ação tenha sido completamente determinado (HOLTZMAN, MOBLEY, 1994). O receptor específico trkA aparentemente ativa o FCN através da autofosforilação, iniciada pela trkA-quinase. Em seguida, há a ativação da fosfolipase C e da fosfatidilinositol 3-quinase, gerando segundos mensageiros, que propagam o sinal do FCN (BLOCH *et al.*, 2001; ROSS, 1991).

Segundo Terenghi (1999), após o trauma nervoso, há morte imediata de 20-40% nos neurônios, provavelmente pela interrupção no suprimento retrógrado de FCN e por apoptose em resposta à agressão. Com a lesão axonal, há também uma importante redução na disponibilidade dos receptores axonais p75 e trkA, o que acaba por dificultar a atuação do FCN no foco lesional (ZENG *et al.*, 1994).

Acredita-se que, de modo geral, os níveis de FCN disponíveis na região traumatizada não são suficientes para compensar a injúria determinada pelo trauma e a importante redução na disponibilidade de seus receptores específicos (TERENGHI, 1999). Para estes casos, segundo diversos autores, a administração de FCN exógeno em um reparo nervoso pode determinar a melhoria dos resultados pós-operatórios, facilitando o crescimento axonal e a mielinização (CHUNZHENG *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 1998; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; ZENG *et al.*, 1994; PU *et al.*, 1999; BLOCH *et al.*, 2001; TERENGHI, 1999; DERBY *et al.*, 1993; BHANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2003; LIUZZI, TEDESCHINI, 1991; ROSS, 1991).

Em seus relatos iniciais, Levi-Montalcini (1952) demonstrou que sarcomas de ratos provocavam importante hipertrofia em gânglios simpáticos e da raiz dorsal, assim como inervação excessiva de diversos órgãos distantes ao tumor (HOLTZMAN, MOBLEY, 1994). Estes achados levaram a pesquisadora a imaginar que as células neoplásicas liberavam algum tipo de substância que promovia o crescimento axonal.

Em seus estudos posteriores, a autora comprovou que o mesmo efeito positivo, quanto ao crescimento axonal, ocorria ao se transplantar os sarcomas para embriões de frango (LEVI-MONTALCINI, 1952). Mais tarde, isolou e purificou o material, dando origem às primeiras amostras do, agora chamado por ela, FCN (LEVI-MONTALCINI, 1987).

A partir da identificação do FCN e de seu isolamento, iniciou-se uma intensa busca por alternativas para sua síntese. Cohen *et al.* (1954) descreveram a obtenção do FCN a partir dos sarcomas de ratos tipo 37 e 180. Alguns autores descreveram também a obtenção de FCN a partir de veneno de cobra (*Bothrops jararaca* e *Crotalus adamanteus*) (LEVI-MONTALCINI, COHEN, 1956; ZANINI, ANGELETTI, LEVI-MONTALCINI, 1968).

Posteriormente, Levi-Montalcini & Cohen (1960) descreveram a obtenção de FCN, em maior quantidade e em maior concentração, a partir da porção tubular da glândula salivar submaxilar de ratos adultos. A partir de então, o chamado FCN salivar foi o mais utilizado em estudos científicos (LEVI-MONTALCINI, 1965; CUI *et al.*, 2007; ZENG *et al.*, 1994; LEVI-MONTALCINI, COHEN, 1956; COHEN, LEVI-MONTALCINI, 1956).

Segundo Aloe *et al.* (1986), as glândulas salivares submaxilares dos ratos sintetizam e liberam grandes quantidades de FCN, principalmente em momentos de estresse. O FCN salivar apresenta agregados moleculares extensos, resultando da interação com outras proteínas (ZANINI, ANGELETTI, LEVI-MONTALCINI, 1968). O

processo de obtenção do FCN salivar pode ser realizado a partir do chamado procedimento de Cohen, detalhadamente descrito no estudo de Zanini *et al.* (1968).

A partir da publicação dos potenciais benefícios do FCN, diversos estudos foram delineados, no intuito de definir as variáveis envolvidas na sua utilização (REIS, 2005; HOLTZMAN, MOBLEY, 1994). O uso clínico do FCN vem sendo avaliado positivamente em diversas doenças – como, por exemplo, na Doença de Alzheimer, na Doença de Parkinson e na Esclerose Lateral Amiotrófica (LEVI-MONTALCINI, CALISSANO, 2006).

Em relação aos reparos nervosos, apesar dos bons resultados descritos na literatura, a aplicabilidade do FCN ainda não foi completamente estabelecida (HOLTZMAN, MOBLEY, 1994). Segundo Fu & Gordon (1998), apesar das extensas evidências comprovando os efeitos diretos do FN em reparos nervosos *in vitro*, mais estudos *in vivo* são necessários para difundir sua utilização clínica. Kingham & Terenghi (2006) reforçaram esta necessidade.

Diversos autores relataram a potencialização da regeneração nervosa, pós-axoniotomia, ao instilarem FCN em RNTT realizados com neurorrafias (LIUZZI, TEDESCHINI, 1991; SONG *et al.*, 2008; CHUNZHENG *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 1998; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; ZENG *et al.*, 1994; PU *et al.*, 1999; BLOCH *et al.*, 2001; TERENCEHI, 1999; DERBY *et al.*, 1993; BHANG *et al.*, 2007; MARCOL *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2003; KINGHAN, TERENCEHI, 2006; MARTINS *et al.*, 2005a; LEVI-MONTALCINI, 1987). Além do crescimento axonal acelerado, os autores também referem que o FCN é capaz de estimular a migração de células não neuronais e aumento importante na angiogênese, contribuindo para a potencialização do processo regenerativo (REIS, 2005; ALOE *et al.*, 1986; CHEM, 2003).

No entanto, recrudescendo o debate sobre as reais indicações do método, Marcol *et al.* (2004) não conseguiram comprovar a ação neuroprotetora e neuroestimuladora do FCN em nervos ciáticos lesados de ratos.

Segundo alguns autores, a dificuldade na utilização do FCN estaria em apresentá-lo no local da neurorafia, na quantidade adequada e no tempo necessário para que o mesmo atue com sucesso (CAPLAN, TIAGCO, TERZIS, 1999). Atualmente, o grande questionamento está na definição do método ideal para a aplicação do FCN no reparo nervoso (TERENGHI, 1999). Segundo Kingham & Terenghi (2006), o avanço nos métodos de infusão dos FCN poderá viabilizar o uso clínico destes agentes com sucesso no futuro.

Song *et al.* (2008) referiram que as neurotrofinas aplicadas sistemicamente não atingem os tecidos nervosos lesados em quantidades terapêuticas adequadas, inviabilizando a aplicação clínica do FCN por esta via.

Em estudos experimentais em ratos, bombas osmóticas de infusão já foram utilizadas com sucesso na tentativa de aplicar o FCN no reparo nervoso por tempo prolongado e em doses mantidas (KINGHAN, TERENCE, 2006). Todavia este método tem pouca aplicabilidade clínica, pelos riscos e morbidades do procedimento (SONG *et al.*, 2008).

Outras opções descritas no passado como promissoras - bombas de injeção sistêmica de implantação subcutânea ou intraperitoneal - foram descartadas clinicamente também pela morbidade potencial (TERENGHI, 1999). Da mesma forma, a administração direta do FCN no reparo nervoso, através de múltiplas aplicações, recebeu muitas críticas, estando distante da opção ideal (SONG *et al.*, 2008).

Uma alternativa promissora é a aplicação do FCN tendo como meio de carreador a CF (MENOVSKY, VAN GULIK, WESSELING, 2002; HUANG *et al.*, 2003; BHANG *et al.*, 2007). Segundo Bhang *et al.* (2007), uma das grandes vantagens de utilizar-se a CF como carreadora do FCN é que este pode ser injetado através de agulha em aplicação única, evitando-se séries de cirurgias invasivas.

Todavia, poucas publicações estão disponíveis sobre o tema e a dúvida ainda persiste (CHUNZHENG *et al.*, 2008; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; ZENG *et al.*, 1994; CHENG *et al.*, 1998; BHANG *et al.*, 2007; CHEM, 2003). Avaliando RNTT, alguns autores apostaram na ação sinérgica dos dois componentes, acreditando que a CF manteria o FCN ativo por mais tempo, gradualmente liberando-o no reparo nervoso (CHUNZHENG *et al.*, 2008; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; ZENG *et al.*, 1994; CHENG *et al.*, 1998; BHANG *et al.*, 2007).

Soluções com fibrinogênio, já foram utilizadas com sucesso para aumentar a duração da ação do FCN (LEE *et al.*, 2003). Bhang *et al.* (2007) demonstraram experimentalmente que a CF é capaz de manter o FCN ativo por cerca de 14 dias em RNTT. Daunois & Seville (1991) relataram aumento significativo na regeneração axonal de nervos ciáticos de ratos ao realizarem o RNTT com a associação de CF e fatores neurotróficos.

Zeng *et al.* (1994), avaliando a associação de CF contendo FCN em RNTT, obtiveram resultados superiores aos grupos em que utilizaram apenas CF ou apenas sutura. Cheng *et al.* (1995) utilizaram com sucesso a CF como veículo carreador do

fator neurotrófico, referindo que a CF permitiu a implantação das moléculas tróficas no tecido nervoso.

Yin *et al.* (2001) relataram significativo aumento na contagem de axônios regenerados, maior diâmetro axonal e maior espessura da bainha de mielina após RNTT realizados com CF e FCN. Em seguida, autores como Jubran & Widenfalk (2003) também relataram excelentes resultados com a técnica. Taylor *et al.* (2006) obtiveram aumento no brotamento axonal ao utilizarem fator neurotrófico em uma base de solução com fibrina em RNTT.

Chunzheng *et al.* (2008) referiram que a associação de CF com FCN, em RNTT, determinou índices de regeneração axonal superiores aos grupos sem FCN. Segundo estes autores, a CF impediu a degradação imediata do FCN, liberando gradualmente a partir da absorção do adesivo (CHUNZHENG *et al.*, 2008).

No tocante a realização de RNTL com CF, contendo FCN, não foram encontradas publicações após revisão sistemática da literatura, nas bases de dados do Medline e LILACS.

O conjunto de dúvidas e questionamentos envolvendo o RNTL de Viterbo, o RNTL protegido, realizado com CF, e a possível potencialização de seus resultados ao associar-se o FCN justifica a realização de mais estudos sobre o assunto.

Segundo Reis (2005), comprovar o sucesso dos FN nos reparos nervosos pode abrir grandes e novas perspectivas para a microcirurgia, justificando investigações sobre o tema. Segundo Levi-Montalcini & Calissano (2006), a grande evolução nos conhecimentos sobre o FCN nos últimos anos e os grandes desafios enfrentados pela medicina do século XXI colocam o estudo do tema em destaque.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4 – MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o protocolo número 246/2009 (Anexo A).

No estudo foram utilizados 72 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, adultos jovens, com idade entre 130 e 150 dias, provenientes do Biotério da UFMS.

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Faculdade de Medicina da UFMS, no período de dezembro de 2009 a julho de 2010 e seguiu a linha de pesquisa desenvolvida pelos orientadores do estudo.

Antes do procedimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação de sete dias no LCE da UFMS. O manejo dos animais seguiu normas internacionais de conduta em laboratório experimental (NHI PUBLICATION, 1985).

Os ratos foram alojados em caixas de polipropileno, adequadas para a espécie (50X40 cm), com três animais por caixa; recebendo ração própria para a espécie (Nuvilab®, Nuvital Nutrientes Prod. Vet. LTDA – Curitiba – PR) e água à vontade. Permaneceram em ambiente controlado, em ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura estável ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) mantida por ar condicionado sem restrições na movimentação. Os dejetos e as caixas dos animais foram substituídos a cada 48 horas.

Cada animal foi pesado em balança de precisão (Precision®, PR 1000 Núcleo) e identificado, por meio de tatuagem na cauda, tendo seus dados anotados em planilha (Anexo B). Em seguida, por meio de sorteio, os animais foram distribuídos em seis grupos (A a F), com 12 animais em cada (Figura 1).

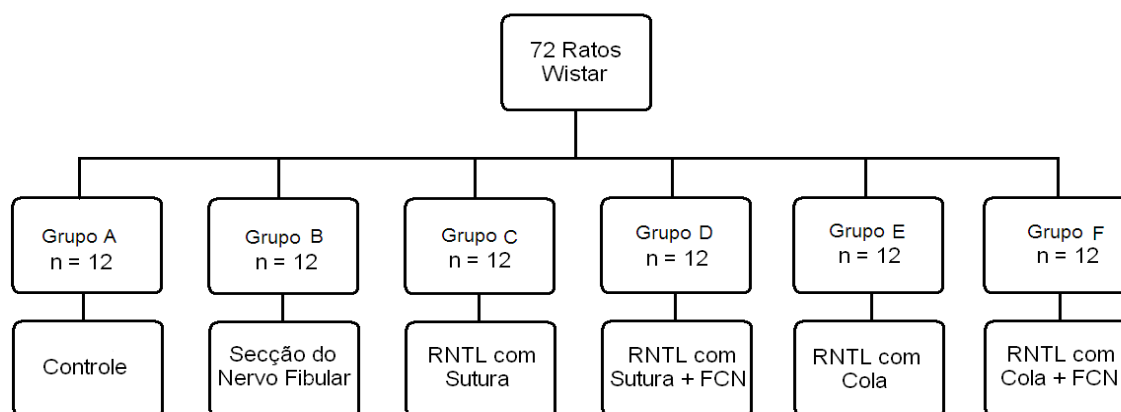


Figura 1 - Representação esquemática dos grupos do estudo.

Legenda: RNTL: reparo nervoso término-lateral; Cola: cola de fibrina; FCN: fator de crescimento nervoso.

4.1 – TESTE DE MARCHA

Imediatamente após a distribuição nos grupos, cada animal foi submetido à análise da função motora, por meio do teste de marcha, seguindo a metodologia clássica proposta por Medinaceli.

Neste teste, o animal foi colocado para caminhar em um corredor de madeira, com 11,5 x 55 cm, com acesso a um ambiente escuro, especialmente projetado para a avaliação da marcha no modelo experimental em estudo. Sobre o corredor, foi colocada uma lâmina de cartolina. O animal teve suas patas traseiras pintadas com azul de metileno e, ao caminhar, deixou impressas suas pegadas na cartolina (LAGO, 2005; OGÜN *et al.*, 2003; MEDINACELI, QUACH, DUCHEMIN, 1982; RAMOS, 2009).

4.2 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO EXPERIMENTAL

No segundo dia do estudo, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico experimental. Cada rato foi separado dos demais e levado para uma nova sala onde o procedimento foi realizado (CHEM, 2003).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina, na dose de 50mg/kg (Laboratório *Fort Godge*, USA) e cloridrato de xylazina, na dose de 3mg/kg (Laboratório

Burs Veterinary Supply, USA), por injeção intramuscular no membro pélvico direito (MPD) (MUELLER, 2001; FARRAG *et al.*, 2007).

Após a obtenção do plano anestésico, procedeu-se a raspagem dos pelos da face lateral do membro pélvico esquerdo (MPE) com lâmina de barbear. Em prancha cirúrgica (30x35cm), os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e fixados por meio de fitas adesivas.

Realizou-se a antissepsia da região, com solução degermante de polivinilpirrolidona-iodo (*Povidine®*), e a colocação de campo estéril fenestrado (DE VRIES *et al.*, 2002).

O procedimento foi realizado utilizando material de microcirurgia e lupa (*Design For Vision®*), com aumento de seis vezes (GIGO-BENATO, DAVILENE, 2010). A cirurgia para acesso ao nervo fibular foi realizada por meio de incisão longitudinal na face súpero-lateral do MPE do animal, com aproximadamente quatro centímetros de comprimento (LIU *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2005a; HAYASHI *et al.*, 2004).

Em seguida, realizou-se a abertura por planos, com divulsão dos músculos bíceps femoral e glúteo, até a localização do nervo ciático e dos seus ramos terminais: nervo tibial, fibular e cutâneo caudal da sura (ou sural) (LAGO, 2005; GRECCO, LEITE, ALBERTONI, 2003; MUELLER, 2008).

Neste momento, os animais do grupo A foram mantidos apenas em observação, sendo considerados o grupo controle de normalidade (Figura 2).



Figura 2 – Fotografia do transoperatório de animal do Grupo A, no qual o nervo fibular não foi seccionado. De forma ilustrativa, o nervo fibular – identificado pela seta branca - está sendo tracionado pelo fio preto.

Os animais dos demais grupos tiveram o nervo fibular dissecado e, a 5 mm de sua origem no nervo ciático, seccionado transversalmente, com microtesoura, gerando dois cotos nervosos (proximal e distal) (ROBILLARD, 2002).

O coto proximal foi curvado, em um ângulo de aproximadamente 100°, e fixado, com um ponto simples com poliamida 7.0, na musculatura abduutora, com o objetivo de evitar um reparo ao acaso (MUELLER, 2001; VITERBO *et al.*, 1998).

No grupo B, o coto distal do nervo fibular fixado na musculatura abduutora da coxa, com um ponto simples com poliamida 7.0, distante do seu coto proximal (Figura 3).

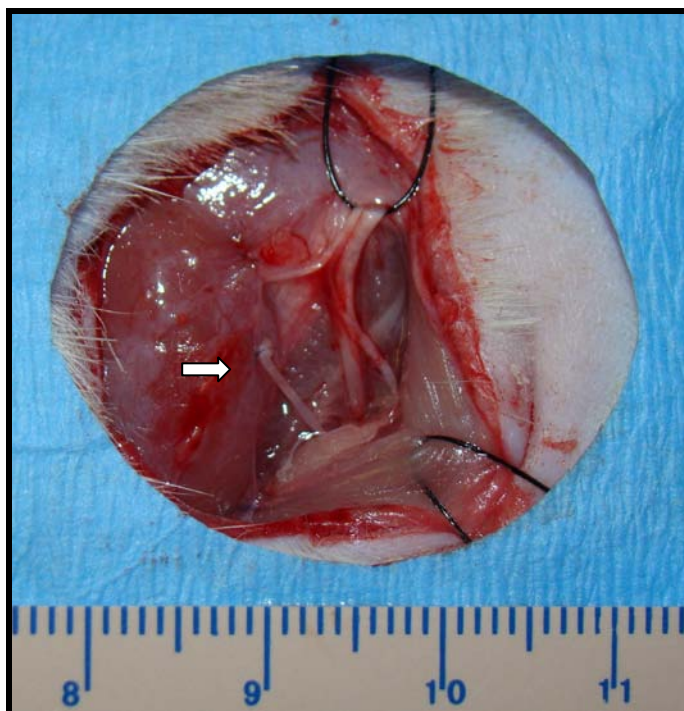


Figura 3 – Fotografia do transoperatório de animal do Grupo B, no qual o nervo fibular – identificado pela seta branca - foi apenas seccionado, sem a realização de reparo nervoso.

No grupo C, o coto distal do nervo fibular foi submetido ao RNTL (sem janela epineural), na face lateral do nervo tibial, a aproximadamente 5 mm de sua origem, utilizando-se dois pontos de poliamida 10.0, conforme técnica descrita por Viterbo (1992) (Figura 4).

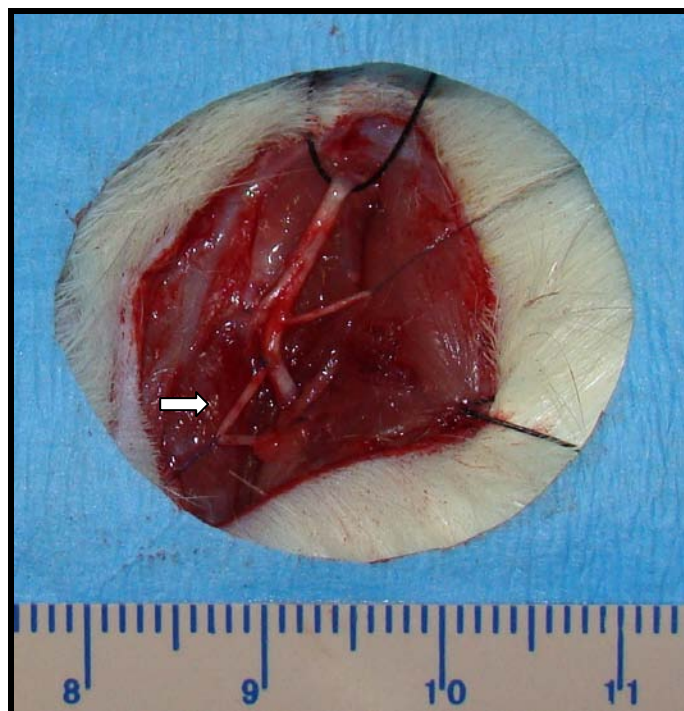


Figura 4 – Fotografia do transoperatório de animal do Grupo C, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se suturas (RNTL de Viterbo). De forma ilustrativa, o nervo fibular já reparado e identificado pela seta branca, está sendo tracionado inferiormente pelo fio azul.

No grupo D, o coto distal do nervo fibular foi submetido ao RNTL de Viterbo, utilizando-se dois pontos de poliamida 10.0 associados a 2,5 µg de FCN (*Recombinant Beta-NGF – Peprotech, Rocky Hill, NJ*), conforme técnica descrita por Jubran & Widenfalk, em 2003. (Figura 5 e 6) (Anexo C).

No grupo E, o coto distal do nervo fibular foi submetido ao RNTL protegido, utilizando-se apenas CF (*Tissucol®, Baxter AG, Viena, Áustria*), conforme técnica descrita por Mueller, em 2001. Seguindo as orientações do fabricante, 20 µl da CF foram aplicados na região do reparo, sendo esta mantida imóvel por 30 segundos (ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006b; TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003; JUBRAN, WIDENFALK, 2003) (Figura 7 e 8) (Anexo D).

No grupo F, o coto distal do nervo fibular foi submetido ao RNTL protegido, utilizando-se CF (*Tissucol®, Baxter AG, Viena, Áustria*) (MUELLER, 2001) associada a 2,5 µg do FCN (*Recombinant Beta-NGF – Peprotech, Rocky Hill, NJ*) (JUBRAN, WIDENFALK, 2003) (Figura 9).

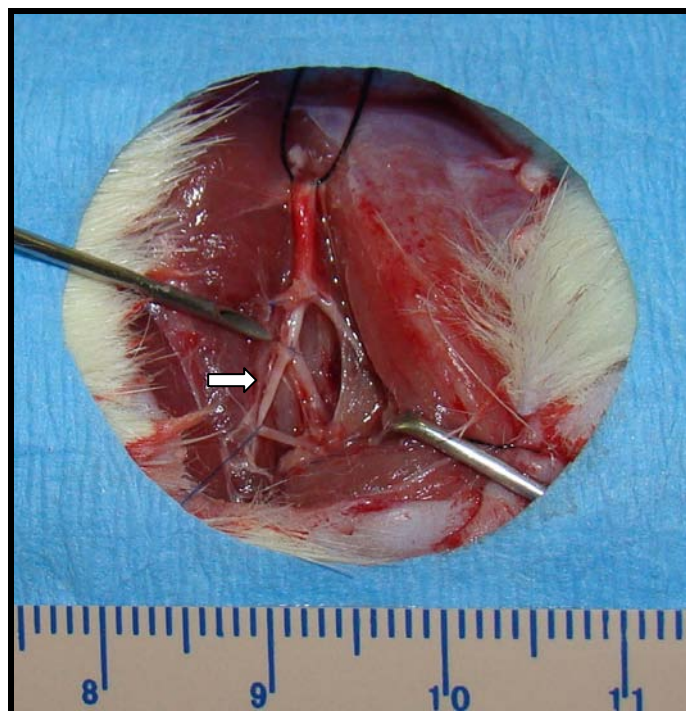


Figura 5 – Fotografia do transoperatório de animal do Grupo D, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se suturas associadas ao FCN. De forma ilustrativa, o nervo fibular, já reparado e identificado pela seta branca, está sendo tracionado inferiormente pelo fio azul.

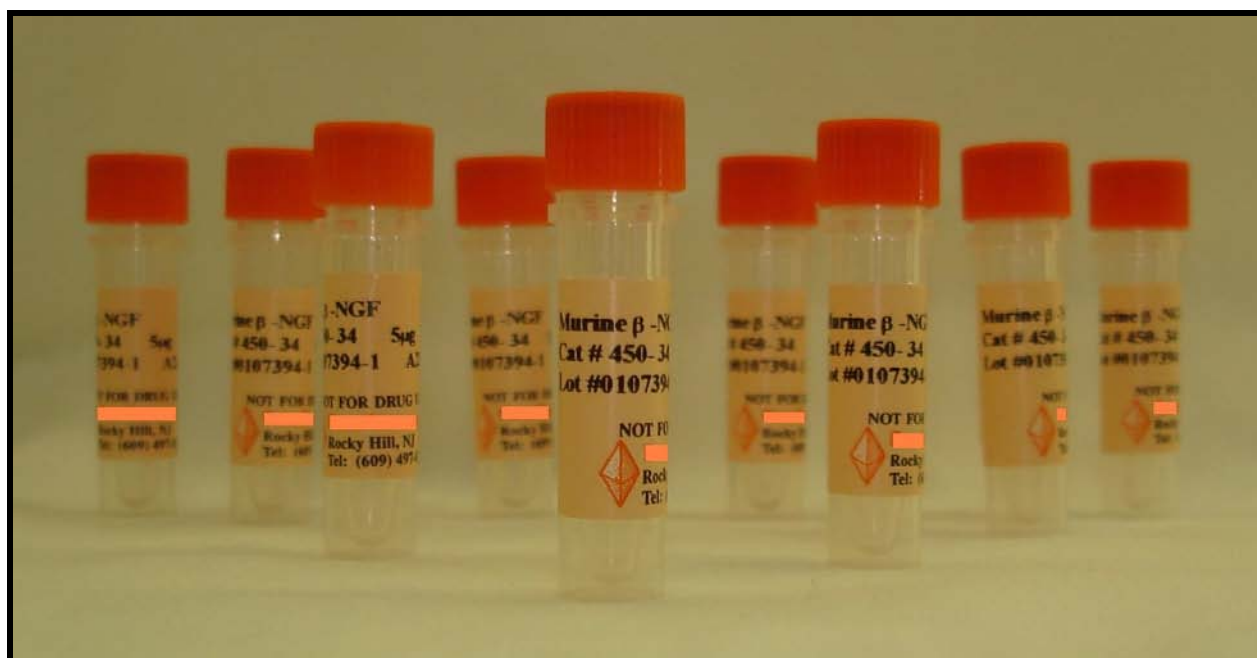


Figura 6 – Fotografia do FCN utilizado no experimento.



Figura 7 – Fotografia da CF utilizada no estudo.

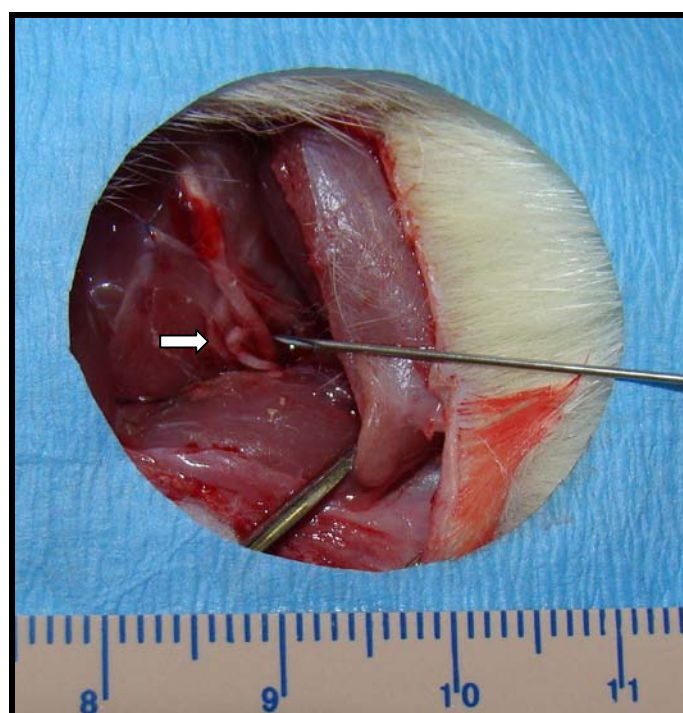


Figura 8 – Fotografia do transoperatório de animal do Grupo E, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se apenas CF. A seta branca identifica o reparo realizado.

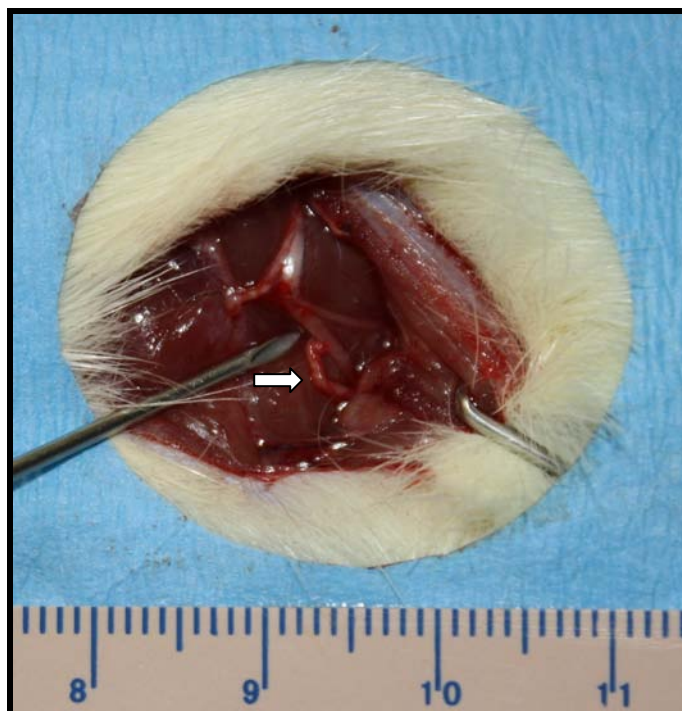


Figura 9 – Fotografia do transoperatório de animal do Grupo F, no qual foi realizado o RNTL do nervo fibular no nervo tibial, utilizando-se CF contendo FCN. A seta branca identifica o reparo realizado.

A Figura 10 demonstra aspecto do trans-operatório de animais dos grupos E e F, demonstrando que a tração submetida ao nervo fibular, logo após a realização do reparo, não determinou o afastamento dos cotos nervosos.

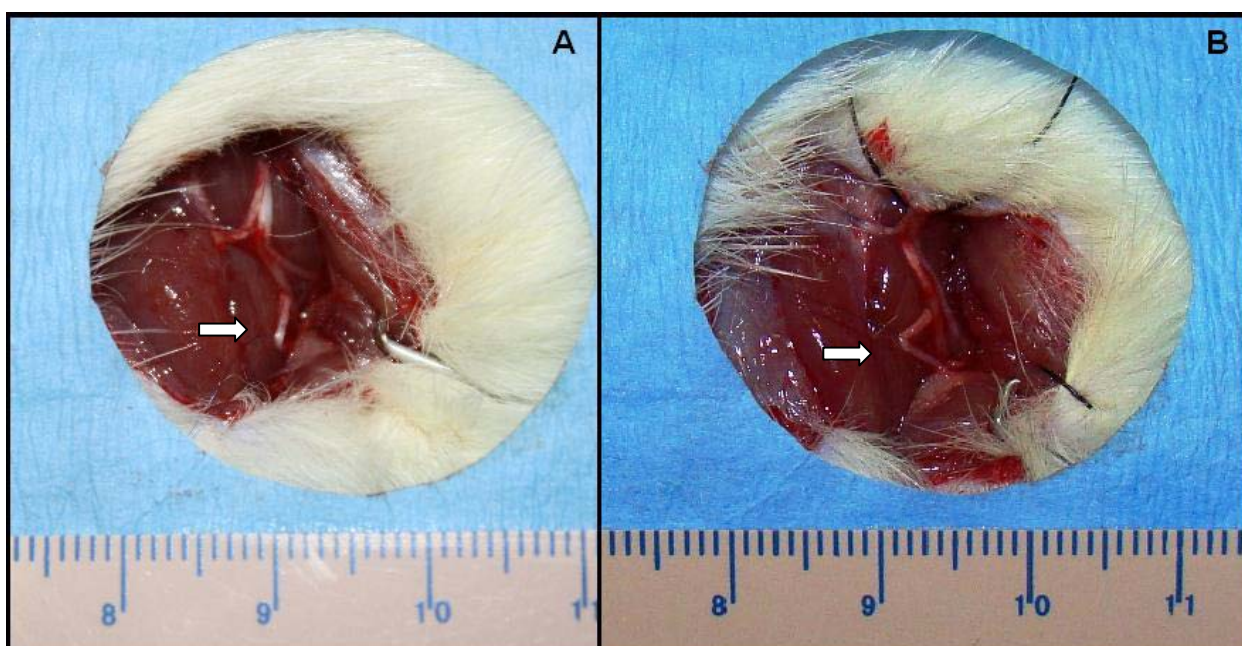


Figura 10 – Fotografias ilustrativas do transoperatório de animais submetidos ao RNTL com CF, demonstrando a resistência do reparo à tração inferior realizada com o fio azul – identificado com a seta branca.

Em seguida, em todos os animais, realizou-se a sutura da pele com pontos contínuos com fio monofilamentar de poliamida 4-0.

O membro pélvico direito (MPD) não foi submetido à intervenção cirúrgica em nenhum animal.

Com o término do procedimento, os animais foram recolocados nas gaiolas e acompanhados diariamente.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela mesma equipe cirúrgica.

A Figura 11 apresenta aspectos da sequência cirúrgica empregada no experimento e a Figura 12 reúne de forma didática os grupos em estudo.

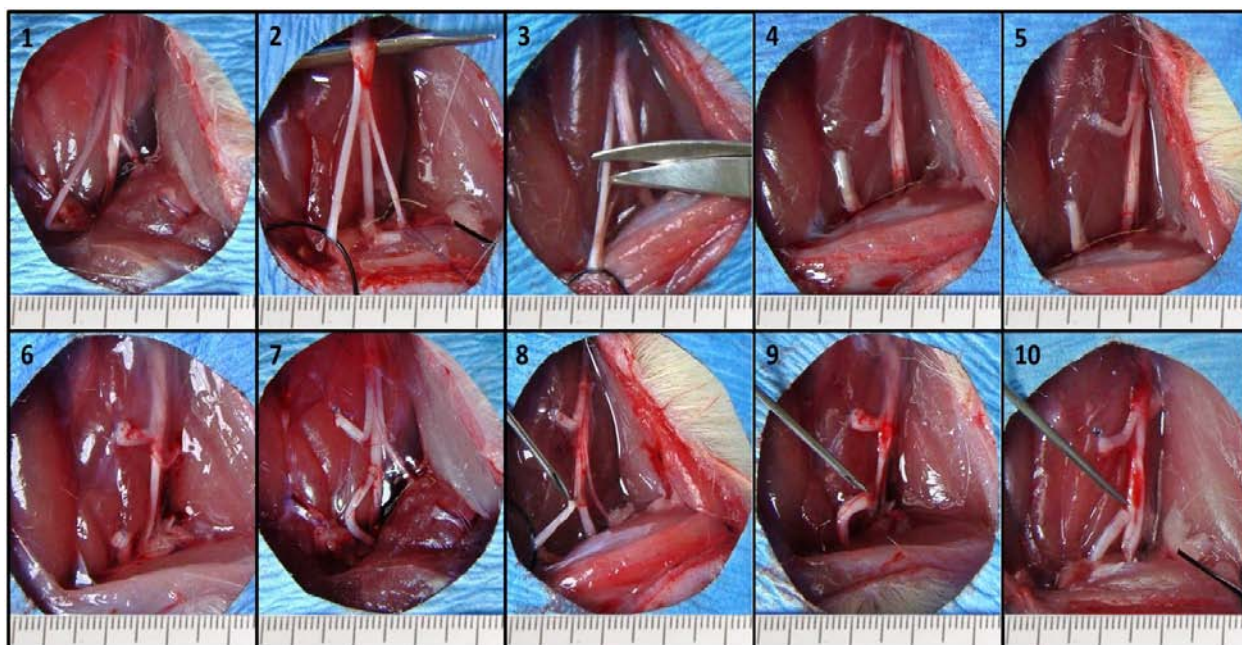


Figura 11 – Fotografias ilustrativas do transoperatório de animais submetidos ao experimento, identificando-se a sequência cirúrgica. **1:** anatomia dos nervos em estudo; **2:** identificação do nervo fibular (fio preto) e nervo sural (fio azul); **3:** secção do nervo fibular com microtesoura; **4:** cotos nervosos separados após a secção do nervo fibular; **5:** fixação do coto nervoso proximal; **6:** fixação do coto distal - grupo B; **7:** RNTL com sutura – grupo C; **8:** RNTL com sutura e FCN – grupo D; **9:** RNTL com CF – grupo E; **10:** RNTL com CF contendo FCN – grupo F.

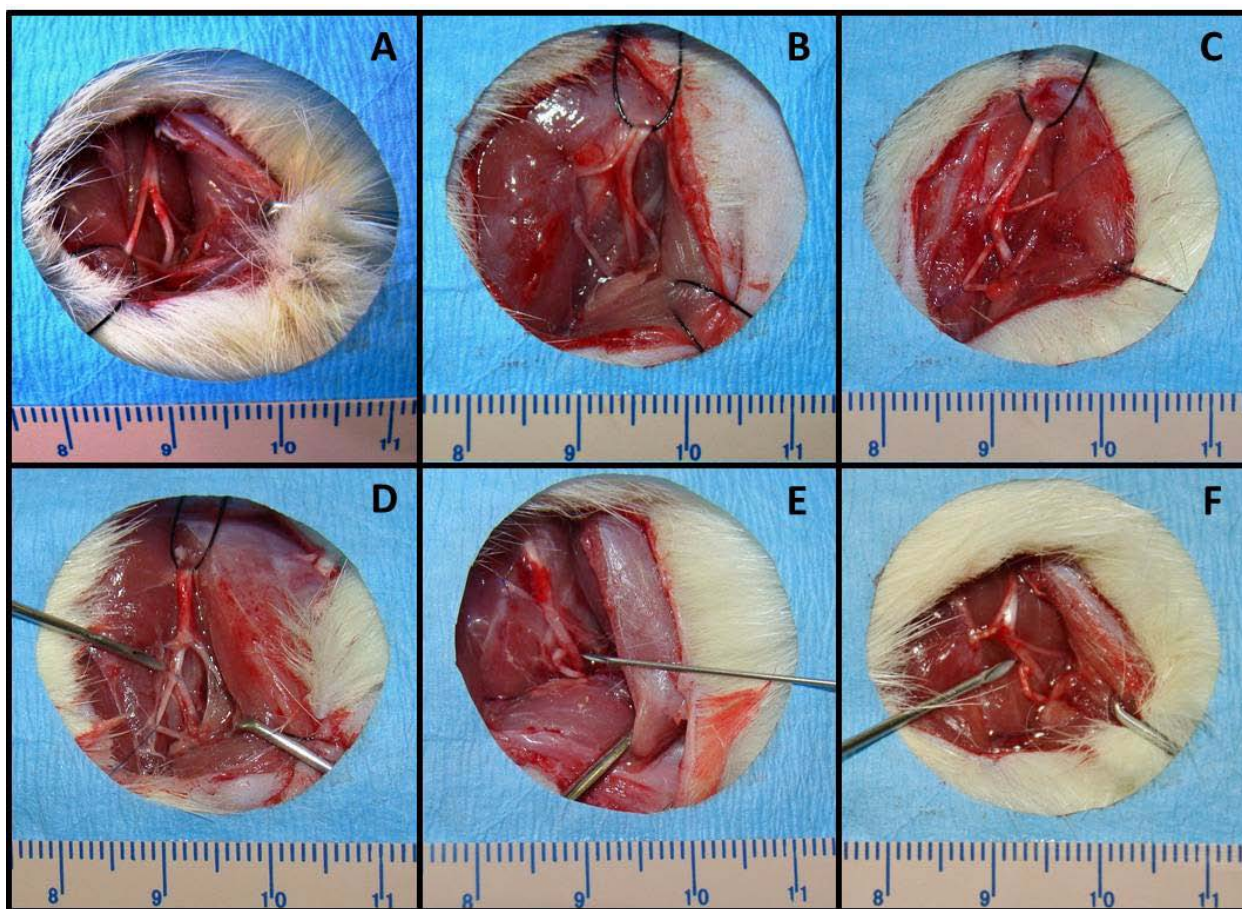


Figura 12 – Grupos em estudo. **A:** Grupo A - grupo controle; **B:** Grupo B – secção do nervo fibular sem reparo; **C:** Grupo C – RNTL com sutura; **D:** Grupo D – RNTL com sutura associado com FCN; **E:** Grupo E – RNTL com CF; **F:** Grupo F – RNTL com CF contendo FCN.

4.3 – ACOMPANHAMENTO DA FUNÇÃO MOTORA

O teste de marcha – já realizado no início do estudo - foi repetido com 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico, com o intuito de comparar os grupos e avaliar o experimento.

4.4 – COLETA DE NERVOS E MÚSCULOS

Noventa dias após o procedimento inicial, os animais foram pesados e novamente submetidos à intervenção cirúrgica. Seguindo a metodologia do procedimento inicial

(LUNA, TEIXEIRA, 2007), os animais foram anestesiados e realizou-se nova incisão, com divulsão das estruturas até a identificação da área em estudo (Figura 13).

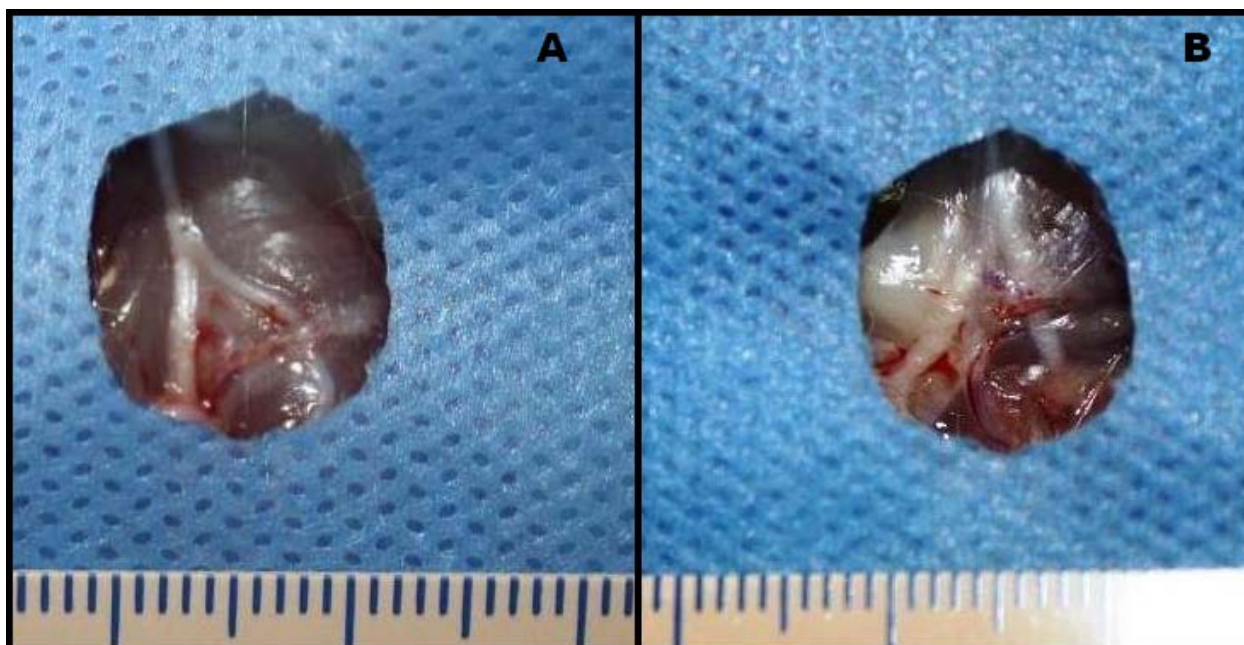


Figura 13 – Fotografia do segundo transoperatório de animais em estudo. **A:** animal do grupo D, demonstrando a permanência do RNTL de Viterbo. **B:** animal do grupo F, também demonstrando a permanência do RNTL realizado com CF contendo FCN.

Para a análise histológica, um segmento nervoso foi removido, contendo a extremidade distal do nervo ciático, assim como um segmento com 2 cm do nervo tibial e do nervo fibular. Na posição anatômica, o material foi fixado com alfinetes em placas de isopor, sendo acondicionado em recipiente com formalina tamponada a 10% (MUELLER, 2008).

Em seguida, foi realizada a retirada total do músculo tibial cranial (RAMOS, 2009; GIGO-BENATO, DAVILENE, 2010) do MPE e do MPD, sendo estes pesados em balança de precisão (*Precision*®, PR 1000 Núcleo) e, em seguida, acondicionados em recipiente com formalina tamponada a 10% (MUELLER, 2008; ROMÃO *et al.*, 2007) (Figura 14).

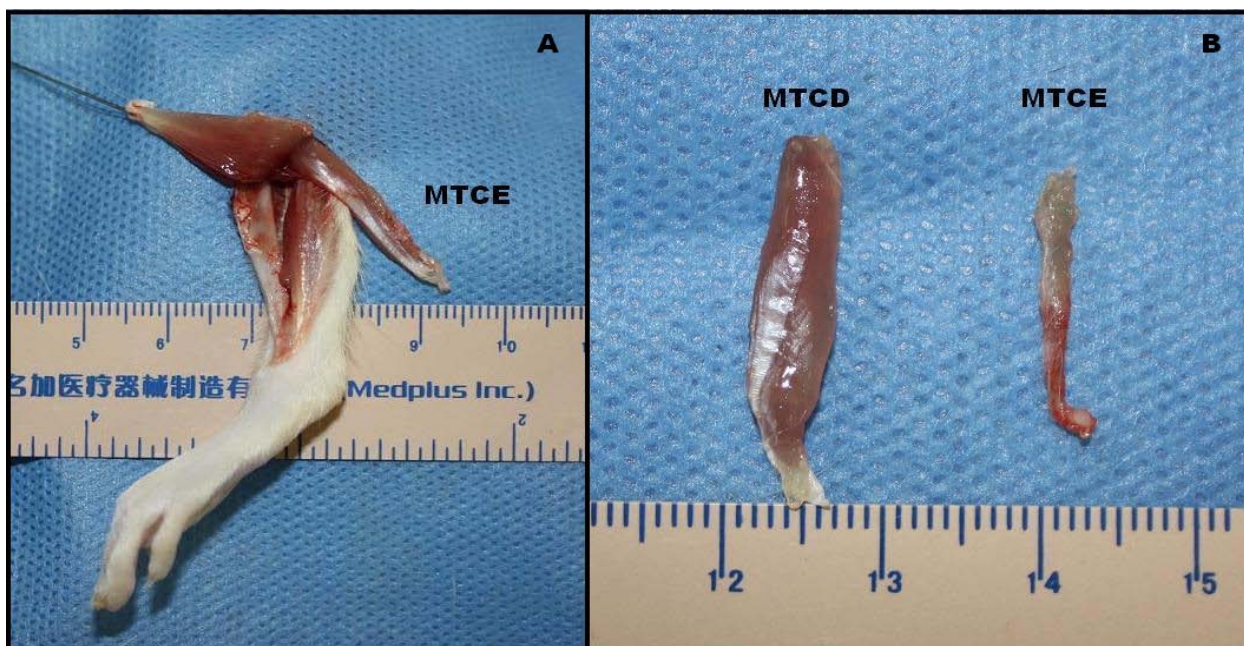


Figura 14 – Fotografia do segundo transoperatório de animais em estudo: **A:** animal do grupo A, com o músculo tibial cranial esquerdo (MTCE) identificado. **B:** músculos tibiais craniais direito e esquerdo (MTCD, MTCE) de animal do grupo B, identificando-se importante atrofia do MTCE após a secção nervosa.

Após a coleta dos nervos e músculos de interesse, realizou-se a eutanásia dos animais, com dose letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg), por meio de injeção intraperitoneal (LUNA, TEIXEIRA, 2007; MUELLER, 2008; CHEM, 2003).

A Figura 15 apresenta o delineamento final do estudo.

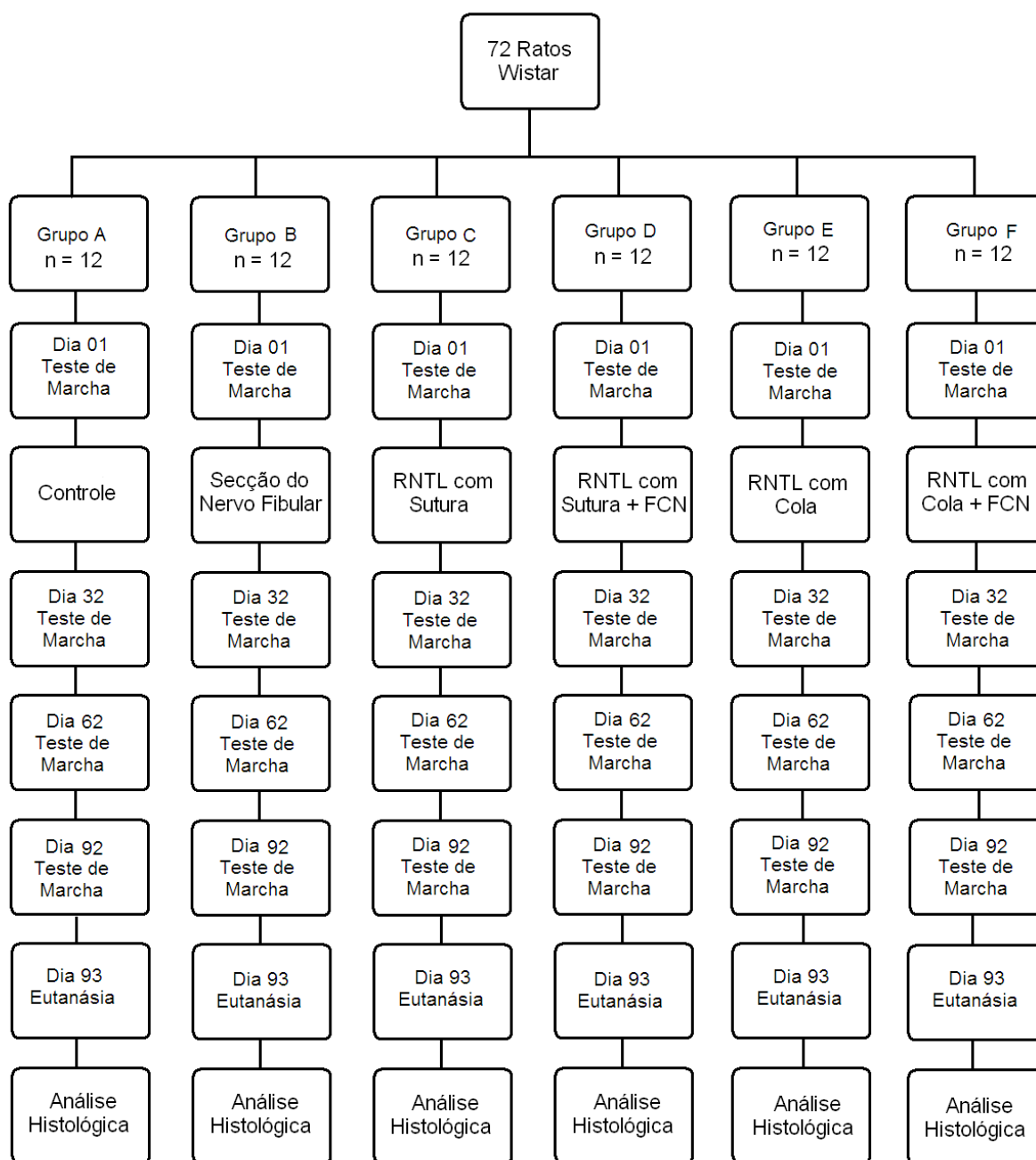


Figura 15 - Representação esquemática do desenho do estudo. **Legenda:** RNTL: reparo nervoso término-lateral; Cola: Cola de Fibrina; FCN: fator de crescimento nervoso.

4.5 – ANÁLISE DA FUNÇÃO MOTORA

Seguindo os preceitos de Medinaceli, a análise dos quatro testes de marcha foi realizada da seguinte maneira (RAMOS, 2009):

Para cada animal, foram avaliadas quatro pegadas consecutivas com as seguintes medidas (ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006a):

- 1) TP = Distância entre o tálus e a terceira falange distal (tamanho da pegada);
- 2) ATD = Distância entre a primeira e quinta falange distal (abertura total dos dedos);
- 3) APD = Distância entre a segunda e a quarta falange distal (abertura parcial dos dedos).

Cada medida, em milímetros, foi anotada em uma planilha eletrônica no Excel® (Microsoft, Redmond, EUA) (Figura 16).

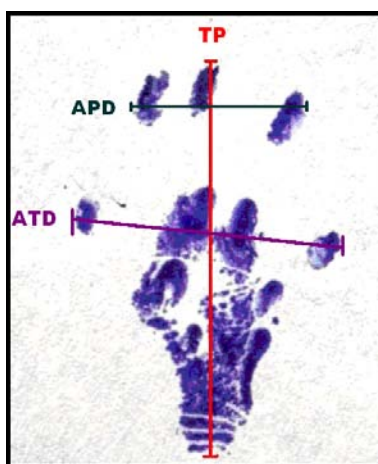


Figura 16 – Aspecto da pegada de um animal em estudo: **TP**: distância entre o tálus e a terceira falange distal (tamanho da pegada); **ATD**: distância entre a primeira e quinta falange distal (abertura total dos dedos); **APD**: distância entre a segunda e a quarta falange distal (abertura parcial dos dedos).

O investigador responsável pela análise da marcha, nos quatro testes, não foi informado a que grupo pertenciam os animais.

A partir das medições, para determinar a recuperação motora dos animais, foi calculado o Índice de Função do Ciático (IFC) utilizando-se a fórmula: (KANAYA, FIRRELL, BREIDENBACH, 1996; DE MEDINACELI, FREED, WYATT, 1982; RAMOS, 2009).

$$\text{IFC} = - 38,3 \frac{(\text{TP MPE} - \text{TP MPD})}{\text{TP MPD}} + 109,5 \frac{(\text{ATD MPE} - \text{ATD MPD})}{\text{ATD MPD}} + 13,3 \frac{(\text{APD MPE} - \text{APD MPD})}{\text{APD MPD}} - 8,8$$

Na interpretação do IFC, valores próximos a zero são considerados normais e os valores próximos de -100 indicam lesão total do nervo ou ausência de regeneração nervosa (LAGO, 2005; MEDINACELI, QUACH, DUCHEMIN, 1982).

4.6 - ESTUDO HISTOLÓGICO

As peças anatômicas, em recipientes apropriados, foram encaminhadas para estudo histológico no Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica (LAC), em Campo Grande - Mato Grosso do Sul.

As amostras de nervo foram desidratadas e incluídas individualmente em historesina. Em seguida, foram realizadas secções transversais no nervo fibular, a 10 mm de sua origem no grupo A, a 5 mm da extremidade do coto distal no Grupo B e a 5 mm do RNTL nos demais grupos. As amostras foram incluídas em parafina e cortadas com micrótomo – com 5 µm de espessura (LAGO, 2005; MUELLER, 2001; ORTIZ-HIDALGO, WELLER, 1992). De cada peça anatômica foi obtida uma lâmina, corada com hematoxilina e eosina (HE) (LAGO, 2005; MUELLER, 2001; ORTIZ-HIDALGO, WELLER, 1992). Da mesma forma, amostras centrais de cada músculo foram retiradas e utilizadas para confecção de uma lâmina, também corada com HE (RAMOS, 2009).

4.7 - DIGITALIZAÇÃO DA IMAGEM

No laboratório de patologia foi realizada a digitalização de quatro campos de cada lâmina, por meio de grade aleatória, para a análise quantitativa da regeneração axonal e muscular (MUELLER, 2001). Cada imagem digital apresentou uma resolução de 640 pontos na horizontal, por 480 pontos na vertical com 24 *bits* de cores (16 milhões de cores). A área analisada por campo foi de 160x120 micrômetros, com resolução final de 4 *pixels* por micrômetro.

Cada campo foi digitalizado em um aumento de 400 vezes, em microscópio óptico (*Vector Corporation, Catálogo PK 6100, Burlingame, EUA*), com óptica plana cromática, acoplado em uma câmera Sony DXC 151 (Tóquio, Japão). A lente utilizada foi a 10/0.45 (*Sigma, Chemical Company, catálogo D5637, St. Louis, Missouri, EUA*), com condensador em abertura máxima a uma distância de 6,5 cm da lâmina, com máxima intensidade de luz. A câmera foi conectada a um computador IBM-PC equipado com microprocessador *Intel Pentium III 550 MHz*, com placa de captura *Matrix MV-LC* (*Matrix, Berlim, Alemanha*).

Para cada imagem utilizou-se o mesmo intervalo de cor, ajustado para identificar áreas representativas de axônios mielinizados, fibras musculares e neoformação de colágeno (MUELLER, 2001).

4.8 - MORFOMETRIA

No laboratório de cirurgia experimental, utilizando um programa de computador específico para análise de imagens – *Image ProPlus 4.5*® – (*Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*), foi realizada a análise morfométrica dos campos digitalizados (CHEM, 2004), avaliando-se:

1) Lâminas do Nervo Fibular: número médio de axônios mielinizados por campo, bem como seu diâmetro médio (MUELLER, 2001; CHEM, 2003).

2) Lâminas do Músculo Tibial Cranial Esquerdo: número médio de fibras musculares por campo, bem como seu diâmetro médio (ROMÃO *et al.*, 2007).

O patologista responsável pela análise morfométrica não foi informado a que grupo pertenciam os animais (Figura 17).

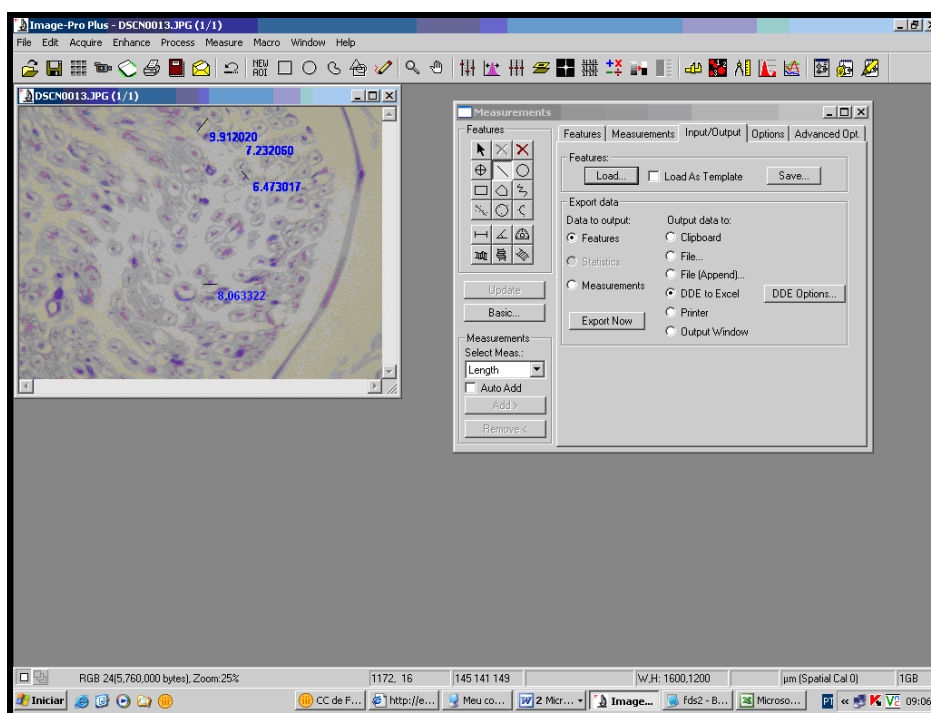


Figura 17 – Aspecto da contagem histológica, realizada por meio do *Image Pro Plus 4.5*® – (*Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*).

Em seguida, foi gerada planilha eletrônica no Excel® (Microsoft, Redmond, EUA) com os valores obtidos.

4.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *BioEstat*® versão 4.0. Para comparação entre os grupos serão utilizados os testes ANOVA e Kruskal Wallis (*a posteriori* Student Newman Keuls). A comparação entre os testes de marcha, em cada grupo, foi realizada por meio do Teste de Friedman. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 - RESULTADOS

5 – RESULTADOS

Durante o estudo não foi identificada infecção na ferida operatória, bem como óbito de animais.

A análise estatística, comparando os grupos em estudo, é apresentada nas tabelas 1-5, em média e desvio padrão (DP).

As informações completas referentes à massa, testes de marcha e análise histológica de cada animal estão expostas nos quadros 1-10 e nos gráficos 1-12 (Anexo E).

A figura 18 apresenta o aspecto da variação das pegadas nos testes de marcha e as figuras 19-22 apresentam fotomicrografias da histologia dos animais em estudo.

Tabela 1 – Massa dos animais (g) no primeiro e no último dia do estudo - 2011

Dia	GRUPOS						p (A X B X C X D X E X F)
	A	B	C	D	E	F	
	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	
01	301,8±07,8	299,2±08,2	299,2±06,2	300,8±06,9	298,6±08,9	298,5±09,1	0,886
93	549,9±12,3	533,9±10,1	547,2±13,9	543,7±16,9	545,4±14,1	544,2±11,8	0,089

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. ANOVA.

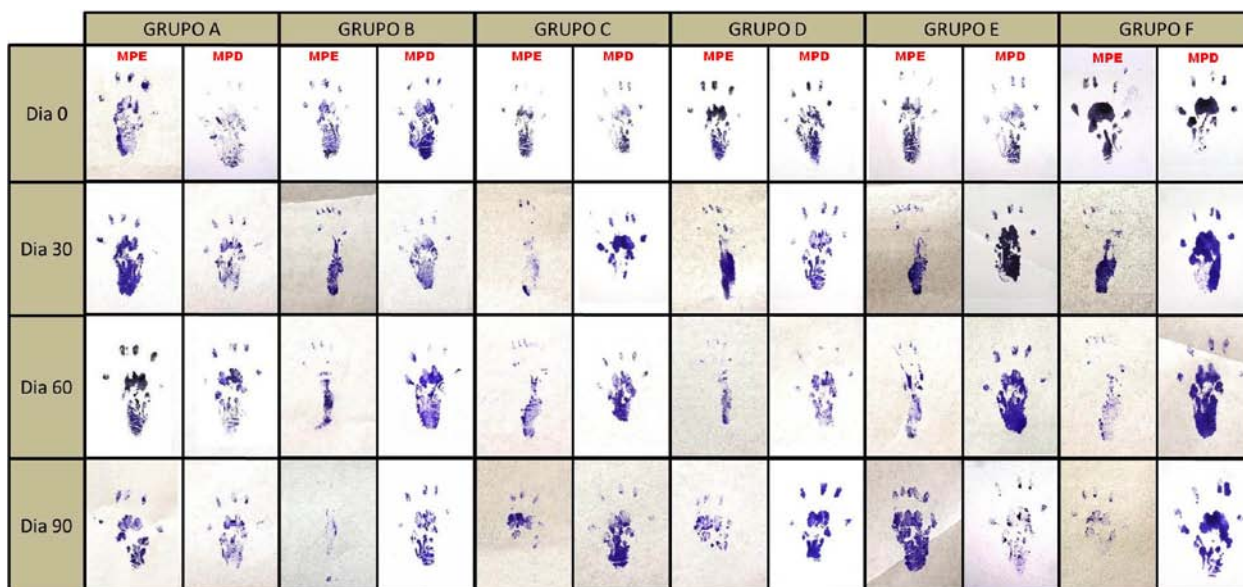


Figura 18: Aspecto das pegadas (MPE, MPD) de animais dos grupos A a F, no primeiro (Dia 0), segundo (Dia 30), terceiro (Dia 60) e quarto (Dia 90) testes de marcha. O aspecto das pegadas do MPE do animal do grupo B demonstra que não houve recuperação motora nos três últimos testes de marcha. Os aspectos das pegadas dos MPE dos animais dos grupos C a F, no quarto teste de marcha, demonstram recuperação funcional, com retorno da abertura dos dedos.

Tabela 2 - Análise dos índices de função obtidos no primeiro, segundo, terceiro e quarto testes de marcha, em cada grupo (x -1) - 2011

Teste	GRUPOS						$p^{(1)}$ (AxBxCxDxExF)
	A	B	C	D	E	F	
	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	
1°	9,1±2,9	8,9±2,8	8,7±4,0	8,3±3,4	7,7±3,9	8,8±1,9	0,976
2°	8,3±2,6	63,6±13,2	64,8±13,3	65,3±14,1	67,1±15,1	71,0±11,6	<0,001 A≠ todos
3°	7,8±3,5	66,2±6,3	66,7±6,0	67,1±7,0	67,0±7,7	58,3±29,7	<0,001 A≠ todos
4°	8,7±2,8	74,3±8,5	32,7±27,1	31,5±28,5	37,9±38,9	25,3±34,7	<0,001 A≠ todos; B≠ todos
$p^{(2)}$	0,960	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
(1°x2°x3°x4°)		1°≠ todos	1°≠(2°,3°)	1°≠(2°,3°)	1°≠(2°,3°)	1°≠(2°,3°)	

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. ⁽¹⁾ Kruskal Wallis e a *posteriori* Student Newman Keuls para a comparação entre os grupos (AxBxCxDxExF). ⁽²⁾ Teste de Friedman para a comparação entre os testes avaliados (1°x2°x3°x4°) em cada grupo.

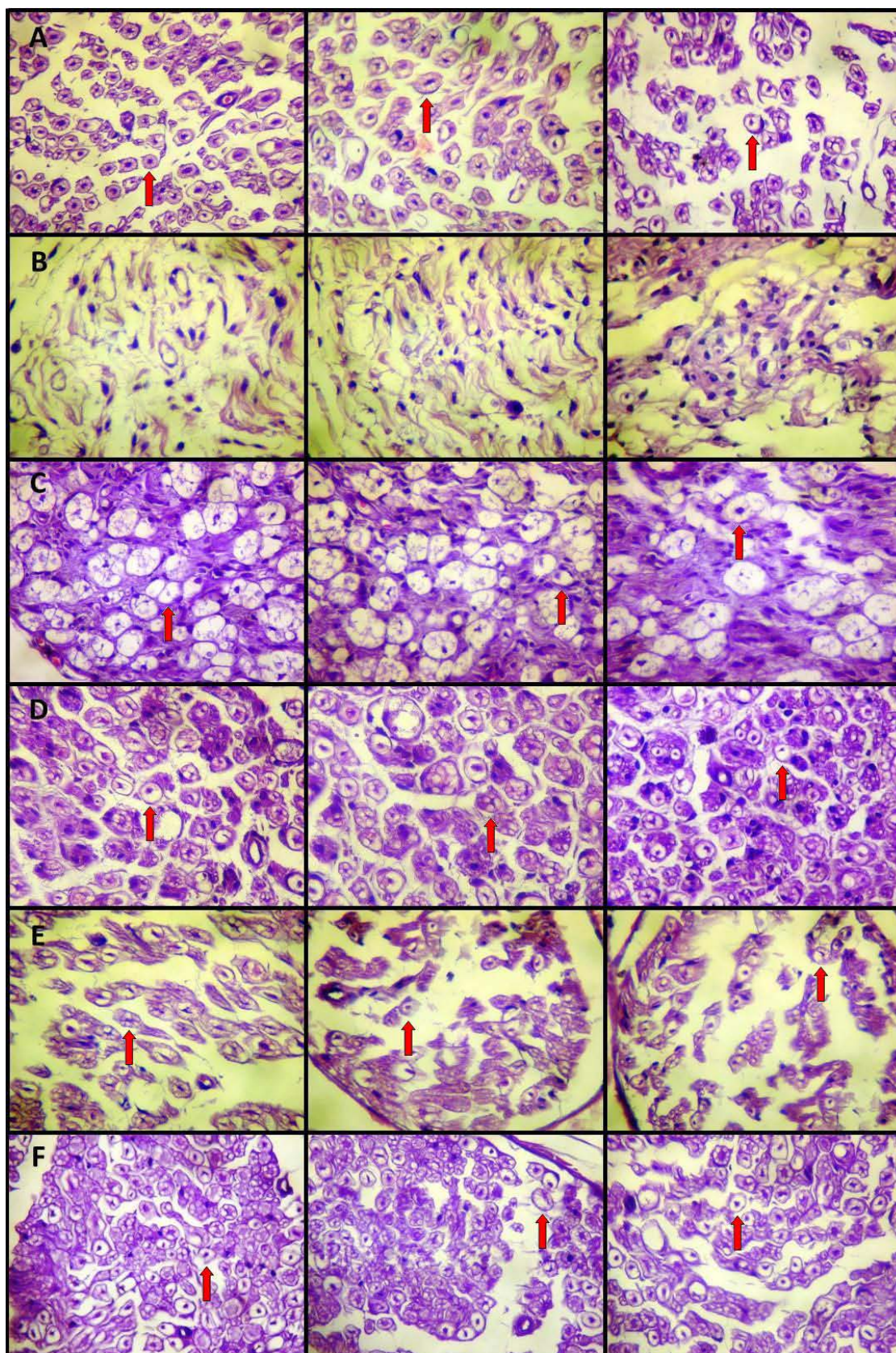


Figura 19: Fotomicrografias do nervo fibular dos animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

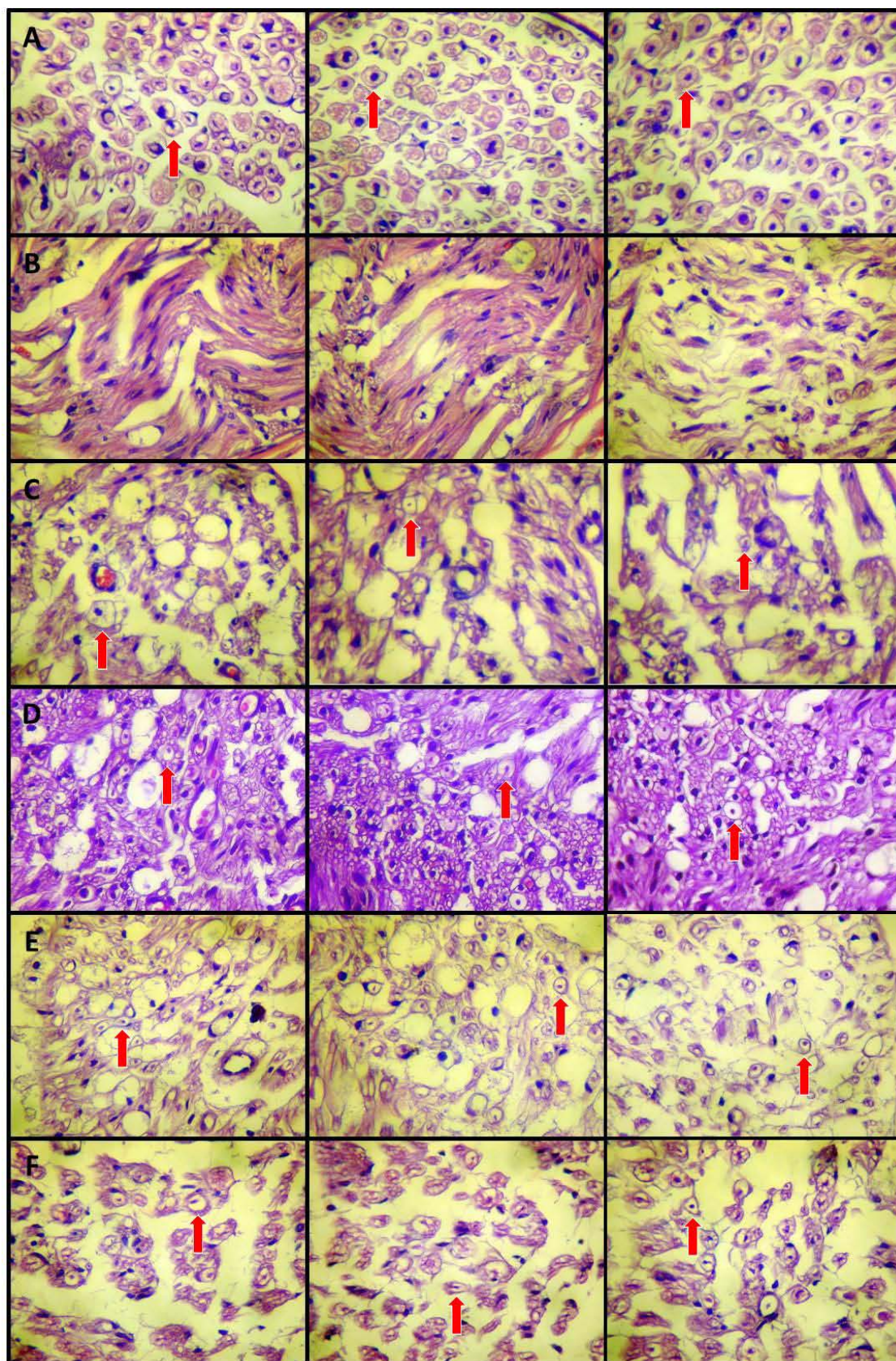


Figura 20: Fotomicrografias do nervo fibular de outros animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – *Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*).

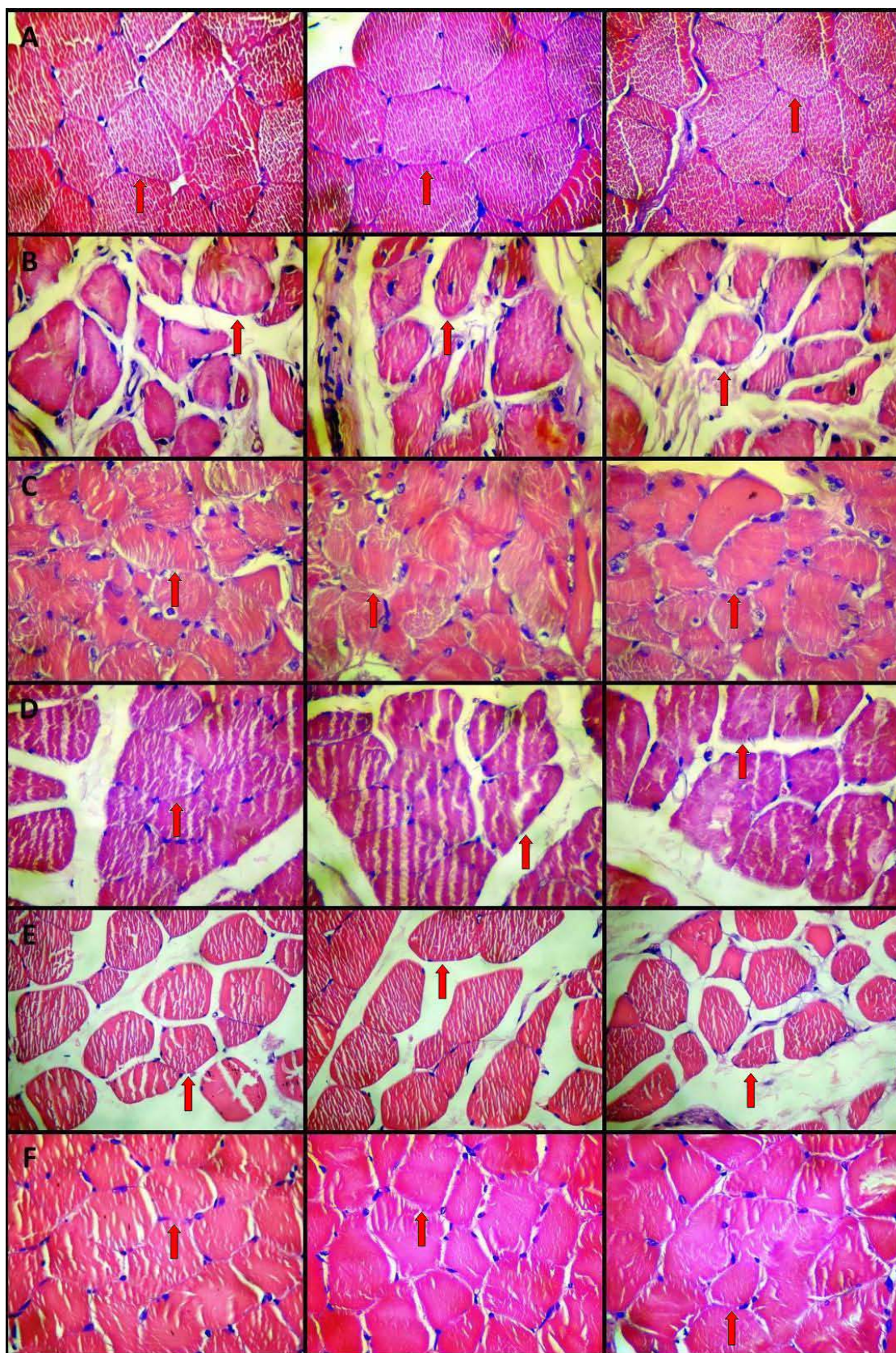


Figura 21: Fotomicrografias do MTC esquerdo dos animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de fibras musculares. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

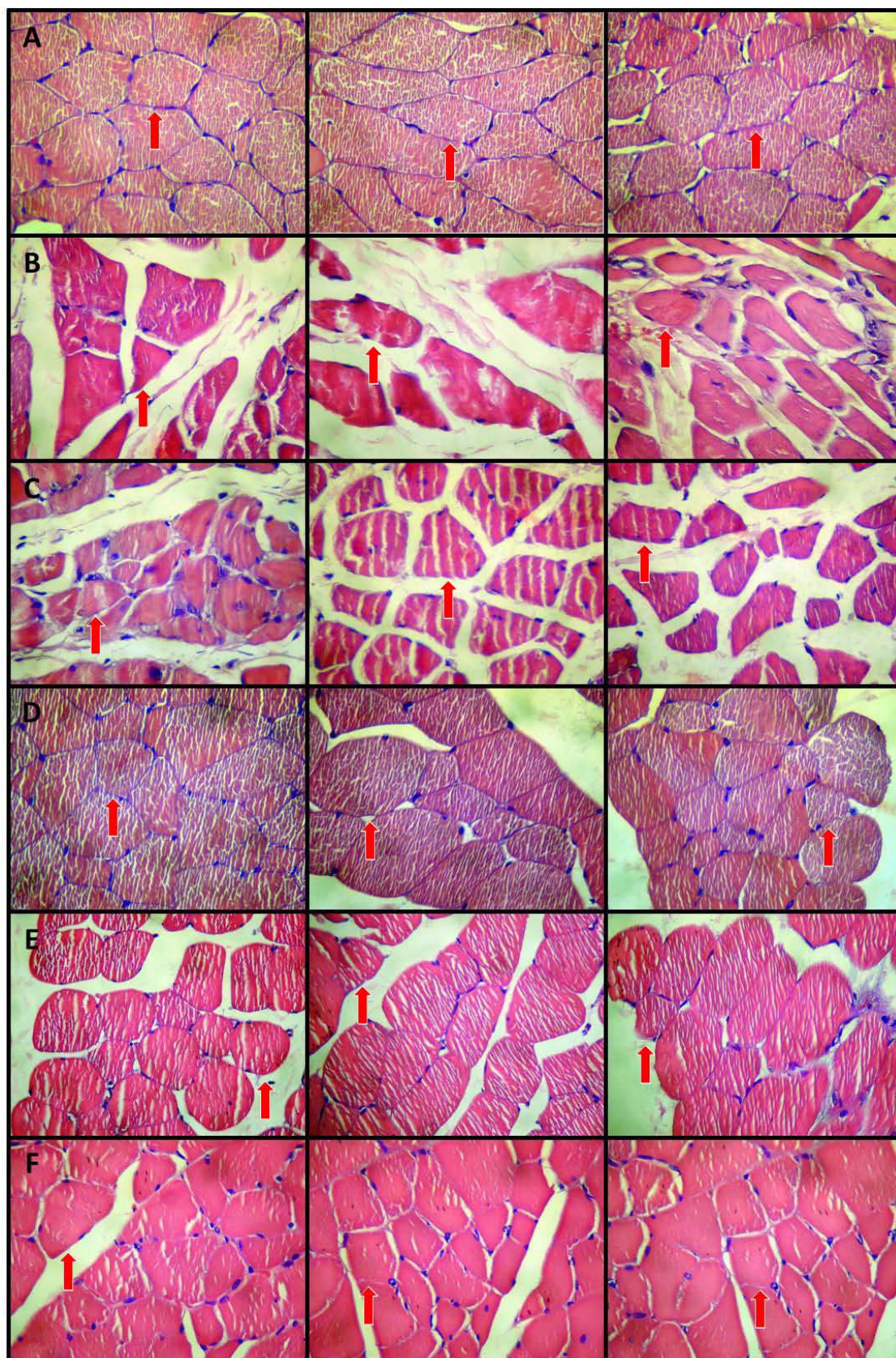


Figura 22: Fotomicrografias do MTC esquerdo de outros animais em estudo. **A:** animais do grupo A; **B:** animais do grupo B; **C:** animais do grupo C; **D:** animais do grupo D; **E:** animais do grupo E; **F:** animais do grupo F. As setas vermelhas representam exemplos de fibras musculares. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x, campos selecionados para contagem celular no *Image Pro Plus 4.5*® – Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Tabela 3 - Análise do número e do diâmetro dos axônios, por campo, nos grupos em estudo - 2011

Axônios	GRUPOS						p (A X B X C X D X E X F)
	A	B	C	D	E	F	
	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	
Número	122,23±12,51	2,98±1,09	68,58±36,78	81,67±35,88	82,48±44,78	86,04±47,08	<0,001 A≠ todos; B≠ todos
Diâmetro	10,01±0,46	3,44±1,82	9,33±1,91	9,13±2,46	8,10±2,42	9,23±1,80	<0,001 B≠ todos

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. *Kruskal Wallis* e a *posteriori* Student Newman Keuls.

Tabela 4 - Análise do número e do diâmetro das fibras musculares do músculo tibial cranial direito, por campo, nos grupos em estudo - 2011

Fibras Musculares	GRUPOS						p (A X B X C X D X E X F)
	A	B	C	D	E	F	
	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	
Número	19,79±2,03	18,48±3,66	17,73±3,09	19,08±3,86	19,19±2,40	20,02±3,13	0,452
Diâmetro	44,42±8,28	22,80±4,21	38,46±9,29	40,41±8,33	40,70±10,79	38,32±11,87	<0,001 B≠ todos

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. *Kruskal Wallis* e a *posteriori* Student Newman Keuls.

Tabela 5 - Análise da massa(g) do músculo tibial cranial nos grupos em estudo - 2011

Massa MTC	GRUPOS						p (A X B X C X D X E X F)
	A	B	C	D	E	F	
	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	MÉDIA±DP	
MPD	1,56±0,13	1,57±0,14	1,58±0,12	1,54±0,16	1,53±0,10	1,55±0,14	⁽¹⁾ 0,938
MPE	1,55±0,11	0,44±0,23	0,85±0,22	0,88±0,29	0,96±0,27	1,03±0,42	⁽²⁾ <0,001 A≠ todos; B≠ todos

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. ⁽¹⁾ ANOVA. ⁽²⁾ *Kruskal Wallis* e a *posteriori* Student Newman Keuls.

6 - DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

Logo após sua descrição, um dos principais questionamentos sobre a técnica de Viterbo (1992) estava na compreensão dos reais mecanismos envolvidos no brotamento axonal lateral a partir de um nervo doador íntegro – sem a janela epineural de Ballance (HAYASHI *et al.*, 2004; LYKISSAS *et al.*, 2007; PONDAAG, GILBERT, 2008; VITERBO, RIPARI, 2008). Atualmente, após as diversas descrições de sucesso com o RNTL de Viterbo, passou-se a questionar qual a importância do FCN na necessária potencialização de seus resultados (MUELLER, 2008; SCHMIDHAMMER, 2007; VITERBO *et al.*, 2009).

Assim como no RNTT, a grande dificuldade da avaliação do FCN exógeno no RNTL está no desenvolvimento do método ideal de apresentá-lo no ponto do reparo, na dose certa e por tempo prolongado (BHANG *et al.*, 2007; DERBY *et al.*, 1993). Diversos modelos questionáveis de administração do FCN já foram descritos na literatura, sendo que, no entanto, a busca pelo método de escolha - aplicável na rotina diária dos microcirurgiões - ainda persiste (SANTOS *et al.*, 1998; MENDERES *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003) e justificou a realização deste estudo.

Os crescentes relatos positivos obtidos após a realização do RNTT com CF contendo FCN (CHUNZHENG *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 2005a; JUBRAN, WIDENFALK, 2003; ZENG *et al.*, 1994; GAO *et al.*, 2008) e entendimento de que a potencialização dos resultados da microcirurgia no futuro passará pela utilização dos FN (MUELLER, 2008; CHEM, 2003; HONDERMARCK, 2008; VITERBO *et al.*, 2009), impulsionaram a avaliação do método no RNTL.

A ausência de estudos anteriores avaliando o RNTL, realizado apenas com CF contendo FCN, impediu a repetição de metodologias já testadas e a desejável comparação com resultados prévios, sendo que um novo modelo experimental foi delineado para a avaliação da hipótese original.

Na UFMS, desde 2006, os orientadores deste estudo desenvolvem uma linha de pesquisa intitulada “Modelos Animais de Doença”, que, entre outras técnicas, estuda o RNTL em suas diferentes formas de realização (NUNES E SILVA, 2008). A partir disso, iniciou-se a investigação da repercussão da associação da CF, contendo FCN, no RNTL protegido (sem suturas), no qual o nervo doador é totalmente preservado, livre

de traumas – uma das principais críticas ao RNTL clássico (Ballance *et al.*, 1903), bem como ao RNTL de Viterbo (VITERBO *et al.*, 1992).

O rato Wistar foi utilizado para realização deste experimento devido ao seu fácil manuseio, sua excelente resistência à infecção, bem como suas similaridades anatômicas e biológicas com os seres humanos (NISHIARA, PRUDDEN, 1958; MEEKS, NELSON, BYARS, 1995; SILVA, 2001). O animal é considerado ideal para estudos de longa duração, sendo a opção para a maioria dos que estudaram o RNTL (TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003; MUELLER, 2001; VITERBO *et al.*, 1992).

Segundo Mueller (2008), o rato apresenta uma rápida regeneração tecidual e excelente recuperação funcional em um pós-operatório relativamente precoce. Chunzheng *et al.* (2008), por exemplo, que avaliaram com sucesso a associação da CF com FCN em RNTT, optaram pelo rato Wistar, influenciando sua utilização neste estudo. Mueller (2008) referiu ainda que autores que utilizaram outros animais, como coelhos e macacos, em estudos semelhantes, referiram elevação nos custos finais e maior facilidade no desenvolvimento de infecções.

No intuito de evitar as possíveis variações do ciclo estral inerente às fêmeas, por influência de hormônios adenohipofisários, utilizou-se apenas ratos do sexo masculino (VITERBO, PALHARES, FRANCIOSI, 1994; SOUZA, 2007). A escolha de animais jovens foi devido à exuberante regeneração axonal apresentada nesta fase de seu desenvolvimento, estimulada pela presença importante dos FN – foco do estudo (MUELLER, 2008).

Para o procedimento anestésico utilizou-se quetamina e xylazina, por via intramuscular (DE VRIES *et al.*, 2002; RASO, BARBIERI, MAZZER, 2006; TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003). Esta associação é muito utilizada no rato Wistar, sendo ótima opção para procedimentos de curta duração como o realizado (ORNELAS, PADILLA, DI SILVIO, 2006b; SILVA, 2001). Os anestésicos proporcionaram um plano profundo suficiente para a realização do procedimento operatório, sem determinarem consequências negativas para a cirurgia e para os animais.

O acesso até o nervo fibular esquerdo foi realizado por meio da divulsão dos músculos glúteo e bíceps femoral, método de referência na literatura para a abordagem direta dos ramos terminais do nervo ciático em ratos (LIU *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2003). Jubran & Widenfalk (2003), autores que também obtiveram bons resultados com a associação da CF, contendo FCN, em RNTT, utilizaram este acesso cirúrgico. Tal acesso permitiu a realização do experimento com rapidez, trauma limitado,

descolamento tecidual mínimo e praticamente sem nenhum sangramento, reduzindo a morbidade da cirurgia e proporcionando uma recuperação pós-operatória tranquila aos animais (MARTINS *et al.*, 2005a; HAYASHI *et al.*, 2004). A evolução satisfatória de todos os animais durante todo o experimento ressaltou a qualidade do método cirúrgico utilizado.

O modelo nervoso tíbio-fibular, preconizado por diversos autores como método ideal para avaliar a regeneração nervosa após o RNTL (ZHAO, CHEN, CHEN, 1997; LUNDBORG, 1994; ROSS, MATSUDA, ZUKER, 1995; NOAH *et al.*, 1997a; NOAH *et al.*, 1997b; ROSSETO *et al.*, 2001; HAYASHI *et al.*, 2004), mostrou-se seguro e reprodutível – condições essenciais para um estudo como o realizado (LEE *et al.*, 2003). Os nervos envolvidos no RNTL experimental - fibular e tibial - apresentam características importantes: facilidade de acesso cirúrgico, constância anatômica, espessura adequada para o reparo cirúrgico e microanatomia fartamente avaliada na literatura (CHEM, 2003).

A escolha das características próprias de cada grupo de animais aqui estudado seguiu a orientação de publicações clássicas apresentadas na literatura (VITERBO *et al.*, 1992; MUELLER, 2001; MUELLER, 2008; SCHMIDHAMMER, 2007; VITERBO *et al.*, 2009), tendo o objetivo principal de avaliar profundamente as variáveis estudadas.

O grupo A foi utilizado como controle da normalidade e o grupo B como controle da denervação. O grupo C foi considerado como um controle positivo, sendo utilizado para avaliar a funcionalidade do RNTL de Viterbo, em sua forma clássica de realização – apenas com suturas (VITERBO *et al.*, 1992).

A inclusão deste grupo no delineamento seguiu a experiência prévia de autores de referência no método como Santos *et al.* (1998), Chunzeng *et al.* (2008), Lee *et al.* (2003) e Hayashi *et al.* (2001), que também utilizaram um controle positivo em seus estudos. Na dissertação de Mueller em 2001 e posteriormente em sua tese de 2008, a autora demonstrou a importância da inclusão de um grupo de controle positivo para a comparação com uma hipótese original.

O grupo D foi incluído no estudo para avaliar a possível influência da aplicação local do FCN, em dose única, no reparo clássico de Viterbo. Apesar da existência de relatos de bons resultados com a técnica no passado - em RNTT -, a literatura mais recente refuta esta possibilidade, alegando a rápida inativação do FCN aplicado sem um meio carreador específico (BHANG *et al.*, 2007).

O grupo E foi delineado para confirmar a hipótese, ainda questionada na literatura, de funcionalidade da realização do RNTL apenas com CF (MUELLER, 2008). O grupo F foi estabelecido para determinar se a adição do FCN no reparo protegido traria benefícios à técnica, a partir da sinergia dos benefícios da CF e do FCN.

A partir da ausência de suturas no grupo F, pôde-se inferir que os resultados obtidos deveram-se apenas à associação da CF e do FCN, facilitando a avaliação das características específicas do procedimento e evitando a adição de fatores de confusão à análise (ROMÃO *et al.*, 2007; MOONEY, LOH, PU, 2009).

O RNTL aqui originalmente apresentado, utilizando-se apenas com CF contendo FCN, no grupo F, foi realizado a partir de uma modificação pontual na técnica clássica de Viterbo (VITERBO *et al.*, 1992). Ao invés de suturar-se o coto distal do nervo fibular na face lateral íntegra do nervo tibial – como preconiza o autor, aplicou-se apenas a associação da CF com o FCN.

Não foram realizadas suturas de ancoragem, bem como não foi confeccionada a janela epineural de Ballance (BALLANCE *et al.*, 1903), garantindo-se, desta forma, a completa preservação do nervo doador – objetivo principal da técnica (RNTL protegido). Apesar de recente na literatura, o RNTL realizado apenas com CF foi realizado com sucesso, comprovando a simplicidade e as vantagens da técnica.

A dose do FCN seguiu os modelos bem sucedidos de autores que avaliaram sua influência em RNTT (JUBRAN, WIDENFALK, 2003; DERBY *et al.*, 1993; CHUNZHENG *et al.*, 2008). No estudo de Tiangco *et al.* (2001), os autores concluíram que o aumento da dose não determina o aumento no efeito dos FN, indicando que a saturação dos receptores e/ou as limitações biológicas poderiam impedir uma maior potencialização da regeneração. Apesar disso, há na literatura diferentes referências à utilização de doses mais elevadas de FCN com diferentes índices de sucesso (BHANG *et al.*, 2007; BLOCH *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 1998; PU *et al.*, 1999).

Lee *et al.* (2003), por exemplo, estudaram diversas doses de FCN (5, 20 e 50 µg) e só obtiveram a potencialização dos resultados, em RNTT, a partir de 20 µg. Novamente, a inexistência de estudos anteriores com o método aqui empregado e a não padronização dos estudos já publicados, avaliando RNTT, dificultaram a comparação com os resultados do presente estudo.

A dose da CF e a aplicação da mesma seguiram as orientações do fabricante, já confirmadas em estudos anteriores que comprovaram sua funcionalidade (TORRES *et al.*, 2003; ORNELAS *et al.*, 2006; MUELLER, 2001; JUBRAN, WIDENFALK, 2003). Em

estudo prévio dos autores, a dose da CF já havia se mostrado eficaz na realização do RNTL protegido (NUNES E SILVA, 2008), fato novamente aqui comprovado.

A avaliação dos resultados do presente estudo foi realizada por meio de diferentes métodos com o objetivo de ampliar as possibilidades de análise e fortalecer as conclusões obtidas (SATO, 2005; RASO, BARBIERI, MAZZER, 2006). O método ideal para a avaliação da regeneração axonal, após um reparo nervoso em um estudo experimental, ainda não foi completamente estabelecido e é motivo de debate intenso na literatura (PU *et al.*, 1999; CHEM, 2003).

Desta forma, os estudos sobre regeneração nervosa permanecem desafiadores, sendo que a comparação entre diferentes autores torna-se muito difícil, principalmente quando distintos testes são avaliados (RASO, BARBIERI, MAZZER, 2006). A simples confirmação histológica da regeneração axonal, no pós-operatório de um reparo nervoso, por exemplo, não indica diretamente a recuperação funcional satisfatória do animal – objetivo principal da cirurgia, exigindo a confirmação por outros métodos como, por exemplo, os testes de função motora e a análise de massa dos músculos envolvidos (LAGO, 2005).

Durante o estudo, não se observou comportamento agressivo dos animais, autofagia do membro operado, consupção ou morte - condições descritas na literatura como indicadores de adequação da metodologia e do tratamento do animal (SOUZA, 2007). Além disso, não foi evidenciado presença de processo infeccioso na ferida operatória, confirmando a qualidade técnica do procedimento e a resistência dos animais à infecção (MUELLER, 2008).

A massa dos animais foi avaliada no início e no final do estudo com o intuito de comparar os grupos e avaliar a evolução de ganho de peso dos animais (NUNES E SILVA, 2008; LAGO, 2005). A massa inicial dos animais foi escolhida por permitir o fácil manejo dos mesmos, bem como, por oferecer aspectos anatômicos com características ideais ao estudo.

Chunzheng *et al.* (2008), por exemplo, utilizaram animais com massa entre 250 e 300g; Lago (2005), entre 250 e 340g, Santos *et al.* (1998) e Torres *et al.* (2003) utilizaram animais entre 200 e 250g. Conforme apresentado da tabela 1, não houve diferença entre as massas dos animais na primeira medição, demonstrando a homogeneidade da amostra (ROMÃO *et al.*, 2007).

Da mesma forma, não foi identificada diferença entre os grupos na última medição, indicando que a cirurgia realizada não interferiu nos hábitos alimentares e na

capacidade de ganho de peso dos animais, comprovando a padronização das condições ambientais oferecidas durante o estudo (MUELLER, 2008). Reis (2005), realizando avaliações de RNTL, obteve conclusões semelhantes quanto à massa dos animais. Este resultado é considerado de grande importância, pois permitiu a comparação entre outras variáveis avaliadas no estudo, como por exemplo, a massa do MTC, que é proporcional à massa final do animal (ROMÃO *et al.*, 2007).

A recuperação funcional foi aferida com o teste de marcha descrito por Medinaceli *et al.* (1982) e ampliado por Menovsky & Beek (2001). O teste é considerado simples, seguro, barato e reprodutível, sendo o método não-invasivo mais utilizado para a avaliação fidedigna da função motora após lesão nervosa no modelo tíbio-fibular (OGÜN *et al.*, 2003; VAREJÃO, MEEK, FERREIRA, 2001).

O índice de função escolhido para a análise da recuperação motora dos animais foi o IFC (ZENG *et al.*, 1994; CHUNZHENG *et al.*, 2008; PU *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2005b). Desde sua descrição, em 1982, por Medinaceli *et al.* (1982), o IFC vem sendo largamente utilizado em estudos experimentais (LOWDON, SEABER, URBANIAK, 1988). Atualmente ele é considerado uma ferramenta adequada para quantificar a recuperação funcional após lesões de ramos do nervo ciático (KANAYA, FIRRELL, BREIDENBACH, 1996).

O IFC oferece melhor correspondência com a recuperação de função clínica real do animal, quando comparado com outros índices já descritos (RASO, BARBIERI, MAZZER, 2006). Segundo Reis (2005), no modelo cirúrgico estudado, o IFC está diretamente correlacionado com a densidade das fibras regeneradas. Chunzheng *et al.* (2008), Gao *et al.* (2008), Zeng *et al.* (1994), por exemplo, também utilizaram o IFC em seus estudos, corroborando a adequação do método. O investigador responsável por analisar os testes de marcha não foi informado a que grupo pertenciam os animais, no intuito de minimizar o viés de aferição (ROBILLARD, 2002).

A análise da função motora foi iniciada no pré-operatório, para determinar se havia diferença na marcha dos animais em cada grupo (MARTINS *et al.*, 2005c). Conforme a tabela 2, no primeiro teste de marcha não houve diferença entre os grupos, garantindo as análises posteriores. Seguindo protocolos de diversos estudos, os testes seguintes foram repetidos com trinta, sessenta e noventa dias após a realização do procedimento cirúrgico, no intuito de detectar precocemente as possíveis alterações de marcha determinadas pela regeneração axonal (LAGO, 2005; BAIN, MACKINMON,

HUNTER, 1989). Este período é julgado suficiente para a confirmação da recuperação motora após reparos nervosos no modelo em estudo (MARTINS *et al.*, 2005a).

A partir dos resultados dos testes de marcha (tabela 2) evidenciou-se que os animais do grupo A não apresentaram alteração no padrão de caminhada durante o estudo, fato esperado, pois este grupo não foi submetido à secção nervosa (LAGO, 2005).

Os animais do grupo B – submetidos à secção, sem posterior reparo cirúrgico – apresentaram prejuízo motor importante a partir do segundo teste. Como esperado, estes animais não apresentaram recuperação de função durante o estudo, mantendo o MPE atrófico, caracterizando a ausência de regeneração axonal (ROBILLARD, 2002).

Os animais dos grupos C, D, E e F, que foram submetidos aos diferentes tipos de RNTL, apresentaram padrões de atrofia do MPE no segundo e terceiro testes (semelhantes ao grupo B), indicando que, neste período, não apresentaram recuperação motora (ROBILLARD, 2002). Todavia, no quarto teste de marcha, estes animais apresentaram recuperação parcial da função motora - indicando regeneração axonal após o RNTL.

No modelo experimental em análise, é esperado que, nos animais em que o RNTL foi bem sucedido, a progressão do crescimento nervoso determine a recuperação da marcha somente cerca de noventa dias após a cirurgia (LAGO, 2005; ROBILLARD, 2002). Tal fato foi confirmado no presente estudo com a recuperação da função motora dos animais dos grupos C, D, E e F somente no quarto teste de marcha.

Assim, comprovou-se que o RNTL, independente da técnica utilizada, determinou a recuperação da função motora dos animais de forma semelhante. Não foi identificada diferença na recuperação da função motora entre os grupos C, D, E e F, indicando que a adição do FCN no grupo F não a influenciou.

A recuperação da marcha dos animais operados não atingiu os níveis do grupo A, indicando que a recuperação motora existiu, mas não atingiu os níveis pré-lesionais (LIU *et al.*, 1999; ROBILLARD, 2002; HAYASHI *et al.*, 2004). Esse resultado já era esperado no modelo experimental estudado, pois mesmo nos casos de reparo axonal efetivado com sucesso, o trauma determinado pela atrofia muscular prolongada (até que a regeneração axonal possibilite o retorno do estímulo nervoso ao músculo prejudicado) no rato, acaba por impedir a recuperação completa da função motora dos animais (CHUNZHENG *et al.*, 2008; ROMÃO *et al.*, 2007).

Neste sentido, Mueller (2008) referiu que, no modelo em estudo, é considerada satisfatória toda recuperação da função motora que atinja cerca de 70% do esperado para um animal não operado – do grupo controle. Em afirmação semelhante, Menovsky & Beek (2001) referiram que valores de cerca de 60% já são considerados satisfatórios para o pós-operatório tardio como o avaliado neste estudo.

Os valores de IFC nos grupos operados no segundo e terceiro testes, que mostraram atrofia foram semelhantes aos obtidos pelos autores Chunzheng *et al.* (2008), neste período ($-84,36 \pm 9,11$ e $-60,54 \pm 7,98$) respectivamente. Da mesma forma, os índices obtidos no quarto teste, que indicaram recuperação da função motora, ficaram muito próximos dos obtidos por Chunzheng *et al.* (2008) ($-36,77 \pm 5,27$), por Martins *et al.* (2005b) ($-38,65 \pm 9,88$), por Lago (2005) ($-44,00 \pm 15,00$) e por Liu *et al.* (1999) ($-37,3 \pm 13,5$).

A eutanásia dos animais foi realizada no nonagésimo pós-operatório, período considerado ideal por diversos autores para a análise proposta, facilitando a identificação da regeneração nervosa no modelo tíbio-fibular (LUNDBORG, 1994; ROSSETO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2003).

A preparação das lâminas histológicas, tanto do nervo fibular esquerdo, quanto do MTC esquerdo, foi realizada com HE, coloração utilizada em diversos estudos sobre o tema (ZHAO, CHEN, CHEN, 1997; AL-QATTAN, AL-THUNYAN, 1998; SOUZA, 2007; CHUNZHENG *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2003). Gao *et al.* (2008), que avaliaram com sucesso a associação da CF com FCN em RNTT, também optaram pela HE.

A alta qualidade das imagens (SOUZA, 2007), já avaliada em estudo prévio do autor (NUNES E SILVA, 2008), foi decisiva para a escolha da HE. A coloração das lâminas foi considerada satisfatória no presente estudo, pois permitiu a realização da morfometria computadorizada sem dificuldades, a partir da clara identificação das estruturas analisadas (CHEM, CHEM, 2004).

O método de avaliação das lâminas, utilizando o programa *Image Pro Plus 4.5*® – (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) é preconizado por diversos autores e se caracteriza pela segurança, reprodutibilidade e confiabilidade das informações obtidas, permitindo a comparação entre os grupos com facilidade (MUELLER, 2001; CHEM, 2003; SOUZA, 2007).

A análise morfométrica do nervo fibular esquerdo foi realizada a partir da comparação entre o número e o diâmetro médio de axônios mielinizados por campo de captura aleatória. Esse tipo de análise histológica é comumente descrito na literatura

como fidedigno de regeneração nervosa no modelo experimental estudado (SAMII *et al.*, 2006; MUELLER, 2001; MUELLER, 2008). Segundo Santos *et al.* (1998), este é o melhor método para avaliar a influência dos FN no reparo nervoso e justificou a escolha neste estudo. Reis (2005) e Dellon & Mackinnon (1989) referiram ainda que estes parâmetros são apropriados para estudos envolvendo aspectos relacionados com neurotropismo.

Mueller (2008) referiu que este método de análise fornece parâmetros fidedignos sobre o estado funcional dos neurônios e das células associadas a eles no pós-operatório. A identificação de axônios mielinizados distais ao ponto de reparo caracteriza o padrão de regeneração axonal, sendo que, quanto mais próximo ao grupo controle, mais acentuada é a regeneração axonal. Quando não se identifica a presença destes axônios, fica evidenciada a não-regeneração nervosa e o insucesso do reparo cirúrgico (TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003).

Na tabela 3, pode-se perceber que o grupo B, apresentou número médio de axônios mielinizados por campo muito inferior aos demais grupos. Este resultado - padrão de não regeneração - era esperado, visto que não se realizou reparo nervoso (LIU *et al.*, 1999; SATO, 2005). De outro modo, os animais dos grupos C, D, E e F, apresentaram regeneração axonal efetiva, confirmando o sucesso do reparo nervoso realizado (ROSSETO *et al.*, 2001; ROMÃO *et al.*, 2007). No entanto, não houve diferença entre os tipos de reparo, indicando que a adição do FCN no grupo F não potencializou a regeneração axonal.

Além disso, todos os animais submetidos ao RNTL apresentaram resultados inferiores ao grupo controle, indicando que houve regeneração axonal, mas que esta não atingiu os níveis de nervos não lesados (ROMÃO *et al.*, 2007).

Segundo Santos *et al.* (1998) é esperado que axônios que regeneram através de um reparo nervoso bem sucedido - por meio das técnicas disponíveis atualmente - nunca alcancem valores similares ao grupo controle. Este fato, já ressaltado por diversos autores (MUELLER, 2001; CHEM, 2003; MARTINS *et al.*, 2005a), foi o que motivou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ainda na tabela 3, pôde-se perceber que, avaliando-se o diâmetro médio da bainha de mielina, o grupo B apresentou redução significativa quando comparada aos demais grupos – novamente confirmando a não regeneração axonal nestes animais (ROMÃO *et al.*, 2007). Além disso, percebeu-se que não houve diferença significativa entre os animais operados e o grupo controle, indicando que os axônios regenerados

nestes animais alcançaram os valores normais – confirmando a maturidade na regeneração obtida como RNTL (LEE *et al.*, 2003; MUELLER, 2008).

Os resultados aqui apresentados foram próximos aos publicados por autores que avaliaram o RNTL em estudos semelhantes – sem a associação do FCN. Romão *et al.* (2007), por exemplo, obtiveram valores médios para o número de axônios de $22,42 \pm 4,14$ e para o diâmetro dos axônios de $10,07 \pm 1,6$. Mueller (2008) obteve o número médio de axônios de $55,81 \pm 19,87$ e diâmetro médio de $5,51 \pm 1,9$. Em estudo anterior, os autores obtiveram o número médio de axônios de $86,95 \pm 10,92$ e diâmetro médio de $7,69 \pm 0,90$ (NUNES E SILVA *et al.*, 2010).

A análise morfométrica do MTC esquerdo foi realizada a partir da contagem do número e do diâmetro médio de fibras musculares por campo em cada grupo. Esse tipo de análise histológica também é comumente descrito na literatura como fidedigno para avaliação de recuperação muscular pós-neurotmeze no modelo tíbio-fibular (ROMÃO *et al.*, 2007). Quando há desnervação muscular - como no grupo B - ou quando não temos a regeneração axonal após um reparo cirúrgico, há atrofia do músculo analisado e redução no diâmetro de suas fibras (ROMÃO *et al.*, 2007; MUELLER, 2008).

Na tabela 4, pôde-se perceber que não houve variação no número de fibras musculares entre os grupos estudados. Este resultado era esperado, pois a cirurgia não influenciou diretamente na musculatura do animal (ROMÃO *et al.*, 2007). No entanto, quando se analisou o diâmetro destas fibras, chegou-se a conclusões interessantes.

No grupo B identificou-se importante redução no diâmetro – confirmando a esperada atrofia muscular após a secção do nervo fibular (MUELLER, 2008; ROMÃO *et al.*, 2007). Quando se analisou os demais grupos, no entanto, percebeu-se que não houve diferença entre os animais operados e o grupo controle. Este resultado demonstrou que a regeneração axonal obtida com os diferentes tipos de RNTL, foi suficiente para determinar a recuperação do diâmetro das fibras musculares, assemelhando-se ao grupo controle (ROMÃO *et al.*, 2007). Novamente, a adição do FCN na CF no grupo F não determinou diferença no resultado em relação aos demais animais.

Os resultados aqui apresentados foram próximos aos apresentados por Romão *et al.* (2007), que obtiveram número médio de fibras, por campo, no grupo submetido ao reparo cirúrgico de 26,25 e diâmetro médio de 55,17. Entretanto, foram diferentes dos resultados obtidos por Mueller (2008), em que a autora não conseguiu, após o RNTL, que o diâmetro da fibra do músculo observado atingisse os valores do grupo controle.

A massa do MTC é considerada uma alternativa válida para determinar a regeneração axonal e sua repercussão no músculo em estudo (ROMÃO *et al.*, 2007). Na tabela 5, pôde-se perceber que não houve variação na massa do MTC direito em todos os grupos, indicando que o procedimento cirúrgico realizado no MPE não alterou o membro não operado (MUELLER, 2008). Avaliando-se o MPE, percebeu-se que o grupo B apresentou redução na massa do MTC esquerdo, quando comparado aos demais grupos, indicando a já esperada atrofia muscular pós-secção nervosa (ROMÃO *et al.*, 2007).

Além disso, percebeu-se, mais uma vez, que não houve diferença nos valores obtidos nos grupos operados, independente da técnica utilizada no reparo e da adição do FCN no grupo F. Novamente, os animais dos grupos operados não alcançaram os valores do grupo A, indicando que o RNTL foi suficiente para diferenciá-los do grupo B, mas não foi suficiente para que eles atingissem os valores da massa do MTC do grupo controle (ROMÃO *et al.*, 2007).

Este resultado foi muito próximo ao relatado no estudo experimental de Kallianen *et al.* (1999), no qual os autores afirmaram que, mesmo após um reparo nervoso bem sucedido, os músculos reinervados apresentam uma esperada diminuição da massa muscular – em comparação ao grupo controle.

Quanto à massa média do músculo reinervado, os resultados aqui apresentados foram novamente próximos aos publicados por Romão *et al.* (2007), que obtiveram valores de 0,64g. Viterbo *et al.* (1998) obtiveram valores médios de 0,45g, mas analisaram ratos Wistar mais jovens – o que prejudicou a comparação dos resultados.

A análise conjunta dos resultados aqui apresentados ofereceu as seguintes conclusões: os animais submetidos ao RNTL (grupos C, D, E e F), independente da técnica de síntese utilizada, apresentaram regeneração axonal efetiva, com consequências positivas semelhantes em todas as variáveis analisadas. A adição do FCN na CF, no grupo F, não potencializou a regeneração axonal do nervo operado, bem como não influenciou a recuperação da função motora dos animais.

Segundo Cheng *et al.* (1998), Currie, Sharp & Martins (2001) e mais recentemente Yu *et al.* (2009), entre as opções disponíveis atualmente, a CF é o meio mais adequado e certamente o mais promissor para a apresentação dos FN em um reparo nervoso. Gao *et al.* (2008) e Bhang *et al.* (2006) acreditam ainda que a CF e o FCN possam desempenhar efeitos positivos para a regeneração axonal, a partir de uma ação sinérgica duradoura no ponto de reparo.

Os autores, todavia, enfatizaram que uma considerável evolução da técnica ainda é necessária para que sua utilização, em larga escala, seja bem definida e ampliada (GAO *et al.*, 2008; BHANG *et al.*, 2006).

Neste sentido, cabe ressaltar que resultados insatisfatórios já foram descritos com a técnica (MARCOL *et al.*, 2004; HONDERMARCK, 2008) e as dúvidas e questionamentos ainda são frequentes na literatura (CHUNZHENG *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2003).

Alguns aspectos pontuais, referentes principalmente às características específicas da associação da CF com o FCN, precisam ser mais bem esclarecidos para que o método seja consolidado como uma alternativa segura e aplicável na rotina cirúrgica (BHANG *et al.*, 2007).

Dentre eles, por exemplo, é necessária a melhor definição do gradiente ideal de liberação do FCN pela CF após sua aplicação no reparo, bem como é necessária a determinação do período em que a CF é capaz de manter o FCN ativo e atuante no sítio cirúrgico (TERENGHI, 1999; OKAJIMA, TERZIZ, 2000) – fatores de fundamental importância especificamente para o RNTL protegido aqui avaliado.

A literatura apresenta considerações controversas sobre o tema. Segundo Bhang *et al.* (2007), por exemplo, a CF libera FCN de forma contínua e estável por até duas semanas, a partir da sua aplicação no reparo. De acordo com Zeng *et al.* (1994), entretanto, esta liberação se dá a partir de um pico - 18hs após a aplicação -, sendo então gradualmente reduzida, até sua total extinção, cerca de 14 dias depois.

Contradizendo os autores anteriores, Currie, Sharp & Martins (2001), Auger *et al.* (1993) e Xu *et al.* (1996) referiram que a CF inicia um processo de degradação enzimática e fagocítica, imediatamente após sua aplicação no local, que dificilmente leva mais de 10 dias, impedindo, desta forma, que o FCN seja liberado por mais tempo.

Segundo Bhang *et al.* (2007) o principal foco dos estudos mais recentes sobre o assunto é prolongar o tempo de ação do FCN no reparo, visto que este é considerado, pela maioria dos autores, o fator de maior impacto na potencialização dos resultados.

No caso em estudo, a desejável prolongação da ação do FCN dependeria de diferentes aspectos que vão desde a manipulação das características específicas da CF, passando pela alteração na densidade de *cross-linking* do gel, pela concentração da fibrina na CF e por sua taxa de dissociação da heparina (BHANG *et al.*, 2007).

Estas variáveis, ainda em estudos iniciais na literatura, poderiam ser modificadas de acordo com as características e necessidades de cada caso, retardando a liberação do FCN ainda ativo e alterando as taxas de sucesso da técnica (BHANG *et al.*, 2007).

Seguindo esta tendência, Lee *et al.* (2003), obtiveram melhores resultados pós-operatórios a partir do aumento na concentração de heparina na mistura da matriz de fibrina. Segundo os autores, a maior concentração de heparina acabou por imobilizar o FCN, diminuindo sua taxa de difusão aquosa e retardando sua liberação no pós-operatório (LEE *et al.*, 2003).

Bhang *et al.* (2007), no entanto, referiram que o ideal seria aumentar os índices de trombina na associação, visto que, desta forma, a densidade do *cross-linking* do gel de fibrina seria elevada e a liberação do FCN retardada.

Outra alternativa recentemente descrita na literatura, na tentativa de prolongar a liberação do FCN na forma ativa no reparo, foi proposta por Yu *et al.* (2009). Estes autores relataram a potencialização dos resultados ao utilizarem o FCN envolvido em microesferas polimerizadas - fixadas à CF. Segundo eles, esta modificação retardou a liberação do FCN, sendo responsável pela melhoria nos índices de regeneração axonal no pós-operatório de RNTT (YU *et al.* 2009).

Em especial no RNTL protegido, realizado apenas com CF, acredita-se que, para a potencialização dos resultados, o FCN tenha que estar presente e ativo, no ponto de reparo, por mais tempo - quando comparado a um RNTT ou a um RNTL clássico. Isso seria necessário, pois o processo de brotamento axonal inicial em um nervo protegido (não lesado) é mais lento e em menor escala do que em um nervo lesado – com o epineuro violado (ZHANG *et al.*, 1999 ; AKEDA *et al.*, 2006; XIONG *et al.*, 2003).

Em um RNTT, por exemplo, os axônios no cone de crescimento aparecem, no ponto do reparo, em 2 dias. Em um RNTL clássico, com suturas e com o epineuro violado, este evento só é detectado com força a partir do décimo quinto dia (AKEDA *et al.*, 2006; LUNDBORG, 1994; SANANPANICH, 2007). O brotamento axonal em um RNTL protegido – como o aqui realizado – ainda não foi determinado, mas parece ser consideravelmente mais lento quando comparado aos reparos citados acima (XIONG *et al.*, 2003; JUBRAN, WIDENFALK, 2003).

Por não incluir axoniotomia, o RNTL protegido acaba por estimular mais tardiamente a liberação de FCN e o aumento da produção de seus receptores de membrana. Desta forma, o gradiente quimiotático no reparo é reduzido e o brotamento axonal acaba por não ser estimulado tão prontamente, quando comparado a um reparo

com suturas (KINGHAN, TERENCE, 2006; PU *et al.*, 1999). Especificamente no RNTL protegido, o processo quimiotático só é deflagrado, com força, a partir da lise do epineuro da face lateral do nervo doador pela ação dos macrófagos recrutados até o local (XIONG *et al.*, 2003; DERBY *et al.*, 1993; JUBRAN, WIDENFALK, 2003).

Essa característica específica do RNTL protegido – o atraso no estímulo à cadeia do FCN e seus receptores - pode ter sido a principal responsável pela não obtenção da potencialização da regeneração axonal evidenciada no presente estudo.

Neste sentido, alguns autores já referiram que pequenas lesões no nervo doador - pela confecção da “janela epineural” ou mesmo pelas mínimas lesões causadas pela entrada da agulha na neurorrafia – poderiam ser necessárias para que melhorias nos resultados fossem alcançadas com a técnica (AKEDA, *et al.* 2006; PONDAAG, GILBERT, 2008; PANNUCCI *et al.*, 2007; HANINEC *et al.*, 2007; MILLESI, SCHMIDHAMMER, 2007).

Segundo Bontioti *et al.* (2006), estas lesões seriam suficientes para proporcionar um maior contato endoneural, uma maior liberação de fatores de crescimento e um maior estímulo à produção dos receptores de membrana, contribuindo decisivamente para a potencialização do brotamento axonal.

De acordo com Derby *et al.* (1993), Lee *et al.* (1999) e Zeng *et al.* (1994), com o trauma nervoso - mesmo que mínimo -, os níveis do FCN e dos seus receptores (trkA e p75) disponíveis no reparo seriam ampliados e a potencialização dos resultados poderia ser obtida com a técnica.

É importante considerar, no entanto, que alguns autores já afirmaram que o RNTL com suturas pode prejudicar o nervo doador, principalmente em nervos de pequeno calibre (PARDINI, FREITAS, PLENTZ, 2005; PAPALIA *et al.*, 2007; MUELLER, 2008). O trauma inicial, determinado pela inserção da agulha durante a realização da sutura, e o trauma tardio, determinado pela formação contínua de granulomas tipo corpo estranho pela presença permanente do fio inabsorvível, são frequentemente enfatizados pelos defensores da utilização da CF (MARTINS *et al.*, 2005a; MUELLER, 2001; CHEM, 2003). Segundo eles, além de prejudicar o nervo doador, a fibrose local, resultante do trauma determinado pela neurorrafia, constitui um verdadeiro obstáculo às fibras em regeneração, comprometendo ainda mais a recuperação e o prognóstico do paciente (VITERBO, TOHMAZINI, GIANINI, 1993; TORRES, GRAÇA, FARIAS, 2003).

Segundo Akeda *et al.* (2006), Matsumoto *et al.* (1999) e Liu *et al.* (1999), a opção de lesar o nervo doador durante o tratamento cirúrgico não é mais aceitável na prática clínica atual e, por isso, alternativas de RNTL que o preservem devem ser estimuladas e estudadas. Neste sentido, o RNTL protegido, realizado neste estudo, alcança o principal objetivo de preservar ao máximo o nervo doador, reduzindo a morbidade do procedimento e os riscos inerentes do trauma nervoso (MATSUMOTO *et al.*, 1999).

Além disso, a realização do procedimento apenas com CF facilita a execução da cirurgia, dispensando grande parte do aparato microcirúrgico caro e normalmente indisponível na maioria dos hospitais – principalmente em regiões periféricas, podendo ainda difundí-lo para cirurgiões menos afeitos com o microscópio cirúrgico (MUELLER, 2001).

Mesmo que o estímulo inicial ao brotamento axonal lateral ocorra mais tardiamente no RNTL protegido, pela preservação completa do epineuro, estudos anteriores já confirmaram a segurança e os benefícios da técnica (MUELLER, 2001; NUNES E SILVA, 2008). Os resultados aqui apresentados confirmaram, mais uma vez, a obtenção de índices finais de regeneração axonal e recuperação funcional semelhantes aos obtidos com RNTL realizado com suturas.

Outro aspecto que cabe ser analisado é a relação específica do modelo cirúrgico experimental utilizado (Modelo Nervoso Tíbio-Fibular) com o FCN e seus receptores de membrana. Este modelo cirúrgico foi descrito por Viterbo (1992) e, desde então, vem sendo preconizado por diversos autores nas investigações envolvendo o RNTL (ZHAO, CHEN, CHEN, 1997; LUNDBORG, 1994; ROSS, MATSUDA, ZUKER, 1995; NOAH *et al.*, 1997a; NOAH *et al.*, 1997b; ROSSETO *et al.*, 2001; HAYASHI *et al.*, 2004) e por estas razões foi a opção no presente estudo.

Este modelo cirúrgico envolve e analisa primordialmente os componentes motores dos ramos terminais do nervo ciático do rato Wistar (VITERBO, 1992). Sabe-se, no entanto, que estes nervos expressam os receptores trkA, de alta afinidade pelo FCN, em pequena quantidade após traumas (KINGHAN, TERENGHI, 2006).

No caso do RNTL realizado por meio do modelo nervoso tíbio-fibular, o transporte retrógrado do FCN exógeno ao corpo axonal (onde o mesmo exercerá suas atividades) é determinado principalmente pelos receptores p75, que tem baixa afinidade ao FCN e somente são estimulados a partir da degeneração walleriana (KINGHAN, TERENGHI, 2006). Especificamente no RNTL protegido, como essa degeneração ocorre mais tardiamente, o estímulo da produção e liberação dos

receptores p75 é ainda mais lento, o que pode ter prejudicado a potencialização dos resultados com a técnica aqui utilizada (JUBRAN, WIDENFALK, 2003).

A partir das considerações aqui referidas, das características próprias da técnica estudada e dos resultados aqui apresentados, acredita-se que conclusões definitivas quanto à possível potencialização do RNTL protegido, realizado apenas com CF contendo FCN, dependerão do desenvolvimento de novas linhas de pesquisa, em que se possa manipular todos os componentes envolvidos no processo cirúrgico.

Nesse sentido, a investigação da associação do FCN no RNTL protegido, utilizando os preceitos recentemente defendidos por Bhang *et al.* (2007) e por Yu *et al.* (2009) e a avaliação da técnica em diferentes modelos cirúrgicos experimentais, conforme indicado por Kinghan & Terenghi (2006), é desejável e urgente, podendo determinar a obtenção de resultados superiores com o método.

Parafraseando Levi-Montalcini e resumindo o entendimento atual sobre técnica, Aloe (2011) referiu que o principal desafio do século XXI é transformar os paradigmas impostos aos estudos sobre o FCN. Segundo o autor, é fundamental que se encontre as indicações reais da técnica, estabelecendo suas características e definindo suas limitações, para que se possa alçar o FCN a seu verdadeiro papel na microcirurgia (ALOE, 2011).

7 - CONCLUSÃO

7 - CONCLUSÃO

O FCN, associado à CF, não foi capaz de potencializar os resultados do RNTL protegido, em ratos.

8-REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akeda K, Hirata H, Matsumoto M, Fukuda A, Tsujii M, Nagakura T, *et al.* Regenerating axons emerge far proximal to the coaptation site in end-to-side nerve coaptation without a perineurial window using a T-shaped chamber. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(4):1194-03.

Al-Qattan MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. *Br J Plast Surg.* 1998;51(3):238-42.

Aloe L. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first cell nerve growth factor. *Arch Ital Biol.* 2011;149(2):175-81.

Aloe L, Alleva E, Böhm A, Levi-Montalcini R. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(16):6184-87.

Auger FA, Guignard R, Lopez Valle AC, Germain L. Role and innocuity of Tisseel, a tissue glue, in the grafting process and in vivo evolution of human cultured epidermis. *Br J Plast Surg.* 1993;46(2):136-42.

Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with special reference to the closure of large gaps. *Surg Gynecol Obstet* 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 Reconstr Surg*. 1989;83(1):129-38.

Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903;1(2209):1009-13.

Barini O. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Sao Paulo Med J*. 2002;120(3):93-94.

Bergel S. Ueber wirkungen des fibrins. *Dtsch Med Wochenschr* *Dtsch Med Wochenschr* 1909;35:663-50.

Battiston B, Tos P, Conforti LG, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neurorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl*. 2007;100:43-50.

Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *J Neurotrauma*. *J Neurotrauma*. 2007;24(5):909-16.

Bertelli JA, dos Santos AR, Calixto JB. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J Reconstr Microsurg*. 1996;12(8):559-63.

Bertelli JA, Ghizoni MF. Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction. *Microsurgery*. 2006;26(4):230-44.

Bertelli JA, Ghizoni MF. Nerve repair by end-to-side coaptation or fascicular transfer: a clinical study. *J Reconstr Microsurg*. 2003;19(5):313-18.

Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery*. 1993;14(2):135-40.

Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(4):998-02.

Bloch J, Fine EG, Bouche N, Zurn AD, Aebischer P. Nerve growth factor - and neurotrophin-3-releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. *Exp Neurol*. 2001;172(2):425-32.

Bontioti E, Dahlin LB, Kataoka K, Kanje M. End-to-side nerve repair induces nuclear translocation of activating transcription factor 3. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2006;40(6):321-28.

Brown KJ, Maynes SF, Bezos A, Maguire DJ, Ford MD, Parish CR. A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Lab Invest*. 1996;75(4):539-55.

Busato Jr WFS. Estudo comparativo entre vasotomia com adesivo de fibrina e micro-sutura convencional em ratos Wistar. [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Medicina; 2005. Doutorado.

Caplan J, Tiagco DA, Terzis JK. Effects of IGF-II in a new end-to-side model. *J Reconstr Microsurg*. 1999;15(5):351-58.

Cederna OS, Kalliainen LK, Urbanchek MG, Rovak JM, Kuzon WN. Donor muscle structure and function after end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107(3):789-96.

Chem EM. Uso da cola de fibrina na anastomose nervosa: estudo comparativo experimental em ratos. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina; 2003. Mestrado.

Chem EM, Chem RC. Uso da cola de fibrina na anastomose nervosa: estudo comparativo experimental em ratos. *Rev AMRIGS* 2004;48(3):171-4.

Cheng H, Hoffer B, Strömberg I, Russell D, Olson L. The effect of glial cell line-derived neurotrophic factor in fibrin glue on developing dopamine neurons. *Exp Brain Res*. 1995;104(2):199-206.

Cheng H, Fraidakis M, Blombäck B, Lapchak P, Hoffer B, Olson L. Characterization of a fibrin glue-GDNF slow-release preparation. *Cell Transplant*. 1998;7(1):53-61.

Chunzheng G, Shengzhong M, Yinglian J, Ji-E W, Jianmin L. Siatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: An experimental study. *Injury*. 2008;39(12):1414-20.

Clark, RA. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol*. 1990;94:128-134.

Cohen S, Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956;42(9):571-74.

Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulation factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1954;40(10):1014–18.

Committee on care and use of laboratory animals of the institute of laboratory animal resources commission on life sciences: Guide for the care and use of laboratory animals, pp 86-93. NIH Publication, Bethesda, Public Health Services, National Institute of Health, 1985.

Cuello C. Experimental neurotrophic factor therapy leads to cortical synaptic remodeling and compensates for behavioral deficits. *J Psychiatry Neurosci*. 1997;22(1):46-55.

Cui B, Wu C, Chen L, Ramirez A, Bearer E, Li W, Mobley W, Chu S. One at a time, live tracking of NGF axonal transport using quantum dots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):666-71.

Currie LJ, Sharp JR, Martins R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(6):1713-26.

Dahlin LB, Bontioti E, Kataoka K, Kanje M. Functional recovery and mechanisms in end-to-side nerve repair in rats. *Acta Neurochir Suppl*. 2007;100:93-95.

Daunois O, Sebillé A. Improvement of muscular reinnervation by using an enriched biological glue in the rat. *Ann Chir Main Memb Super*. 1991;10(2):113-17.

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(3):634-43.

de Vries J, Menovsky T, van Gulik S, Wesseling P. Histological effects of fibrin glue on nervous tissue: a safety study in rats. *Surg Neurol*. 2002;57(6):415-22.

Delistoianov N. Implante de tubo de silicone com e sem colágeno na regeneração de nervos de eqüinos. [Tese]. Jaboticabal: Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista; 2007. Doutorado.

Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration neural regeneration. *Ann. Plast. Surg* 23:197-02,1989.

Derby A, Engleman VW, Friedrich GE, Neises G, Rapp SR, Roufa DG. Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve. *Exp Neurol*. 1993;119(2):176-91.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146(5):1029-39.

Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope*. 2007;117(1):157-65.

Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397-05.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(1):397-05.

Furlam, M. Structure of fibrinogen and fibrin. In: Francis JL, Ed. *Fibrinogen fibrin stabilization, and fibrinolysis*. London: VCH Publishers; 1988. p.17-64.

Gao C, MaS, Ji Y, Wang JE, Li J. Sciatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: an experimental study. *Injury*. 2008;39(12):1414-20.

Gigo-Benato, Davilene. Análise da regeneração do nervo isquiático de ratos em lesões moderadas e graves sob ação de laser de baixa intensidade. [Tese]. São Paulo: Instituto de ciências Biomédicas, Universidade Federal de São Carlos; 2010. Doutorado.

Gosk J, Knakiewicz M, Wiacek R, Reichert P. The use of the fibrin glue in the peripheral nerves reconstructions. *Polim Med*. 2006;36(2):11-15.

Grecco MAS, Leite VM, Albertoni WM. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o fluor-gold como marcador neuronal. *Acta Ortop Bras*. 2003;11(4):225-29.

Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci*. 1997;110(7):861-70.

Grey EG. Fibrin as a haemostatic in cerebral surgery. *Surg Gynaecol Obstet.* 1915; 21: 452-54.

Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.* 1997;190:57-71.

Haninec P, Ámal FS, Tomas R, Houstava L, Dubovy P. Direct repair (nerve grafting), neurotization, and end-to-side neurorrhaphy in the treatment of brachial plexus injury *J Neurosurg.* 2007;106(3):391-99.

Hayashi A, Pannucci C, Moradzadeh A, Kawamura D, Magill C, Hunter DA, et al. Axotomy or compression is required for axonal sprouting following end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol.* 2008;211(2):539-50.

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(1):129-37.

Herter T, Bennefeld H. The influence of fibronectin on the fibrosing of a nerve anastomosis in the rat. *Res Exp Med.* 1989;189(5):321-29.

Holtzman DM, Mobley WC. Neurotrophic factors and neurologic disease. *West J Med.* 1994;161(3):246–54.

Hondermarck H. Nerve growth factor: the dark side of the icon. *Am J Pathol.* 2008;172(4):865-67.

Horch RE, Bannasch H, Kopp J, Andree C, Stark GB. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant*. 1998;7(3):309-17.

Hsieh P, Chen LB. Behavior of cells seeded in isolated fibronectin matrices. *J Cell Biol*. 1983;96(5):1208-17.

Huang MC, Chen KC, Chuang TY, Chang WC, Lee LS, Huang WC, *et al*. Cervical root repair in adult rats after transection: recovery of forelimb motor function. *Exp Neurol*. 2003;180(2):101-09.

Ichinose A, Davies EW. Primary structure of human coagulation factor XIII. *Adv Exp Med Biol*. 1988;231:15-27.

Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol*. 2003;181(2):204-12.

Junqueira LC, Carneiro C. *Histologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 427.

Kallianinen LK, Cederna PS, Kuzon WN. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconst Surg*. 1999;103(7):1919-27.

Kanaya, F, Firrell, JC, Breidenbach, WC. Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(7):1264-71.

Kelly EJ, Jacoby C, Terenghi G, Mennen U, Ljungberg C, Wiberg M. End-to-side nerve coaptation: a qualitative and quantitative assessment in the primate. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007;60(1):1-12.

Kingham PJ, Terenghi G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat*. 2006;209(4):511-26.

Lago O Jr, Bortolletto CV, Araújo AM, Donoso CPM, Kume PK, Repka JCD. Avaliação funcional e histológica do reparo de nervo ciático utilizando cola de fibrina e sutura em ratos Wistar. *Rev Bras Ortop*. 2005;40(1):69-78.

Lee AC, Yu VM, Lowe JB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, *et al*. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2003;184(1):295-03.

Levi-Montalcini R. Nerve growth promoting factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1952;55:330-36.

Levi-Montalcini R. Tissue and nerve growth promoting factors. *Proc R Soc Med*. 1965;58:357-60.

Levi-Montalcini R. The nerve Growth factor: thirty-five years later. *EMBO J*. 1987;6(5):1145-54.

Levi-Montalcini R, Calissano P. The scientific challenge of the 21th century: from a reductionist to a holistic approach via systems biology. *BMC Neurosci*. 2006; 7(1):1471-2202.

Levi-Montalcini R, Cohen S. A nerve growth-stimulating factor isolated from mouse salivary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1960;46,302-09.

Levi-Montalcini R, Cohen S. In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulation agent isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956;42(9):695-99.

Lida H, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Wang Y, Low PA. Peripheral nerve ischemia: reperfusion injury and fiber regeneration. *Exp Neurol*. 2003;184(2):997-02.

Liu K, Chen LE, Seaber AV, Goldner RV, Urbaniak JR. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurorrhaphy in the rat model. *J Orthop Res*. 1999;17(2):293-00.

Liuzzi FJ, Tedeschini B. Peripheral nerve regeneration. *Neurosurg Clin N Am*. 1991;2,:31-42.

Lowdon IM, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. *J Neurosci Methods*. 1988;24(3):279-81.

Luna SPL, Teixeira MW. Eutanásia: considerações éticas e indicações técnicas. *Rev CFMV*. 2007;13(41):60-69.

Lundborg G, Zhao Q, Kange M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerves by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg Br.* 1994;19(3):277-82.

Lykissas MG, Korompilias AV, Batistatou AK, Mitsionis GI, Beris AE. Can end-to-side neurorrhaphy bridge large defects? An experimental study in rats. *Muscle Nerve.* 2007;36(5):664-71.

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

Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve.* 1991;14(1):1116-22.

Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Pietrucha-Dutczak M, Olakowska E, Malinowska I, *et al.* Influence of nerve growth factor upon the injured peripheral nerve in the absence of its distal part. *Ital J Anat Embryol.* 2004;109(4):199-08.

Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JP. Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(3A):601-04.

Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPR. Mecanismos básicos da regeneração nervosa. *Arq Bras Neurocir.* 2005;24(1):20-25.

Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surg Neurol.* 2005;64:10-16.

Matras H, Dinges HP, Lassman J, Mamoli B. Zur Nahtlosen interfaszikularen Nerventransplantation in Tierexperiment. Wien Med Wochenschr. 1972;122(37):517-23.

Matras H, Dinges HP, Mamoli B. Non-sutured nerve transplantation. J Maxillofac Surg. 1973;1(1):37-40.

Matsuka YV, Migliorini MM, Ingham KC. Cross-linking of fibronectin to C-terminal fragments of the fibrinogen alpha-chain by factor XIIIa. J Protein Chem. 1997;16(8):739-45.

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 neuroraphy using a y-chamber model. J Reconstr Microsurg. 1999;15(4):281-86.

Mattar Jr R. Microcirurgia: Lesões dos nervos periféricos In: Mélega JM, Baroudi R, ed. Cirurgia Plástica – fundamentos e arte. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. p. 509-25.

Mattar RJ, Azze RJ, Ferreira MC, Zumiotti AV. Estudo experimental comparativo entre as reconstruções do nervo periférico com adesivo de fibrina e com sutura epineural convencional. Rev Soc Bras Cir Plast. 1990;5:40-43.

Mattar RJ, Cho AB, Grillo VA. Sutura mínima associada ao adesivo de fibrina em microanastomoses arteriais: estudo experimental comparativo com a técnica de sutura convencional. Rev Bras Ortop. 2005;40(6):349-59.

Medinaceli L, Quach T, Duchemin AM. Is vigor of regeneration a key factor in recovery from peripheral nerve injuries? *Exp Neurol*. 1986;94(3):788-90.

Meeks GR, Nelson KC, Byars RW. Wound strength in abdominal incisions: a comparison of two continuous mass closure techniques in rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(6):1676-82.

Menderes A, Yilmaz M, Vayvada H, Özer E, Barutçu A. Effects of nerve growth factor on the neurotization of denervated muscles. *Ann Plast Surg*. 2002;48(4):415-22.

Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg*. 2001;95(4):694-99.

Menovsky T, van Gulik S, Wesseling P. Histological effects of fibrin glue on nervous tissue: a safety study in rats. *Surg Neurol*. 2002;57(6):415-22.

Millesi H, Schmidhammer R. End-to-side coaptation - controversial research issue or important tool in human patients. *Acta Neurochir Suppl*. 2007;100:103-06.

Mooney E, Loh C, Pu LLQ. The use of fibrin glue in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(3):989-92.

Morandin W, Ortiz V. Adesivos biológicos em cirurgia. *Acta Cir Bras*. 1992;7(2):80-85.

Mueller SF. Estudo morfológico da regeneração axonal na síntese término-lateral de nervo periférico de ratos com adesivo de fibrina e micro-sutura. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2001. Mestrado.

Mueller SF. Regeneração axonal proveniente de nervo intacto para nervo parcialmente lesado utilizando neurorrafia término-lateral – trabalho experimental no plexo braquial de ratos. [Tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 2008. Doutorado.

Nishiara G, Prudden JF. A qualitative relationship of wound tensile strength to length. *Surg Gynecol Obstet*. 1958;107(3):305-10.

Nishihira S, McCaffrey TV. Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989;100(1):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*. 1997;13(5):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 graft. *J Reconstr Microsurg*. 1997;13(2):99-06.

Nunes e Silva, D. Anastomose nervosa término-lateral utilizando cola de fibrina. Estudo experimental em ratos. [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina; 2008. 70p. Mestrado.

Nunes e Silva D, Coelho J, Frazílio FO, Odashiro AN, Carvalho PT, Pontes ER, *et al*. End-to-side nerve repair using fibrin glue in rats. *Acta Cir Bras*. 2010;25(2):158-62.

Ogün TC, Özdemir M, Senaram H, Üstun ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. *J Neurosurg*. 2003;99(1):180-85.

Okajima S, Terziz JK. Ultrastructure of early axonal regeneration in a end-to-side neurorrhaphy model. *J Reconstr Microsurg*. 2000;16(4):313-23.

Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation - Part I. Wave amplitude, conduction velocity, and plantar-length factors. *J Reconstr Microsurg*. 2006;22(2):119-22.

Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation - Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg*. 2006;22(2):123-28.

Ortiz-Hidalgo CC, Weller RO. Peripheral nervous system. In: Sternberg SS, ed. *Histology for pathologists*. New York: Raven Press; 1992. p.169-93.

Pandit, A. S., Wilson, D. J., and Feldman, D. S. Fibrin scaffold as an effective vehicle for the delivery of acidic fibroblast growth factor (FGF-1). *J Biomater Appl*. 2000;14(3):229-42.

Pannucci C, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hayashi A. End-to-side nerve repair: review of the literature. *Restor Neurol Neurosci*. 2007;25(1):45-63.

Papalia I, Geuna S, D'Alcontres FS, Tos P. Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 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.

Pardini Jr AG, Freitas AD, Plentz EG. Avaliação da sensibilidade após neurografia término-lateral de nervos digitais: nota prévia. *Rev Bras Ortop*. 2005;40(9):543-54.

Pondaag W, Gilbert A. Results of end-to-side nerve coaptation in severe obstetric brachial plexus lesions. *Neurosurgery*. 2008;62(3):656-63.

Pu LL, Syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Forman DL, *et al*. Effects of Nerve Growth Factor on Nerve Regeneration through a Vein Graft across a Gap. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(5):1379-85.

Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang*. 1997;72(3):133-43.

Ramos L. Efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório induzido por estiramento muscular em ratos. [Tese]. São Paulo: Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009. Doutorado.

Raso VVM, Barbieri CH, Mazzer N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. *Acta Ortop Bras*. 2006;14(3):133-36.

Rebol J, Milojković V, Didanovic V. Side-to-end hypoglossal-facial anastomosis via transposition of the intratemporal facial nerve. *Acta Neurochir*. 2006;148(6):653-57.

Reis FA. Estudo comparativo do brotamento axonal do nervo vago em enxerto nervoso autólogo. [Dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 1999. Mestrado.

Reis FA. O impacto do órgão-alvo sobre a regeneração axonal lateral do nervo vago em enxerto nervoso autólogo fixado através da neurorrafia término-lateral: estudo histológico e morfométrico em ratos. [Tese]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2005. Doutorado.

Robillard BG, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter A. End-to-Side Neurorrhaphy and Lateral Axonal Sprouting in a Long Graft Rat Model. *Laryngoscope*. 2002;112(5):899-05.

Romão AM, Viterbo F, Stipp E, 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):41-46.

Ross A. Identification of tyrosine kinase TrK as a nerve growth factor receptor. *Cell Regul*. 1991;2(9):685-90.

Ross A, Matsuda H, Zuker RM. End-to-side nerve coaptation for muscle reinnervation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 1995;2:104-05.

Rosseto M, Fagundes DJ, Taha MO, Souza HS, Aydos RD, Guimarães RB, *et al*. Regeneration of peripheral nerves after end-to-side anastomoses, maintaining epineurion, in rats. *Acta Cir Bras*. 2001;16(3):141-49.

Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WMJ. Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17(8):615-24.

Saltz R, Sierra D, Feldman D, Saltz MB, Dimick A, Vasconez LO. Experimental and clinical applications of fibrin glue. *Plast Reconstr Surg*. 1991;88(6):1005-15.

Samii M, Koerbel A, Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Samii A, Gharabaghi A. Using an end-to-side interposed sural nerve graft for facial nerve reinforcement after vestibular schwannoma resection. *J Neurosurg*. 2006;105(6):920-23.

Sananpanich K, Galea MP, Morrison WA, Messina A. Quantitative characterization of regenerating axons after end-to-side and end-to-end coaptation in a rat brachial plexus model: a retrograde tracer study. *J Neurotrauma*. 2007;24(5):864-75.

Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neurosci Methods*. 1998;85(1):119-27.

Sato KM. Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos. [Monografia]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Faculdade de Medicina; 2005. Graduação em Medicina.

Schmidhammer R, Redl H, Hopf R, van der Nest DG, Millesi H. Synergistic terminal motor end-to-side nerve graft repair: investigation in a non-human primate model. *Acta Neurochir Suppl*. 2007;100:97-01.

Shekarriz B, Stoller ML. The use of fibrin sealant in urology. J Urol. 2002;167(3):1218-25.

Sierra DH, Feldman DS, Saltz R, and Huang, S. A method to determine shear adhesive strength of fibrin sealants. J Appl Biomater. 1992;3(2):147-51.

Silva C. Biologia celular e molecular da regeneração do sistema nervoso periférico. Atualiz Neurociênc. 1995;1:1-16.

Silva C. Fatores Neurotróficos: estrutura função e aplicações clínicas. Atualiz Neurociênc. 1995;1:17-20.

Silva RB. Estudo histológico do enxerto ósseo autógeno e da matriz óssea bovina desvitalizada, sob ação de antiinflamatórios, em ratos. [Tese]. São Paulo: UNIFESP, Faculdade de Medicina; 2001. Doutorado.

Sjöberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze injured rat sciatic nerve. Brain Res. 1989;485(1):102-08.

Song XY, Li F, Zhang FH, Zhong J, Zhou XF. Peripherally-derived BDNF promotes regeneration of ascending sensory neurons after spinal cord injury PLoS One. 2008;3(3):1707-08.

Souza FI. Estudo da ação das neuregulinas 1-alfa e 1-beta na regeneração nervosa. Estudo experimental em camundongos isogênicos (C57BL/6J). [Dissertação]. São Paulo: Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007. Mestrado.

Sunderland S. Nerve injuries and their repair. A critical appraisal. Edinburg: Churchill Livingstone, 1991.

Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India*. 2002;50(1):23-26.

Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon SE, Strasberg SR, Haughey BH, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy: a long-term study of neural regeneration in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;119(4):337-41.

Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon SE, Strasberg SR, Haughey BH, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy resulting in limited sensory axonal regeneration in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997;106(6):506-12.

Taylor SJ, Rosenzweig ES, McDonald JW, Sakiyama-Elbert SE. Delivery of Neurotrophin-3 from fibrin enhances neuronal fiber sprouting after spinal cord injury. *J Control Release*. 2006, 20;113(3):226-35.

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

Tiago DA, Papakonstantinou KC, Mullinax KA, Terzis JK. IGF-I and end-to-side nerve repair: A dose-response study. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17(4):247-56.

Torres MF, Graça DL, Farias EL. Reparação microcirúrgica de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de Biofill em ratos Wistar. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003;55(5):25-29.

Toth C, Martinez JA, Liu WQ, Diggle J, Guo GF, Ramji N, *et al.* Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience*. 2008;154(2):767-83.

Varejão ASP, Meek MF, Ferreira JA. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1-9.

Viterbo F. Neurorrafia látero-terminal: estudo experimental no rato. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina; 1992. 198p. Doutorado.

Viterbo F, Amr AH, Stipp EJ, Reis FJ. End-to-side neurorrhaphy: Past, Present and Future. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124:351-8.

Viterbo F, Faleiros HRP. Microcirurgia: Técnicas Básicas. In: Mélega JM, Baroudi R, ed. *Cirurgia Plástica – fundamentos e arte*. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. p. 477-83.

Viterbo F, Palhares A, Franciosi LF. Restoration of sensitivity after removal of the sural nerve: a new application of latero-terminal neurorrhaphy. *Sao Paulo Med J*. 1994;112(4):658-60.

Viterbo F, Ripari WT. Prevention of pressure ulcers in paraplegics through nerve graft with latero-terminal neurorrhaphy. *Rev Soc Bra Cir Plast*. 2008;(1):120-21.

Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without the epineurium. *Sao Paulo Med J*. 1998;116(5):1808-14.

Viterbo F, Tohmazini IA, Gianini MJ. Reparação de nervos periféricos com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Resultados preliminares. *Acta Cir Bras*. 1993;2:85-88.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg*. 1994;94(7):1038-47.

Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni AN. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Rev Paul Med*. 1992;110(6):267-75.

Weiss E, Yamaguchi Y, Falabella A, Crane S, Tokuda Y, Falanga V. Un-cross-linked fibrin substrates inhibit keratinocyte spreading and replication: Correction with fibronectin and factor XIII cross-linking. *J Cell Physiol*. 1998;174(1):58-65.

Xiong G, Ling L, Nakamura R, Sugiura Y. Retrograde tracing and electrophysiological findings of collateral sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *Hand Surg*. 2003;8(2):145-50.

Xu W, Li H, Brodniewicz T, Auger FA, Germain L. Cultured epidermal sheet grafting with Hemaseel HMN fibrin sealant on nude mice. *Burns*. 1996;22(3):191-96.

Yin Q. et al. Neurotrophin-4 delivered by fibrin glue promotes peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2001;24(3):345-51.

Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves: measurement of the rate of regeneration. *Lancet*.1940;3:126-28.

Yu H, Peng J, Guo Q, Zhao B, Sui X, Wang Y. Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery*. 2009;29(4):330-36.

Zanini A, Angeletti P, Levi-Montalcini R. Immunochemical properties of the nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61(3):835-42.

Zeng L, Worsg A, Redl H, Schlag G. Peripheral nerve repair with nerve growth factor and fibrin matrix. *Eur J Plast Surg*. 1994;17:228-32.

Zhang F, Cheng C, Chin BT, Ho PR, Weibel TJ, Lineaweaver WC, *et al*. Results of termino-lateral neurorrhaphy to original and adjacent nerves. *Microsurgery*. 1998;18(4):276-81.

Zhang Z, Soucacos PN, Bo J, Beris AE. Evaluation of collateral sprouting after end-to-side nerve coaptation using a fluorescent double-labeling technique. *Microsurgery*. 1999;19(6):281-86.

Zhao JZ, Chen ZW, Chen TY. Nerve regeneration after terminolateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 1997;13(1):31-37.

9 - NORMAS ADOTADAS

9 - NORMAS ADOTADAS

Conselho Nacional de Saúde – Resolução n. 01/88: Normas de pesquisa em saúde. Bioética. 1995;3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. 3 ed. São Paulo, Bireme, 1996, 1146p.

International Committee on Veterinary Anatomical Nomenclature – Nomina Anatomica Veterinária. 3ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. International Committee of Medical Journal Editors. Ann Intern Méd. 1997;126:36-47.

10 - ANEXOS

10 - ANEXOS

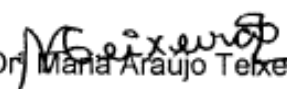
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em animais.



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 246/2009 do Doutorando Daniel Nunes e Silva, sob a orientação da Profª Drª Andréia Conceição Milan Brochado Antoniolli Silva, referente ao projeto de pesquisa **“Fator de crescimento nervoso associado à cola de fibrina no reparo nervoso término-lateral. Estudo Experimental em ratos”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 26 de novembro de 2009.

Campo Grande (MS), 26 de novembro de 2009.


Dr. Maria Araújo Teixeira
Presidente da CEUA

Anexo B – Protocolo Cirúrgico Experimental.**PROTOCOLO CIRÚRGICO**

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Departamento de Clínica-Cirúrgica

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste

Doutorando: Daniel Nunes e Silva

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Brochado Antonioli

Co-Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo

Data ____/____/____ Hora: ____:____ Protocolo Número: _____

Animal Número: _____ Peso: _____ Grupo: _____

Anestesia: _____

Intercorrências: _____

Procedimento cirúrgico: _____

Intercorrências: _____

Tempo cirúrgico: _____

Evolução pós-operatória: _____

Anexo C – FCN utilizado no estudo.



Princeton Business Park, 5 Crescent Ave., P O Box 275
Rocky Hill, NJ 08553 USA
Tele: 609.497.0253 Fax: 609.497.0321
www.peprotech.com Email: info@peprotech.com

Certificate of Analysis

Recombinant Murine β -NGF

Catalog# 450-34

Lot # 0107394-1

Expiration Date: February 2012

Source: *E.coli*

Sequence: MSSTHPVFHM GEFSVCDSVS VVVGDKTTAT
DIKGKEVTVL AEVNINNSVF RQYFFETKCR ASNPVESGCR
GIDSKHWSY CTTTHTFVKA LTDEKQAAW RFIRIDTACV
CVLSRKATRR G

Synonyms: beta-Nerve Growth Factor

Description: β -NGF is a neurotrophic factor structurally related to BDNF, NT-3 and NT-4. These proteins belong to the cysteine-knot family of growth factors that assume stable dimeric structures. β -NGF is a potent neurotrophic factor that signals through its receptor β -NGFR, and plays a crucial role in the development and preservation of the sensory and sympathetic nervous systems. β -NGF also acts as a growth and differentiation factor for B lymphocytes and enhances B-cell survival. The functional form of murine β -NGF is a noncovalently disulfide-linked homodimer, of two 13.4 kDa polypeptide monomers (240 total amino acid residues). The three disulfide bonds are required for biological activity.

Purity: $\geq 98\%$ by SDS-PAGE gel and HPLC analyses.

Endotoxin: Endotoxin level is < 0.1 ng / μ g of β -NGF (< 1 EU/ μ g).

Formulation: Sterile filtered through a 0.2 micron filter. Lyophilized with no additives.

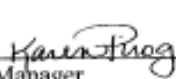
Reconstitution: Centrifuge the vial prior to opening. Reconstitute in water to a concentration of 0.1-1.0 mg/ml. *Do not vortex*. This solution can be stored at 2-8°C for up to 1 week. For extended storage, it is recommended to further dilute in a buffer containing a carrier protein (example 0.1% BSA) and store in working aliquots at -20°C to -80°C.

Storage/Stability: The lyophilized protein is stable at room temperature for up to 1 month. Working aliquots stored with a carrier protein are stable for at least 6 months at -20°C to -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

Biological activity: Determined by the dose-dependent stimulation of the proliferation of human TF-1 cells. The expected ED₅₀ is ≤ 1.0 ng/ml, corresponding to a specific activity of 1×10^6 units/mg.

For a list of references using this product please visit our website at www.peprotech.com

Country of Origin: USA

 Jan. 13, 2010
QC Manager

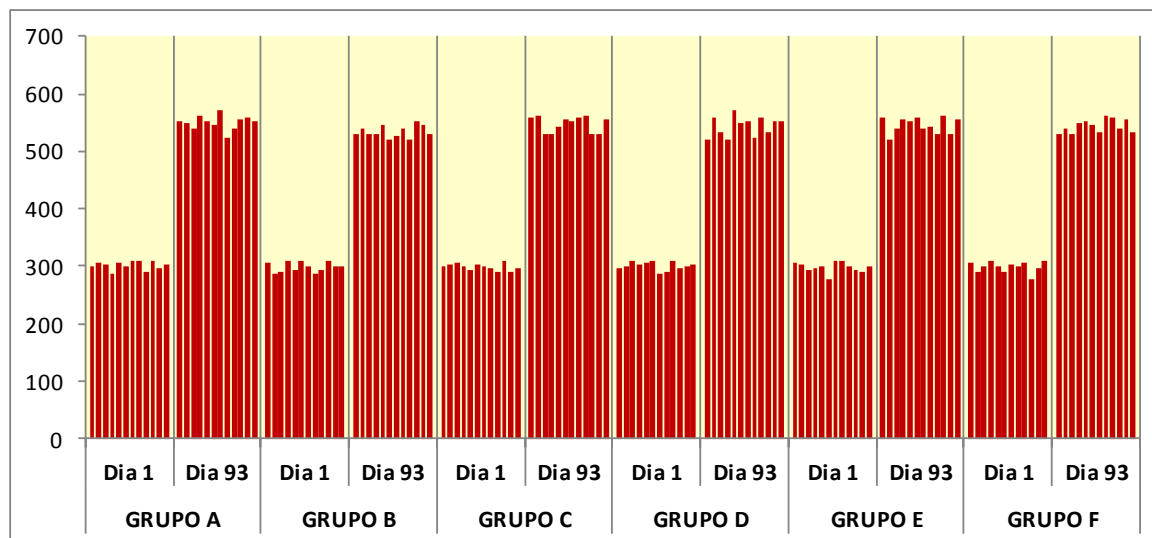
Usage: For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Anexo D – Quadros e Tabelas apresentando o resultado integral do estudo.

Quadro 1: Massa (g) dos animais no primeiro e no último dia do experimento cirúrgico.

Rato N.	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D		GRUPO E		GRUPO F	
	Dia 1	Dia 93	Dia 1	Dia 93	Dia 1	Dia 93	Dia 1	Dia 93	Dia 1	Dia 93	Dia 1	Dia 93
1	299	552	306	530	301	559	298	520	307	559	305	530
2	307	548	288	538	302	562	300	559	302	521	289	539
3	302	539	291	531	307	530	308	532	294	538	301	529
4	288	562	309	529	299	529	302	522	298	555	308	550
5	307	551	295	545	295	544	305	571	299	551	299	552
6	300	545	308	519	302	555	308	550	278	560	290	547
7	311	572	301	528	300	551	288	551	308	538	302	533
8	310	525	288	539	296	559	290	523	311	544	300	562
9	289	539	293	521	290	561	311	559	300	529	305	559
10	310	555	311	551	311	529	298	533	295	563	277	539
11	297	560	299	547	290	530	299	551	290	530	298	557
12	302	551	301	529	297	557	302	553	301	557	308	533
MÉD.	302	549,9	299,2	533,9	299	547,2	301	543,7	298,6	545,4	298,5	544,17

Gráfico 1: Peso dos animais (g) no primeiro e no último dia do estudo.



Quadro 2: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto Testes de Marcha dos animais do grupo A.

Quadro 2: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto testes de marcha dos animais do grupo A.																																						
Teste	Rato	TS D				TS D				TS E				TS E				PL D				PL E				PL E				ITS D				ITS E				SFI
N.	N.	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD		
1	1	21	20	21	21	20,75	20	21	22	23	21,50	32	33	33	32	32,50	33	33	32	33	32,75	10	10	11	10	10,25	10	10	11	11	10,50					-4,81		
1	2	22	21	23	21	21,75	21	22	23	22	22,00	31	32	32	32	31,75	31	31	32	31	31,25	11	12	12	11	11,50	11	11	12	12	11,50					-6,94		
1	3	22	23	23	21	22,25	22	23	24	22	22,75	33	33	32	32	32,50	31	32	32	32	31,75	11	11	12	12	11,50	11	12	12	11	12					-5,46		
1	4	20	21	23	21	21,25	20	22	21	21	21,00	33	31	28	31	30,75	28	33	32	33	31,50	10	10	11	10	10,25	12	10	10	10	10,50					-10,70		
1	5	22	23	22	20	21,75	21	23	22	20	21,50	33	32	32	33	32,50	34	33	32	32	32,75	11	12	12	11	11,50	11	12	12	12	11,75					-10,06		
1	6	20	21	22	21	21,00	22	21	21	22	21,50	35	34	34	36	34,75	35	34	34	34	34,25	12	12	12	12	12,00	11	12	12	12	11,75					-5,92		
1	7	21	22	20	22	21,25	21	23	22	21	21,75	34	32	32	34	33,00	34	33	32	33	33,00	12	11	12	13	12,00	12	11	12	11	11,50					-6,78		
1	8	21	21	23	20	21,25	21	20	22	21	21,00	33	34	32	34	33,25	35	34	35	34	34,50	11	12	11	11	11,25	11	11	11	12	11,25					-11,53		
1	9	22	22	23	22	22,25	22	20	22	22	21,50	34	32	32	33	32,75	34	33	33	34	33,50	11	12	12	12	11,75	11	12	12	11	11,50					-13,65		
1	10	21	23	22	21	21,75	21	22	21	21	21,25	31	32	32	32	31,75	32	32	32	32	32,00	12	12	12	11	11,75	12	11	12	13	12,00					-11,34		
1	11	25	25	21	23	23,50	22	24	25	22	23,25	28	32	32	31	30,75	31	32	32	31	31,50	11	11	11	12	11,25	12	12	11	10	11,25					-10,90		
1	12	22	23	23	24	23,00	23	22	22	23	22,50	32	32	32	33	32,25	32	32	32	31	31,75	12	12	11	10	11,25	12	11	12	10	11,25					-10,59		
2	1	22	24	22	23	22,75	22	23	22	22	22,25	32	33	33	32	32,50	32	32	32	32	32,00	11	12	12	11	11,50	12	12	11	12	11,75					-10,33		
2	2	22	21	21	23	21,75	22	21	22	21	21,50	33	32	32	32	32,25	33	34	32	33	33,00	12	12	12	13	12,25	11	12	12	11	11,50					-11,76		
2	3	22	21	21	22	21,50	22	22	22	21	21,75	35	35	35	34	34,75	35	34	34	34	34,25	13	13	12	11	12,25	12	12	12	12	12,00					-7,25		
2	4	23	23	22	23	22,75	23	23	22	22	22,50	33	34	32	32	32,75	33	35	32	33	33,25	14	14	14	14	14,00	14	14	13	14	13,75					-10,83		
2	5	22	23	21	21	21,75	21	23	21	22	21,75	34	33	33	34	33,50	35	33	33	33	33,50	14	13	13	12	13,00	13	14	13	13	13,25					-8,54		
2	6	22	23	23	22	22,50	23	23	22	22	22,50	35	36	32	33	34,00	35	36	33	32	34,00	11	13	12	14	12,50	11	12	12	13	12,00					-9,33		
2	7	21	21	21	21	21,00	21	21	21	23	21,50	33	34	33	34	33,50	33	32	33	32	32,50	12	13	14	12	12,75	12	12	12	13	12,25					-5,57		
2	8	23	23	22	21	22,25	21	23	22	24	22,50	34	34	35	35	34,50	33	34	32	33	33,00	11	12	13	11	11,75	12	12	12	12	12,00					-5,62		
2	9	23	24	23	24	23,50	24	23	22	22	22,75	35	36	34	34	34,75	34	35	32	32	33,25	13	14	12	12	12,75	13	13	11	13	12,50					-10,90		
2	10	21	22	22	24	22,25	23	23	22	24	23,00	33	32	33	35	33,25	28	32	34	33	31,75	12	12	13	14	12,75	12	12	13	11	12,00					-4,16		
2	11	22	22	22	23	22,25	22	21	22	22	21,75	33	34	34	34	33,75	29	33	34	33	32,25	13	12	13	13	12,75	13	12	12	13	12,50					-9,82		
2	12	21	22	21	22	21,50	21	22	23	22	22,00	32	32	33	32	32,25	34	33	29	33	32,25	12	12	12	11	11,75	13	12	12	13	12,50					-5,40		
3	1	24	22	23	23	23,00	24	23	22	23	23,00	33	32	33	32	32,50	33	33	32	33	32,75	12	12	12	12	12,00	12	12	13	11	12,00					-9,09		
3	2	22	23	22	22	22,25	22	23	23	22	22,50	33	34	32	32	32,75	32	32	33	33	32,50	12	12	13	12	12,25	12	12	13	12	12,25					-7,28		
3	3	25	24	23	24	24,00	23	22	23	23	22,75	35	35	34	35	34,75	35	34	33	35	34,25	12	13	14	13	13,00	12	11	13	12	12,00					-14,98		
3	4	23	24	24	24	23,75	23	24	25	24	24,00	33	32	32	32	32,25	32	34	31	34	32,75	15	12	13	14	13,50	15	15	12	13	13,75					-7,99		
3	5	25	24	22	23	23,50	25	24	23	25	24,25	35	35	33	34	34,25	35	31	31	32	32,25	15	13	13	12	13,25	13	14	14	15	14,00					-2,32		
3	6	24	23	24	23	23,50	24	23	24	23	23,50	36	34	33	32	33,75	35	36	33	34	34,50	15	12	15	13	13,75	12	13	13	14	13,00					-10,38		
3	7	22	23	22	24	22,75	22	23	22	24	22,75	35	35	34	35	34,75	34	33	34	35	34,00	14	14	13	12	13,25	15	13	12	12	13,00					-8,22		
3	8	23	24	25	25	24,25	24	24	24	25	24,25	35	35	34	36	35,00	36	34	33	33	34,00	14	15	15	13	14,25	13	12	14	15	13,50					-8,41		
3	9	25	24	23	22	23,50	24	24	23	23	23,75	34	34	35	35	34,50	34	33	33	34	33,50	11	14	12	13	12,50	13	12	13	12	12,50					-6,52		
3	10	23	23	23	22	22,75	24	23	24	24	23,75	32	32	32	33	32,25	34	34	34	33	33,75	15	15	15	14	14,75	14	14	15	13	14,00					-6,44		
3	11	22	23	22	22	22,25	23	24	23	24	23,50	33	34	34	33	33,50	34	33	34	32	33,25	12	13	12	13	12,50	11	14	13	13	12,75					-2,10		
3	12	23	23	24	24	23,50	23	23	23	23	23,00	34	34	33	33	33,50	34	32	34	33	33,25	12	12	12	13	12,25	15	13	12	11	12,75					-10,30		
4	1	25	23	24	24	24,00	26	25	23	23	24,25	35	33	34	34	34,00	34	34	35	34	34,25	13	12	11	13	12,25	13	12	13	14	13,00					-7,13		
4	2	23	23	23	24	23,25	23	24	25	24	24,00	34	34	33	33	33,50	33	34	32	34	33,25	14	16	15	14	14,75	15	14	15	13	14,25					-5,43		
4	3	25	24	23	23	23,75	23	23	23	23	23,00	37	35	36	37	36,25	36	36	34	35	35,25	13	12	14	15	13,50	14	12	14	14	13,50					-11,20		
4	4	25	23	25	24	24,25	25	26	25	24	25,00	33	34</																									

Quadro 3: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto Testes de Marcha dos animais do grupo B.

Teste	Rato	TS D				TS D				TS E				TS E				PL D				PL D				PL E				PL E				ITS D				ITS D				ITS E				ITS E				SFI
N.	N.	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD									
1	1	20	21	21	20	20,50	21	20	21	22	21,00	31	32	33	31	31,75	32	32	32	33	32,25	11	11	11	10	10,75	11	11	11	10	10,75	11	11	12	11	11,25	11	11	11	11	11,25	-6,11								
1	2	21	22	22	22	21,75	22	21	22	21	21,50	32	31	32	31	31,50	31	31	32	32	31,50	10	11	12	12	11,25	10	11	11	11	10,75	10	11	11	11	10,75	10	11	11	11	10,75	-10,65								
1	3	23	22	24	22	22,75	23	23	23	22	22,75	32	33	34	32	32,75	33	32	32	31	32,00	11	11	11	10	10,75	12	11	11	11	11,25	12	11	11	11	11,25	12	11	11	11	11,25	-7,30								
1	4	21	20	22	22	21,25	21	21	21	21	21,00	32	32	32	32	29	31,25	33	33	32	31	32,25	11	10	11	11	10,75	11	11	11	12	11,25	11	11	11	12	11,25	11	11	11	12	11,25	-10,70							
1	5	21	22	23	21	21,75	22	22	22	21	21,75	32	31	33	33	32,25	33	34	32	33	33,00	11	10	12	10	10,75	10	10	11	10	10,25	10	10	11	10	10,25	10	10	11	10	10,25	-10,31								
1	6	21	20	22	20	20,75	22	21	20	22	21,25	33	32	33	33	32,75	34	33	34	33	33,50	11	12	11	12	11,50	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	-6,75								
1	7	24	22	22	21	22,25	21	23	22	21	21,75	34	34	32	34	32	34	33,50	35	35	32	32	33,50	10	11	12	11	11,00	11	11	10	10	10,50	10	10	10	10,50	10	10	10	10,50	-11,87								
1	8	22	21	22	21	21,50	22	21	20	21	21,00	36	35	35	35	35,25	35	34	34	35	34,50	13	12	12	12	12,25	12	12	11	12	11,50	12	12	11	12	11,50	12	12	11	12	11,50	-11,35								
1	9	21	21	22	21	21,25	22	22	22	20	21,50	33	34	32	34	32	34	33,25	34	34	32	32	33,00	12	11	11	11	11,25	10	11	11	10	10,50	10	10	10	10,50	10	10	10	10,50	-8,11								
1	10	22	22	23	22	22,25	21	21	21	22	21,25	32	34	34	33	33,25	33	33	33	33	33,00	11	13	12	12	12,00	12	12	12	12	12,00	12	12	12	12	12,00	12	12	12	12	12,00	-13,43								
1	11	22	21	21	22	21,50	22	23	22	22	22,25	30	33	32	33	32,00	32	32	32	33	32,25	12	12	11	12	11,75	13	12	11	12	11,75	13	12	11	12	11,75	13	12	11	12	11,75	-5,00								
1	12	23	22	22	22	22,25	23	22	22	24	22,75	33	34	33	34	33,50	34	32	34	34	33,50	10	12	10	11	10,75	11	12	11	12	11,50	10	12	10	11	10,75	11	12	11	12	11,50	-5,41								
2	1	23	23	22	24	23,00	11	8	12	12	10,75	31	32	32	32	31,75	35	37	33	32	34,25	12	12	11	11	11,50	7	3	7	4	5,25	12	12	11	11	11,50	7	3	7	4	5,25	-77,36								
2	2	22	23	22	22	22,25	15	12	14	11	13,00	32	32	33	32	32,25	34	33	34	39	35,00	11	12	11	13	11,75	9	7	5	9	7,50	12	13	12	13	12,50	9	7	5	9	7,50	-62,40								
2	3	23	22	21	21	21,75	12	13	14	13	13,00	33	33	33	33	33,00	33	35	33	32	33,25	12	13	12	13	12,50	9	6	9	9	8,25	12	13	12	13	12,50	9	6	9	9	8,25	-57,66								
2	4	22	23	22	22	22,25	13	12	5	12	10,50	33	32	32	33	32,50	32	32	39	32	33,75	12	12	14	13	12,75	8	8	7	7	7,50	12	12	13	13	12,75	8	8	7	7	7,50	-73,58								
2	5	24	22	22	21	22,25	13	13	14	13	13,25	33	34	33	34	33,50	32	33	33	31	32,25	14	13	13	14	13,50	7	8	6	8	7,25	14	13	13	14	13,50	7	8	6	8	7,25	-57,82								
2	6	23	23	22	22	22,50	14	5	14	15	12,00	34	34	32	35	33,75	34	34	35	34	34,25	12	13	12	13	12,50	6	7	7	8	7,00	12	13	12	13	12,50	6	7	7	8	7,00	-66,32								
2	7	22	22	22	23	22,25	8	7	9	11	8,75	36	36	33	35	35,00	36	32	37	33	34,50	12	13	13	12	12,50	7	9	10	9	8,75	12	13	13	12	12,50	7	9	10	9	8,75	-78,68								
2	8	22	24	22	22	22,50	15	15	15	15	15,00	35	34	35	36	35,00	35	36	36	37	36,00	12	12	13	11	12,00	8	7	4	9	7,00	12	12	13	11	12,00	8	7	4	9	7,00	-51,94								
2	9	23	22	23	21	22,25	16	16	15	16	15,75	33	32	34	35	33,50	35	34	33	35	34,25	13	13	12	12	12,50	6	9	9	9	8,25	13	13	12	12	12,50	6	9	9	9	8,25	-46,17								
2	10	22	22	22	23	22,25	15	15	13	14	14,25	32	32	33	33	32,50	33	33	33	32	32,75	12	12	12	13	12,25	6	6	7	6	6,25	12	12	12	13	12,25	6	6	7	6	6,25	-54,98								
2	11	23	23	22	22	22,50	11	6	4	9	7,50	33	34	33	33	33,25	32	33	34	33	33,00	14	12	13	14	13,25	8	7	6	7	7,00	14	12	13	14	13,25	8	7	6	7	7,00	-87,79								
2	12	22	22	22	22	22,00	16	15	14	16	15,25	33	32	33	31	32,25	34	39	33	32	34,50	12	13	12	13	12,50	9	9	9	9	9,00	12	13	12	13	12,50	9	9	9	9	9,00	-48,79								
3	1	23	22	24	23	23,00	15	15	14	14	14,50	32	32	33	33	32,50	31	38	32	32	33,25	12	13	12	14	12,75	7	6	7	6	6,50	12	13	12	14	12,75	7	6	7	6	6,50	-56,67								
3	2	23	23	22	24	23,00	13	14	13	13	13,25	33	33	32	33	32,75	36	30	27	29	30,50	13	12	13	13	12,75	9	8	8	8	8,25	13	12	13	13	12,75	9	8	8	8	8,25	-57,28								
3	3	22	22	23	22	22,25	14	11	13	10	12,00	34	34	34	34	34,00	38	33	39	38	37,00	14	14	13	13	13,50	6	9	9	9	8,25	14	14	13	13	13,50	6	9	9	9	8,25	-67,80								
3	4	24	23	22	22	22,75	11	10	10	11	10,50	33	33	32	33	32,75	29	21	28	31	27,25	12	12	13	14	12,75	3	5	7	8	5,75	12	12	13	14	12,75	3	5	7	8	5,75	-68,63								
3	5	24	24	22	24	23,50	15	14	8	15	13,00	34	35	34	33	34,00	22	29	33	30	28,50	15	13	15	15	14,50	7	7	5	8	6,75	15	13	15	15	14,50	7	7	5	8	6,75	-58,64								
3	6	25	24	24	24	24,25	13	12	13	11	12,25	33	34	33	34	33,50	30	37	39	32	34,50	15	14	15	14	14,50	9	7	6	9	7,75	15	14	15	14	14,50	9	7	6	9	7,75	-70,32								
3	7	23	23	22	25	23,25	11	12	15	14	13,00	36	35	34	36	35,25	34	33	34	35	34,00	15	14	13	15	14,25	9	9	9	9	9,00	15	14	13	15	14,25	9	9	9	9	9,00	-60,62								
3	8	23	24	25	23	23,75	11	12	13	11	11,75	35	34	34	34	34,25	36	34	33	33	34,00	13	15	15	13	14,00	8	8	7	7	7,50	13	15	15	13	14,00	8	8	7	7	7,50	-70,02								
3	9	24	24	24	23	23,75	12	12	14	11	12,25	33	34	33	34	33,75	34	35	33	33	34,50	13	14	12	14	13,25	7	8	8	8	7,75	14	12	14	14	13,25	7	8	8	8	7,75	-67,06								
3	10	24	23	24	23	23,50	12	13																																										

Quadro 4: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto Testes de Marcha dos animais do grupo C.

Teste	Rato	TS D				TS D				TSE				TSE				PL D				PL D				PLE				PLE				ITS D				ITS D				ITS E				ITS E				SFI
N.	N.	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD									
1	1	20	20	20	21	20,25	21	21	20	20	20,50	31	32	32	32	31,75	32	32	32	32	32,00	11	11	11	11	11,00	12	12	11	10	11,25	12	12	11	10	11,25	12	12	11	10	11,25	-7,45								
1	2	21	21	22	22	21,50	22	22	22	21	21,75	33	33	33	33	31	32,50	30	34	32	32	32,00	12	11	11	12	11,50	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	-6,65							
1	3	23	22	24	22	22,75	23	22	22	22	22,00	32	33	32	32	31	32,00	30	32	32	31	31,25	12	12	12	12	12,00	12	10	11	11	11,00	12	10	11	11	11,00	12	10	11	11	11,00	-12,62							
1	4	21	20	22	22	21,25	24	23	22	20	22,25	34	32	33	32	32,75	33	34	33	30	32,50	11	11	11	12	11,25	11	10	11	11	10,75	11	10	11	11	10,75	11	10	11	11	10,75	-3,95								
1	5	23	24	21	22	22,50	23	23	23	23	23,00	33	33	33	33	33,00	32	33	32	31	32,00	10	11	10	12	10,75	10	11	11	13	11,25	10	11	11	13	11,25	10	11	11	13	11,25	-4,59								
1	6	22	22	21	21	21,50	21	20	22	21	21,00	34	34	34	32	33,50	34	33	32	31	32,50	11	11	12	12	11,50	12	11	11	11	11,25	11	11	11	11	11,25	11	11	11	11	11,25	-10,49								
1	7	23	22	21	21	21,75	22	23	23	23	22,75	35	33	33	33	34	33,75	34	34	35	34	34,25	12	12	12	11	11,75	12	12	12	11	11,75	12	12	12	11	11,75	12	12	12	11	11,75	-4,33							
1	8	22	22	22	22	22,00	20	21	23	22	21,50	36	33	33	33	34	34,00	34	34	33	33	33,50	12	12	13	12	12,25	12	11	12	12	11,75	12	11	12	12	11,75	12	11	12	12	11,75	-11,27							
1	9	21	22	21	21	21,25	22	22	22	22	22,00	33	33	32	34	33,00	34	34	33	33	33,50	12	12	11	11	11,50	13	12	12	12	12,25	12	12	12	12	12,25	12	12	12	12	12,25	-4,65								
1	10	22	24	23	22	22,75	21	21	21	22	21,25	33	30	33	32	32,00	31	32	31	32	31,50	11	12	12	13	12,00	11	11	11	12	11,25	11	11	11	12	11,25	11	11	11	12	11,25	-16,25								
1	11	24	22	22	24	23,00	23	24	21	22	22,75	30	31	31	32	31,00	33	33	32	33	32,75	12	11	12	12	11,75	13	13	12	11	11,25	13	13	12	11	11,25	13	13	12	11	11,25	-11,59								
1	12	23	20	23	23	22,25	22	22	21	21	21,75	33	34	30	31	32,00	31	30	31	32	31,00	11	12	11	11	11,25	11	11	10	10	10,50	11	11	10	10	10,50	11	11	10	10	10,50	-10,95								
2	1	22	23	22	23	22,50	11	8	11	9	9,75	32	33	32	33	32,50	35	35	37	33	35,00	11	11	12	11	11,25	3	7	6	9	6,25	7	6	9	6,25	7	6	9	6,25	7	6	9	6,25	-79,71						
2	2	22	23	22	23	22,50	15	12	14	12	13,25	33	31	32	31	31,75	34	33	33	34	33,50	12	12	12	13	12,25	7	5	8	10	7,50	7	5	8	10	7,50	7	5	8	10	7,50	-61,08								
2	3	23	22	21	22	22,00	12	11	14	11	12,00	35	32	35	32	33,50	33	34	35	33	33,75	13	11	12	11	11,75	6	9	12	7	8,50	6	9	12	7	8,50	6	9	12	7	8,50	-62,54								
2	4	22	23	22	22	22,25	13	12	11	12	12,00	33	33	32	33	32,75	32	32	32	39	33,75	14	12	13	14	13,25	8	7	11	5	7,75	8	7	11	5	7,75	8	7	11	5	7,75	-65,93								
2	5	24	21	22	21	22,00	10	13	14	14	12,75	34	33	31	33	32,75	32	32	33	33	32,50	14	12	12	12	12,50	8	6	7	5	6,50	8	6	7	5	6,50	8	6	7	5	6,50	-60,93								
2	6	23	23	23	22	22,75	14	11	14	11	12,50	35	33	32	33	33,25	34	33	34	35	34,00	12	14	13	14	13,25	7	7	8	10	8,00	7	7	8	10	8,00	7	7	8	10	8,00	-64,27								
2	7	22	23	22	23	22,50	8	7	9	10	8,50	33	34	32	34	33,25	36	35	32	37	35,00	12	12	13	12	12,25	9	10	9	11	9,75	9	10	9	11	9,75	9	10	9	11	9,75	-81,66								
2	8	22	23	22	22	22,25	15	15	15	15	15,00	34	36	35	36	35,25	35	35	36	36	35,50	11	12	13	11	11,75	7	4	6	10	6,75	7	4	6	10	6,75	7	4	6	10	6,75	-50,41								
2	9	23	22	23	21	22,25	11	16	12	16	13,75	35	35	34	35	34,75	35	36	34	33	34,50	13	12	12	12	12,25	9	9	10	4	8,00	9	9	10	4	8,00	9	9	10	4	8,00	-54,97								
2	10	22	22	22	22	22,00	15	15	13	15	14,50	33	33	32	33	32,75	33	34	33	33	33,25	12	13	13	14	13,00	6	7	11	5	7,25	6	7	11	5	7,25	6	7	11	5	7,25	-52,60								
2	11	23	23	22	23	22,75	9	6	4	7	6,50	33	32	34	32	32,75	32	33	33	34	33,00	13	12	12	13	12,50	7	6	5	13	7,75	7	6	5	13	7,75	7	6	5	13	7,75	-92,36								
2	12	22	22	22	22	22,00	16	15	14	15	15,00	32	33	32	33	32,50	34	35	39	33	35,25	12	11	12	11	11,50	9	9	10	5	8,25	9	9	10	5	8,25	9	9	10	5	8,25	-50,64								
3	1	23	22	24	23	23,00	15	15	14	15	14,75	33	33	33	33	33,00	31	32	38	32	33,25	12	12	13	12	12,25	6	7	11	9	8,25	6	7	11	9	8,25	6	7	11	9	8,25	-52,71								
3	2	23	23	22	23	22,75	13	14	13	14	13,50	33	32	32	32	32,25	36	37	30	27	32,50	12	12	13	12	12,25	8	8	5	12	8,25	8	8	5	12	8,25	8	8	5	12	8,25	-57,96								
3	3	22	23	23	22	22,50	14	11	13	11	12,25	35	33	34	34	34,00	38	38	33	39	37,00	12	13	12	13	12,50	9	9	11	7	9,00	9	9	11	7	9,00	9	9	11	7	9,00	-65,79								
3	4	22	23	22	22	22,25	11	10	10	11	10,50	33	34	33	34	33,50	39	35	33	28	33,75	15	14	14	14	14,25	5	7	10	6	7,00	5	7	10	6	7,00	5	7	10	6	7,00	-73,68								
3	5	24	24	22	24	23,50	15	14	8	14	12,75	35	33	34	33	33,75	38	37	37	33	36,25	15	12	13	12	13,00	7	5	11	5	7,00	7	5	11	5	7,00	7	5	11	5	7,00	-67,87								
3	6	25	24	25	24	24,50	13	12	13	12	12,50	36	34	33	34	34,25	30	33	37	39	34,75	15	15	13	13	14,00	7	6	7	10	7,50	7	6	7	10	7,50	7	6	7	10	7,50	-69,17								
3	7	23	23	22	25	23,25	11	12	15	13	12,75	35	33	34	33	33,75	34	35	33	34	34,00	14	15	14	12	13,75	9	9	4	5	6,75	9	9	4	5	6,75	9	9	4	5	6,75	-65,31								
3	8	23	24	25	23	23,75	11	12	13	12	12,00	35	36	34	36	35,25	36	37	34	33	35,00	14	15	14	13	14,00	8	7	6	7	7,00	8	7	6	7	7,00	8	7	6	7	7,00	-69,35								
3	9	24	24	25	23	24,00	12	12	14	11	12,25	34	35	34	35	34,50	34	35	33	33	33,75	11	13	15	13	13,00	8	8	9	8	8,25	8	8	9	8	8,25	8	8	9	8	8,25	-66,44								
3	10	24	23	24	23	23,50	12	13	12	13	12,50	32	33	32	33	32																																		

Quadro 5: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto Testes de Marcha dos animais do grupo D.

Teste	Rato	TS D				TS D				TSE				TSE				PL D				PL D				PLE				PLE				ITS D				ITS D				ITS E				ITS E				SFI
N.	N.	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD									
1	1	22	22	22	21	21,75	22	20	22	22	21,50	31	31	32	32	31,50	32	32	32	31	31,75	32	32	32	30	31,50	10	10	11	11	10,75	12	11	11	10	11,00	12	11	11	10	11,00	-10,05								
1	2	21	20	22	22	20,25	22	21	21	21	21,25	32	32	32	31	31,75	32	32	32	30	31,50	10	11	11	12	11,00	12	11	11	12	11,00	12	11	11	12	11,50	12	11	12	11,50	-7,89									
1	3	20	20	21	20	20,25	22	22	23	21	22,00	30	32	32	32	31,50	29	31	31	32	30,75	10	11	12	12	11,25	12	12	11	11	11,50	12	12	11	11	11,50	12	11	11	11,50	1,87									
1	4	20	21	23	21	21,25	21	22	22	21	21,50	32	33	31	30	31,50	33	33	33	33	33,00	11	11	11	11	11,00	12	12	12	12	11	11,75	12	12	12	11	11,75	12	11	11,75	-8,43									
1	5	23	22	22	21	22,00	22	24	22	21	22,25	29	31	31	32	30,75	32	33	32	33	32,50	12	12	12	10	11,50	11	12	10	12	11,25	12	12	10	12	11,25	12	12	10	12	11,25	-10,02								
1	6	21	21	21	21	21,00	22	22	21	22	21,75	33	33	33	33	33,00	33	33	33	34	33,25	11	12	11	12	11,50	11	11	11	12	11,25	12	11	11	12	11,25	12	11	11	12	11,25	-5,47								
1	7	21	23	22	21	21,75	21	20	22	22	21,25	32	32	31	33	32,00	34	34	32	34	33,50	10	11	12	11	11,00	13	11	12	11	11,00	13	11	12	11	11,75	12	11	12	11	11,75	-12,21								
1	8	22	22	22	21	21,75	22	22	22	22	22,00	34	33	32	33	33,00	33	31	31	33	32,00	13	12	11	13	12,25	10	11	12	11	11,00	12	12	11	12	11,25	12	11	12	12	11,25	-7,47								
1	9	22	23	23	22	22,50	21	21	22	21	21,25	34	34	33	33	33,50	33	34	34	33	33,50	10	12	11	12	11,25	10	12	12	11	11,25	10	12	12	11	11,25	10	12	12	11	11,25	-14,88								
1	10	22	23	21	21	21,75	20	22	22	21	21,25	35	33	33	34	33,75	33	33	33	32	32,75	11	11	12	12	11,50	12	13	12	13	12,50	12	13	12	13	12,50	12	13	12	13	12,50	-9,03								
1	11	22	20	21	22	21,25	22	23	21	21	22,00	32	31	33	30	31,50	32	32	32	32	32,00	10	11	10	11	10,50	12	11	10	11	10,50	12	11	11	11	11,25	12	11	11	11,25	12	11	11	11,25	-4,59					
1	12	23	23	23	22	22,75	23	23	23	23	23,00	32	32	33	32	32,00	33	32	33	30	32,00	11	12	11	11	11,25	11	11	12	12	11,50	12	11	12	12	11,50	12	11	12	12	11,50	-7,30								
2	1	23	23	23	23	23,00	11	9	8	12	10,00	33	32	33	32	32,50	33	35	35	37	35,00	12	11	12	11	11,50	7	6	9	7	7,25	7	6	9	7	7,25	7	6	9	7	7,25	-78,55								
2	2	23	23	22	23	22,75	14	12	12	12	12,50	31	32	32	32	31,75	34	34	33	33	33,50	12	12	12	12	12,00	5	8	10	9	8,00	5	8	10	9	8,00	5	8	10	9	8,00	-64,68								
2	3	23	22	21	22	22,00	14	11	13	14	13,00	32	35	35	34	34,00	35	33	34	35	34,25	13	11	13	11	12,00	9	12	7	11	9,75	9	12	7	11	9,75	9	12	7	11	9,75	-56,37								
2	4	22	23	22	21	22,00	11	9	12	5	9,25	33	32	32	32	32,25	36	32	32	32	33,00	14	14	13	13,75	7	11	5	10	8,25	7	11	5	10	8,25	7	11	5	10	8,25	-78,47									
2	5	24	21	22	21	22,00	14	14	13	14	13,75	33	32	33	34	33,00	36	32	32	33	33,25	13	13	14	12	13,00	6	7	5	8	6,50	6	7	5	8	6,50	6	7	5	8	6,50	-56,80								
2	6	23	23	23	22	22,75	14	11	5	14	11,00	33	32	32	33	32,50	35	34	33	34	34,00	11	12	12	14	12,25	7	8	10	8	8,25	7	8	10	8	8,25	7	8	10	8	8,25	-71,47								
2	7	22	23	24	23	23,00	9	10	7	11	9,25	34	32	33	34	33,25	34	36	35	32	34,25	12	12	12	12	12,00	10	9	11	10	10,00	10	9	11	10	10,00	10	9	11	10	10,00	-77,63								
2	8	22	23	22	21	22,00	15	15	15	15	15,00	36	35	35	35	35,25	34	35	35	36	35,00	11	12	11	12	11,50	4	6	10	7	6,75	4	6	10	7	6,75	4	6	10	7	6,75	-48,86								
2	9	23	22	23	21	22,25	12	16	16	15	14,75	35	34	34	34	34,25	34	35	36	34	34,75	13	13	13	12	12,75	9	10	4	9	8,00	9	10	4	9	8,00	9	10	4	9	8,00	-51,22								
2	10	22	22	22	22	22,00	13	15	15	13	14,00	33	32	33	35	33,25	31	33	34	33	32,75	12	12	12	13	12,25	7	11	5	10	8,25	7	11	5	10	8,25	7	11	5	10	8,25	-52,39								
2	11	23	23	22	23	22,75	11	7	6	4	7,00	32	34	34	34	33,50	35	32	33	33	33,25	13	13	13	12	12,75	6	5	3	6	5,00	6	5	3	6	5,00	6	5	3	6	5,00	-92,41								
2	12	22	23	22	23	22,50	14	15	15	14	14,50	33	32	33	32	32,50	34	34	35	39	35,50	12	12	12	12	12,00	9	10	5	11	8,75	9	10	5	11	8,75	9	10	5	11	8,75	-54,87								
3	1	23	22	24	23	23,00	14	15	15	14	14,50	33	33	33	32	32,75	33	31	32	38	33,50	12	12	12	12	12,00	7	11	9	8	8,75	7	11	9	8	8,75	7	11	9	8	8,75	-53,75								
3	2	23	23	22	23	22,75	13	14	14	13	13,50	32	32	32	32	32,00	33	36	37	30	34,00	12	13	12	12	12,25	8	5	11	6	7,50	8	5	11	6	7,50	8	5	11	6	7,50	-60,87								
3	3	23	23	23	22	22,75	13	11	12	13	12,25	33	34	34	35	34,00	36	38	38	33	36,25	12	13	12	13	12,50	9	11	7	11	9,50	9	11	7	11	9,50	9	11	7	11	9,50	-65,07								
3	4	22	23	24	24	23,25	10	11	10	10	10,25	34	33	32	32	32,75	33	39	35	33	35,00	15	15	15	14	14,75	7	6	6	5	6,00	7	6	6	5	6,00	7	6	6	5	6,00	-80,55								
3	5	24	24	22	24	23,50	8	14	14	8	11,00	33	34	33	34	33,50	35	38	37	37	36,75	15	14	15	12	14,00	5	11	5	9	7,50	5	11	5	9	7,50	5	11	5	9	7,50	-76,94								
3	6	25	24	25	23	24,25	13	12	12	13	12,50	34	33	33	32	33,00	35	30	33	37	33,75	15	15	15	15	15,00	6	7	10	8	7,75	6	7	10	8	7,75	6	7	10	8	7,75	-69,16								
3	7	23	23	22	25	23,25	15	13	12	15	13,75	33	34	34	35	34,00	37	34	35	33	34,75	14	14	14	15	14,25	9	4	5	6	6,00	9	4	5	6	6,00	9	4	5	6	6,00	-62,09								
3	8	23	24	25	23	23,75	13	12	12	13	12,50	36	34	34	36	35,00	36	36	37	34	35,75	14	14	14	15	14,25	7	6	7	7	6,75	7	6	7	7	6,75	7	6	7	7	6,75	-68,49								
3	9	23	24	25	24	24,00	14	11	12	14	12,75	35	34	35	35	34,75	38	34	35	33	35,00	14	12	13	13	13,00	8	8	9	9	8,50	8	8	9	9	8,50	8	8	9	9	8,50	-65,01								
3	10	22	23	24	23	23,00	12	13	14	12	12,75	33	32																																					

Quadro 6: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto Testes de Marcha dos animais do grupo E.

Teste	Rato	TS D				TS D				TS E				TS E				PL D				PL D				PL E				PL E				ITS D				ITS D				ITS E				ITS E				SFI
		1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD									
1	1	22	22	21	22	21,75	22	22	22	21	21,75	32	32	32	32	32,00	32	32	32	33	32,25	12	12	12	12	12,00	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	-9,38								
1	2	21	21	22	21	21,25	21	21	21	22	21,25	32	32	31	32	31,75	32	32	31	31	31,50	12	12	12	11	11,75	12	11	11	12	11,50	12	11	11	12	11,50	12	11	11	12	11,50	-8,78								
1	3	20	22	20	21	20,75	22	23	23	22	22,50	32	32	32	32	31,75	32	31	31	32	31,50	12	11	12	12	11,75	12	12	12	12	12,00	12	12	12	12	12,00	12	12	12	12	12,00	1,02								
1	4	21	22	23	22	22,00	21	22	21	22	21,50	32	31	33	32	32,00	30	32	32	32	31,50	11	11	11	11	11,00	12	11	11	11	11,25	12	11	11	11	11,25	12	11	11	11	11,25	-10,39								
1	5	20	24	23	21	22,00	21	22	22	22	21,75	32	32	31	33	32,00	33	33	32	31	32,25	11	10	12	10	10,75	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	12	12	12	13	12,00	-9,11								
1	6	21	20	22	20	20,75	22	21	23	22	22,00	32	33	34	33	33,00	33	32	33	32	32,50	12	11	11	12	11,50	12	12	12	11	11,50	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	-1,33								
1	7	22	22	22	22	22,00	22	23	22	21	22,00	33	32	34	33	33,00	33	33	32	32	32,50	11	11	12	11	11,25	13	12	12	12	12,25	12	12	12	12	12,25	12	12	12	12	12,25	-7,04								
1	8	22	23	23	21	22,25	21	23	22	20	21,50	34	34	34	34	34,00	33	34	33	33	33,25	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	12	12	11	12	11,75	-11,65								
1	9	20	22	23	23	22,00	23	22	22	21	22,00	33	32	33	33	32,75	34	33	33	34	33,50	11	12	12	13	12,00	10	12	11	11	11,00	10	12	11	11	11,00	10	12	11	11	11,00	-10,79								
1	10	22	23	22	22	22,25	22	22	21	21,75	32	32	33	32	32,25	33	33	32	34	33,00	10	10	12	11	10,75	11	12	12	13	12,00	10	10	12	13	12,00	10	10	12	13	12,00	-10,60									
1	11	23	23	22	23	22,75	23	24	22	22	22,75	31	30	31	31	30,75	32	32	32	31	31,75	11	12	11	12	11,50	11	12	11	11	11,25	11	12	11	11	11,25	11	12	11	11	11,25	-10,33								
1	12	22	22	22	21	21,75	23	23	23	23	23,00	33	32	33	33	32,75	34	32	32	33	32,75	12	10	11	11	11,00	11	11	12	11	11,25	11	11	12	11	11,25	11	11	12	11	11,25	-2,20								
2	1	21	23	22	23	22,25	9	9	8	12	9,50	32	33	32	33	32,50	34	35	33	35	34,25	11	12	12	11	11,50	6	9	7	9	7,75	11	12	12	11	11,50	6	9	7	9	7,75	-77,95								
2	2	22	23	23	22	22,50	12	12	12	12	12,00	33	32	32	32	32,25	35	34	34	34	34,25	12	12	12	13	12,25	8	10	9	10	9,25	12	12	12	13	12,25	8	10	9	10	9,25	-65,53								
2	3	22	23	22	22	22,25	11	11	13	14	12,25	32	35	32	32	32,75	36	33	35	33	34,25	11	13	12	11	11,75	12	7	11	7	9,25	12	7	11	7	9,25	12	7	11	7	9,25	-62,60								
2	4	22	21	21	22	21,50	9	9	12	5	8,75	33	34	32	32	32,75	36	32	36	32	34,00	14	14	14	14	14,00	11	5	10	5	7,75	11	5	10	5	7,75	11	5	10	5	7,75	-81,14								
2	5	23	23	23	22	22,75	14	14	13	14	13,75	34	33	32	33	33,00	37	32	36	32	34,25	10	14	10	12	11,50	7	5	8	5	6,25	10	14	10	12	11,50	7	5	8	5	6,25	-59,64								
2	6	23	24	23	24	23,50	11	11	5	14	10,25	35	36	32	32	33,75	34	34	35	34	34,25	12	12	12	14	12,50	8	10	8	10	9,00	12	12	12	14	12,50	8	10	8	10	9,00	-74,83								
2	7	23	23	23	23	23,00	10	10	7	11	9,50	33	34	32	33	33,00	35	36	34	36	35,25	12	12	14	12	12,50	9	11	10	11	10,25	12	12	12	14	12,50	9	11	10	11	10,25	-78,08								
2	8	23	22	22	22	22,25	15	15	15	15	15,00	34	34	35	33	34,00	36	35	34	35	35,00	12	11	13	11	11,75	6	10	7	10	8,25	12	11	13	11	11,75	6	10	7	10	8,25	-49,57								
2	9	22	23	22	23	22,50	16	16	16	15	15,75	35	36	34	34	34,75	35	35	34	35	34,75	13	13	12	12	12,50	10	4	9	4	6,75	13	13	12	12	12,50	10	4	9	4	6,75	-47,77								
2	10	24	24	22	22	23,00	15	15	15	13	14,50	33	32	32	33	32,50	32	33	31	33	32,25	12	13	13	14	13,00	11	5	10	5	7,75	12	13	13	14	13,00	11	5	10	5	7,75	-54,34								
2	11	23	23	23	22	22,75	7	7	6	4	6,00	33	34	34	33	33,50	34	32	35	32	33,25	13	13	13	13	13,00	5	3	6	3	4,25	13	13	13	13	13,00	5	3	6	3	4,25	-98,09								
2	12	22	23	24	23	23,00	15	15	15	14	14,75	32	32	32	33	32,25	35	34	34	34	34,25	12	12	12	12	12,00	10	5	11	5	7,75	12	12	12	12	12,00	10	5	11	5	7,75	-55,16								
3	1	22	23	22	23	22,50	15	15	15	14	14,75	33	32	33	33	32,75	33	31	33	31	32,00	12	12	12	12	12,00	11	9	8	9	9,25	12	12	12	12	12,00	11	9	8	9	9,25	-48,69								
3	2	23	22	23	24	23,00	14	14	14	13	13,75	33	34	32	32	32,75	33	36	33	36	34,50	13	12	13	14	13,00	5	11	6	11	8,25	13	12	13	14	13,00	5	11	6	11	8,25	-59,74								
3	3	23	23	23	22	22,75	11	11	12	13	11,75	35	35	34	34	34,50	37	38	36	38	37,25	13	12	14	13	13,00	11	7	11	7	9,00	13	12	14	13	13,00	11	7	11	7	9,00	-68,89								
3	4	23	23	22	23	22,75	11	11	10	10	10,50	33	32	33	32	32,50	38	39	33	39	37,25	15	15	13	14	14,25	6	6	5	6	5,75	15	15	13	14	14,25	6	6	5	6	5,75	-81,29								
3	5	22	23	22	23	22,50	14	14	14	8	12,50	35	35	34	33	34,25	39	38	35	38	37,50	14	15	13	14	14,00	11	5	9	5	7,50	14	15	13	14	14,00	11	5	9	5	7,50	-67,28								
3	6	23	22	24	23	23,00	12	12	12	13	12,25	36	34	33	33	34,00	35	36	35	36	35,50	15	15	15	13	14,50	7	10	8	10	8,75	15	15	15	13	14,50	7	10	8	10	8,75	-66,94								
3	7	23	23	22	23	22,75	13	13	12	15	13,25	35	35	34	34	34,50	37	34	37	34	35,50	14	14	13	14	13,75	4	5	6	5	5,00	14	14	13	14	13,75	4	5	6	5	5,00	-64,10								
3	8	23	23	23	22	22,75	12	12	12	13	12,25	35	35	34	34	34,50	37	36	36	36	36,25	14	14	15	13	14,00	6	7	7	7	6,75	14	14	15	13	14,00	6	7	7	7	6,75	-68,17								
3	9	23	23	24	24	23,50	11	11	12	14	12,00	34	34	34	35	34,25	38	35	38	36	36,75	12	13	12	13	12,50	8	9	9	9	8,75	12	13	12	13	12,50	8	9	9	9	8,75	-69,17								
3	10	24	24	22	24	23,50	13	13	14	12																																								

Quadro 7: Resultados do primeiro, segundo, terceiro e quarto Testes de Marcha dos animais do grupo F.

Teste	Rato	TS D				TS D	TSE				TS E	PL D				PL D	PLE				PLE	ITS D				TS D	ITS E				ITS E	SFI
N.	N.	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	1	2	3	4	MÉD	
1	1	23	23	22	22	22,50	22	23	22	23	22,50	31	31	31	32	31,25	32	32	31	31	31,50	11	11	11	11	11,00	12	12	12	11	11,75	-8,20
1	2	21	21	22	21	21,25	21	21	21	22	21,25	32	32	32	31	31,75	31	32	32	32	31,75	12	12	12	10	11,50	12	11	12	12	11,75	-8,51
1	3	22	22	22	21	21,75	22	23	22	21	22,00	32	33	32	33	32,00	32	32	33	32	32,25	12	11	12	11	11,50	11	11	12	11	11,25	-8,13
1	4	22	21	21	21	21,25	21	22	21	22	21,50	32	31	32	32	31,75	32	33	32	33	32,50	11	11	11	12	11,25	12	11	11	11	11,25	-8,42
1	5	22	23	21	21	21,75	22	23	22	21	22,00	32	32	32	33	32,25	33	33	33	33	33,00	12	12	12	11	11,75	12	12	12	12	12,00	-8,15
1	6	21	21	22	21	21,25	22	22	21	21	21,50	33	33	34	33	33,25	32	32	33	32	32,25	12	10	12	10	11,00	11	12	11	12	11,50	-5,76
1	7	20	22	21	22	21,25	21	22	22	22	21,75	32	32	32	33	32,25	32	32	32	32	32,00	11	11	12	11	11,25	10	11	11	11	10,75	-6,5
1	8	22	21	22	20	21,25	21	21	21	21	21,00	34	34	32	33	33,25	33	31	29	31	31,00	12	12	11	12	11,75	12	11	11	12	11,50	-7,78
1	9	20	22	21	22	21,25	20	21	21	21	20,75	33	32	32	33	32,50	30	31	31	32	31,00	13	12	13	12	12,50	12	12	12	12	12,00	-10,14
1	10	22	22	22	21	21,75	20	21	21	22	21,00	31	32	32	33	32,00	33	32	33	32	32,50	11	12	11	12	11,50	12	12	12	12	12,00	-12,60
1	11	23	24	22	23	23,00	23	23	22	23	22,75	30	32	32	31	31,25	32	32	32	32	32,00	13	11	11	13	12,00	12	13	11	11	11,75	-11,19
1	12	23	23	24	23	23,25	23	24	23	23	23,25	32	33	31	32	31,75	33	33	32	32	32,50	12	12	12	12	12,00	12	11	12	12	11,75	-9,98
2	1	23	24	23	23	23,25	9	9	8	10	9,00	32	33	33	33	32,50	35	36	34	36	35,25	12	12	12	13	12,25	11	10	8	6	8,75	-82,95
2	2	23	22	23	23	22,75	12	12	12	11	11,75	32	32	32	32	32,00	36	35	34	35	35,00	12	12	12	13	12,25	10	7	7	7	7,75	-70,22
2	3	22	21	22	22	21,75	11	11	13	10	11,25	32	32	35	34	33,25	35	35	34	35	34,75	13	13	12	11	12,25	4	9	9	10	8,00	-68,00
2	4	22	23	22	23	22,50	9	9	12	8	9,50	32	32	32	32	32,00	32	33	31	33	32,25	14	14	14	14	14,00	5	10	7	4	6,50	-79,49
2	5	21	23	21	23	22,00	14	14	13	12	13,25	32	33	33	34	33,00	34	32	35	32	33,25	14	14	11	12	12,75	3	6	9	9	6,75	-58,90
2	6	22	23	22	22	22,25	11	11	5	10	9,25	32	32	32	33	32,25	35	34	34	34	34,25	12	12	12	14	12,50	5	11	6	7	7,25	-80,74
2	7	23	21	23	21	22,00	10	10	7	8	8,75	32	33	33	34	33,00	33	31	33	31	32,00	12	12	14	12	12,50	9	8	7	6	7,50	-78,91
2	8	22	23	22	23	22,50	15	13	15	14	14,25	35	33	35	35	34,50	33	36	33	36	34,50	12	11	13	11	11,75	11	6	9	9	8,75	-52,35
2	9	21	24	22	24	22,75	16	5	15	12	12,00	34	34	34	34	34,00	37	38	36	38	37,25	13	13	12	12	12,50	7	11	6	7	7,75	-69,26
2	10	22	22	22	24	22,50	15	14	15	12	14,00	32	33	33	35	33,25	38	39	33	39	37,25	13	13	13	14	13,25	6	5	8	8	6,75	-61,30
2	11	23	22	23	23	22,75	7	7	6	11	7,75	34	33	34	34	33,75	39	38	35	38	37,50	13	13	13	13	13,00	5	9	9	9	8,00	-90,37
2	12	22	22	22	22	22,00	14	15	15	10	13,50	32	33	33	32	32,50	35	36	35	36	35,50	12	12	12	12	12,00	10	8	5	7	7,50	-59,63
3	1	23	22	23	23	22,75	10	11	7	10	9,50	33	33	33	32	32,75	39	35	37	37	37,00	12	12	12	12	12,00	6	5	7	6	6,00	-84,19
3	2	23	23	23	22	22,75	23	21	23	23	22,50	32	32	32	32	32,00	35	31	31	32	32,25	12	12	13	12	12,25	12	12	13	12	12,25	-10,30
3	3	22	24	22	24	23,00	12	8	9	11	10,00	34	34	34	35	34,25	39	39	35	37	37,50	12	12	14	13	12,75	5	5	7	5	5,50	-81,89
3	4	22	24	22	24	23,00	22	20	22	19	20,75	33	32	32	32	32,25	34	33	34	35	34,00	15	15	13	14	14,25	13	15	12	13	13,25	-22,52
3	5	24	24	24	23	23,75	21	22	21	21	21,25	34	33	33	34	33,50	36	34	33	33	34,00	15	15	13	12	13,75	15	14	14	15	14,50	-20,17
3	6	24	23	24	23	23,50	22	20	22	17	20,25	33	33	33	32	32,75	35	36	33	34	34,50	15	15	15	13	14,50	14	13	13	14	13,50	-26,91
3	7	25	23	25	24	24,25	20	21	23	20	21,00	34	34	34	35	34,25	34	33	34	35	34,00	14	14	13	12	13,25	12	13	12	12	12,25	-24,20
3	8	23	24	23	25	23,75	21	23	22	23	22,25	34	34	34	36	34,50	36	34	33	33	34,00	14	14	15	13	14,00	15	12	14	15	14,00	-15,16
3	9	23	24	23	22	23,00	6	11	6	10	8,25	34	35	35	35	34,75	38	38	36	39	37,75	13	13	12	13	12,75	6	7	7	6	6,50	-88,85
3	10	23	23	23	22	22,75	22	20	19	21	20,50	32	33	32	33	32,50	34	34	34	33	33,75	15	15	15	14	14,75	13	14	15	13	13,75	-22,00
3	11	24	24	24	22	23,50	22	20	20	22	21,00	34	34	34	33	33,75	34	33	34	33	33,50	12	12	12	13	12,25	12	13	12	11	12,00	-20,44
3	12	23	23	24	23	23,25	22	21	22	20	21,25	33	33	33	33	33,00	34	32	33	31	32,50	13	13	12	13	12,75	11	13	12	11	11,75	-18,68
4	1	25	23	25	24	24,25	7	9	6	11	8,25	35	34	34	34	34,25	39	35	39	38	37,75	13	13	11	13	12,50	6	5	8	8	6,75	-91,08
4	2	25	23	25	24	24,25	22	10	24	21	19,25	33	33	33	33	33,00	34	30	31	29	31,00	14	14	15	14	14,25	13	11	12	11	11,75	-31,39
4	3	24	24	24	23	23,75	10	8	5	12	8,75	36	36	36	37	36,25	39	40	36	38	38,25	13	13	14	15	13,75	9	5	7	4	6,25	-87,33
4	4	22	23	22	24	22,75	22	21	21	24	22,00	33	33	33	32	32,75	31	30	30	30	30,25	15	15	14	15	14,75	13	11	12	11	11,75	-12,19
4	5	24	26	24	23	24,25	24	22	21	20	21,75	36	34	34	35	34,75	27	24	31	34	29,00	14	14	13	15	14,00	11	10	11	10	10,50	-17,08
4	6	24	23	24	25	24,00	23	24	24	24	23,75	33	35	33	34	33,75	31	30	30	30	30,25	15	13	12	16	14,00	12	11	12	13	12,00	-7,87
4	7	26	23	26	23	24,50	21	2																								

Gráfico 2: IFC dos animais do Grupo A nos quatro testes de marcha.

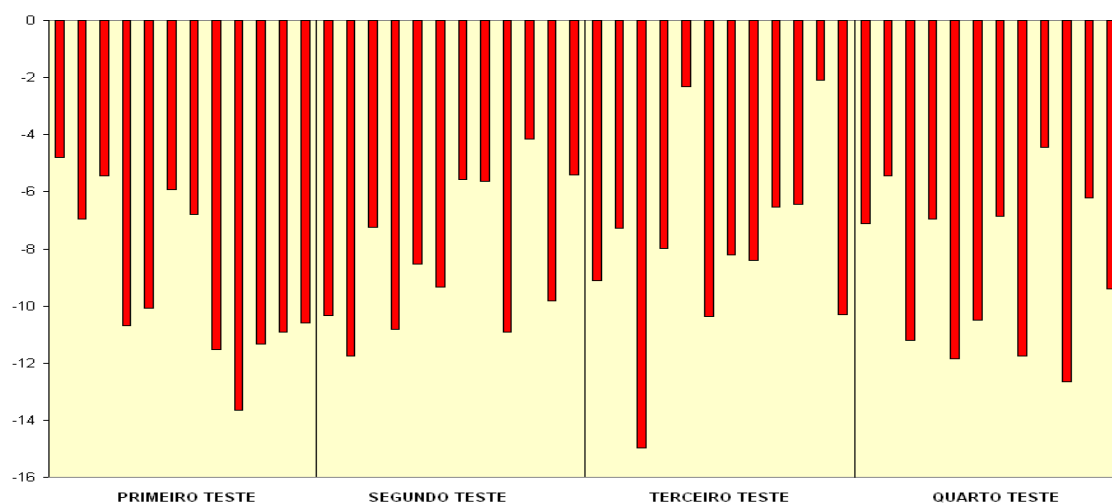


Gráfico 3: IFC dos animais do Grupo B nos quatro testes de marcha.

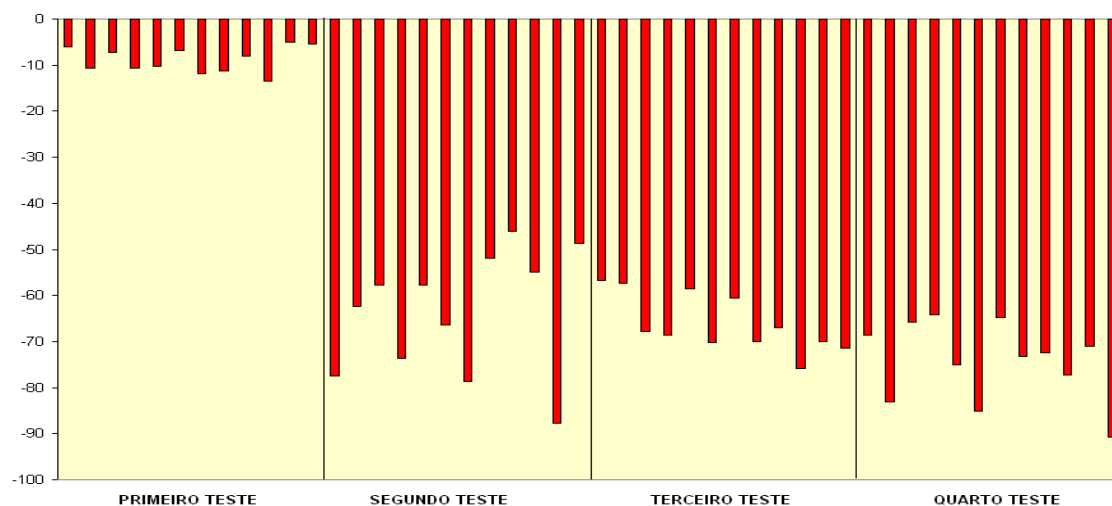


Gráfico 4: IFC dos animais do Grupo C nos quatro testes de marcha.

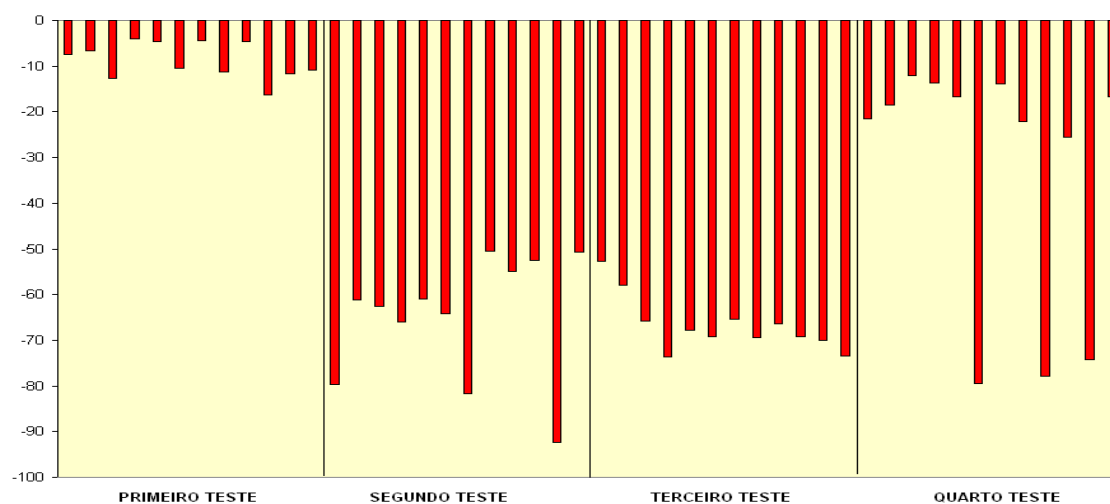


Gráfico 5: IFC dos animais do Grupo D nos quatro testes de marcha.

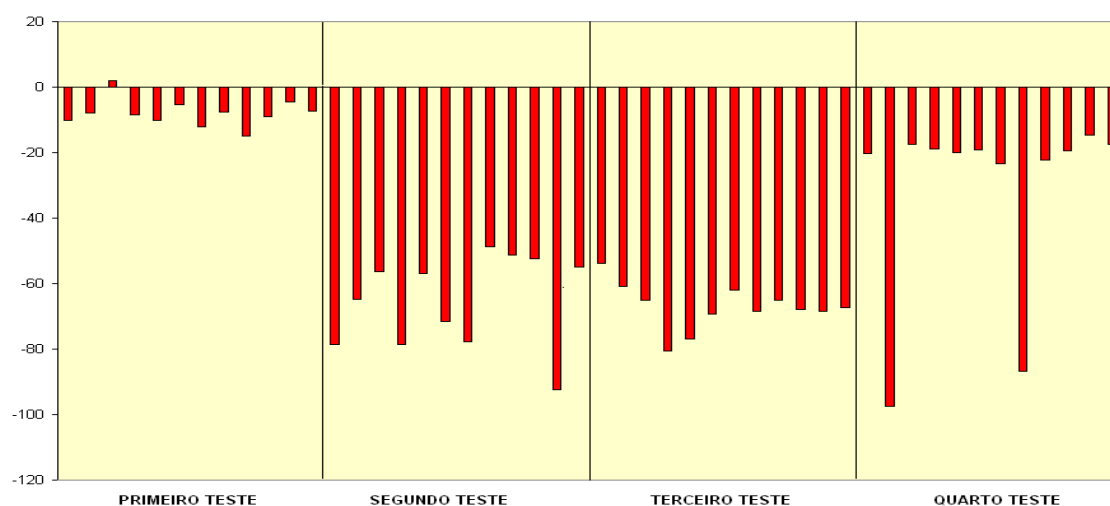
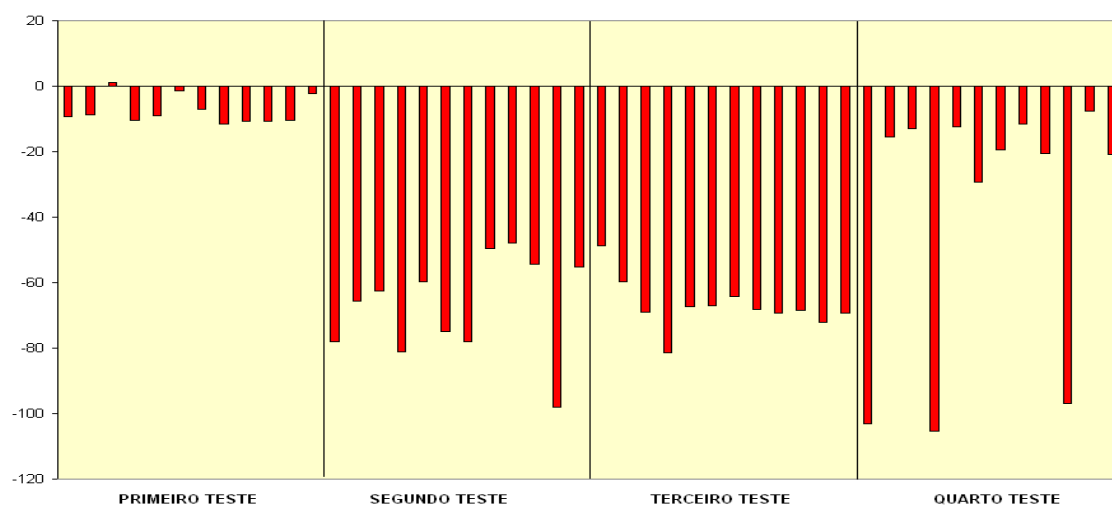
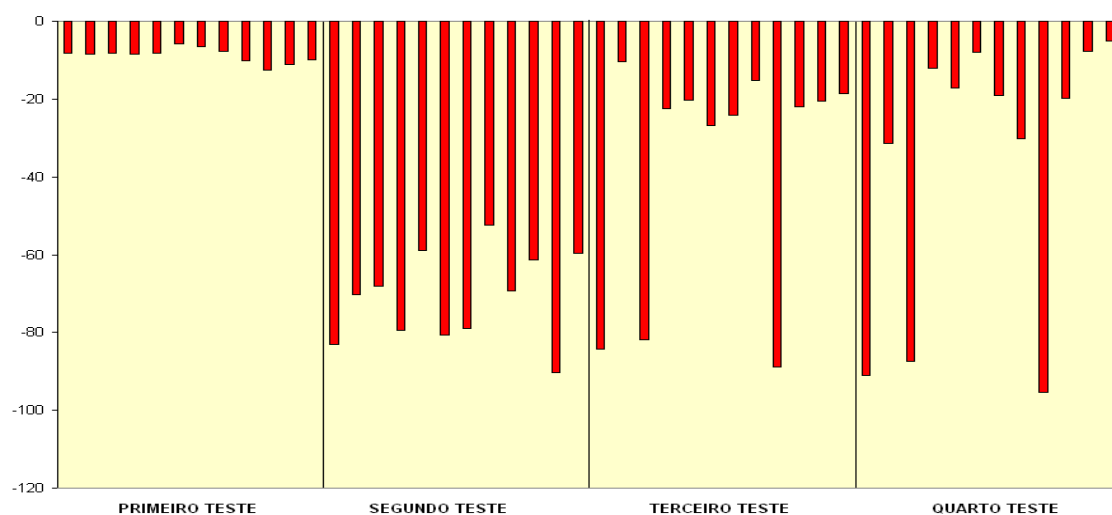
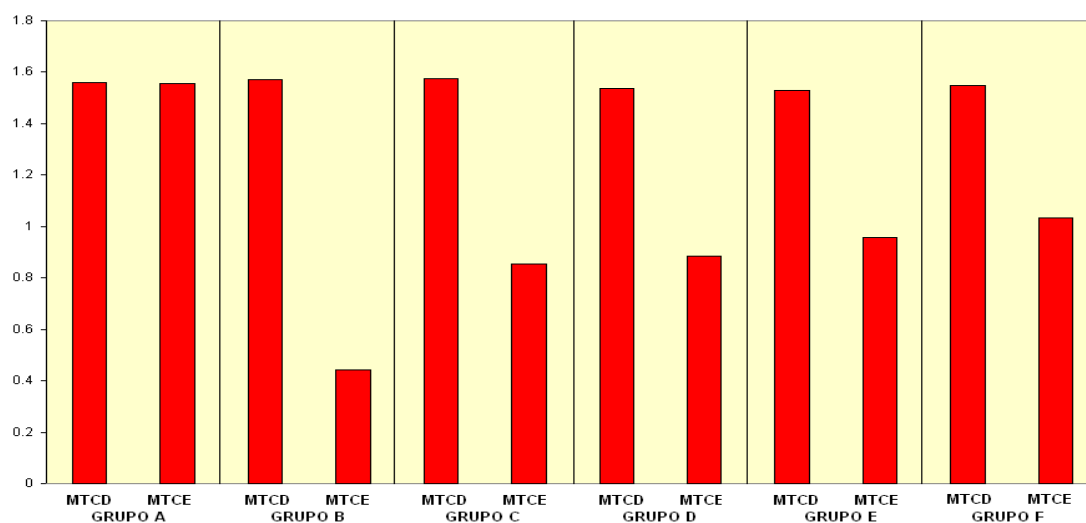


Gráfico 6: IFC dos animais do Grupo E nos quatro testes de marcha.**Gráfico 7:** IFC dos animais do Grupo F nos quatro testes de marcha.

Quadro 8: Massa (g) do MTC no MPD e MPE.

Rato N.	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D		GRUPO E		GRUPO F	
	MPD	MPE	MPD	MPE	MPD	MPE	MPD	MPE	MPD	MPE	MPD	MPE
1	1,62	1,63	1,72	0,33	1,77	0,99	1,71	0,93	1,5	0,52	1,78	0,23
2	1,51	1,54	1,33	0,47	1,42	0,85	1,3	0,21	1,56	1,13	1,39	1,33
3	1,4	1,47	1,75	0,11	1,55	0,78	1,39	1,09	1,69	1,02	1,58	0,49
4	1,68	1,69	1,44	0,88	1,59	0,9	1,51	1	1,57	0,65	1,72	1,25
5	1,58	1,5	1,55	0,38	1,62	1,06	1,4	1,21	1,35	0,96	1,33	0,99
6	1,72	1,78	1,59	0,42	1,51	0,55	1,69	1,11	1,56	1,17	1,75	1,27
7	1,33	1,39	1,74	0,77	1,4	0,91	1,77	0,89	1,42	0,99	1,44	1,15
8	1,77	1,58	1,6	0,65	1,69	1,11	1,44	0,44	1,55	1,14	1,58	1,39
9	1,44	1,51	1,57	0,25	1,77	0,43	1,62	0,71	1,59	1,21	1,51	0,39
10	1,55	1,49	1,35	0,5	1,44	1,05	1,51	0,99	1,62	0,42	1,49	1,29
11	1,49	1,48	1,56	0,41	1,55	0,63	1,4	1,01	1,51	1,16	1,48	1,33
12	1,61	1,59	1,66	0,14	1,59	0,98	1,69	1,02	1,41	1,11	1,53	1,29
MÉD.	1,56	1,55	1,572	0,443	1,58	0,853	1,536	0,884	1,53	0,96	1,55	1,033

Gráfico 8: Massa (g) média dos MTC direito e esquerdo dos grupos em estudo.

Quadro 9: Representação do resultado da análise histológica do nervo fibular direito, realizada com o Image Pro Plus 4.5 ®.

RATO N.	GRUPO	NÚMERO DE AXÔNIOS/CAMPO				NÚMERO MÉDIO DE AXÔNIOS/CAMPO	DIÂMETRO MÉDIO DE AXÔNIOS/ CAMPO				DIÂMETRO MÉDIO DE AXÔNIOS/CAMPO
		CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4		CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4	
1	A	156	137	172	126	147,75	11,23	10,67	9,97	9,88	10,44
2	A	115	103	99	94	102,75	7,75	13,45	10,33	10,02	10,39
3	A	155	132	128	99	128,50	9,9	8,23	11,67	10,01	9,95
4	A	101	88	161	122	118,00	8,81	10,23	9,49	9,91	9,61
5	A	99	146	158	139	135,50	7,47	11,41	11,09	10,02	10,00
6	A	167	132	100	121	130,00	11,25	10,92	9,99	6,77	9,73
7	A	99	87	102	134	105,50	9,09	11,43	12,07	11,19	10,95
8	A	155	111	132	99	124,25	11,87	9,95	9,98	8,85	10,16
9	A	144	138	91	108	120,25	11,69	10,08	12,59	6,02	10,10
10	A	117	102	95	183	124,25	9,94	8,57	7,99	10,32	9,21
11	A	129	100	91	139	114,75	8,86	9,05	12,41	9,92	10,06
12	A	172	94	105	90	115,25	7,94	9,05	9,99	11,22	9,55
1	B	1	3	0	5	2,25	4,47	6,39	0	5,76	4,16
2	B	2	0	1	4	1,75	3,33	0	2,12	6,99	3,11
3	B	0	5	3	0	2,00	0	4,46	2,11	0	1,64
4	B	2	2	7	2	3,25	4,89	7,71	4,48	9,01	6,52
5	B	3	6	0	4	3,25	2,12	4,86	0	3,39	2,59
6	B	0	5	9	2	4,00	0	2,68	3,99	2,15	2,21
7	B	6	2	1	1	2,50	1,17	3,64	2,19	2,18	2,30
8	B	0	2	7	9	4,50	0	2,97	4,44	2,28	2,42
9	B	1	2	3	0	1,50	2,77	1,26	1,99	0	1,51
10	B	2	7	3	0	3,00	2,55	3,49	9,95	0	4,00
11	B	9	3	6	2	5,00	10,6	11,7	4,44	2,11	7,21
12	B	0	4	5	2	2,75	0	3,33	8,89	2,38	3,65
1	C	77	65	97	91	82,50	11,67	2,34	9,76	7,72	7,87
2	C	88	69	91	80	82,00	6,64	15,56	6,41	15,62	11,06
3	C	110	97	90	103	100,00	8,13	8,44	7,67	6,56	7,70
4	C	98	80	44	96	79,50	5,55	19,23	5,55	12,25	10,65
5	C	67	88	91	96	85,50	6,67	7,11	7,98	4,49	6,56
6	C	3	11	7	1	5,50	11,45	19,24	10,87	3,45	11,25
7	C	88	95	67	102	88,00	4,67	8,01	6,67	7,83	6,80
8	C	99	91	79	102	92,75	4,99	9,99	10,44	19,32	11,19
9	C	14	3	11	7	8,75	7,7	11,26	11,11	14,82	11,22
10	C	101	85	89	92	91,75	7,34	11,21	4,48	6,6	7,41
11	C	11	6	10	17	11,00	2,23	5,98	10,02	19,55	9,45
12	C	87	91	109	96	95,75	11,76	10,56	6,22	14,45	10,75
1	D	100	97	108	91	99,00	4,33	5,78	2,2	7,31	4,91
2	D	0	5	2	7	3,50	0	10	7,49	6,11	5,90
3	D	92	94	107	115	102,00	9,96	11,75	4,56	7,7	8,49
4	D	101	98	100	114	103,25	6,62	10	8,27	6,6	7,87
5	D	41	95	99	98	83,25	12,4	11,02	19,81	14,02	14,31
6	D	78	83	97	80	84,50	11,28	19,87	5,37	8,8	11,33
7	D	99	106	114	88	101,75	10,3	11,28	10,25	11,07	10,73
8	D	7	6	17	8	9,50	2,34	6,78	12,98	14,56	9,17
9	D	114	86	94	101	98,75	11,03	9,25	8,89	7,25	9,11
10	D	98	114	101	99	103,00	10,67	7,65	7,12	8,36	8,45
11	D	111	99	105	97	103,00	7,67	5,68	15,67	7,11	9,03
12	D	101	115	42	97	88,75	3,76	8,9	13,87	14,67	10,30
1	E	11	30	17	9	16,75	6,67	4,58	8,9	9,11	7,32
2	E	47	99	117	122	96,25	6,6	10,78	8,74	4,12	7,56
3	E	100	102	115	118	108,75	7,01	6,99	12,46	6,97	8,36
4	E	2	6	11	0	4,75	2,44	3,87	5,55	0	2,97
5	E	99	111	119	128	114,25	12,78	14,56	7,9	10,88	11,53
6	E	111	107	94	121	108,25	6,33	10	7,89	11,34	8,89
7	E	99	108	115	102	106,00	6,22	11,08	10,66	6,92	8,72
8	E	126	111	108	44	97,25	12,45	10,89	9,02	7,36	9,93
9	E	131	106	118	100	113,75	8,02	7,76	15,01	10,66	10,36
10	E	3	7	10	2	5,50	2,34	6,1	2,96	7,25	4,66
11	E	125	109	117	104	113,75	6,67	12,83	9,27	10,71	9,87
12	E	51	127	119	121	104,50	6,38	6,92	8,83	5,98	7,03
1	F	5	2	11	17	8,75	11,83	10,44	7,66	10,45	10,10
2	F	123	63	99	129	103,50	9,65	14,64	8,89	10,37	10,89
3	F	7	15	9	2	8,25	3,55	16,45	3,67	2,22	6,47
4	F	119	114	100	101	108,50	10,09	11,56	9,61	11,34	10,65
5	F	132	129	117	99	119,25	11,98	11,03	10,48	8,99	10,62
6	F	101	127	130	119	119,25	10,22	7,87	9,63	11,27	9,75
7	F	40	115	111	100	91,50	9,98	11,47	10,02	9,99	10,37
8	F	111	127	115	120	118,25	7,89	10,25	9,08	7,23	8,61
9	F	3	11	21	10	11,25	4,33	6,5	2,21	7,2	5,06
10	F	119	126	137	107	122,25	10,9	11,55	9,25	6,99	9,67
11	F	120	99	118	73	102,50	9,75	10,55	7,71	11,98	10,00
12	F	114	100	138	125	119,25	9,65	4,79	8,88	10,93	8,56

Quadro 10: Representação do resultado da análise histológica do MTCD, realizada com o Image Pro Plus 4.5 ®.

RATO	GRUPO	FIBRAS MUSCULARES/CAMPO				NÚMERO MÉDIO	DIÂMETRO MÉDIO DE FIBRAS/ CAMPO				DIÂMETRO MÉDIO
		CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4		CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4	
1	A	17	18	14	19	17,00	55,71	60,44	44,88	50,03	52,77
2	A	13	17	17	22	17,25	41,55	44,12	38,55	29,56	38,45
3	A	18	18	15	22	18,25	38,88	42,43	49,98	56,27	46,89
4	A	17	21	28	14	20,00	33,47	22,56	29,17	40,09	31,32
5	A	22	20	19	18	19,75	52,67	59,34	61,03	48,81	55,46
6	A	14	12	14	27	16,75	33,57	39,66	47,43	50,02	42,67
7	A	19	18	19	19	18,75	29,2	33,12	33,49	45,76	35,39
8	A	17	13	25	19	18,50	36,3	39,98	46,34	54,43	44,26
9	A	22	29	21	20	23,00	51,52	57,09	63,88	49,9	55,60
10	A	22	18	17	14	17,75	67,33	44,76	49,17	50,05	52,83
11	A	22	21	24	20	21,75	33,48	39,9	31,16	44,67	37,30
12	A	22	23	21	20	21,50	44,6	23,23	48,65	44,12	40,15
1	B	14	17	22	8	15,25	26,55	22,17	26,99	14,33	22,51
2	B	22	13	19	11	16,25	27,75	31,99	14,55	30,06	26,09
3	B	14	18	22	14	17,00	11,56	32,89	21,11	27,86	23,36
4	B	14	17	14	7	13,00	18,76	34,66	23,11	22,88	24,85
5	B	18	22	14	22	19,00	29,08	33,78	42,19	18,95	31,00
6	B	17	14	18	16	16,25	17,56	43,22	13,28	11,42	21,37
7	B	19	19	17	14	17,25	22,76	23,67	19,45	21,03	21,73
8	B	25	17	19	22	20,75	21,72	17,76	19,45	20,03	19,74
9	B	21	22	7	16	16,50	12,87	28,75	23,91	27,76	23,32
10	B	17	11	29	28	21,25	23,98	27,55	32,89	21,83	26,56
11	B	24	22	26	25	24,25	11,17	19,76	10,76	16,88	14,64
12	B	21	22	29	28	25,00	15,54	23,87	15,34	19,09	18,46
1	C	14	12	14	17	14,25	44,65	52,67	50,03	50,88	49,56
2	C	19	18	19	19	18,75	32,44	33,57	29,56	15,62	27,80
3	C	17	13	25	19	18,50	19,44	29,2	56,27	55,71	40,16
4	C	22	29	21	20	23,00	48,81	36,3	40,09	41,55	41,69
5	C	22	18	17	14	17,75	50,02	51,52	48,81	38,88	47,31
6	C	22	21	24	20	21,75	21,88	32,54	42,19	18,95	28,89
7	C	22	23	21	20	21,50	54,43	33,48	45,76	52,67	46,59
8	C	14	17	22	8	15,25	49,9	44,6	19,44	33,57	36,88
9	C	22	13	19	11	16,25	19,96	35,66	23,12	22,02	25,19
10	C	14	18	22	14	17,00	44,67	52,56	60,44	36,3	48,49
11	C	14	17	14	9	13,50	20,76	30,99	19,35	31,96	25,77
12	C	14	17	22	8	15,25	39,66	44,88	42,43	45,76	43,18
1	D	22	13	19	11	16,25	33,12	38,55	22,56	54,43	37,17
2	D	14	18	22	14	17,00	12,56	39,89	29,11	27,81	27,34
3	D	14	27	14	13	17,00	57,09	29,17	39,66	50,05	43,99
4	D	18	22	14	22	19,00	44,76	61,03	33,12	44,67	45,90
5	D	17	14	18	16	16,25	39,9	47,43	39,98	44,12	42,86
6	D	19	19	17	14	17,25	23,23	33,49	57,09	39,66	38,37
7	D	25	17	19	22	20,75	50,03	46,34	44,76	33,12	43,56
8	D	21	22	7	16	16,50	17,56	40,22	13,28	18,42	22,37
9	D	18	27	29	28	25,50	56,27	47,43	23,23	57,09	46,01
10	D	24	31	17	25	24,25	40,09	33,49	50,03	44,76	42,09
11	D	21	22	29	28	25,00	48,81	46,34	29,56	44,76	42,37
12	D	14	12	14	17	14,25	51,52	63,88	56,27	39,9	52,89
1	E	19	18	19	19	18,75	23,11	22,88	27,75	31,99	26,43
2	E	17	13	25	19	18,50	33,48	50,03	48,81	50,03	45,59
3	E	22	29	21	20	23,00	44,6	29,56	50,02	29,56	38,44
4	E	22	18	17	14	17,75	23,67	19,45	19,44	29,2	22,94
5	E	22	21	24	20	21,75	52,56	40,09	54,43	40,09	46,79
6	E	11	13	19	22	16,25	30,02	48,81	49,9	48,81	44,39
7	E	22	20	19	18	19,75	44,88	51,52	50,05	51,52	49,49
8	E	14	12	14	25	16,25	61,03	33,66	44,67	55,71	53,80
9	E	19	18	19	19	18,75	47,43	29,56	44,12	41,55	40,67
10	E	17	13	25	19	18,50	19,87	28,75	24,91	27,76	25,32
11	E	22	31	21	20	23,50	46,34	40,09	39,66	33,47	39,89
12	E	22	18	16	14	17,50	63,88	48,81	53,27	52,67	54,66
1	F	22	21	24	20	21,75	20,55	23,33	26,99	17,32	22,05
2	F	22	23	21	20	21,50	31,16	55,71	29,45	29,2	36,38
3	F	14	17	22	8	15,25	12,54	23,87	19,34	21,85	19,40
4	F	17	13	25	19	18,50	46,34	38,88	29,44	41,55	39,05
5	F	22	29	21	33	26,25	63,88	33,47	66,73	38,88	50,74
6	F	22	18	17	14	17,75	49,17	52,67	33,55	33,47	42,22
7	F	22	21	24	20	21,75	31,16	48,65	39,99	52,67	43,12
8	F	22	23	21	20	21,50	48,65	46,34	60,02	33,57	47,15
9	F	14	17	22	8	15,25	19,45	21,03	20,11	14,88	18,87
10	F	22	13	19	26	20,00	50,05	49,17	29,44	36,3	41,24
11	F	14	30	14	17	18,75	44,67	31,16	66,73	51,52	48,52
12	F	22	13	27	26	22,00	44,12	40,07	52,67	67,33	51,05

Gráfico 11: Número médio de fibras do MTCE, por campo, nos animais em estudo.

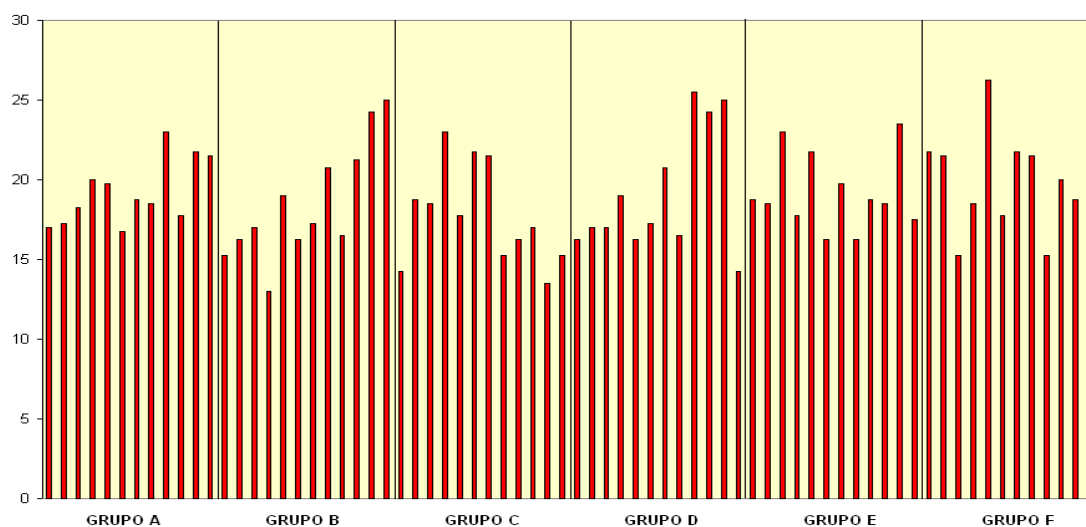
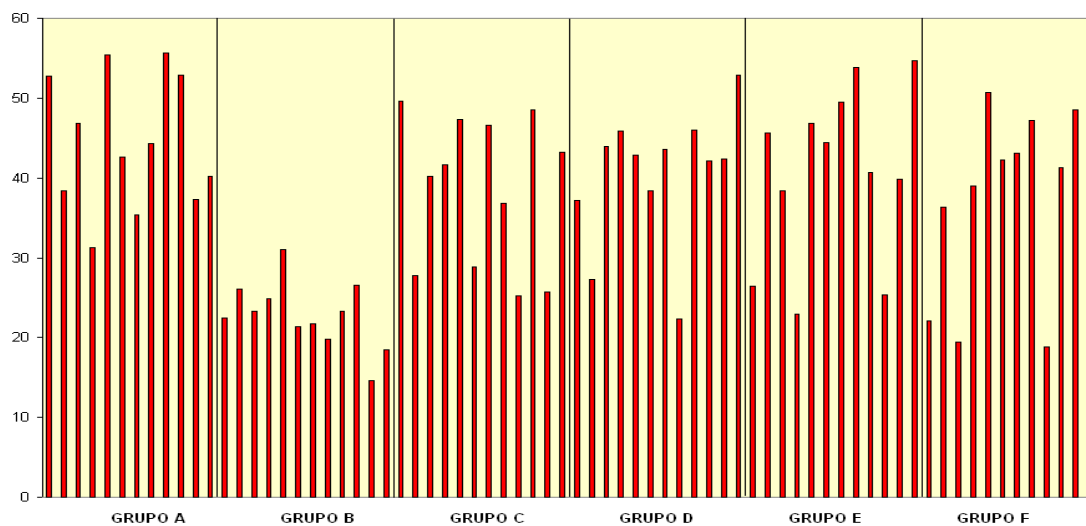


Gráfico 12: Diâmetro médio de fibras do MTCE, por campo, nos animais em estudo.



11 - APÊNDICE

DECLARAÇÃO

Declaro que o artigo intitulado **Nerve growth factor with fibrin glue in end-to-side nerve repair in rats** dos autores **Daniel Nunes e Silva; Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva; Ricardo Dutra Aydos; Fausto Viterbo; Elenir Rose Jardim Cury Pontes; Danilo Nakao Odashiro; Rafael José de Castro; Diogo Gomes Augusto**, foi aceito e está programado para o fascículo de abril de 2012 da Revista ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA.

Prof. Saul Goldenberg

Editor

Acta Cir Bras