Daniel Nunes e Silva

ANASTOMOSE NERVOSA TÉRMINO–LATERAL UTILIZANDO COLA DE FIBRINA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

CAMPO GRANDE

2008

Daniel Nunes e Silva

ANASTOMOSE NERVOSA TÉRMINO–LATERAL UTILIZANDO COLA DE FIBRINA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA:
Profa. Dra. Andréia Brochado Antoniolli da Silva

CAMPO GRANDE

2008

Daniel Nunes e Silva

ANASTOMOSE NERVOSA TÉRMINO–LATERAL UTILIZANDO COLA DE FIBRINA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

ORIENTADORA:
Profa. Dra. Andréia Brochado Antoniolli da Silva

CAMPO GRANDE

2008

Nunes e Silva, Daniel
Anastomose nervosa término-lateral utilizando cola de fibrina. Estudo experimental em ratos. — Campo Grande, 2008.
xvii. 52p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste.

End-to-side nerve repair with fibrin glue. Experimental study in rats.

1. Sutura. 2. Cola de fibrina. 3. Microcirurgia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

COORDENADOR: **PROF. DR. RICARDO DUTRA AYDOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO GRANDE, 29 DE AGOSTO DE 2008.

AUTOR:
Daniel Nunes e Silva

ORIENTADORA:
Profa. Dra. Andréia Brochado Antoniolli da Silva

TÍTULO:
Anastomose nervosa término-lateral utilizando cola de fibrina. Estudo experimental em ratos.

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

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

Prof. Dr. Carlos Henrique Marques dos Santos
Professor Assistente do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS

MEMBRO SUPLENTE:
Profa. Dra. Iandara Schettert Silva
Professora Assistente da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMS

“Os homens são sábios não na proporção de sua experiência,
mas na sua capacidade para a experiência”

Bernard Shaw

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos
JAIME E JOANA,
os reais e melhores motivos de tudo isso.

A minha esposa
CÍNTIA,
companheira de todos os momentos e
base da nossa família.

A minha família,
SIDNEI, ROSAURA E CECÍLIA,
que me ensinaram a
buscar sempre o máximo.

A meus sogros,
JAIME E IVONE,
que apoiaram o difícil sonho de
construirmos nosso futuro no Centro-Oeste.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

AGRADECIMENTOS

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL** (UFMS), pelo apoio efetivo na realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. **RICARDO DUTRA AYDOS**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, que nos apresentou o curso e nos permitiu integrá-lo.

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

Ao Prof. Dr. **PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO**, Professor Associado do Departamento de Fisioterapia da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP).

Ao Prof. Dr. **ALEXANDRE NAKAO ODASHIRO,** Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da UNIDERP, pela preparação e análise morfológica das lâminas.

Ao Prof. **FABRÍCIO DE OLIVEIRA FRAZÍLIO,** Professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIDERP, pelo apoio na realização do experimento cirúrgico.

À Profa. **JULICE COELHO**, Professora Adjunta da Faculdade de Fisioterapia da UNIDERP, pela importante participação na realização deste estudo.

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.

À Profa. Dra. **REGINA MARIA PAPAIS ALVARENGA**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), que proporcionou as bases técnicas e anatômicas para a realização inicial desta dissertação.

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

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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do desenho do estudo..... 14

Figura 2 Fotografia demonstrando a dissecção trans-operatória, identificando o nervo ciático e seus ramos terminais..... 15

Figura 3 Fotografia do trans-operatório de um animal do grupo B, no qual não foi realizada anastomose nervosa..... 16

Figura 4 Fotografia do trans-operatório de um animal do Grupo C..... 17

Figura 5 Fotografia da medição das pegadas dos animais no teste de marcha..... 18

Figura 6 Representação esquemática das peças anatômicas retiradas dos animais no nonagésimo dia do estudo..... 20

Figura 7 Representação esquemática dos locais de secção nervosa para estudo histológico..... 21

Figura 8 Aspecto das pegadas de três animais do grupo A, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo..... 24

Figura 9 Aspecto das pegadas de três animais do grupo B, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo..... 24

Figura 10 Aspecto das pegadas de três animais do grupo C, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo..... 24

Figura 11 Aspecto das pegadas de outros seis animais do grupo C, no nonagésimo dia do estudo..... 25

Figura 12 Comparação entre as pegadas dos grupos A, B e C no primeiro e segundo teste de marcha..... 25

Figura 13 Fotomicrografia da histologia do nervo fibular dos animais 4 (A) e 7 (B) do grupo A. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x)..... 27

Figura 14 Fotomicrografia da histologia do nervo fibular dos animais 2 (C) e 11 (D) do grupo B. Com a utilização do programa *Image Pro Plus 4.5* ®, não foram identificados axônios mielinizados nestes campos. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x)..... 28

Figura 15 Fotomicrografia da histologia do nervo fibular dos animais 9 (E) e 10 (D) do grupo C. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados regenerados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x)..... 28

Figura 16 Fotomicrografia da histologia do nervo fibular de outros dois animais do grupo C: rato 5 (G) e 15 (H). As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados regenerados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento de 400X)..... 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise estatística do peso médio dos animais, no primeiro e no nonagésimo dia do estudo (g)..... 23

Tabela 2 Análise dos valores médios dos índices obtidos no teste de marcha, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo..... 26

Tabela 3 Representação dos valores das médias do número e do diâmetro dos axônios por campo, nos Grupos A, B e C, no 90° dia do estudo..... 29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Peso (g) dos animais dos grupos A, B e C, no primeiro e no nonagésimo dia do estudo..... 23

Gráfico 2 Resultado dos testes de marcha no trigésimo e nonagésimo dia do estudo..... 27

Gráfico 3 Análise morfométrica dos animais dos grupos A, B e C, no nonagésimo dia do estudo (número e diâmetro médio de axônios por campo)..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATL: anastomose término-lateral
ATT: anastomose término-terminal
HE: hematoxilina-eosina
IF: índice fibular
ITS: afastamento intermediário dos dedos
MPD: membro pélvico direito
MPE: membro pélvico esquerdo
NTL: neurorrafia término-lateral
NTT: neurorrafia término-terminal
PL: tamanho da pegada
PLF: fator de tamanho da pegada
SFI: índice de função ciática
TS: afastamento dos dedos
TST: afastamento relativo dos dedos
UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UNIDERP: Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal
UNIRIO: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

RESUMO

Introdução: A realização da anastomose nervosa término-lateral (ATL) com cola de fibrina é considerada controversa na literatura. Poucos estudos experimentais estão disponíveis sobre o tema. Apesar disso, há relatos de sua utilização clínica com sucesso. Os principais questionamentos referem-se aos mecanismos de brotamento axonal a partir da face lateral de um nervo íntegro.
Objetivo: O objetivo deste trabalho é estudar a regeneração axonal após ATL com cola de fibrina, em ratos.
Método: Foram utilizados 45 ratos Wistar distribuídos em três grupos: os animais do grupo A (n=15) não foram submetidos à secção nervosa (grupo controle); os animais do grupo B (n=15) foram submetidos apenas à secção do nervo fibular, sem posterior reanastomose; e os animais do grupo C (n=15) foram submetidos à secção do nervo fibular e à ATL - sem abertura epineural - com cola de fibrina no nervo tibial. Posteriormente os animais foram submetidos a dois testes de marcha (30 e 90 dias) e à análise morfométrica (90 dias) por meio da aferição do número e diâmetro axonal por campo.
Resultados: A análise estatística dos testes de marcha demonstrou que o grupo A não apresentou alteração no padrão de caminhada durante o estudo ($p>0,05$). O grupo B apresentou prejuízo motor no primeiro e no segundo teste ($p>0,05$). O grupo C apresentou um padrão de atrofia no primeiro teste, com recuperação da marcha no segundo teste ($p<0,05$). Na análise morfométrica, o grupo C apresentou regeneração axonal significativamente superior ao grupo B ($p<0,05$).
Conclusão: A ATL realizada com cola de fibrina resultou em regeneração axonal no rato, demonstrada tanto histologicamente quanto funcionalmente.
Descritores: Sutura, cola de fibrina, microcirurgia.

ABSTRACT

Background: The effectiveness of end-to-side nerve repair with fibrin glue persists controversial in medical literature. Few experimental studies are available. The technique is currently being used clinically but the mechanisms behind this technique are essentially unknown.
Objective: This study was undertaken to evaluate axonal regeneration after end-to-side nerve repair with fibrin glue in rats.
Method: Forty-five Wistar rats were divided into three groups: group A (n=15), were not submitted to surgery (control group); group B (n=15) were submitted to fibular transection without repair; and group C (n=15), were submitted to fibular transection with end-to-side nerve anastomosis with fibrin glue, in the lateral surface of an intact tibial nerve (without epineural window). The three groups were submitted to walking track (30 and 90 days) and posterior morphometrical analysis (90 days) by the axonal number and diameter measurement.
Results: The functional tests demonstrated that there was no difference in the walking track during the study in group A ($p>0,05$). The group B had walking pattern impairment in the two tests ($p>0,05$). The group C had walking pattern impairment in the first test, with important recovery in the second test ($p<0,05$). The morphometrical assessment revealed significantly higher number of regenerated mielinates axons in group C, compared to group B ($p\leq0,05$).
Conclusion: The end-to-side nerve repair with fibrin glue shows axonal recovery, demonstrated through functional and morphometrical ways in rats.
Key words: suture; fibrin glue; microsurgery.

ÍNDICE

01	INTRODUÇÃO	01
02	OBJETIVOS	04
03	REVISÃO DA LITERATURA	05
04	MÉTODO	13
05	RESULTADOS	23
06	DISCUSSÃO	30
07	CONCLUSÃO	38
08	REFERÊNCIAS	39
09	NORMAS ADOTADAS	46
10	ANEXOS	47

1 - INTRODUÇÃO

A cirurgia dos nervos periféricos continua em franca evolução. Recentemente, melhores resultados vêm sendo obtidos a partir do aprimoramento da técnica operatória, dos equipamentos microcirúrgicos e do maior entendimento dos aspectos envolvidos na regeneração axonal[1-4]. No entanto, mesmo em condições ideais, os resultados pós-operatórios são muitas vezes imprevisíveis e freqüentemente relatados como desapontadores[5-10]. Em busca de maiores índices de sucesso, vários estudos têm sido delineados, sendo que a necessidade de alternativas técnicas mais eficazes é reconhecida há anos[10-13].

Um dos principais focos de pesquisas é o desenvolvimento de produtos ou técnicas que evitem ou minimizem o uso de suturas nas anastomoses nervosas, prevenindo o surgimento de fibrose no reparo nervoso[4,6,10,14,15]. Um ponto anastomótico rico em fibrose pode determinar um bloqueio à regeneração neuronal, comprometendo conseqüentemente a recuperação e o prognóstico do paciente[16].

Desde as primeiras publicações sobre reparo nervoso, a neurorrafia término-terminal (NTT), tem sido o método mais utilizado, sendo considerada o "padrão-ouro" pela maioria dos autores[2-4,7,10,15,17]. No entanto, o trauma pela inserção da agulha e a formação de granuloma tipo corpo estranho são freqüentemente relatados, principalmente em nervos de pequeno calibre[17-19]. O material de sutura constitui ainda um obstáculo às fibras em regeneração, devido à proliferação de tecido conjuntivo no ponto anastomótico[11,16]. Outros fatores prejudiciais são o tempo cirúrgico prolongado - principalmente em reconstruções múltiplas e após traumas extensos - e a excessiva manipulação nervosa durante a cirurgia[5,16]. Além disso, a necessidade da utilização de microscópio e material específico de microcirurgia, que são de alto custo e não estão disponíveis em todas as instituições, associada à exigência de um treinamento longo e contínuo do microcirurgião e de sua equipe, restringem a realização deste procedimento a centros especializados[5,11].

Na tentativa de minimizar algumas das dificuldades da microsutura, passou-se a estudar o papel da cola de fibrina neste processo. Atualmente, ela

é considerada uma excelente alternativa à NTT[4-6,11,15,17-23]. Sua utilização é atraumática, minimizando consideravelmente a fibrose no ponto anastomótico[6,18-20,23]. A cola de fibrina permite a realização da intervenção em condições locais desfavoráveis, reduz o tempo cirúrgico e ainda pode dispensar o microscópio[4,6,20,23]. Alguns autores acreditam que a cola de fibrina possibilite um maior alinhamento das fibras nervosas, com conseqüente melhor taxa de regeneração axonal, melhor velocidade de condução e maior amplitude de onda, determinando melhores resultados em anastomoses término-terminais (ATT)[5,6,11,17,19,21].

Apesar das amplas indicações da ATT – com microsutura ou cola de fibrina – ela não pode ser indicada em todos os casos[3,7,18,21]. Em determinadas situações, como nas perdas de substância nervosa ou quando o coto nervoso proximal não está disponível, a ATT não é factível[24,25]. Nestes casos, a opção freqüentemente utilizada é o enxerto nervoso[7,18]. No entanto, os enxertos não constituem a melhor escolha para todos os pacientes[3,10]. Eles apresentam resultados clínicos variáveis, dependem da qualidade do leito receptor e acrescentam uma morbidade significativa ao procedimento cirúrgico[7]. O enxerto autógeno tem ainda fonte doadora limitada e acaba por determinar uma seqüela sensitiva ou motora no paciente[3,10].

Para estes casos em que o coto nervoso proximal não está disponível para a realização de uma ATT e a realização de uma enxertia nervosa é temerária ou não se enquadra como primeira indicação, uma alternativa é a neurorrafia término-lateral (NTL)[3,7,8,10,12,18,26-28].

Viterbo[29] reascendeu o interesse sobre o tema a partir de uma modificação na técnica clássica da NTL em 1992. O autor obteve regeneração nervosa após uma NTL com preservação do epineuro. Seus achados repercutiram internacionalmente, tornando-se grande fonte de pesquisa[9,18,28,30-36]. No entanto, após diversas publicações recentes com resultados conflitantes[3,7,10,25,37-41], o real papel da técnica de Viterbo permanece sendo questionado.

Por exigir microneurorrafias, a NTL de Viterbo apresenta as mesmas desvantagens referidas ao método tradicional como o trauma local, a formação de granulomas, a dificuldade técnica, o tempo cirúrgico prolongado e a

exigência de material específico[18]. Estes aspectos poderiam justificar alguns insucessos com a técnica e os elementos contraditórios na literatura.

A comprovação de que a cola de fibrina poderia ser utilizada com sucesso em uma anastomose nervosa término-lateral (ATL) determinaria um grande avanço para a microcirurgia. Se comprovada sua funcionalidade, os benefícios das duas técnicas seriam somados: a morbidade do procedimento seria minimizada, a realização seria facilitada, o tempo e o custo cirúrgico seriam reduzidos e os resultados potencialmente melhorados.

Em revisão sistemática da literatura, nas bases de dados do *Medline* e *LILACS*, no tocante a realização de ATL com cola de fibrina, foram encontrados apenas quatro estudos com resultados divergentes[10,12,18,42]. Diante do exposto, entende-se a relevância e a necessidade de mais estudos sobre o tema.

2 - OBJETIVOS

2.1 - GERAL

Estudar a anastomose nervosa término-lateral, utilizando a cola de fibrina, em ratos.

2.2 - ESPECÍFICOS

1 – Estudar a morfologia da anastomose nervosa término-lateral, realizada com cola de fibrina, em ratos;

2 – Estudar a função motora de ratos submetidos à anastomose nervosa término-lateral, realizada com cola de fibrina.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – A LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO

Os nervos periféricos são formados basicamente por axônios e células de Schwann, circundados pela membrana basal[10]. Cada axônio é cercado por fibras de colágeno chamadas de endoneuro – que é elástico e resistente, protegendo a fibra nervosa[37]. Um conjunto de fibras nervosas agrupadas forma os fascículos, envoltos pelo perineuro[10]. O perineuro é circundado por um tecido conjuntivo espesso chamado de epineuro[37]. O epineuro divide-se em interno e externo. O epineuro interno preenche o espaço entre os fascículos, funcionando como um amortecedor, o externo recobre o nervo[10].

A lesão em um nervo periférico é classificada de acordo com o prejuízo estrutural sofrido, com a repercussão funcional e com a capacidade de regeneração nervosa[10,28].

Segundo Sato[10] e Mattar[37], Seddon classificou as lesões nervosas em três tipos: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. A neuropraxia é o grau mais leve de lesão, caracterizada pela manutenção da estrutura do nervo, apesar da condução axonal ser interrompida temporariamente[37]. A axoniotmese é caracterizada pela interrupção do axônio, não havendo, no entanto, lesão no perineuro e epineuro[10]. Assim, há preservação da continuidade anatômica do nervo[37]. Ocorre a degeneração walleriana, porém com um bom prognóstico. Na neurotmese, o grau mais importante de lesão, ocorre uma ruptura completa das estruturas do nervo. Não há mais a continuidade do epineuro, não havendo, desta forma, possibilidade de regeneração sem intervenção do microcirurgião[37].

Sato[10] e Mattar[37] também referem que Sunderland classificou as lesões dos nervos periféricos em cinco graus, dependendo do comprometimento anatômico. A lesão grau I é a neuropraxia de Seddon; a lesão grau II é aquela em que ocorre a disjunção axonal completa com degeneração walleriana, 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 perinerual; e a lesão grau V é a neurotmese de Seddon[10,37].

3.2 – A REGENERAÇÃO AXONAL APÓS A LESÃO NERVOSA

A secção determina importantes alterações na estrutura do nervo. O segmento distal é submetido a um processo de degeneração, descrito em 1850 por Augustus Waller e conhecido até hoje como degeneração walleriana[37]. Os neurofilamentos e microtúbulos do axoplasma são proteolisados e o restante do axônio é digerido por ação de macrófagos e células de Schwann[10]. O tubo endoneural fica vazio, a espera do axoplasma em regeneração[28,37].

Os macrófagos e as células de Schwann passam a sintetizar então os fatores de crescimento nervosos[10]. As células de Schwann estimulam a formação das colunas de Bügner, fundamentais para o crescimento orientado dos brotos nervosos[28,37]. A partir deste conjunto de fatores, passa-se a produzir o axoplasma necessário para permitir uma regeneração axonal de cerca de 1 a 2 mm por dia[10,28,37].

3.3 – AS ANASTOMOSES NERVOSAS

A recuperação funcional satisfatória, após a lesão de um nervo periférico, depende de vários aspectos, que envolvem uma complexa cadeia de eventos moleculares, celulares, bioquímicos e eletrofisiológicos[3,9,36]. Uma anastomose nervosa de qualidade é citada como componente fundamental deste processo, pois permite que os axônios em regeneração encontrem o coto distal, a partir do correto alinhamento de seus fascículos nervosos[11,28]. Uma reparação nervosa rica em fibrose pode determinar um bloqueio à regeneração neuronal, comprometendo, conseqüentemente, a recuperação e o prognóstico do paciente[16].

3.3.1 – A NEURORRAFIA TÉRMINO-LATERAL

A origem da NTL é controversa e paira sobre diversos autores[43]. Os primeiros estudos foram realizados por Letievant, em 1873, Huber, em 1895 e Kennedy, em 1899[10,43]. No entanto, a maioria dos autores[10,43] credita a autoria à Ballance, *et al*[1]. em 1903.

No intuito de recuperar os movimentos de uma hemi-face paralisada, Ballance, *et al*[1]. realizaram uma NTL, suturando o nervo facial na porção lateral do nervo espinhal acessório, após ter confeccionado uma abertura no epineuro (janela epineural). Ballance, *et al*[1]. referiram a reanimação da face simultaneamente à realização de movimentos com os ombros[1]. No entanto, devido à difícil confirmação e reprodução experimental de seus resultados na época, a NTL de Ballance não manteve muitos seguidores[2,3].

Em 1992, Viterbo propôs uma modificação pontual na NTL[24,29]. Mantendo o epineuro intacto, o autor demonstrou experimentalmente, pela primeira vez, a ocorrência de regeneração nervosa por meio de uma NTL. Ele obteve sucesso ao suturar um nervo lesado à superfície lateral de um nervo íntegro - sem janela epineural[29]. Assim, Viterbo[24] demonstrou que a integridade do epineuro não impedia a regeneração axonal. Ao não confeccionar a janela epineural, ele diminuiu consideravelmente a lesão do nervo doador, um dos principais problemas creditados à NTL de Ballance[44]. A morbidade da NTL foi minimizada, as indicações foram ampliadas, a realização técnica foi facilitada e o tempo cirúrgico foi reduzido[7,8,18,44]. O período de recuperação tornou-se mais curto, principalmente para nervos motores, uma vez que a neurorrafia pôde ser realizada próxima à região afetada[7,8]. Eliminou-se também, em determinadas situações, a necessidade de enxertia nervosa[7,18]. Basicamente, Viterbo transformou todos os nervos periféricos em potenciais doadores de axônios[28,29].

Mais tarde, Hayashi, *et al.*[36] e Zhang, *et al.*[45] confirmaram histologicamente que a reinervação do nervo lesado (receptor) dava-se pelo brotamento de axônios a partir do nervo íntegro (doador). As neurotrofinas, como os fatores de crescimento nervosos, fator de crescimento tipo-insulina e os fatores de crescimento dos fibroblastos, assim como os fatores produzidos

pelas células de Schwann, associados com o contato físico no ponto anastomótico, seriam os responsáveis pela viabilização do brotamento axonal[28,36,45].

Os achados de Viterbo repercutiram intensamente na literatura, determinando o surgimento de novas linhas de pesquisa sobre o assunto[28]. Vários autores confirmaram experimentalmente a validade da NTL de Viterbo, entre eles destacam-se Liu, *et al.*[3], Pardini, *et al.*[7], Robillard, *et al.*[9], Samii, *et al.*[12], Mueller[18], Zhao, *et al.*[30], Lundborg, *et al.*[31], Ross, *et al.*[32], Noah, *et al.*[33,34], Rosseto, *et al.*[35], Hayashi, *et al.*[36], Tarasidis, *et al.*[39,40], Zhang, *et al.*[45], Papalia, *et al.*[46], Akeda, *et al.*[47], Lykissas, *et al.*[48] e Sananpanich, *et al.*[49].

A NTL passou então a ser aplicada clinicamente por alguns autores e foi incluída no arsenal terapêutico do microcirurgião[7,8,12,26,27,50-55].

Apesar das publicações confirmando os achados de Viterbo, a NTL permanece sendo considerada controversa na literatura[10,25,55,51,56,57]. Alguns autores não conseguiram reproduzir experimentalmente ou clinicamente os achados de Viterbo[10,42,55,58]. Outros afirmam que os estudos que confirmaram a reanastomose têm problemas no desenho experimental ou na análise quantitativa do crescimento axonal[10,49,59]. Robillard, *et al.*[9] acreditam que a grande inconsistência dos achados se deva provavelmente à variação nos modelos cirúrgicos de experimentação, associado às variações nas técnicas de análise histológica e de função pós-operatória.

Há autores que contestam também a qualidade da reinervação obtida pela técnica[7,9,10,39,40,55,56]. Robillard, *et al.*[9], Sato[10] e Tarasidis, *et al.*[39,40] não consideraram a recuperação motora adequada após a NTL. Pardini, *et al.*[7], Dahlin, *et al.*[52] e Schmidhammer, *et al.*[60] consideram os resultados da NTL inferiores aos da NTT. Milesi e Schmidhammer[13] e Schmidhammer, *et al.*[60] preconizam a técnica apenas para reparação de ramos motores terminais.

Uma possível lesão ao nervo doador após a NTL também é questionada[3,7,10,34,43,57,59]. No entanto, autores como Liu, *et al.*[3], Zhang, *et al.*[38] e Lykissas, *et al.*[48] não evidenciaram prejuízo ao nervo doador.

Outra discussão presente na literatura diz respeito à adaptação cerebral dos axônios regenerados após uma NTL. Há dúvidas se a função motora, após um período de treinamento, poderia ser independente do nervo doador[3]. Barini sugeriu que a área de correspondência cerebral seria alterada pela NTL[59].

Robillard, *et al.*[9] e Hayashi, *et al.*[61] fizeram considerações semelhantes. Recentemente, Hayashi, *et al.*[61] questionaram ainda se o nervo doador poderia suprir adequadamente a inervação de órgãos-alvos diferentes.

Beris, *et al.*[27], Battiston, *et al.*[56], Kelly, *et al.*[57], Schmidhammer, *et al.*[60] e Pannucci, *et al.*[62], todos em 2007, referiram que as indicações clínicas da NTL não estão plenamente estabelecidas e que os relatos clínicos existentes são raros, variáveis e controversos. Samii, *et al.*[12], Mattar[37], Pondaag e Gilbert[55] e Bertelli e Ghizoni[58] referem que ainda são necessários mais estudos para que sejam definidos seus reais limites de utilização. Robillard, *et al.*[9] acreditam que diante das controvérsias sobre o tema e de sua relevância para a microcirurgia, é imperativo que novas pesquisas sejam realizadas.

3.4 – A COLA DE FIBRINA

A primeira descrição de um adesivo a base de fibrina foi feita por Bergel, em 1909, que desenvolveu um selante em forma de pó para hemostasia de ferimentos[63]. No entanto, somente 30 anos depois foram publicados estudos experimentais utilizando um adesivo com fibrinogênio em anastomoses de nervos periféricos[64]. A partir da década de oitenta, com o avanço nas técnicas de isolamento dos fatores de coagulação e aumento da concentração do fibrinogênio, a cola de fibrina passou a ser usada clinicamente com êxito em reconstruções de nervos periféricos[65]. Atualmente, ela é utilizada em diversas especialidades médicas[4,54,66-68].

Buscando melhores resultados na regeneração axonal, cada vez mais estudos vêm sendo desenvolvidos aplicando a cola de fibrina em anastomoses nervosas. A maior experiência clínica vem da Europa, visto que a cola de fibrina somente foi aprovada nos Estados Unidos no início dos anos noventa[15,17].

As colas biológicas podem ser derivadas dos cianoacrilatos (adesivos sintéticos), da resorcina-formaldeído, do colágeno ou da fibrina[69].

As colas sintéticas, derivadas dos cianoacrilatos ou de compostos de gelatina-resorcinol-formaldeído, apresentam desvantagens claras na aplicação para regeneração nervosa. Elas não são biocompatíveis ou biodegradáveis, induzem um processo inflamatório intenso, causando, muitas vezes, reação tipo corpo estranho, fibrose extensa ou até mesmo necrose tecidual – por liberação local de calor[70].

A cola biológica derivada da fibrina (ou do fibrinogênio) é referida, pela maioria dos autores, como cola de fibrina[18,20] e não apresenta as características indesejáveis referidas às colas sintéticas[69].

A cola de fibrina é um composto concentrado de proteínas plasmáticas humanas, apresentando altos teores de fibrinogênio, fibronectina e fator XIII da coagulação[71]. Comercialmente, ela é oferecida em dois kits e pode requer o aquecimento para a reconstituição dos componentes e sua homogeneização. Após a preparação, a cola 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[15,66,67].

A cola de fibrina é aplicada no ponto anastomótico através de uma seringa própria com duplo lúmem, que reúne os componentes e ativa sua função selante[15]. Após a aplicação, ocorre a formação de uma massa branca e elástica, com características semelhantes a um coágulo sangüíneo normal[18].

O efeito selante baseia-se na reprodução do estágio final da cascata da coagulação, onde o fibrinogênio é quebrado 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, polimerizando a fibrina, formando os coágulos estáveis com propriedades adesivas[20,66,71-73].

O metabolismo fisiológico do coágulo 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 três dias, é iniciada a reabsorção do coágulo pelos macrófagos e a neovascularização. Após quatorze dias, o coágulo apresenta-se plenamente organizado[74].

A cola de fibrina provém de vários doadores, sendo obtida a partir de plasma humano. Assim, alguns autores relataram, no passado, certa restrição

ao seu uso devido à existência teórica da possibilidade da transmissão de doenças[10,18]. 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 cola de fibrina[10,66,70].

A aceitação da cola de fibrina foi tão ampla nas ATT, que atualmente vários autores preconizam a substituição do fio de sutura pela cola de fibrina, referindo a esta melhores resultados, já que ela não determina a formação de um obstáculo para as fibras nervosas em crescimento[5,6,11,16,17,19,20,70]. Segundo vários autores[6,17,18,54,66], a técnica é ainda mais simples, rápida, barata e requer menor treinamento do cirurgião. Além disso, pode ainda ser utilizada como carreadora de fatores neurotróficos, acelerando a regeneração nervosa[54].

Há, todavia, autores que também questionam a utilização da cola de fibrina nas ATT. Relatos de melhores resultados com a utilização da neurorrafia clássica são freqüentes na literatura[19,37,54,68,74]. Matar[37] ainda refere que a cola de fibrina tem resistência à tração significativamente inferior à sutura nervosa. Segundo Rebol, *et al.*[41], a cola de fibrina apresenta menor eficiência em determinadas regiões, como, por exemplo, em anastomoses na região cervical, devido ao contato com a lisozima e a lactoferrina da saliva.

Outra desvantagem citada na literatura seria o alto custo da cola de fibrina[16]. No entanto, por dispensar grande parte do material microcirúrgico e por reduzir o tempo cirúrgico e anestésico, o uso da cola tornar-se atrativo no custo final do procedimento[10,66].

Autores como Lago, *et al.*[4], Menovsky e Beek[15] e Martins, *et al.*[17] afirmaram que mais estudos são necessários para que a cola de fibrina alcance uma posição definitiva no arsenal dos microcirurgiões.

3.5 – A ANASTOMOSE TÉRMINO-LATERAL COM COLA DE FIBRINA

O papel da cola de fibrina na ATL ainda não foi completamente estabelecido. A literatura sobre o tema é escassa e apresenta resultados divergentes.

Após revisão sistemática da literatura em língua inglesa, nas bases de dados do *Medline* e *LILACS*, utilizando as palavras chaves *end-to-side nerve repair* e *fibrin glue*, foram identificados apenas quatro estudos com resultados divergentes[10,12,18,42].

As dúvidas e incertezas sobre a NTL, somam-se aos questionamentos da aplicabilidade da cola de fibrina na ATL. No entanto, os potenciais benefícios da referida técnica justificam mais estudos sobre o tema[12,18].

4 - MÉTODO

4.1 - AMOSTRA

Foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, adultos, com idade entre 130 e 150 dias, pesando entre 275 e 294 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: A, B e C (Figura 1).

Os animais do grupo A (n=15) não foram submetidos à secção nervosa, sendo mantidos em observação e considerados o grupo controle.

Os animais do grupo B (n=15) foram submetidos à secção do nervo fibular, sem posterior reanastomose.

Os animais do grupo C (n=15) foram submetidos à secção do nervo fibular, com imediata ATL - sem abertura epineural - no nervo tibial, realizada com cola de fibrina.

4.2 - PROCEDIMENTOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética da UFMS, recebendo o número 157/2007.

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UFMS, no período de maio a dezembro de 2007.

Antes de serem submetidos ao procedimento, os animais passaram por um período de adaptação de sete dias no Laboratório de Cirurgia Experimental da UFMS. O manejo dos animais seguiu normas internacionais de conduta em laboratório experimental[75].

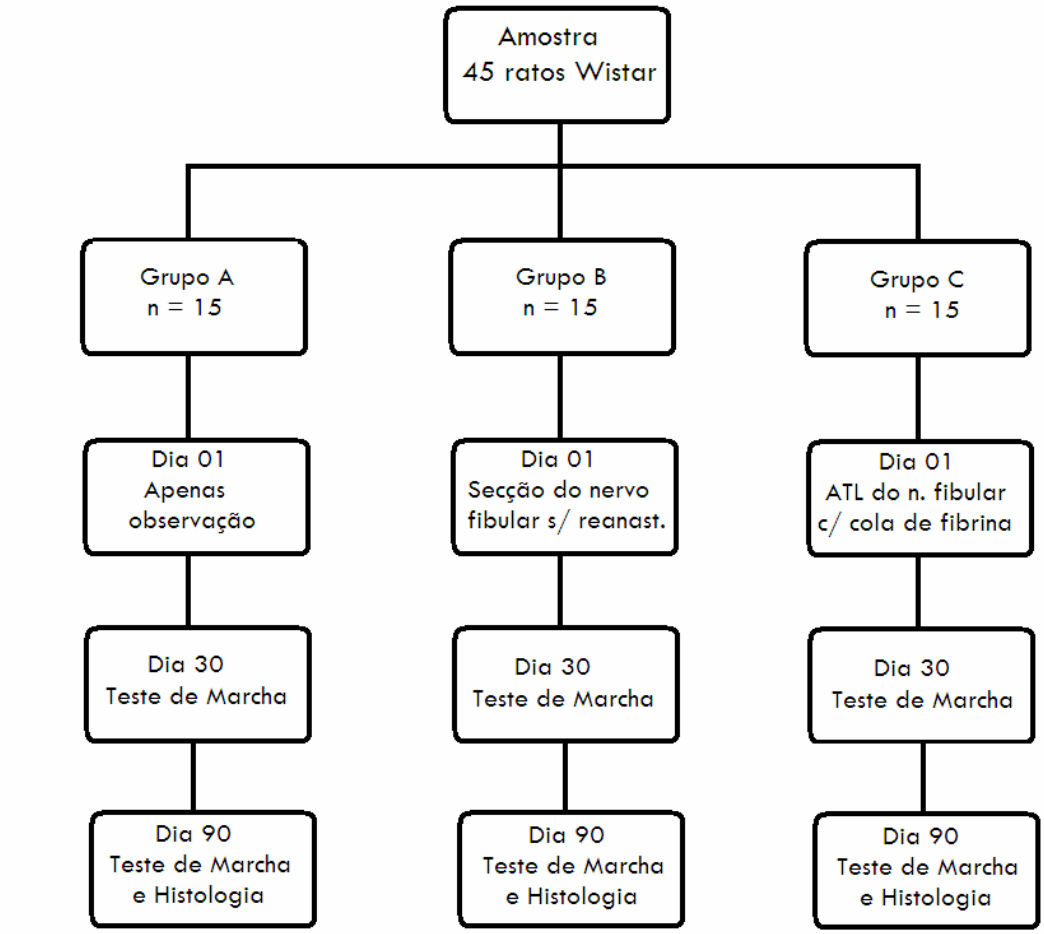

Figura 1 - Representação esquemática do desenho do estudo.

Os ratos foram alojados em caixas de polipropileno, adequadas para a espécie, com 0,15 metros quadrados, 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±1°C) mantida por ar condicionado. 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. Somente os ratos dos grupos B e C foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/kg, Laboratório *Fort Godge*, USA) e cloridrato de xylazina (50mg/kg, Laboratório *Burs Veterinary Supply*, USA), através de injeção intraperitoneal[18].

Após a obtenção do plano anestésico, procedeu-se a raspagem dos pêlos 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 anti-sepsia da região, com solução degermante de polivinilpirrolidona-iodo (*Povidine ®*), e a colocação de campo estéril fenestrado[76].

O procedimento foi realizado utilizando material de microcirurgia e lupa (*Design For Vision ®*), com aumento de quatro e meia vezes. 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 (*standard dorsal gluteal-splitting approach*)[3,17,36].

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)[4,77] (Figura 2).

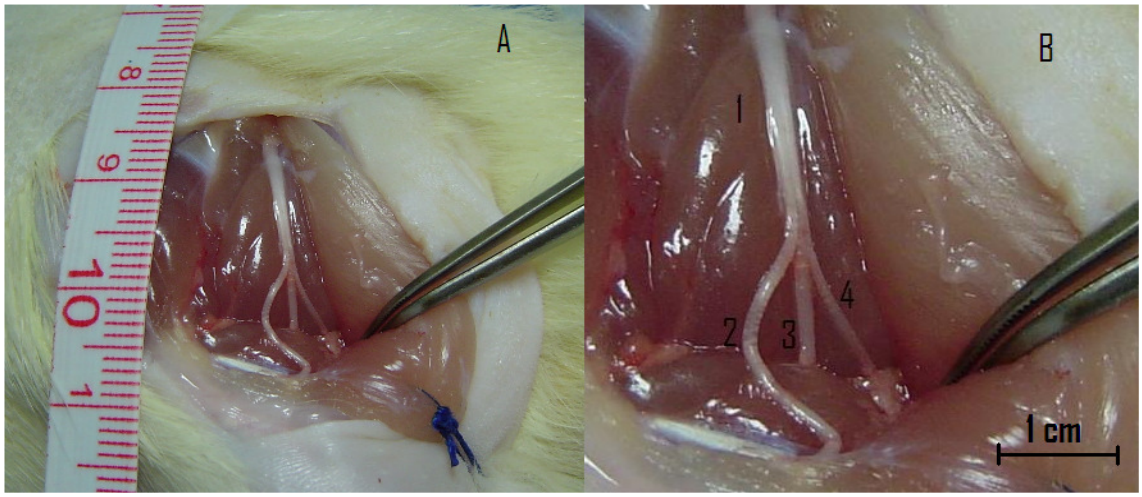

Figura 2: Fotografias demonstrando a dissecção trans-operatória, identificando o nervo ciático e seus ramos terminais. **A)** Aspecto da dissecção anatômica do MPE, após a divulsão da musculatura superficial. **B)** Identificação do nervo ciático (1), nervo fibular (2), nervo tibial (3) e nervo cutâneo caudal da sura (4).

O nervo fibular foi dissecado e seccionado transversalmente, com microtesoura, a três milímetros de sua origem no nervo ciático, gerando dois cotos nervosos[9]. O coto proximal foi curvado, em um ângulo de aproximadamente 100º, e fixado, com um ponto simples com poliamida 7.0, na musculatura abdutora, com o objetivo de evitar uma reanastomose ao acaso[3,18,44].

A partir deste momento, cada grupo foi submetido a um procedimento diferente, conforme descrição a seguir:

Os animais do grupo B não foram submetidos à reanastomose – grupo Sham (Figura 3).

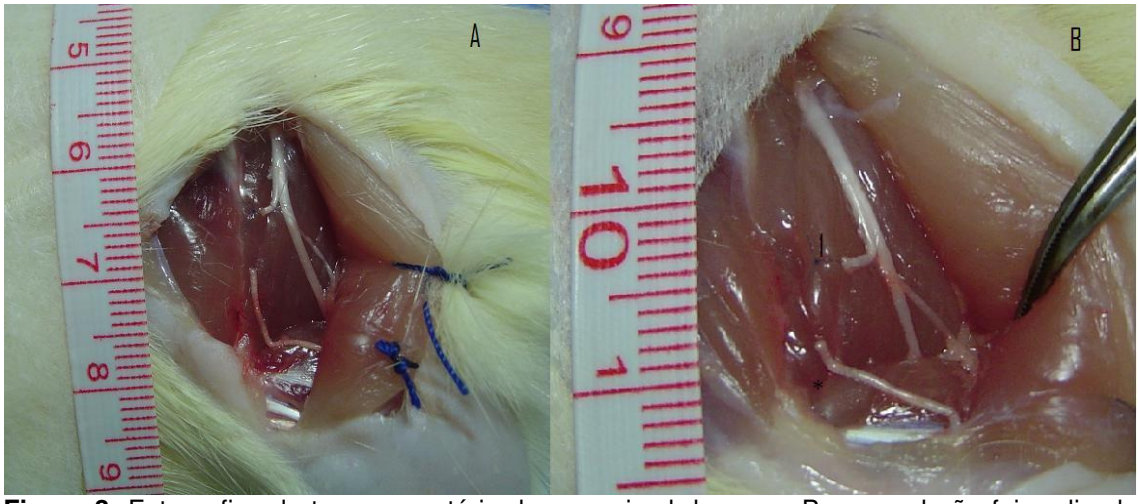

Figura 3: Fotografias do trans-operatório de um animal do grupo B, no qual não foi realizada anastomose nervosa – grupo Sham. **A)** Nervo fibular seccionado. **B)** Aspecto em detalhe, evidenciando o coto proximal do nervo fibular (1) e o coto distal (*) não submetido à reanastomose.

Os animais do grupo C foram submetidos a uma ATL com cola de fibrina. O coto distal do nervo fibular foi anastomosado à face lateral do nervo tibial, a quatro milímetros de sua origem. A anastomose foi realizada com manutenção do epineuro, conforme técnica descrita por Mueller[18], baseada na ATL de Viterbo[29]. Neste grupo, a anastomose foi realizada com cola de fibrina (*Tissucol®, Baxter AG, Viena, Áustria*) e, seguindo as orientações do fabricante, uma gota da cola foi aplicada na região da anastomose, sendo esta mantida imóvel por 30 segundos[6,11] (Figura 4).

Em seguida 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.

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

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado pelo mesmo investigador.

No trigésimo dia do estudo, iniciou-se a segunda fase do experimento: a análise da função motora, por meio do método do teste de marcha (*walking track analysis*)[4,51,78], incluindo os grupos A, B e C.

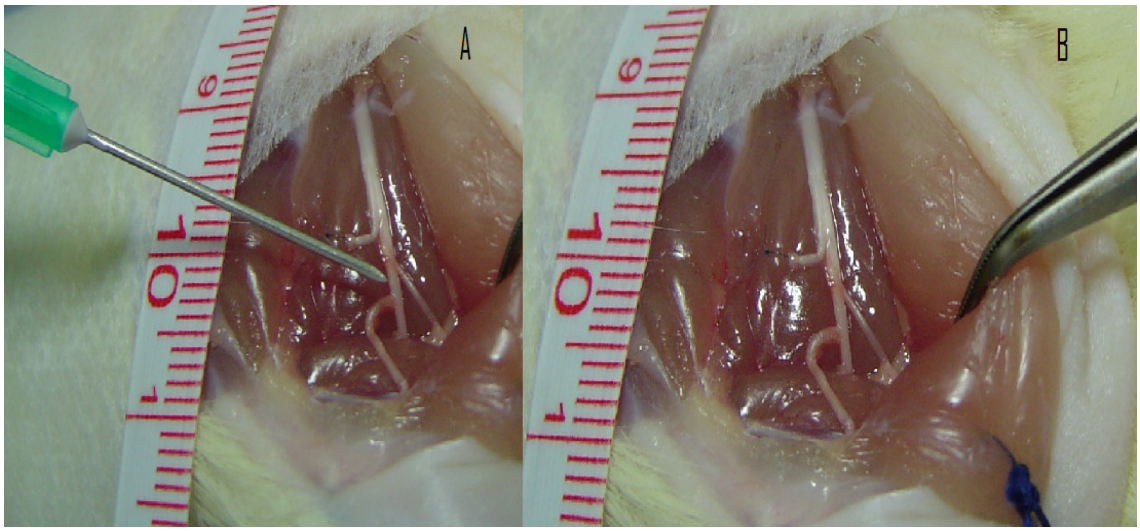

Figura 4: Fotografias do trans-operatório de um animal do Grupo C. **A)** Aplicação da cola de fibrina. **B)** Aspecto da ATL após a aplicação da cola de fibrina.

Neste teste, os animais foram colocados para caminhar em um corredor de madeira (*walking down corridor*), com 11,5 x 55 cm, com acesso a um ambiente escuro. Sobre o corredor, foi colocada uma lâmina de cartolina. Os animais tiveram suas patas traseiras pintadas e, ao caminhar, deixaram impressas suas pegadas[4,51,78].

Para cada animal, foram analisadas quatro pegadas consecutivas[5]. As medidas usadas para calcular os índices de função foram (Figura 5):

1) PL = Distância entre o tálus e a terceira falange distal (*print length*);

2) TS = Distância entre a primeira e quinta falange distal (*toe spreading*);

3) ITS = Distância entre a segunda e a quarta falange distal (*intermediary toe spreading*).

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

A partir das medições, foram calculados índices de função para determinar a recuperação motora dos animais. Os índices analisados foram o Afastamento Relativo dos Dedos (TST)[15,78], o Fator de Tamanho da Pegada (PLF)[5,9], o Índice Fibular (IF)[3,79] e o Índice de Função Ciática (SFI)[4].

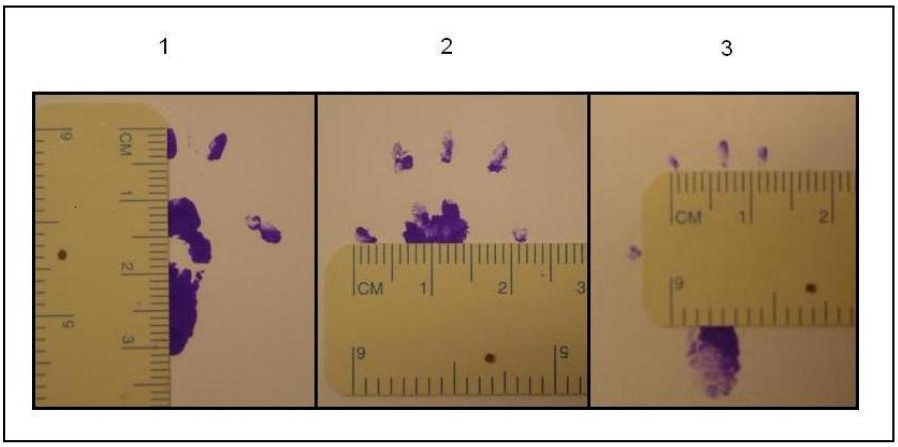

Figura 5: Fotografia da medição das pegadas dos animais no teste de marcha. **1)** Distância entre a impressão do tálus e da terceira falange distal (PL); **2)** Distância entre a impressão da primeira e quinta falange distal (TS); **3)** Distância entre a impressão da segunda e a quarta falange distal (ITS).

O TST foi calculado a partir da fórmula[15,78]:

$$TST = \frac{TSE}{TSD} * 100$$

Na interpretação do TST, a perda completa de função motora resulta em um índice menor ou igual a 30%. Uma perda de 50% da função motora correlaciona-se com um TST de 65%. Enquanto que a ausência de prejuízo motor correlaciona-se com um TST de 100%[15,78].

O PLF foi calculado a partir da fórmula[5,9]:

$$PLF = \frac{(PL\ MPE - PL\ MPD)}{PL\ MPD}$$

Na interpretação do PLF, valores próximos de zero, com 90 dias de pós-operatório, indicam função motora preservada. Quanto menor o índice, maior a perda de função[5,9].

O IF foi calculado a partir da fórmula[3]:

$$IF = 174.9 \frac{(PL\ MPE - PL\ MPD)}{PL\ MPD} + 80.3 \frac{(TS\ MPE - TS\ MPD)}{TS\ MPD} - 13.4$$

Na interpretação do IF, valores próximos de zero representam uma função normal do nervo fibular e valores próximos de -100 (menos cem) indicam disfunção completa[3,79].

O SFI foi calculado a partir da fórmula[4]:

$$SFI = -38{,}3\frac{(PL\ MPE - PL\ MPD)}{PL\ MPD} + 109{,}5\frac{(TS\ MPE - TS\ MPD)}{TS\ MPD} + 13{,}3\frac{(ITS\ MPE - ITS\ MPD)}{ITS\ MPD} - 8{,}8$$

Na interpretação do SFI, valores próximos a zero são considerados normais e os valores próximos de –100 (menos cem) indicam lesão total do nervo ou ausência de regeneração nervosa[4,78].

No 90° dia pós-operatório, iniciou-se a terceira fase do experimento.

Para critério de comparação, repetiu-se a análise da função motora – teste de marcha - com noventa dias.

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

Os animais dos três grupos foram então sacrificados com dose letal de pentobarbital sódico (75mg/kg), por meio de injeção intraperitonial[80]. Seguindo a metodologia utilizada no primeiro procedimento, realizou-se uma nova incisão, com divulsão das estruturas até a identificação da área em estudo.

Um segmento nervoso foi removido para a análise histológica, contendo a extremidade do nervo ciático, assim como um segmento com dois centímetros do nervo tibial e do nervo fibular (Figura 6).

Na posição anatômica, o material foi fixado com alfinetes em placas de isopor, sendo acondicionado em recipiente com formalina tamponada a 10%.

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

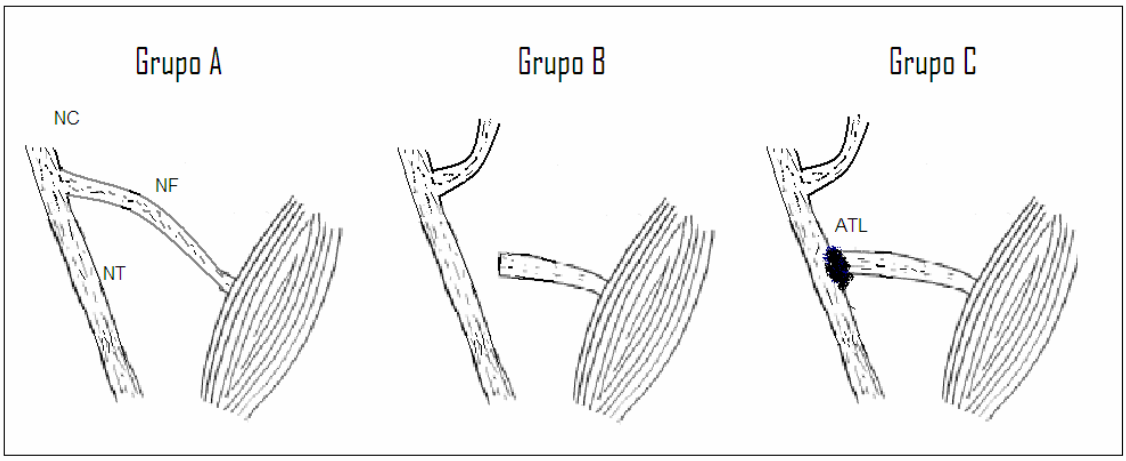

Figura 6: Representação esquemática das peças anatômicas retiradas dos animais no nonagésimo dia do estudo. Segmentos nervosos retirados dos grupos A, B e C, sendo identificados o nervo ciático (NC), nervo fibular (NF) e nervo tibial (NT). No grupo C, ATL representa a anastomose término-lateral, realizada com cola de fibrina.

4.3 - ESTUDO HISTOLÓGICO

As áreas para corte histológico foram identificadas por meio de tinta da índia para inclusão[18,81]. Conforme representado na figura 7, para a produção de lâminas, foram obtidas secções transversais no nervo fibular, a 8 mm de sua origem no grupo A, a 5 mm de seu coto distal no grupo B, e a 5 mm da ATL com o nervo tibial, no grupo C.

As amostras foram incluídas em parafina e cortadas com micrótomo – com cinco micrômetros de espessura[4,18,81]. De cada peça anatômica foi obtida uma lâmina, com quatro cortes seriados, corados com hematoxilina e eosina (HE)[4,18,81].

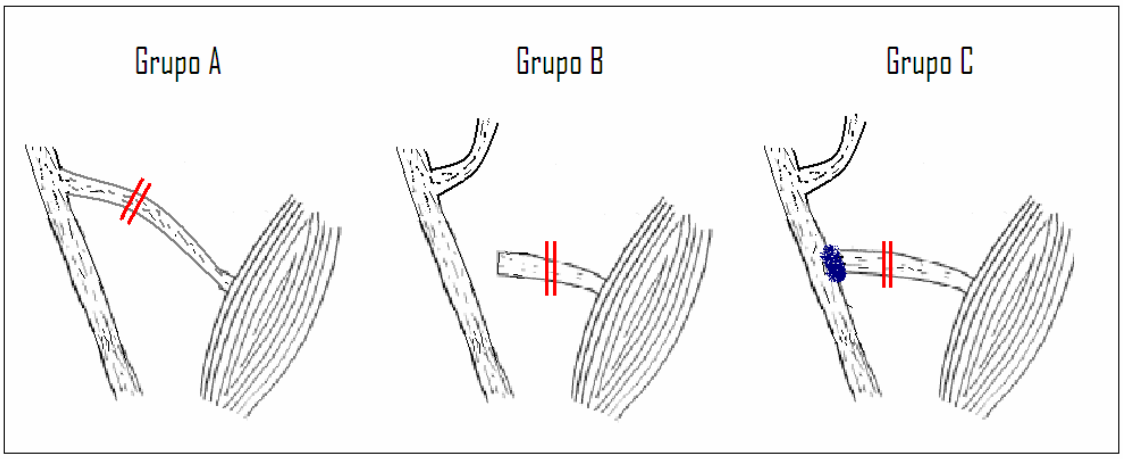

Figura 7 – Representação esquemática dos locais de secção nervosa para estudo histológico. Grupos A, B e C, demonstrando os pontos de secção para estudo histológico no nervo fibular (vermelho) e a ATL com cola de fibrina (azul).

4.4 - DIGITALIZAÇÃO DA IMAGEM

No laboratório de patologia, realizou-se a digitalização dos quatro campos de cada lâmina, por meio de grade, para a análise quantitativa da regeneração axonal[18].

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). Utilizou-se uma lente 10/0.45 (*Sigma, Chemical Conpany, 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).

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.

Para cada imagem utilizou-se o mesmo intervalo de cor, ajustado para identificar áreas representativas de regeneração axonal (axônios mielinizados) e neoformação de colágeno[18].

4.5 - MORFOMETRIA

No laboratório de informática da UNIDERP, utilizando um programa de computador específico para análise de imagens – *Image Pro Plus 4.5 ®* – (*Media Cybernetics, Silver Spring, EUA*), foi realizada a análise morfométrica dos campos digitalizados[19].

A análise morfométrica foi realizada avaliando o número e o diâmetro dos axônios mielinizados em cada campo[18]. O campo analisado foi delimitado por grade computadorizada, sendo estipulado em 97,98 micrômetros quadrados[18].

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

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

4.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *BioEstat* versão 4.0. Para comparação entre os grupos A, B e C foram utilizados os testes ANOVA e Kruskal Wallis (*a posteriori* Student Newman Keuls). A comparação entre os períodos (30^o e 90^o dia), em cada grupo, foi realizada por meio do teste Wilcoxon para amostras relacionadas. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 – RESULTADOS

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

A análise estatística, comparando os grupos A, B e C, é apresentada nas tabelas 1-3, em média e desvio padrão (DP).

As informações referentes ao peso, testes de marcha e análise morfométrica de cada animal estão expostas no quadros 1-5 (em anexo).

As figuras 8-12 apresentam o aspecto do teste de marcha e as figuras 13-16 apresentam fotomicrografias da histologia dos animais dos grupos A, B e C.

Tabela 1 – Análise estatística do peso (g) médio dos animais, no primeiro e no nonagésimo dia do estudo.

Dia	GRUPOS						$p^{(1)}$
	A (n=15)		B (n=15)		C (n=15)		
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
DIA 01	284,1	6,1	282,7	5,0	280,7	4,2	0,190
DIA 90	430,5	18,4	428,9	14,0	431,3	21,6	0,934

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. (1) ANOVA.

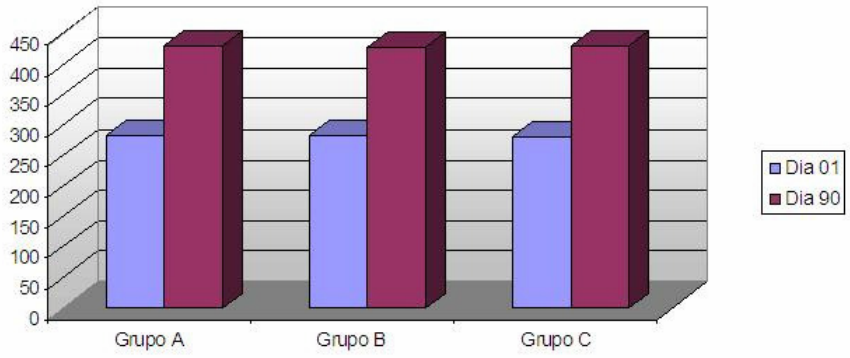

Gráfico 1: Peso (g) médio dos animais dos grupos A, B e C no primeiro e nonagésimo dia do estudo.

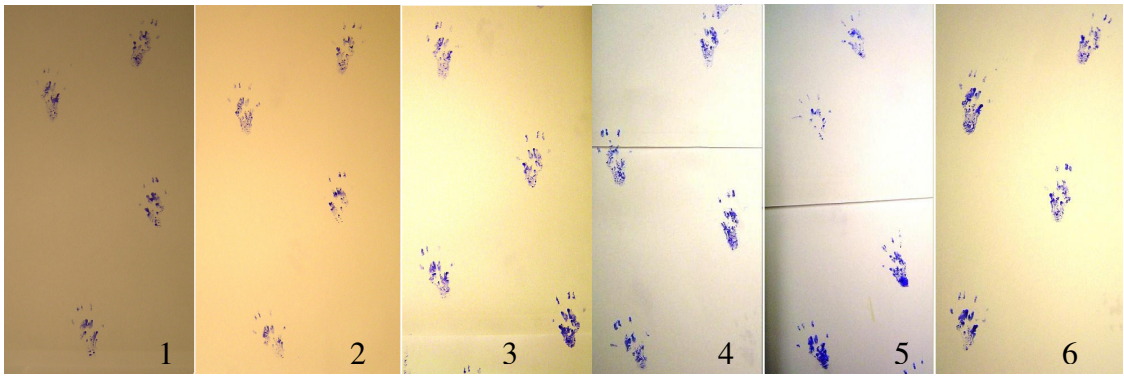

Figura 8: Aspecto das pegadas de três animais do grupo A, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo. **1-3:** pegadas dos ratos 4, 7 e 12 no trigésimo dia; e **4-6:** pegadas dos mesmos animais no nonagésimo dia, demonstrando a semelhança da impressão da pegada do MPD e do MPE durante o estudo.

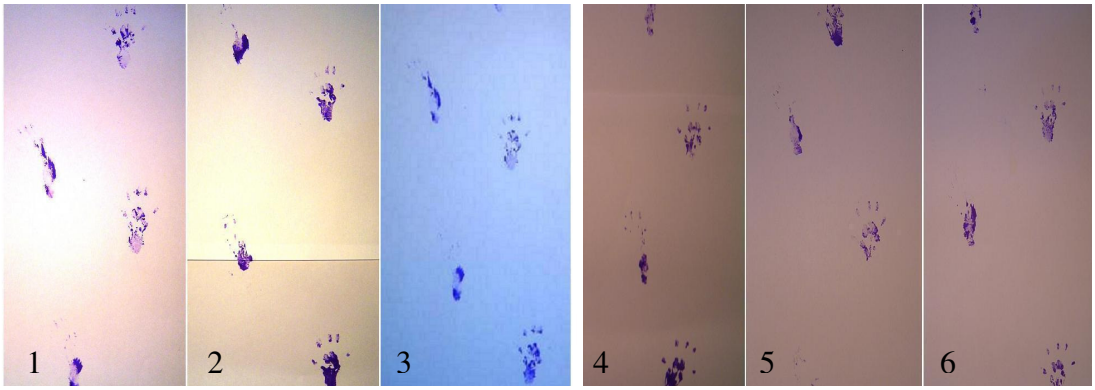

Figura 9: Aspecto das pegadas de três animais do grupo B, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo. **1-3:** pegadas dos ratos 1, 3 e 9 no trigésimo dia; e **4-6:** pegadas dos mesmos animais no nonagésimo dia, demonstrando a diferença da impressão da pegada do MPD e do MPE, indicando que a atrofia detectada no MPE manteve-se durante o estudo.

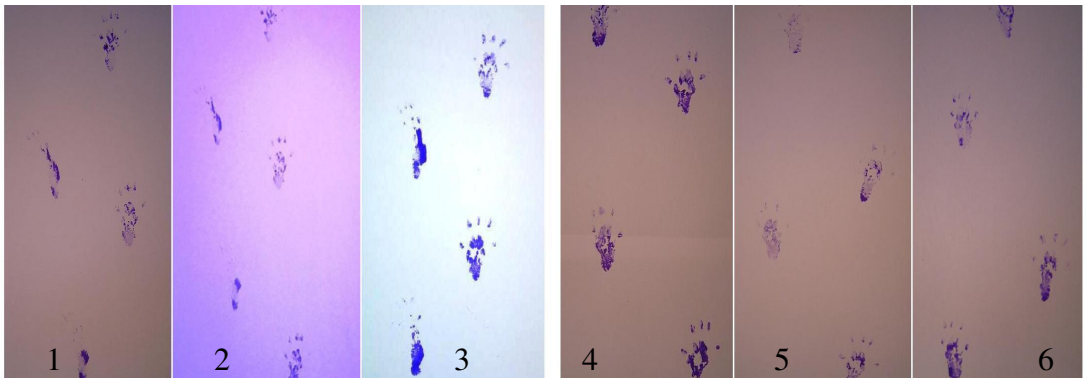

Figura 10: Aspecto das pegadas de três animais do grupo C, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo. **1-3:** pegadas dos animais 8, 12 e 15 no trigésimo dia; e **4-6:** pegadas dos mesmos animais no nonagésimo dia, demonstrando que a diferença que existia entre o MPD e o MPE no primeiro teste, não foi mantida no segundo teste, indicando recuperação funcional após a ATL com cola de fibrina.

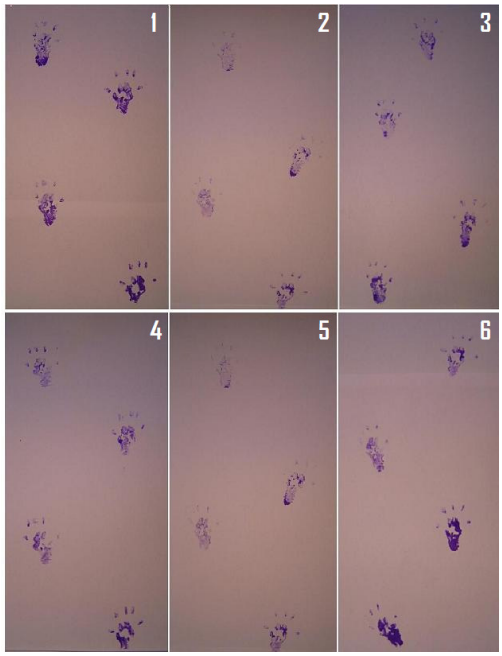

FIGURA 11: Aspecto das pegadas de outros seis animais do grupo C, no nonagésimo dia do estudo. **1-6:** Aspecto das pegadas dos animais 2, 4, 6, 7, 10, 13 do grupo C, no nonagésimo pós-operatório, demonstrando a semelhança na impressão das pegadas dos dois membros, indicando a recuperação funcional do MPE, após a ATL com cola de fibrina.

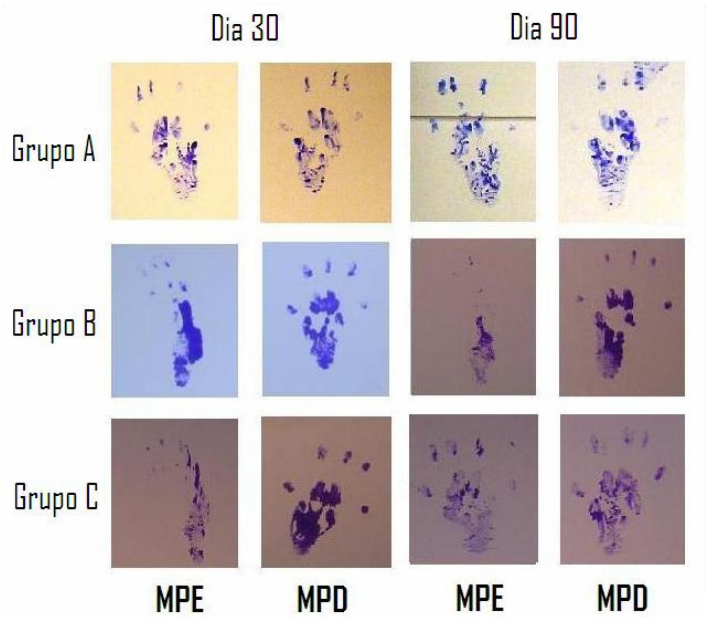

Figura 12: Comparação entre as pegadas dos grupos A, B e C no primeiro e segundo teste de marcha. Aspecto, em detalhe, das pegadas de três animais, no trigésimo e no nonagésimo dia de acompanhamento. **Grupo A:** Pegadas de um animal do grupo A, no trigésimo e nonagésimo dia, demonstrando a simetria das mesmas. **Grupo B:** Pegadas de um animal do grupo B, demonstrando atrofia do MPE no trigésimo e nonagésimo dia. **Grupo C:** Pegadas de um animal do grupo C, demonstrando atrofia do MPE no trigésimo dia, e recuperação funcional no nonagésimo dia.

Tabela 2 – Análise dos valores médios dos índices obtidos nos teste de marcha, no trigésimo e nonagésimo dia do estudo.

Teste de Marcha	Dia	GRUPOS A (n=15) MÉDIA	A (n=15) DP	B (n=15) MÉDIA	B (n=15) DP	C (n=15) MÉDIA	C (n=15) DP	$p^{(1)}$ (A X B X C)
PLF	30	[a] 0,00	0,02	[a] -0,02	0,11	[a] -0,02	0,03	0,182
	90	[a] -0,02	0,05	[b] -0,18	0,11	[a] -0,02	0,04	<0,001
	$p^{(2)}$ (30X90)	0,116		<0,001		0,975		
TST	30	[a] 100,50	5,10	[b] 62,50	9,40	[b] 60,80	10,70	<0,001
	90	[a] 100,20	4,20	[b] 55,70	3,30	[a] 95,80	3,80	<0,001
	$p^{(2)}$ (30X90)	0,865		0,036		<0,001		
IF	30	[a] -13,08	4,89	[b] -46,66	22,17	[b] -47,63	10,35	<0,001
	90	[a] -17,22	10,20	[b] -78,06	18,66	[a] -20,45	6,97	<0,001
	$p^{(2)}$ (30X90)	0,256		<0,001		<0,001		
SFI	30	[a] -8,01	5,45	[b] -57,14	11,63	[b] -57,88	11,09	<0,001
	90	[a] -8,22	5,36	[b] -65,85	7,50	[a] -12,90	5,04	<0,001
	$p^{(2)}$ (30X90)	0,776		0,256		<0,001		

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. (1) Kruskal Wallis e a *posteriori* Student Newman Keuls para a comparação entre os grupos (A x B x C). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. (2) Teste de Wilcoxon para a comparação entre os períodos avaliados (30 X 90 dias) em cada grupo.

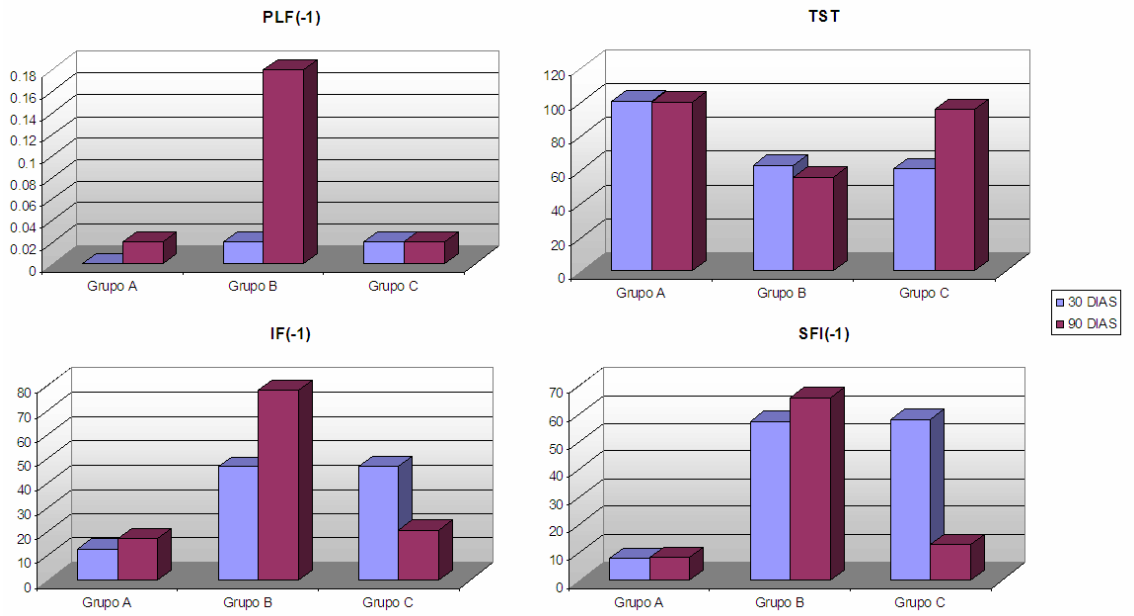

Gráfico 2: Resultado dos testes de marcha no trigésimo e nonagésimo dia do estudo.

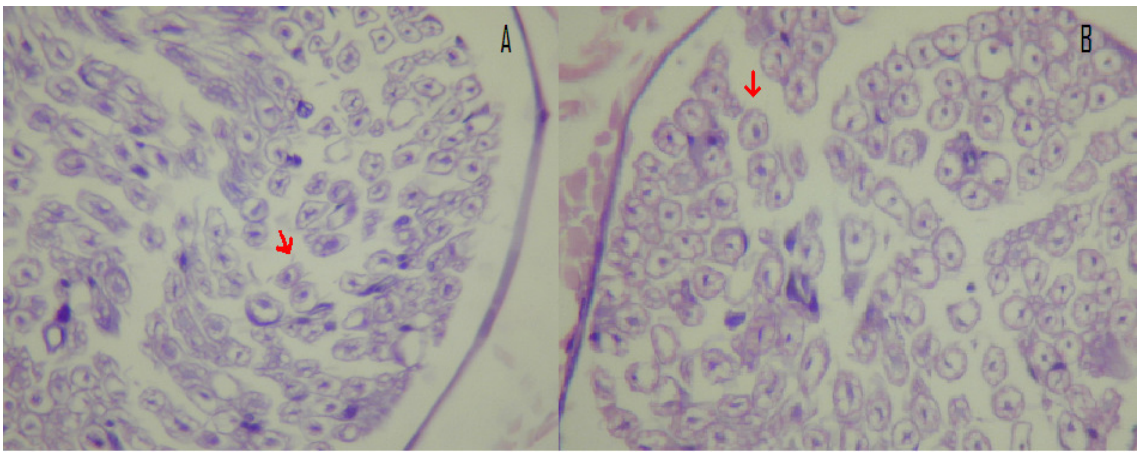

Figura 13: Fotomicrografias da histologia do nervo fibular dos animais 4 (A) e 7 (B) do grupo A. As setas vermelhas, representam exemplos de axônios mielinizados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x).

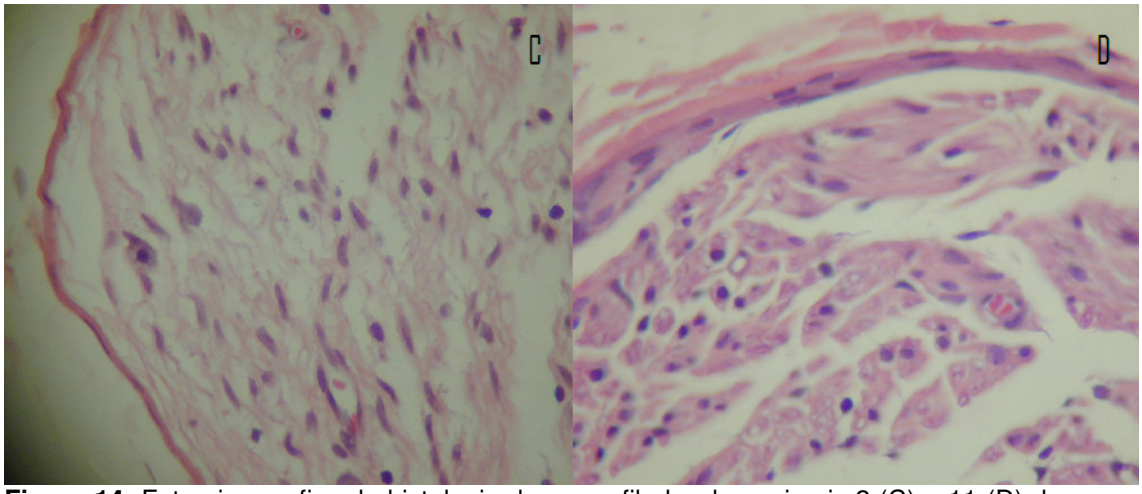

Figura 14: Fotomicrografias da histologia do nervo fibular dos animais 2 (C) e 11 (D) do grupo B. Com a utilização do programa *Image Pro Plus 4.5* ®, não foram identificados axônios mielinizados nestes campos. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x).

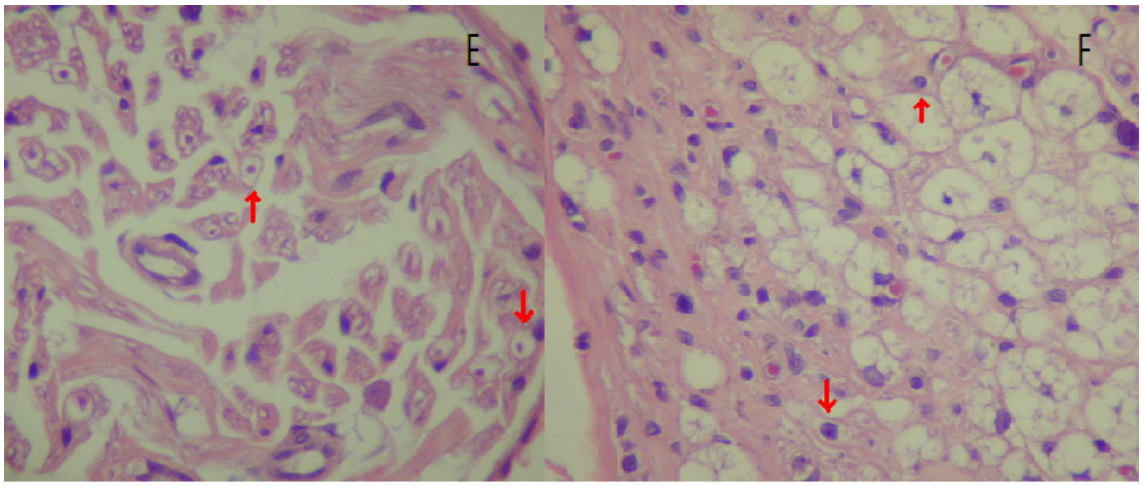

Figura 15: Fotomicrografias da histologia do nervo fibular dos animais 9 (E) e 10 (D) do grupo C. As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados regenerados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x).

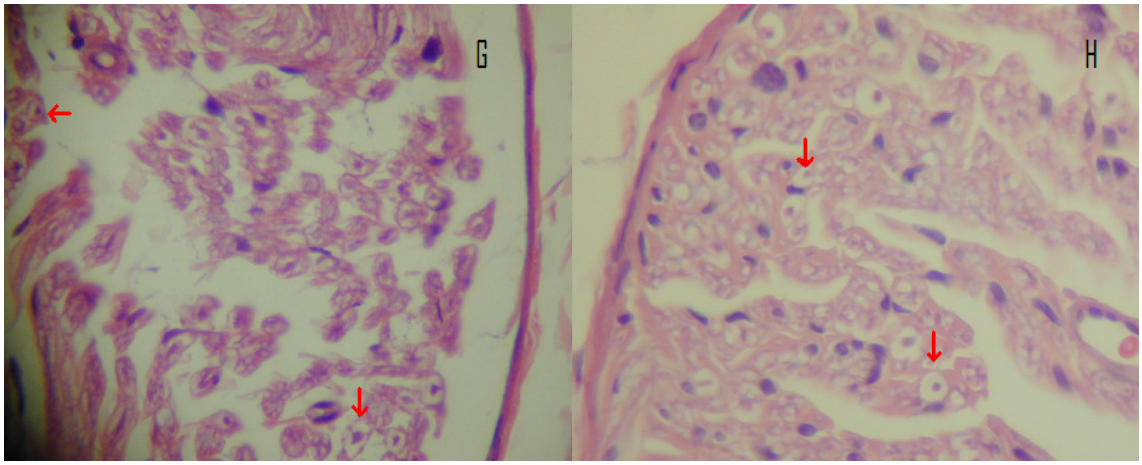

Figura 16: Fotomicrografias da histologia do nervo fibular de outros dois animais do grupo C: rato 5 (G) e 15 (H). As setas vermelhas representam exemplos de axônios mielinizados regenerados. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento de 400X).

Tabela 3 – Representação dos valores das médias do número e do diâmetro dos axônios por campo, nos Grupos A, B e C, no 90° dia do estudo.

	GRUPOS						$p^{(1)}$
Axônios	A (n=15)		B (n=15)		C (n=15)		(A X B X C)
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Número médio	106,57	2,57	4,86	4,06	86,95	10,92	< 0,001(A>C>B)
Diâmetro médio	9,64	1,14	2,68	2,46	7,69	0,90	< 0,001(A>C>B)

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

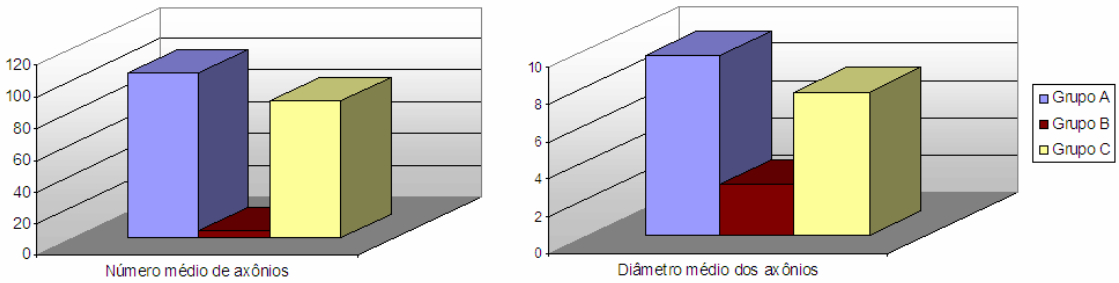

Gráfico 3: Análise morfométrica dos animais dos grupos A, B e C, no nonagésimo dia do estudo (número e diâmetro médio de axônios por campo).

6 - DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas técnicas microcirúrgicas e a inclusão de novos elementos que potencializem a regeneração nervosa e possibilitem a obtenção de melhores resultados pós-operatórios são freqüentemente apresentados na literatura[4,6,11-13]. Estes fatores, associados ao crescente interesse da comunidade científica pela possibilidade da regeneração axonal a partir da doação lateral de axônios de um nervo íntegro - sem prejudicá-lo, foram os principais responsáveis pela realização deste estudo.

Buscando padrões comparativos para correta análise dos resultados e conclusões, o modelo cirúrgico-experimental utilizado foi o proposto por Viterbo[24,29]. O modelo tíbio-fibular foi reproduzido com sucesso por diversos autores e é considerado adequado para a investigação da regeneração axonal após NTL[3,9,18,30-36,39,40]. Seguindo a técnica utilizada por Muller[18], adaptou-se o modelo cirúrgico-experimental para a ATL com cola de fibrina.

O rato foi o animal escolhido para este experimento devido a sua fácil obtenção e manuseio, bem como sua excelente resistência a infecção e suas similaridades anatômicas e biológicas com os seres humanos[82-84]. Além disso, ele é o modelo animal utilizado pela maioria dos autores que estudam a NTL e a ATL com cola de fibrina[11,18,24,35,44]. Para homogeneinizar a amostra, evitando as variações do ciclo estral inerente às fêmeas, utilizou-se apenas ratos machos[53].

No procedimento anestésico foram utilizados quetamina e xylazina, por via intraperitonial[76,85]. Ambas são amplamente utilizadas em modelos animais, principalmente no rato, sendo indicadas para procedimentos de curta duração como o do estudo[6,84,85]. Os anestésicos utilizados proporcionaram um plano anestésico de aproximadamente 40 minutos, período adequado para a realização do procedimento operatório.

A exposição das estruturas em estudo foi realizada através do *standard dorsal gluteal-splitting approach*, método referido na literatura para a abordagem do nervo ciático e de seus ramos em ratos[3,17]. Tal acesso permite a realização do experimento com mínimo descolamento tecidual e sangramento,

reduzindo a morbidade do procedimento e facilitando a recuperação do animal no pós-operatório[3,17,36].

A neurotmese, realizada no nervo fibular, foi apropriada para a investigação proposta, visto que, para a regeneração nervosa, ela exige uma intervenção cirúrgica para a restauração da continuidade anatômica macroscópica do nervo. Assim, a identificação de axônios mielinizados, distalmente à ATL, indicaria a regeneração nervosa e o sucesso da anastomose[10].

Alguns autores, que estudam a utilização da cola de fibrina, preconizam a associação de alguns pontos microcirúrgicos de ancoragem na anastomose, para minimizar o risco de deiscência[15,19]. No presente estudo, a ATL foi realizada apenas com cola de fibrina, uma vez que a confecção de sutura dificultaria a análise dos resultados. Ao não associar sutura à cola, pôde-se inferir que a regeneração axonal obtida no grupo C deveu-se apenas à ação do selante.

Com o término da cirurgia, a recuperação anestésica dos animais ocorreu em cerca de trinta minutos, não havendo nenhum óbito. Tanto o modelo anestésico quanto o modelo cirúrgico foram, desta forma, considerados apropriados para este estudo.

A verificação da regeneração axonal após a ATL com cola de fibrina foi realizada por meio do teste de marcha e da análise histológica[4,10,85]. A simples confirmação histológica da regeneração axonal não indica diretamente a recuperação funcional do animal, exigindo a confirmação com os testes de função motora[4,10,85].

A recuperação funcional do animal foi avaliada por meio do teste de marcha (*walking track analysis*), seguindo a metodologia proposta por Menovsky, *et al.*[15] e Medinaceli, *et al.*[78]. O teste de marcha é o método não-invasivo mais utilizado para a avaliação da função motora após lesão nervosa no modelo animal em estudo[4,10,51,78,85,86]. O teste de marcha possibilita a análise do padrão da caminhada do animal pela da impressão de suas pegadas[9,10,51,78]. Segundo Raso, *et al.*[85], o teste de marcha correlaciona-se fidedignamente com a regeneração axonal, tendo ainda aplicação rápida, prática e barata. Apesar da ampla utilização, este teste também é criticado por alguns autores[9,10,51]. Robillard, *et al.*[9] e Ogün, *et al.*[51] acreditam que a

metodologia do teste é de difícil realização e consome muito tempo na análise dos seus resultados. Sato[10] acredita que a natureza subjetiva das medidas e outros fatores, como presença de úlceras no calcanhar, contratura e perda de dedos, podem comprometer a análise do teste. Medinaceli, *et al.*[78] referem que, apesar destes fatores, o teste de marcha é uma excelente opção para o modelo em estudo.

Outros métodos têm sido descritos como alternativas para a avaliação da função motora após reanastomoses nervosas, todavia também recebem críticas. Segundo Lago, *et al.*[4] e Raso, *et al.*[85], métodos tradicionais como os eletrofisiológicos, apesar de usados em grande escala, falham na correlação com a função motora no rato. Parâmetros como a velocidade de condução nervosa, o pico e a amplitude do potencial de ação podem conduzir a interpretações inapropriadas quanto à recuperação funcional do animal[4,85].

Dos raros estudos sobre o tema disponíveis na literatura, apenas um avalia a função motora após ATL com cola de fibrina[10]. No entanto, por utilizar um modelo cirúrgico-experimental diferente (ATL do nervo ulnar no nervo mediano), a autora optou por utilizar o teste de força da preensão (*Grip Strength Test*), descrito inicialmente por Perrine, em 1968[10]. Este teste é bem aplicável no modelo utilizado pela autora, contudo não é preconizado no modelo tíbio-fibular.

O teste de marcha, aplicado no presente estudo, foi realizado com trinta e, posteriormente, com noventa dias, período considerado ideal para análises comparativas entre os grupos[3,4,17,87]. Antes do trigésimo dia, devido à má qualidade das pegadas, a avaliação do teste fica prejudicada[85]. Prazos superiores a noventa dias são considerados inapropriados, visto que os animais, em que a regeneração axonal não ocorreu, desenvolvem úlceras e retrações importantes nos membros, dificultando a análise comparativa do teste[17].

A realização do teste de marcha, bem como a análise de seus resultados, foi considerada simples e rápida neste estudo. Acredita-se que a familiaridade com o método facilite seu emprego[4,85]. Para minimizar o viés de aferição, o investigador responsável por analisar os testes de marcha não foi informado a que grupo pertenciam os animais[9].

A análise dos resultados do teste de marcha (tabela 2), utilizando os índices de função, evidenciou 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. Os animais do grupo B – submetidos à secção do nervo fibular, sem posterior anastomose – apresentaram prejuízo motor importante (*footdrop*) no primeiro teste. Como esperado, eles mantiveram o MPE atrófico no segundo teste de marcha, indicando ausência de recuperação funcional[4,9]. Os animais do grupo C – submetidos à ATL com cola de fibrina – apresentaram padrão de atrofia do MPE no trigésimo pós-operatório (semelhante ao grupo B). Todavia, eles demonstraram uma melhora importante na marcha no nonagésimo pós-operatório, indicando que houve recuperação funcional após a ATL com cola de fibrina. Neste estudo, obteve-se diferença estatisticamente significativa quando foi comparada a recuperação funcional, no segundo teste de marcha, entre os grupos B e C. No nonagésimo dia de acompanhamento, os animais do grupo C voltaram a apresentar um padrão de caminhada semelhante aos animais do grupo A.

Mueller[18], que utilizou o modelo cirúrgico-experimental deste estudo, não aplicou teste de função nos animais, impedindo a comparação dos resultados. Sato[10], não obteve recuperação motora satisfatória após realizar a ATL com cola de fibrina. No entanto, a análise dos seus resultados fica prejudicada devido às diferenças metodológicas importantes e à ausência de avaliação morfológica no seu estudo.

Liu, *et al.*[3], utilizando metodologia de análise funcional semelhante à utilizada neste estudo, obtiveram valores de IF=-100,6$\pm$3,8 para um grupo semelhante ao grupo B; e valores de IF=-37,3$\pm$13,5 para um grupo submetido à NTL. Quando comparamos com o IF obtido no grupo C, pode-se inferir que a recuperação funcional dos animais submetidos à ATL com cola foi equivalente à recuperação dos animais submetidos à NTL no estudo de Liu.

Lago, *et al.*[4], utilizando o SFI para avaliar a recuperação após neurorrafias término-terminais, obtiveram índices de -17,00$\pm$50, semelhante ao SFI do grupo C deste estudo.

No intuito de confirmar os achados do teste de função, realizou-se a análise morfológica das peças anatômicas no nonagésimo dia de

acompanhamento. Alguns autores utilizaram períodos menores como trinta[33,42] e cinqüenta dias[50] e receberam críticas pela possibilidade de viés de aferição[18]. Outros autores, como o próprio Viterbo, *et al.*[29], utilizaram períodos maiores sem que isto refletisse significativamente na avaliação. Autores como Mueller[18], Lundborg, *et al.*[31], Rosseto, *et al.*[35] e Zhang, *et al.*[38], analisando a NTL, utilizaram 90 dias de acompanhamento em seus estudos. Este período é considerado, pela maioria dos autores, como suficiente para confirmar a regeneração nervosa no modelo tíbio-fibular[19,38]. No presente estudo, a análise histológica no nonagésimo dia foi considerada satisfatória, pois permitiu a identificação da regeneração axonal.

A coloração para a preparação das lâminas foi a HE, método utilizado em diversos estudos sobre o tema[4,11,18,30,38,50]. Trata-se de uma técnica rápida, simples e barata para a análise histológica. Alguns autores utilizaram outros métodos para a análise da regeneração axonal como, por exemplo, o tetróxido de ósmio[6,9,17,35,47] e o azul de toluidina[3,15,36]. No entanto, estes métodos são de custo elevado, de difícil realização e não estão disponíveis em todos os centros. Assim, seguindo o modelo de Muller[18], optou-se pela HE. No presente estudo, este método foi considerado satisfatório, pois corou adequadamente as estruturas estudadas e permitiu a realização da morfometria computadorizada com facilidade.

A análise morfométrica da regeneração axonal foi realizada através da contagem do número e do diâmetro dos axônios em cada campo. Este método foi utilizado por diversos autores e é considerado como preditivo de regeneração nervosa no modelo tíbio-fibular[12,18,85].

A presença de regeneração axonal foi caracterizada a partir da identificação de axônios com bainhas de mielina. Quando estes não foram evidenciados, encontrando-se apenas abundante tecido fibroso, ficou caracterizada a não-regeneração[11,35].

Neste estudo, conforme a tabela 3, o grupo C apresentou regeneração axonal significativamente superior ao grupo B, demonstrando a efetividade da ATL com cola de fibrina.

Os resultados encontrados foram próximos aos relatados por Mueller[18]. A autora relata um número médio de 55,81$\pm$19,87 axônios por campo, com diâmetro axonal médio de 5,51$\pm$1,9 micrômetros[18].

A presença dos poucos e dismórficos axônios identificados no grupo B também é referida na literatura. Acredita-se que estes axônios relacionem-se com anastomoses ao acaso, a partir do crescimento desorientado das fibras nervosas vindas do coto proximal[10]. Mueller[18] não exclui esta possibilidade, mesmo após a realização da rotação e sutura do coto proximal do nervo fibular. Sato[10] relaciona este resultado às possíveis lesões epineurais durante a dissecção do animal. Liu, *et al.*[3], no entanto, não verificaram a presença de axônios regenerados nos animais submetidos apenas à secção nervosa (método idêntico ao grupo B), referindo ter observado apenas fibrose.

Assim, os resultados da análise histológica confirmaram os achados dos testes de função: ocorreu reinervação no coto distal do nervo fibular submetido à ATL com cola de fibrina.

Os resultados do presente estudo foram comparáveis aos achados de Mueller[18]. Em um estudo experimental com metodologia e delineamento semelhantes, a autora obteve regeneração axonal – confirmada pela histologia - após ATL com cola de fibrina, com resultados semelhantes aos obtidos com a NTL[18].

No entanto, os resultados contrariam as publicações de Sato[10] e Bertelli, *et al.*[42]. Todavia, estes estudos receberam críticas, utilizaram modelo cirúrgico-experimental diverso e não aplicaram a metodologia aqui proposta. Bertelli, *et al.*[42] não obtiveram regeneração após ATL com cola de fibrina em nervos do membro superior de ratos. No entanto, estes autores não incluíram um grupo de síntese comparativo em seu estudo[18]. Sato[10] também não obteve sucesso quando avaliou a recuperação de força após ATL com cola de fibrina em membro superior de ratos. Todavia, este estudo não incluiu uma análise histológica da anastomose, avaliando somente a função motora dos animais.

O principal questionamento sobre a técnica de Viterbo[24] incide no mecanismo de brotamento de axônios a partir do nervo doador, que ultrapassam uma verdadeira barreira composta pelo endoneuro, perineuro e epineuro até atingirem o nervo receptor[36,55].

Segundo vários autores, uma lesão no nervo doador – pela confecção da "janela epineural" ou mesmo pelas mínimas lesões (orifícios) causadas pela entrada da agulha na neurorrafia – é fundamental para o sucesso da técnica[3,55,62,88]. Segundo Liu, *et al.*[3] e Bontioti, *et al.*[88], estas pequenas lesões

seriam suficientes para proporcionar um maior contato entre os nervos, com conseqüente maior liberação de fatores de crescimento, contribuindo decisivamente para o brotamento axonal. Recentemente, Pannucci, *et al.*[62] afirmaram que, para a obtenção de melhores resultados na NTL, a lesão axonal no nervo doador é necessária. Robillard, *et al.*[9] e Akeda, *et al.*[47] foram céticos quanto à possibilidade do brotamento de axônios sem pelo menos uma mínima lesão no nervo doador. Em artigo de revisão, Bertelli e Ghizoni[25] não recomendaram a realização da ATL com cola de fibrina, justificando que a mesma não determinaria lesão no nervo doador, que, segundo eles, seria fundamental para o sucesso da anastomose.

Os resultados do presente estudo reforçam os achados de Akeda, *et al.*[47] e Matsumoto, *et al.*[89] que verificaram regeneração axonal mesmo em um modelo de NTL protegido (*noninjurious end-to-side neurorrhaphy models*). Compreende-se que a lesão no nervo doador, mesmo que mínima, pode determinar um prejuízo a ele e à anastomose, devendo assim ser evitada[3,36,89]. A regeneração obtida no grupo C suporta a teoria de que a cola pode ser utilizada na ATL, mesmo, e principalmente, sem lesar o nervo doador[18].

O mecanismo exato do brotamento axonal através da NTL ainda não foi completamente esclarecido e permanece como fonte de estudos[3,47]. Os macrófagos – células-chave na degeneração walleriana – parecem ser os responsáveis por lisar o perineuro, permitindo que as neurotrofinas, vindas do nervo receptor, desencadeiem o brotamento axonal[3,10,47]. Este mesmo mecanismo poderia explicar a regeneração axonal após a ATL com cola de fibrina.

A reprodutibilidade dos achados de estudos experimentais como este, utilizando ratos, para seres humanos é questionada. Liu, *et al.*[3] foram taxativos ao referirem que no homem, a maior espessura do epineuro, perineuro e até mesmo do endoneuro, prejudicaria o brotamento axonal com a técnica. Todavia, Samii, *et al.*[12], em 2006, relataram um caso clínico de sucesso ao utilizar a ATL com cola de fibrina em um paciente com lesão no nervo facial durante uma cirurgia de schwannoma vestibular.

Millesi e Schmidhammer[13] e Raso, *et al.*[85] afirmam que as controvérsias sobre a técnica baseiam-se na complexidade da mesma e nas inúmeras variáveis envolvidas no processo. Segundo eles, vários autores demonstraram

excelentes resultados com a técnica, assim como outros obtiveram falhas completas[13,85]. Segundo Milesi e Schmidhammer[13], aparentemente todos estão corretos, uma vez que, neste caso, um resultado pode ser diferente de acordo com as circunstâncias envolvidas.

Assim, entende-se a necessidade de mais estudos, principalmente devido à relevância do tema, aos achados divergentes na literatura[9,13,36,85] e aos resultados aqui apresentados.

7 – CONCLUSÃO

A anastomose nervosa término-lateral, realizada com cola de fibrina, resultou em regeneração axonal em ratos, demonstrada tanto histologicamente quanto funcionalmente.

8 - REFERÊNCIAS

1. Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. Br Med J. 1903;2:1009-13.

2. 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.

3. 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):293-300.

4. 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 Bra Ortop. 2005;40(1):69-78.

5. 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.

6. 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):123-8.

7. Pardini Jr AG, Freitas AD, Plentz EG. Avaliação da sensibilidade após neurorrafia término-lateral de nervos digitais: nota prévia. Rev Bras Ortop. 2005;40(9):543-554.

8. 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;106:391–99.

9. Robillard BG, Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter A. End-to-Side Neurorrhaphy and Lateral Axonal Sprouting in a Long Graft Rat Model. Laryngoscope. 2002;112:899–905.

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

11. Torres MFP, Graça DL, Farias ELP. 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):25-9.

12. 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):920-3.

13. Millesi H, Schmidhammer R. End-to-side coaptation - controversial research issue or important tool in human patients. Acta Neurochir Suppl. 2007;100:103-6.

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

15. 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):694-9.

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

17. 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(1):10-6.

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

19. Chem EM, Chem RC. Uso da cola de fibrina na anastomose nervosa: estudo comparativo experimental em ratos. Revista AMRIGS. 2004;48(3):171-74.

20. Gosk J, Knakiewicz M, Wiacek R, Reichert P. The use of the fibrin glue in the peripheral nerves reconstructions. Polim Med. 2006;36(2):11-5.

21. 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(3):601-4.

22. 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.

23. Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. Neurol India. 2002;50(1):23-6.

24. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni AN. Latero-terminal neurorraphy without removal of the epineural sheat: an experimental study in rats. São Paulo Med J. 1992;110:267-75.

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

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

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

28. 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.

29. Viterbo F. Neurorrafia látero-terminal: estudo experimental no rato. [Tese de Doutorado].São Paulo: Botucatu; Faculdade de Medicina; 1992. p198.

30. Zhao JZ, Chen ZW, Chen TY. Nerve regeneration after terminolateral neurorrhaphy: experimental study in rats. J Reconstr Microsurg. 1997;13(1):31-7.

31. 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. 1994;19:277-82.

32. Ross A, Matsuda H, Zuker RM. End-to-side nerve coaptation for muscle reinervation. Plast Reconstr Aesthetic Surg. 1995;2:104-5.

33. Noah EM, Williams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorraphy: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an and-to-side nerve graft. J Reconstr Microsurg. 1997;13:99-105.

34. Noah EM, Williams A, Fortes W, Terzis JK. A new animal model to investigate axonal sprouting after end-to-side meurorrhaphy. J Reconstr Microsurg. 1997;13(5):317-25.

35. Rosseto M, Fagundes DJ, Taha MO, Souza HS, Aydos RD, Guimarães RB, Novo NF, Juliano Y. Regeneration of periferic nerves after end-to-side anastomoses, mainteining epineuron, in rats. Acta Cir Bras. [serial online] 2001;16(3).

36. 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.

37. 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.509-525.

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

39. 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.

40. 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. Otol head Neck Surg. 1998;119(4):337-41.

41. Rebol J, Milojković V, Didanovic V. Side-to-end hypoglossal-facial anastomosis via transposition of the intratemporal facial nerve. Acta Neurochir. 2006;148(6):653-7.

42. 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.

43. Papalia I, Geuna S, D'Alcontres FS, Tos P. Origin and history of end-to-side neurorrhaphy. Microsurgery. 2007;27(1):56-61.

44. 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.

45. 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):281-6.

46. 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.

47. Akeda K, Hirata H, Matsumoto M, Fukuda A, Tsujii M, Nagakura T, Ogawa S, Yoshida T, Uchida A. 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):1194-203.

48. 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.

49. 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.

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

51. Ogün TC, Özdemir M, Senaram H, Üstun ME. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injures. J Neurosurg. 2003;99:180-185.

52. Dahlin LB, Bontioti E, Kataoka K, Kanje M. Functional recovery and mechanisms in end-to-side nerve repair in rats. Acta Neurochir Suppl. 2007;100:93-5.

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

54. 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.

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

56. 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.

57. 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.

58. Bertelli JA, Ghizoni MF. Nerve repair by end-to-side coaptation or fascicular transfer: a clinical study. J Reconstr Microsurg. 2003 Jul;19(5):313-8.

59. Barini O. End-to-side neurorraphy with and without perineurium. Sao Paulo Med J. Suppl. 2002;120(3):69.

60. 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;100:97-101.

61. Hayashi A, Pannucci C, Moradzadeh A, Kawamura D, Magill C, Hunter DA, Tong AY, Parsadanian A, Mackinnon SE, Myckatyn TM. Axotomy or compression is required for axonal sprouting following end-to-side neurorrhaphy. Exp Neurol. [serial online] 2008;25(1).

62. 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.

63. Bergel S. Ueber wikungen des fibrins. Dtsch Med Wochenschr 1909;35: 663-665.

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

65. Matras H, Dinges HP, Mamoli B. Non-sutured nerve transplantation. J Max Fac Surg.1973;1:37-40.

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

67. Mattar RJ, Cho AB, Grillo VAT. Sutura mínima associada ao adesivo de fibrina em microanastomoses arteriais: estudo experimental comparativo com a técnica de sutura convencional. Rev Bra Ortop. 2005;40(6):349-359.

68. 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 Cir Plast. 1990;5:40-3.

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

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

71. Herter T, Bennefeld H. The influence of fibronectin on the fibrosing of a nerve anastomosis in the rat. Res Exp Med. 1989;189(5):321-9.

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

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

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

75. 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.

76. 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.

77. 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 Bra. 2003;11(4):225-29.

78. Medinaceli L, Quach T, Duchemin AM. Is vigor of regeneration a key factor in recovery from peripheral nerve injuries? Exp Neurol. 1982;94:788-90.

79. 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;24:279-81.

80. Luna SPL, Teixeira MW. Eutanásia: considerações éticas e indicações técnicas. Rev CFMV. 2007;13(41):60-8.

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

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

83. 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;173:1676-83.

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

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

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

87. Bain JR, Mackinmon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg. 1989;83:129-36.

88. 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):321-8.

89. 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;15:281-85.

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. 3ed. São Paulo, Bireme, 1996, 1146p.

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

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

10 – ANEXOS

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Departamento de clínica-cirúrgica Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Mestrando: Daniel Nunes e Silva Orientadora: Prof. Dra. Andréia Brochado Antoniolli
Título: ANASTOMOSE NERVOSA TÉRMINO–LATERAL UTILIZANDO COLA DE FIBRINA.

PROTOCOLO CIRÚRGICO

Data ___/___/___ Hora:___:___ Protocolo Número:_____

Animal Número:_____ Peso:_____ Grupo:_____

Anestesia:_____

Intercorrências:_____

Procedimento cirúrgico:_____

_____

_____

_____

_____

Intercorrências:_____

Cola de fibrina utilizada:_____

Tempo cirúrgico:_____

Evolução pós-operatória:_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Quadro 1: Peso (g) dos animais no primeiro e no nonagésimo dia do estudo.

Rato	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C	
N.	Dia 1	Dia 90	Dia 1	Dia 90	Dia 1	Dia 90
1	277	399	280	411	279	427
2	278	411	279	421	289	405
3	277	404	286	409	275	399
4	291	451	281	418	281	450
5	288	424	280	423	275	455
6	279	419	291	444	283	449
7	283	425	279	438	279	453
8	288	440	288	431	288	444
9	277	417	280	429	277	431
10	291	445	291	448	282	449
11	294	449	278	426	281	454
12	282	425	290	450	279	401
13	279	455	281	449	280	432
14	290	444	277	414	285	421
15	288	450	280	422	277	399

Quadro 2: Representação dos resultados do primeiro e segundo Teste de Marcha dos animais do grupo A.

RATO	TS D				TS D	TS E				TS E	TST	PL D				PL D	PL E				PL E	PLF	ITS D				ITS D	ITS	
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
1	20	21	22	20	20,75	21	22	23	22	22,00	106,02	33	32	33	31	32,25	32	32	32	32	32,00	-0,01	12	11	12	12	11,75	11	1
2	24	25	25	24	24,50	23	24	24	25	24,00	97,96	33	31	32	33	32,25	33	33	33	33	33,00	0,02	12	11	12	12	11,75	12	1
3	21	23	23	23	22,50	20	22	22	21	21,25	94,44	31	32	31	33	31,75	32	32	31	32	31,75	0,00	12	12	13	13	12,50	11	1
4	25	24	24	23	24,00	25	24	23	23	23,75	98,96	32	32	32	32	32,00	32	32	32	33	32,25	0,01	12	11	12	11	11,50	12	1
5	21	20	19	20	20,00	22	20	21	22	21,25	106,25	34	32	33	34	33,25	33	33	33	32	32,75	-0,02	14	13	13	14	13,50	15	1
6	23	23	23	24	23,25	24	24	22	23	23,25	100,00	36	35	35	34	35,00	35	34	35	34	34,50	-0,01	14	14	15	14	14,25	14	1
7	20	20	19	21	20,00	22	20	22	20	21,00	105,00	33	34	32	33	33,00	33	32	32	32	32,25	-0,02	13	13	14	13	13,25	12	1
8	20	22	24	21	21,75	23	22	22	23	22,50	103,45	36	35	35	33	34,75	36	36	35	35	35,50	0,02	12	12	13	13	12,50	11	1
9	24	22	22	23	22,75	23	21	22	21	21,75	95,60	33	34	32	33	33,00	34	34	33	34	33,75	0,02	12	13	12	13	12,50	12	1
10	20	22	23	22	21,75	24	24	22	24	23,50	108,05	32	34	33	31	32,50	33	33	33	32	32,75	0,01	14	14	13	14	13,75	14	1
11	25	25	21	23	23,50	21	23	25	23	23,00	97,87	33	32	32	34	32,75	31	31	32	33	31,75	-0,03	12	12	12	13	12,25	13	1
12	22	23	23	24	23,00	22	24	24	23	23,25	101,09	30	31	32	30	30,75	32	32	31	31	31,50	0,02	11	12	11	11	11,25	12	1
13	22	24	24	23	23,25	21	24	21	22	22,00	94,62	32	33	34	32	32,75	32	32	32	32	32,00	-0,02	12	13	12	13	12,50	12	1
14	21	20	22	22	21,25	23	23	23	21	22,50	105,88	33	31	33	33	32,50	32	32	33	32	32,25	-0,01	11	12	11	11	11,25	12	1
15	22	23	20	23	22,00	20	20	19	22	20,25	92,05	32	33	31	31	31,75	32	33	31	32	32,00	0,01	12	12	12	12	12,00	12	1
1	24	23	23	24	23,50	25	24	22	23	23,50	100,00	33	31	33	33	32,50	33	33	32	33	32,75	0,01	12	11	12	12	11,75	14	1
2	21	20	20	22	20,75	21	22	24	23	22,50	108,43	32	33	31	31	31,75	32	32	31	33	32,00	0,01	13	13	13	13	13,00	12	1
3	24	23	22	23	23,00	22	21	22	23	22,00	95,65	36	36	35	36	35,75	35	32	33	34	33,50	-0,06	12	13	12	12	12,25	11	1
4	24	24	24	23	23,75	24	25	25	25	24,75	104,21	32	33	31	31	31,75	32	35	31	34	33,00	0,04	16	15	16	16	15,75	15	1
5	24	23	21	20	22,00	24	23	22	23	23,00	104,55	36	36	35	36	35,75	36	30	31	32	32,25	-0,10	13	14	13	13	13,25	13	1
6	23	22	24	23	23,00	24	23	21	20	22,00	95,65	32	33	31	31	31,75	34	33	32	31	32,50	0,02	14	14	11	14	13,25	12	1
7	21	21	22	22	21,50	20	22	21	22	21,25	98,84	36	36	35	36	35,75	33	31	32	32	32,00	-0,10	13	13	14	13	13,25	14	1
8	24	25	25	24	24,50	24	23	22	24	23,25	94,90	36	35	35	33	34,75	32	33	31	31	31,75	-0,09	12	12	13	13	12,50	12	1
9	24	23	22	23	23,00	25	24	25	23	24,25	105,43	33	34	32	33	33,00	33	31	32	33	32,25	-0,02	12	13	12	13	12,50	12	1
10	24	23	22	23	23,00	22	23	24	23	23,00	100,00	30	31	32	30	30,75	33	32	33	31	32,25	0,05	14	14	13	14	13,75	13	1
11	24	23	22	24	23,25	25	24	22	23	23,50	101,08	32	33	34	32	32,75	28	31	32	32	30,75	-0,06	12	12	12	13	12,25	12	1
12	24	22	24	23	23,25	24	22	21	22	22,25	95,70	33	31	33	30	31,75	33	32	33	31	32,25	0,02	11	12	11	11	11,25	16	1
13	22	21	22	21	21,50	22	23	22	22	22,25	103,49	32	33	31	31	31,75	32	31	32	33	32,00	0,01	12	13	12	13	12,50	12	1
14	24	25	25	25	24,75	23	24	25	24	24,00	96,97	36	36	35	36	35,75	35	32	34	33	33,50	-0,06	11	12	11	11	11,25	11	1
15	24	25	22	23	23,50	24	22	22	24	23,00	97,87	32	33	31	31	31,75	33	32	31	32	32,00	0,01	13	13	13	13	13,00	12	1

Quadro 3: Representação dos resultados do primeiro e segundo Teste de Marcha dos animais do grupo B.

RATO	TS D				TS D	TS E				TS E	TST	PL D				PL D	PL E				PL E	PLF	ITS D				ITS D	IT	
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	
1	24	22	22	23	22,75	13	14	13	0	10,00	43,96	32	34	33	31	32,50	29	29	30	31	29,75	-0,08	12	12	11	12	11,75	6	
2	20	22	23	22	21,75	14	15	14	15	14,50	66,67	33	32	32	34	32,75	33	34	34	33	33,50	0,02	13	13	13	13	13,00	6	
3	25	25	25	23	24,50	13	13	14	13	13,25	54,08	30	31	32	30	30,75	28	27	25	29	27,25	-0,11	15	15	15	14	14,75	8	
4	22	23	23	24	23,00	14	15	14	15	14,50	63,04	32	33	34	32	32,75	20	21	24	19	21,00	-0,36	13	12	13	12	12,50	9	
5	25	24	24	23	24,00	14	15	15	15	14,75	61,46	33	31	31	32	31,75	33	32	33	32	32,50	0,02	15	15	14	15	14,75	7	
6	21	20	22	22	21,25	15	15	15	15	15,00	70,59	32	33	31	31	31,75	32	32	31	32	31,75	0,00	15	15	13	14	14,25	9	
7	24	23	23	23	23,25	16	16	15	16	15,75	67,74	33	34	31	32	32,50	32	33	33	31	32,25	-0,01	14	15	15	14	14,50	6	
8	20	20	19	21	20,00	15	15	0	14	11,00	55,00	33	32	33	33	32,75	34	34	35	34	34,25	0,05	13	14	13	13	13,25	7	
9	23	22	24	22	22,75	11	15	15	15	14,00	61,54	33	32	32	31	32,00	31	32	32	33	32,00	0,00	14	13	14	13	13,50	7	
10	19	20	18	21	19,50	16	15	14	16	15,25	78,21	32	33	31	32	32,00	35	36	36	37	36,00	0,13	12	13	12	12	12,25	9	
11	21	20	19	21	20,25	15	15	14	14	14,50	71,60	34	33	37	33	34,25	35	34	33	35	34,25	0,00	12	12	12	12	12,00	9	
12	22	21	21	20	21,00	13	14	13	13	13,25	63,10	32	32	33	31	32,00	33	33	33	32	32,75	0,02	12	12	13	12	12,25	8	
13	24	22	23	22	22,75	14	15	14	15	14,50	63,74	32	31	33	31	31,75	32	33	34	33	33,00	0,04	11	11	11	11	11,00	7	
14	22	23	24	22	22,75	11	10	10	11	10,50	46,15	33	32	31	33	32,25	34	33	33	32	33,00	0,02	12	11	11	12	11,50	6	
15	20	22	22	21	21,25	15	14	16	15	15,00	70,59	32	32	31	32	31,75	31	31	32	32	31,50	-0,01	12	12	13	13	12,50	7	
1	23	22	23	23	22,75	13	12	13	11	12,25	53,85	33	32	31	33	32,25	28	30	27	29	28,50	-0,12	12	12	11	12	11,75	6	
2	21	21	22	22	21,50	11	12	15	14	13,00	60,47	32	30	31	32	31,25	14	27	30	29	25,00	-0,20	13	13	13	13	13,00	8	
3	21	22	23	21	21,75	11	12	13	11	11,75	54,02	33	34	33	33	33,25	15	21	28	19	20,75	-0,38	12	13	12	12	12,25	6	
4	22	23	23	24	23,00	12	12	14	11	12,25	53,26	32	33	34	32	32,75	22	16	17	30	21,25	-0,35	16	15	16	16	15,75	4	
5	23	24	23	24	23,50	12	13	12	14	12,75	54,26	33	31	31	32	31,75	30	31	22	32	28,75	-0,09	12	13	12	13	12,50	6	
6	21	20	20	21	20,50	11	11	12	12	11,50	56,10	34	32	33	34	33,25	24	30	15	27	24,00	-0,28	11	14	13	14	13,00	8	
7	23	24	23	24	23,50	15	12	14	11	13,00	55,32	36	35	35	34	35,00	29	30	31	29	29,75	-0,15	12	12	12	13	12,25	7	
8	21	20	20	21	20,50	12	13	14	13	13,00	63,41	32	34	33	31	32,50	29	31	27	14	25,25	-0,22	11	12	11	11	11,25	8	
9	21	22	24	23	22,50	13	12	13	12	12,50	55,56	33	32	32	34	32,75	30	32	31	32	31,25	-0,05	14	13	14	13	13,50	5	
10	24	23	22	23	23,00	12	14	12	13	12,75	55,43	30	31	32	30	30,75	29	32	16	29	26,50	-0,14	12	13	12	12	12,25	9	
11	21	22	23	22	22,00	13	10	12	13	12,00	54,55	32	33	34	32	32,75	30	33	31	30	31,00	-0,05	12	12	12	12	12,00	5	
12	24	23	20	23	22,50	12	11	11	12	11,50	51,11	32	32	33	31	32,00	29	30	30	29	29,50	-0,08	13	13	13	13	13,00	7	
13	20	20	20	22	20,50	14	12	11	12	12,25	59,76	32	31	33	31	31,75	31	30	29	29	29,75	-0,06	12	13	12	12	12,25	7	
14	22	22	23	23	22,50	14	12	14	11	12,75	56,67	33	32	31	33	32,25	28	28	29	30	28,75	-0,11	16	15	11	11	13,25	5	
15	24	21	22	23	22,50	12	12	12	11	11,75	52,22	32	32	31	32	31,75	30	27	13	29	24,75	-0,22	13	14	13	13	13,25	7	

Quadro 4: Representação dos resultados do primeiro e segundo Teste de Marcha dos animais do grupo C.

RATO	TS D				TS D	TS E				TS E	TST	PL D				PL D	PL E				PL E	PLF	ITS D				ITS D	IT	
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	
1	18	20	17	17	18,00	14	14	14	14	14,00	77,78	37	38	36	35	36,50	36	37	36	36	36,25	-0,01	14	13	14	14	13,75	6	
2	22	22	19	17	20,00	10	10	11	10	10,25	51,25	36	35	36	34	35,25	34	32	34	31	32,75	-0,07	15	15	14	15	14,75	6	
3	19	20	18	18	18,75	15	15	16	15	15,25	81,33	33	32	34	33	33,00	31	33	29	31	31,00	-0,06	13	14	13	13	13,25	8	
4	22	21	21	22	21,50	14	14	13	14	13,75	63,95	34	30	31	33	32,00	32	33	32	33	32,50	0,02	12	13	12	12	12,25	7	
5	24	22	23	22	22,75	13	12	13	12	12,50	54,95	33	32	31	32	32,00	31	31	32	31	31,25	-0,02	16	15	16	16	15,75	6	
6	22	23	24	24	23,25	14	15	0	15	11,00	47,31	32	31	30	30	30,75	29	29	30	30	29,50	-0,04	11	14	13	13	12,75	9	
7	25	24	25	24	24,50	16	15	14	15	15,00	61,22	32	33	32	32	32,25	32	33	30	31	31,50	-0,02	13	12	13	12	12,50	8	
8	22	23	21	22	22,00	15	15	0	15	11,25	51,14	32	33	32	31	32,00	33	32	31	30	31,50	-0,02	12	11	12	11	11,50	7	
9	24	24	22	23	23,25	16	16	15	16	15,75	67,74	33	31	32	32	32,00	32	33	32	32	32,25	0,01	13	11	11	12	11,75	6	
10	24	22	22	23	22,75	0	15	14	15	11,00	48,35	33	32	33	30	32,00	30	32	31	31	31,00	-0,03	13	12	13	13	12,75	6	
11	20	22	23	20	21,25	14	14	13	14	13,75	64,71	33	31	32	33	32,25	33	31	33	33	32,50	0,01	15	15	14	15	14,75	9	
12	22	23	23	23	22,75	14	14	15	0	10,75	47,25	32	32	31	32	31,75	32	31	32	33	32,00	0,01	15	15	15	14	14,75	9	
13	25	24	24	23	24,00	15	15	15	14	14,75	61,46	34	32	33	34	33,25	32	33	34	33	33,00	-0,01	15	14	14	14	14,25	8	
14	21	20	22	20	20,75	14	15	11	15	13,75	66,27	36	35	35	34	35,00	36	36	35	36	35,75	0,02	13	13	14	13	13,25	6	
15	24	23	23	24	23,50	16	16	15	16	15,75	67,02	33	34	32	33	33,00	32	33	33	32	32,50	-0,02	12	12	12	12	12,00	6	
1	23	24	23	22	23,00	22	23	23	23	22,75	98,91	34	33	31	33	32,75	33	33	31	31	32,00	-0,02	12	13	12	13	12,50	12	
2	24	25	26	25	25,00	22	25	23	22	23,00	92,00	34	32	31	33	32,50	34	32	31	34	32,75	0,01	11	14	13	14	13,00	13	
3	23	23	24	23	23,25	24	23	22	24	23,25	100,00	32	32	33	34	32,75	32	32	33	34	32,75	0,00	12	12	12	13	12,25	12	
4	21	22	22	21	21,50	21	23	21	20	21,25	98,84	30	30	31	32	30,75	28	30	31	32	30,25	-0,02	12	13	12	12	12,25	12	
5	20	23	24	24	22,75	21	22	23	21	21,75	95,60	34	33	32	31	32,50	29	33	32	33	31,75	-0,02	12	12	11	12	11,75	12	
6	21	20	22	20	20,75	21	21	20	20	20,50	98,80	33	31	32	32	32,00	33	31	32	32	32,00	0,00	13	13	13	13	13,00	13	
7	24	25	23	25	24,25	24	23	22	21	22,50	92,78	33	31	32	33	32,25	33	31	32	32	32,00	-0,01	12	12	12	13	12,25	11	
8	25	25	25	24	24,75	23	23	22	22	22,50	90,91	28	31	32	32	30,75	28	31	32	32	30,75	0,00	11	11	11	12	11,25	11	
9	23	23	23	24	23,25	22	22	21	23	22,00	94,62	33	32	33	31	32,25	33	32	33	27	31,25	-0,03	12	13	12	13	12,50	12	
10	25	24	25	23	24,25	22	21	22	22	21,75	89,69	32	31	32	33	32,00	27	31	37	33	32,00	0,00	14	14	13	14	13,75	12	
11	22	23	24	22	22,75	24	21	22	22	22,25	97,80	33	32	31	32	32,00	33	32	31	32	32,00	0,00	11	12	11	11	11,25	10	
12	21	22	22	21	21,50	20	22	21	20	20,75	96,51	31	32	33	32	32,00	31	32	33	32	32,00	0,00	15	14	12	14	13,75	12	
13	24	24	25	25	24,50	22	23	20	24	22,25	90,82	36	35	37	34	35,50	29	35	36	34	33,50	-0,06	13	13	14	13	13,25	13	
14	24	23	21	23	22,75	24	24	22	22	23,00	101,10	33	32	33	34	33,00	30	27	27	27	27,75	-0,16	12	12	12	12	12,00	12	
15	24	24	22	23	23,25	24	24	22	22	23,00	98,92	31	30	31	33	31,25	31	30	30	33	31,00	-0,01	12	12	11	13	12,00	11	

Quadro 5: Representação do resultado da análise morfológica realizada com o *Image Pro Plus* 4.5 ®.

RATO	GRUPO	NÚMERO DE AXÔNIOS				NÚMERO MÉDIO	DIÂMETRO DE AXÔNIOS				DIÂMETRO MÉDIO
		CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4	DE AXÔNIOS/CAMPO	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	CAMPO 4	DE AXÔNIOS/CAMPO
1	**A**	113	99	114	92	104,50	12,99	11,65	8,84	9,44	10,73
2	**A**	101	107	97	131	109,00	8,84	12,33	11,67	11,62	11,12
3	**A**	114	97	112	98	105,25	8,39	8,79	9,97	9,51	9,17
4	**A**	115	95	110	107	106,75	7,31	9,01	8,11	8,2	8,16
5	**A**	94	122	104	91	102,75	11,62	10,32	12,06	9,57	10,89
6	**A**	114	109	91	112	106,50	9,51	11,67	10,43	12,16	10,94
7	**A**	94	110	109	99	103,00	8,2	12,99	11,62	9,01	10,46
8	**A**	130	104	97	111	110,50	9,57	8,75	9,51	6,99	8,71
9	**A**	100	94	130	104	107,00	12,16	8,39	8,2	11,67	10,11
10	**A**	97	131	117	92	109,25	8,78	7,31	7,99	7,32	7,85
11	**A**	119	91	111	100	105,25	9	11,62	10,03	9,62	10,07
12	**A**	94	110	117	119	110,00	8,5	9,51	9,51	6,9	8,61
13	**A**	104	97	94	126	105,25	12,33	8,2	9,55	11,67	10,44
14	**A**	98	112	110	96	104,00	8,79	6,99	7,31	9,97	8,27
15	**A**	111	102	96	129	109,50	9,01	7,31	11,62	8,11	9,01
1	**B**	9	13	7	11	10,00	5,07	5,67	4,67	6,02	5,36
2	**B**	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
3	**B**	7	12	0	9	7,00	5,37	4,12	0	3,76	3,31
4	**B**	0	10	2	11	5,75	0	3,13	1,34	4,12	2,15
5	**B**	9	4	12	7	8,00	4,43	5,08	3,67	4,09	4,32
6	**B**	9	11	5	0	6,25	1,43	2,54	3,87	0	1,96
7	**B**	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
8	**B**	7	12	5	3	6,75	6,62	4,78	5,51	3,76	5,17
9	**B**	7	0	0	2	2,25	2,49	0	0	1,65	1,04
10	**B**	14	11	13	9	11,75	8,29	6,54	7,99	8,01	7,71
11	**B**	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
12	**B**	9	11	6	4	7,50	5	4,43	5,14	5,67	5,06
13	**B**	0	1	0	0	0,25	0	2,49	0	0	0,62
14	**B**	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0,00
15	**B**	13	12	1	4	7,50	3,61	2,98	3,01	4,49	3,52
1	**C**	90	85	81	93	87,25	8,23	8,84	8,03	7,54	8,16
2	**C**	100	87	94	96	94,25	7,56	8,09	7,64	6,55	7,46
3	**C**	84	91	94	112	95,25	8,13	8,44	7,67	7,95	8,05
4	**C**	76	91	97	86	87,50	6,12	6,67	7,02	5,99	6,45
5	**C**	83	79	81	93	84,00	5,71	6,62	7,09	5,99	6,35
6	**C**	109	95	90	85	94,75	8,39	7,54	6,32	8,88	7,78
7	**C**	95	88	80	99	90,50	7,99	8,13	7,65	8,01	7,95
8	**C**	83	87	60	91	80,25	7,21	8,93	7,78	6,69	7,65
9	**C**	70	59	86	87	75,50	8,88	10,66	11,09	7,76	9,60