

MARCOS DA CUNHA LOPES VIRMOND

REPARAÇÃO TUBULAR DE NERVO CIÁTICO COM  
PERICÁRDIO BOVINO PRESERVADO:  
ESTUDO EXPERIMENTAL, EM RATOS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina (Área de Concentração: Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental).

**Orientador: Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira**

BOTUCATU

1999

## **Dedicatória**

*Aos que não mais aqui estão, Maria e Herculaninho*

*Aos que estão, Herculano, Izabel e Tarso*

*Aos que continuarão, Lucas e Luiza*

*... e a quem sempre esteve e estará, Regina*

## **Homenagem especial**

Ao meu avô, Dr. Euclides Silveira da Cunha Lopes, que defendeu em 1913, na Faculdade de Medicina de Porto Alegre, sua tese, "Da anestesia loco-regional nas herniorrafias inguinaes"

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Frank Duerksen F.R.C.S.(Cd.) pela condução segura numa linha de vida profissional;

A Prof.a. Dra. Tânia Cestari pelo incentivo primeiro;

A bióloga M.S. Andréa de Faria Fernandes Belone pelo paciente e competente apoio técnico e operacional;

Aos dedicados funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, particularmente a Irene pelo exemplo de competência e dedicação;

Ao Prof. Dr. Diltor V.A. Opromolla, sempre estimulando o crescimento acadêmico de seus pesquisadores;

Ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, pela oportuna indicação dos caminhos até Botucatu;

A Iraci Borges e suas auxiliares, por manterem uma biblioteca exemplar dentro do Instituto Lauro de Souza Lima;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela competente assessoria e análise estatística dos dados;

Ao Prof. Dr. Flávio F. Aragon, pela assessoria computacional na operacionalização dos dados;

Aos funcionários da Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima;

Ao Prof. Dr. Joel Lastória pelo discreto mas vital apoio no momento certo;

Ao Dr. Fernando C. Monti e Paula Opromolla pelo constante estímulo e apoio editorial;

Ao Mauricio Angeluti de Oliveira pelo competente apoio no tratamento gráfico das fotos deste trabalho;

A Telma Aparecida Sneideris pelo incansável interesse na qualidade da apresentação e na manutenção do cronograma;

**"Nada é certo senão a incerteza, nem nada há mais miserável e orgulhoso do que o homem."**

Plínio

# SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>Revisão de Literatura .....</b>	<b>13</b>
<b>Material e Método.....</b>	<b>19</b>
<b>Animais de experimentação .....</b>	<b>19</b>
<b>Grupos experimentais .....</b>	<b>19</b>
<b>Seqüência dos tempos experimentais .....</b>	<b>20</b>
<b>Atributos estudados .....</b>	<b>21</b>
<b>Técnicas utilizadas .....</b>	<b>22</b>
<b>Anestesia .....</b>	<b>23</b>
<b>Técnica cirúrgica .....</b>	<b>23</b>
<b>Eutanásia .....</b>	<b>27</b>
<b>Coleta de dados .....</b>	<b>28</b>
<b>Processamento para histologia .....</b>	<b>28</b>
<b>Contagem de axônios mielinizados .....</b>	<b>29</b>
<b>Análise de complicações .....</b>	<b>30</b>
<b>Análise estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>Quanto ao peso corpóreo .....</b>	<b>33</b>
<b>Quanto à inspeção do tegumento da região plantar .....</b>	<b>36</b>
<b>Goniometria da articulação do tornozelo .....</b>	<b>37</b>
<b>Quanto à histologia .....</b>	<b>39</b>
<b>Quanto à contagem de axônios .....</b>	<b>48</b>
<b>Quanto às complicações observadas .....</b>	<b>48</b>

<b>Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>Quanto à metodologia .....</b>	<b>51</b>
<b>Reparação tubular .....</b>	<b>51</b>
<b>Material de experimentação .....</b>	<b>55</b>
<b>Grupos experimentais .....</b>	<b>59</b>
<b>Atributos estudados .....</b>	<b>60</b>
<b>Quanto aos resultados .....</b>	<b>62</b>
<b>Peso corpóreo .....</b>	<b>62</b>
<b>Trofismo do tegumento da região plantar .....</b>	<b>63</b>
<b>Mobilidade passiva da flexão plantar .....</b>	<b>66</b>
<b>Achados histológicos .....</b>	<b>70</b>
<b>Contagem de axônios .....</b>	<b>74</b>
<b>Quanto ao grupo controle .....</b>	<b>77</b>
<b>Quanto aos 20 casos com complicações .....</b>	<b>80</b>
<b>Quanto à diferença do tamanho do defeito experimental .....</b>	<b>86</b>
<b>Considerações Finais.....</b>	<b>87</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>89</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>90</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>96</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>110</b>

## RESUMO

Estudou-se o reparo tubular de perdas de segmento de nervo periférico mediante o uso do pericárdio bovino preservado como material para a confecção do tubo. O *Ratus norvegicus* foi o animal de experimentação. Os resultados revelam que houve regeneração de fibras nervosas procedentes do cabo proximal, atingido o cabo distal do nervo, em 97,3% de uma amostra que exclui os casos que apresentaram complicações incompatíveis com o processo de regeneração neural. Conclui-se que o pericárdio bovino é material de fácil obtenção e manuseio cirúrgico, determina reação tecidual desprezível e comporta-se adequadamente enquanto material para o reparo tubular de defeitos experimentais de nervo ciático em ratos. Sugere-se o aperfeiçoamento deste método com vistas à sua possível aplicação clínica.

## INTRODUÇÃO

Entende-se por reparação tubular de um nervo periférico a utilização de um tubo no qual são inseridos os cotos de um nervo seccionado com a finalidade de permitir adequadas condições para o processo de regeneração neural, estabelecendo-se assim continuidade do nervo lesado.

Collin et al. (1984) definem o reparo tubular como sendo o preenchimento de uma perda neural por meio de um condutor interposto entre os cotos. Sunderland (1991) refere-se à reparação tubular como o uso de um material tubular (veia, artéria, tecido mesotelial ou material biodegradável, entre outros) atuando como um condutor no sentido de facilitar a passagem de axônios em regeneração através de um segmento de perda de tecido neural.

Os eventos celulares e bioquímicos que ocorrem dentro do tubo já foram alvo de estudos, particularmente em tubos pseudo-sinoviais (Lundborg et al., 1997). Inicialmente, o tubo é preenchido por fluído e, posteriormente, é formada uma matriz de fibrina contendo macrófagos. A matriz é povoada por capilares e células de Schwann a partir tanto do coto proximal como do distal. Segue-se o crescimento axonal proveniente da extremidade proximal.

As técnicas clássicas da reparação de nervos são a sutura término-terminal, seja epineural ou perineural, e os enxertos de nervo. A primeira é indicada nos casos em que existe pouca perda de segmento, permitindo um afrontamento dos cotos proximal e distal com um ajuste fascicular adequado e uma sutura sem tensão. Este último fator

é fundamental para obtenção de resultados satisfatórios. Assim, a esta situação não interessa o reparo tubular.

No caso de perdas mais extensas, nas quais o princípio da sutura sem tensão não pode ser atendido, o enxerto de nervo surge como procedimento de escolha (Suematsu et al., 1989). Entretanto, alguns autores consideram os resultados desta última técnica não totalmente satisfatórios (Sedon, 1975; Sunderland, 1978; Brunelli, 1985). As áreas doadoras são escassas e podem se mostrar insuficientes para resolver necessidades de reparações mais extensas. Na área doadora, existe uma perda sensorial residual que representa uma seqüela de gravidade variável. O leito receptor destes enxertos pode mostrar-se com intensa fibrose e com poucas condições para uma adequada vascularização do enxerto, situação esta mais freqüente nos casos em que, usualmente, também se necessita de um enxerto de maior comprimento.

A reparação tubular é uma técnica cirúrgica alternativa para a resolução de lesões neurais com perda importante de segmento em um nervo periférico. Esta técnica apresenta algumas vantagens, tais como: prover orientação por contato para um alinhamento longitudinal do crescimento neural; reduzir a invasão de fibrose no microambiente de regeneração; e inibir o crescimento axonal extrafascicular (Collin, 1984). Além destas, podemos mencionar que a presença do tubo propicia um microambiente mais favorável à regeneração neural, permitindo uma atuação adequada de substâncias solúveis envolvidas neste processo.

Muitos materiais foram utilizados para a construção do tubo (Quadros 1 e 2). No entanto, uma das grandes vantagens desta técnica seria, uma vez definido um tipo ótimo de material, a de se dispor de uma

quantidade ilimitada desse material para atender às mais diversas necessidades do cirurgião a qualquer momento. Talvez, este seja o caso do pericárdio bovino preservado, pois é material disponível comercialmente e em quantidade suficiente para preencher grandes perdas; sendo exógeno elimina a questão de seqüelas residuais nas áreas doadoras, comuns nos casos de enxertos autólogos; tem baixa imunogenicidade devido ao sistema utilizado para seu preparo; e pode ser aplicado em zonas de intensa fibrose, com leito de pobre vascularização, uma vez que, preservado, não necessita revascularização.

Como se vê, o pericárdio bovino preservado preenche várias condições para se tornar um material de escolha para o reparo tubular de perdas neurais.

Assim, propõe-se o estudo experimental da reparação tubular neural com uso de pericárdio bovino preservado, com o objetivo de se verificar a possibilidade da ocorrência de regeneração neural desde o coto proximal até o distal<sup>1</sup>.

---

Para a produção deste texto, utilizou-se :  
UNESP. Normas para publicações. v. 2, Referências Bibliográficas; v. 4, Dissertações e Teses;  
NOMINA anatômica, 5° ed.. MEDSI.

## REVISÃO DE LITERATURA

As primeiras referências à reparação tubular remontam ao fim do século passado. Weiss (1944) apresenta uma extensa lista de artigos publicados versando sobre esse assunto (Quadro 1):

Quadro 1- Principais publicações até 1943 sobre reparo tubular (Weiss, 1944 )

Autor	Ano	Material utilizado
Gluck	1880	osso descalcificado
Vanlair	1882	osso descalcificado
Kolliker	1890	osso descalcificado
v. Büngner	1981	artéria; veia
Huber	1895	membrana de cartilagem
Payr	1900	magnésio
Pomerancew	1900	osso descalcificado
Lotheissen	1901	gelatina
Foramitti	1904	artéria; preservada ou não
Craig & Ellis	1905	membrana de cartilagem
Sherren	1906	membrana de cartilagem
Treutlein	1906	artéria
v. Auffenberg	1907	osso descalcificado
Hashimoto & Tokuoka	1907	artéria preservada
Tilmanns	1907	*
Wrede	1909	veia
Röpke	1910	*
Perekropoff	1913	artéria, veia
Denk	1914	fáscia
Eden & Rehn	1914	tecido adiposo
Hirschel	1915	artérias preservadas
Auerbach	1915	galalite
Fullerton	1915	veia
Hans	1915	epineurio
Heile & Henzel	1915	borracha não vulcanizada
Kirk & Lewis	1915	fáscia
Kredel	1915	fáscia e gordura
Nageotte	1915	veia

Autor	Ano	Material utilizado
		( continuação do Quadro 1 )
Bethe	1916	artéria
Edinger	1916	tubo de ágar
Mauclair	1916	traquéia
Meisel	1916	fáscia
Auerbach	1916	preparado de caseína
Stracker	1916	veias; tubo de ágar
Bencke	1917	tubo de ágar; artéria
Burk	1917	tubo de ágar
Dustin	1917	artéria; veia; fáscia
Eden	1917	artéria <i>in situ</i>
v. Enderlen & Lobenhoffer	1917	artéria; nervura central de pena ; tubo de ágar
Hohmann & Spielmeyer	1917	tubo de ágar; artéria
Kirschner	1917	tubo de ágar; fáscia e gordura
Müller & Berlinger	1917	tubo de ágar; artéria
Perthes	1917	tecido adiposo
Spitzzy	1917	tubo de ágar
Steinthal	1917	borracha
Bielschowsky & Unger	1918	dura preservada
Meuriot & Platon	1918	borracha
Platt	1919	fáscia lubrificada; veia
Huber	1920	artéria, fáscia, membrana cartilaginosa
Stopford	1920	fáscia; veia
Kraus & Reisner	1940	músculo, gordura
Verne & Iselin	1941	pergaminho
Spurling	1943	tântalo

\* No original, o autor não menciona os materiais utilizados.

Pode-se depreender que o interesse por este tipo de reparo nunca diminuiu com o passar dos anos. No entanto, somente em 1944 começaram a surgir publicações mais consistentes sobre o assunto (Quadro 2).

Quadro 2 - Principais publicações sobre reparo tubular de 1944 a 1998 (lista parcial).

Autor	Ano	Material utilizado
Weiss	1944	tântalo
Weiss	1944	artéria
Weiss	1946	artéria
Campbell	1956	milipore
Moback	1958	milipore
Campbell	1961	milipore
Chao	1962	amioplastina
Gulati	1969	enxerto arterial
Lumborg	1980	pseudosinóvia
Rosen	1980	colágeno
Lundborg	1981	mesotélio
Chiu	1982	veia
Lumborg	1982	silicone
Molander	1982	poliglactina
Gibby	1983	colágeno
Rosen	1983	ácido poliglicólico
Uzman	1983	acrílico semi permeável
Collin	1984	colágeno
Scaraveilli	1984	filme plástico de PVC
Seckel	1984	poliéster
Henry	1985	poliéster
Mackinnon	1985	pseudosinovia
Mackinnon	1988	ácido poliglicólico PGA
Madison	1988	silicone
Rosen	1989	colágeno
Walton	1989	veia
Suemutso	1989	veia
Wang	1993	veia invertida
Brunelli	1993	veia e músculo
Den Dunnen	1993	co-polímero de poli-L-lactide e poli-ε-capro-lactona
Benito-Ruiz	1994	veia invertida
Langone	1995	poliorganofosfazeno
Wang	1995	veia invertida
Lundborg	1997	silicone/poliamida
Foidart-Dessalle	1998	veia com células de Schwann

Para o reparo tubular, Lundborg et al. (1980) utilizaram um tubo pseudo sinovial previamente formado em torno de uma prótese de tendão de silicone concluindo que, após três meses, há a formação de um nervo. Chiu et al. (1982) repararam defeito neural com enxerto de veia, obtendo regeneração neural através da luz da veia, inclusive com reinervação muscular demonstrada por eletromiografia. Gibby et al. (1983) seccionaram nervo radial de gatos em grupos não reparado, reparado com sutura e reparado com tubo de colágeno. Concluíram que, mesmo havendo regeneração em todos os grupos, o reparado com tubo de colágeno apresenta melhor reinervação de estruturas sensórias da pele. Colin et al. (1984) não encontram diferença substancial de resultados entre três grupos que utilizaram, isto é, reparo em nervo tibial de ratos com tubo de colágeno, com tubo pseudo-sinovial e por enxerto de nervo. Entretanto, reconhecem que o reparo tubular apresenta algumas vantagens sobre o enxerto de nervo, particularmente no que se refere à ocorrência de fibrose. Mackinnon et al. (1985) promoveram um avanço neste modelo ao utilizarem reparo tubular com tubo pseudo-sinovial em primatas, logrando regeneração adequada das fibras nervosas entre os cotos. Posteriormente, Mackinnon et al. (1988), já em um estudo de aplicação clínica, utilizaram tubo confeccionado com ácido poliglicólico (PGA), relatando excelentes resultados aferidos pelos testes de discriminação de dois pontos móveis e estático. Referem também que, de forma geral, seus resultados com o tubo de PGA são superiores aos obtidos com enxerto de nervo. Da mesma forma, Walton et al. (1989) apresentam uma série de 22 nervos digitais reparados com enxerto de veia, concluindo que os defeitos com tamanho entre um e três centímetros apresentam resultados similares

aos obtidos com enxerto de nervo. Dentro do conceito de compartimentos extraperineural e endoperineural, Rosen et al. (1989) corrigiram defeitos criados em nervos mediano e ulnar de gatos envolvendo os fascículos seccionados com uma membrana de colágeno hipoantigênico. Concluem que os resultados obtidos com a reparação tubular não são significativamente diferentes dos alcançados tanto com sutura epineural como perineural. Entre 1991 e 1994, Lundborg et al. apresentaram dois artigos sobre o uso clínico da técnica do tubo pseudo sinovial a partir de prótese de silicone para reparar os nervos ulnar e mediano. Em 1995, Langone et al. discutem o uso de reparo tubular com prótese de poliorganofosfazeno com a característica de se tratar de um material biodegradável.

Em estudo mais direcionado ao uso de tubos para análise das características da regeneração neural, Scaravilli et al. (1984a) reconhecem que a presença do coto distal é essencial para que ocorra uma regeneração adequada. Seckel et al. (1984) apresentam evidências que apoiam a noção de que os tecidos do coto distal exercem um efeito trófico essencial nos axônios do coto proximal para lograr sua regeneração. Scaravilli et al. (1984 b) utilizaram o modelo do reparo tubular para estudar o processo de formação e organização estrutural do perineuro. Madison et al. (1985,1988), demonstram que a introdução de colágeno ou gel de laminina dentro do tubo favorece a regeneração axonal, permitindo que esta ocorra mesmo com grandes distâncias entre os cotos. De fato, Suematsu et al. (1989) comentam, em experimento de reparo tubular com veias, que o sucesso da regeneração neural com este material poderia, em parte, ser devido a uma possível secreção de laminina a partir das células do

endotélio da veia. O uso de veia invertida surgiu com vistas a evitar-se o possível efeito bloqueador da progressão axonal pelas válvulas em sua parede (Wang et al., 1993; Benito -Ruiz et al., 1994). Com vistas a resolver o problema do colapso da veia, foi proposta a introdução de músculo desnaturado em sua luz (Brunelli et al., 1993). Além de prevenir o colapso, o músculo desnaturado teria a vantagem de apresentar um substrato adequado para o alongamento axonal através da membrana basal da célula muscular. Em verdade, o uso de músculo desnaturado, visando promover a regeneração neural, já tinha sido investigado extensivamente por Glasby et al. (1990).

Preocupado quanto ao comprimento, e na tentativa de obter regeneração em defeitos de maiores dimensões, Maeda et al. (1993) e Francel et al. (1997) sugeriram introduzir dentro de um tubo de silicone vários segmentos de enxerto de nervo, contemplando assim a presença de células de Schwann e de fatores neurotróficos que seriam liberados a partir das células destes segmentos. Já Lundborg et al. (1997) introduziram filamentos de poliamida que agiriam como facilitadores da progressão axonal.

A bibliografia consultada permite dizer que esta técnica tem sido utilizada para o estudo dos fatores celulares e bioquímicos do processo de regeneração neural e, mais restritamente, como aplicação clínica. A contínua presença de trabalhos em periódicos científicos versando sobre este assunto atesta seu perene interesse e atualidade. Constata-se também que, até o momento, não existem referências ao uso de pericárdio bovino para a confecção do tubo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Animais de Experimentação**

Foram utilizados 86 ratos (*Ratus norvegicus*) com 45 a 50 dias de idade, machos, pesando entre 180g e 215g (média de 197g), fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Desses 86 animais, quatro foram utilizados para a padronização da técnica empregada, dezessete destinaram-se ao grupo controle e os restantes sessenta e cinco ratos serviram às fases definitivas de experimentação. Todos os animais foram mantidos em caixas de plástico forradas com maravalha e com tampa de grade metálica por onde recebiam água *ad libitum* por sucção em frasco de vidro emborcado e alimentação padronizada constituída de ração para hamster.

### **2. Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em dois grupos: tratado e controle. Por sua vez, cada grupo foi dividido em dois subgrupos diferenciados pelo tamanho do defeito experimental criado no nervo ciático, constituindo-se assim quatro subgrupos (A,B,C e D). Para os subgrupos A e C foi criado um defeito de 9 mm e para os subgrupos B e D, um defeito de 13 mm, como pode se verificar no Quadro 3.

Uma vez estabelecida a padronização da técnica empregada, os animais foram incluídos no grupo tratado ou controle de modo aleatório por sorteio, mantendo-se a proporção de um animal do grupo controle para quatro do grupo tratado. O tratamento experimental consistiu na

introdução de um tubo de pericárdio bovino no defeito criado no nervo ciático do membro posterior direito e o grupo controle sofreu apenas ressecção de segmento do nervo, nas mesmas dimensões do grupo tratado.

Todos os animais foram observados por um período aproximado de cinco meses após o procedimento experimental.

Quadro 3 - Divisão dos animais de experimentação quanto ao número e tamanho do defeito neural.

Subgrupos	Dimensão ( em mm )	Número de animais	
		tratado	controle
A	9	29	----
B	9	----	8
C	13	36	----
D	13	----	9
	Total	65	17

### 3. Seqüência dos Tempos Experimentais

3.1. Pesagem inicial do animal.

3.2. Inspeção da pata do membro posterior direito.

3.3. Goniometria do angulo passivo de flexão plantar da articulação do tornozelo do membro posterior direito.

3.4. Anestesia.

3.5. Tricotomia da regido lateral do membro posterior direito.

- 3.6. Colocação do rato em decúbito ventral horizontal com os membros posteriores em abdução, fixados em placa de cortiça por meio de agulha hipodérmica.
  - 3.7. Procedimento cirúrgico padronizado.
  - 3.8. Recuperação anestésica.
  - 3.9. Manutenção dos animais
  - 3.10. Pesagem final do animal.
  - 3.11. Inspeção da pata do membro posterior direito.
  - 3.12. Goniometria do angulo passivo de flexão plantar da articulação do tornozelo do membro posterior direito.
  - 3.13. Sacrifício do animal.
  - 3.14. Abertura cirúrgica do local de experimento.
  - 3.15. Retirada de segmento de nervo contendo o tubo experimental.
  - 3.16. Inspeção do segmento de nervo nos animais do grupo controle.
  - 3.17. Processamento dos segmentos de nervo para histologia.
  - 3.18. Histologia.
  - 3.19. Contagem de axônios mielinizados.
4. Atributos Estudados
    - 4.1. Peso corpóreo ( PC ).
    - 4.2. Condição trófica do tegumento da região plantar do membro posterior direito.

4.3. Mobilidade passiva da flexão plantar da articulação do tornozelo do membro posterior direito.

4.4. Achados histológicos compatíveis com regeneração neural de ponto proximal, médio e distal do segmento experimental do nervo tratado.

4.5. Densidade axonal nos pontos proximal, médio e distal do segmento experimental do nervo tratado.

## 5. Técnicas Utilizadas

### 5.1. Pesagem

Cada animal foi pesado logo no início dos tempos experimentais e imediatamente antes do momento da eutanásia. Para a pesagem foi utilizada balança comercial comum com subdivisão máxima de dez gramas.

### 5.2 Inspeção da pata do membro posterior direito.

Antes de iniciar o procedimento cirúrgico e de eutanásia do animal, procedeu-se A inspeção da região plantar do membro tratado com vistas A presença ou não de úlcera plantar.

### 5.3. Goniometria da articulação do tornozelo.

Imediatamente antes do procedimento cirúrgico, foi feita a goniometria do Angulo passivo de flexão plantar maxima da articulação do tornozelo do membro posterior direito. Utilizou-se para tal um goniômetro de plástico. O mesmo procedimento foi seguido imediatamente antes do sacrifício do animal.

## 6. Anestesia

Os animais foram anestesiados por via peritoneal empregando-se o pentobarbital<sup>1</sup> na dose de 1 ml/kg de peso corpóreo. Complementarmente, o local de incisão foi infiltrado com 2 a 3 ml de solução de lidocaína a 1%. Ainda que variável o tempo requerido para se obter efeito anestésico suficiente para início do procedimento cirúrgico, em nenhum caso houve necessidade de dose de manutenção. Em eventuais casos de depressão respiratória durante o ato cirúrgico ou no período de recuperação pós-anestésica, os ratos sofreram aspiração traqueal com cânula de polipropileno fina acoplada a uma seringa de 10 ml ou foram ventilados com ar ambiente insuflado por uma cânula de polipropileno mais espesso em comunicação com uma pêra de borracha.

## 7. Técnica Cirúrgica

### 7.1. Posição do animal

Após a anestesia e tricotomia, os animais foram colocados em decúbito ventral - horizontal, sobre uma placa de cortiça espessa. Os membros posteriores foram abduzidos e fixados na placa por meio de agulhas hipodérmicas 25x7 que transfixavam a pele da região interdigital. Os membros anteriores foram mantidos em posição por agulhas hipodérmicas colocadas imediatamente atrás e acima da região dos cotovelos.

---

<sup>1</sup>Thionembutal ( Abbot®).

## 7.2. Antissepsia.

A porção de pele tricotomizada no membro posterior direito foi pincelada com solução de álcool iodado. Ressalte-se que, após este procedimento, o ato cirúrgico não foi estéril. Apenas utilizaram-se luvas de borracha limpas, fios de sutura inicialmente estéreis, laminas de bisturi número 15 inicialmente estéreis e material cirúrgico inicialmente esterilizado. Entre um procedimento e outro, o material cirúrgico era limpo com solução fisiológica e mantido em caixa de alumínio contendo solução de álcool iodado que os cobria completamente. Os fios de sutura, régua metálica e papel milimetrado de eletrocardiografia também eram imergidos nesta solução.

## 7.3. Via de Acesso

Foi utilizada uma incisão longitudinal medindo cerca de seis centímetros que começava proximalmente a um centímetro lateralmente a coluna vertebral e estendida distalmente sobre a face dorsal da articulação do joelho, em direção ligeiramente oblíqua. Após, por divulsão romba entre as fibras do músculo bíceps femoral, atingiu-se o plano do nervo ciático que, nesta situação se dispõe sobre o músculo adutor femoral. Identificou-se também a divisão do nervo ciático, a partir da fossa poplítea, nos seus ramos sural, tibial posterior e fibular

## 7.4. Criação do defeito neural.

Utilizando-se lupa cirúrgica de 3,5 aumentos marca Keeler, tanto no grupo tratado como no controle, praticou-se a ressecção de um segmento do nervo ciático, sendo referência proximal o ponto de emergência do ramo muscular proximal para os músculos bíceps femoral, semitendinoso e semimembranoso (Daniel et al., 1977). Tomando-se este

ponto como referência zero, foram medidas, de acordo com o grupo, distâncias de 9 mm e 13 mm. Procedeu-se então à incisão no limite proximal e distal com uma tesoura microcirúrgica e o segmento assim determinado foi retirado da ferida operatória, estendido sobre cartão numerado e preservado em solução de formalina à 10% para eventual referência futura. A medida da distância foi efetuada com um papel milimetrado usado em eletrocardiografia e aferida com uma régua milimétrica de metal graduada com dez centímetros de comprimento.

#### 7.5. Preparação do tubo.

Retirou-se parcialmente de seu frasco uma membrana de pericárdio bovino preservado<sup>1</sup>, medindo 11 cm x 6 cm e com espessura de 0,32 mm. Ressecou-se uma lâmina de aproximadamente 4 x 3 cm. O restante do material foi recolocado em seu frasco, o qual foi vedado com tampa própria e lacrado com filme de PVC. A lâmina para uso foi colocada em uma placa de Petri contendo solução de cloreto de sódio a 9%, a qual foi trocada até quatro vezes antes do uso do material. Dessa lâmina foi recortado um segmento retangular medindo, no seu lado maior, 4 mm a mais do que o defeito criado, e 5 ou 6 mm em seu lado menor.

#### 7.6. Reparação do defeito neural.

O retângulo de pericárdio foi levado à ferida operatória e colocado sob os dois cotos do nervo ciático (Fig.1). Tanto o coto proximal como o distal foram fixados neste retângulo por meio de uma sutura de mononáilon 8 zeros<sup>2</sup> passada a 1 mm para dentro do lado menor do retângulo e tomando tecido epineural de um ponto situado a 1 mm do limite do cabo em questão. Após, praticou-se uma sutura contínua com o

---

I IMC® produzido por Biomédica Indústria, Comércio e Representações S.A. número 34943 <sup>2</sup>  
Mononylon Ethicon®

mesmo fio, desde o lado distal até o proximal de maneira a aproximar os dois lados maiores do retângulo na forma de um tubo (Fig. 2).

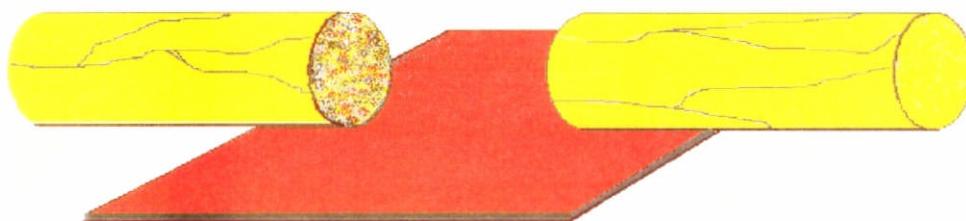


Fig. 1 — Desenho esquemático mostrando a lâmina de pericárdio bovino em fase de fixação aos cotos seccionados.



Fig.2 — Desenho esquemático mostrando o tubo já confeccionado.

### 7.7. Procedimento no grupo controle.

Após a ressecção do segmento correspondente, conforme descrito em 7.4, tomou-se o cuidado de não manipular os cabos, deixando-os fixos ao músculo subjacente pela tênue fáschia que normalmente recobre o nervo ciático junto ao referido grupo muscular. De imediato, executou-se o fechamento da ferida operatória.

### 7.8. Fechamento da ferida operatória.

Após irrigação com solução de cloreto de sódio A 9%, os planos musculares foram aproximados manualmente e a pele foi fechada com sutura contínua de mononáilon<sup>1</sup> 5 ou 6 zeros de acordo com a disponibilidade e, finalmente, a ferida foi pincelada com solução de álcool iodado.

## 8. Eutanásia

Ao completar o tempo aproximado de experimentação, cada animal sofreu eutanásia mediante inalação de éter em ambiente saturado. Cada um foi colocado em uma caixa de plástico emborcada, medindo aproximadamente 45 x 30 x 25 cm juntamente com um chumaço de algodão fartamente embebido em éter sulfúrico até constatação de morte por ausência de batimentos cardíacos aferida pela palpação do tórax do animal. Tomou-se o cuidado de que a eutanásia fosse procedida em ambiente isolado do local onde se encontravam os demais animais.

---

<sup>1</sup> Mononylon Ethicon®

## 9. Coleta de dados

Imediatamente antes de sofrerem eutanásia os animais foram pesados, inspecionados quanto à presença ou não de úlcera plantar e submetidos à goniometria do ângulo passivo de flexão plantar máxima da articulação do tornozelo do membro posterior direito. Os resultados destes atributos foram devidamente anotados em formulário apropriado. Informações adicionais quanto ao aspecto do tubo e presença ou ausência de reação inflamatória também foram anotadas no mesmo documento, assim como outros comentários.

## 10. Processamento para histologia.

No caso dos animais do grupo tratado, um segmento do nervo ciático foi retirado com uso de bisturi descartável com lâmina número 15. Deste, foram destacados três segmentos correspondendo respectivamente a: segmento proximal para fixação em tetróxido de ósmio a 4%; segmento médio para fixação em tetróxido de ósmio a 4%; e segmento distal para fixação em tetróxido de ósmio a 4% (Quadro 4). Em alguns casos, separou-se um segmento adicional, do segmento proximal ou distal, que recebeu um índice para sua identificação. Assim, um segmento extra proximal fixado em tetróxido de ósmio recebeu a denominação de P1 e um segmento extra distal recebeu a denominação de DI.

No caso dos animais do grupo controle, onde a inspeção permitiu inferir a possibilidade de ter havido crescimento neural que atingiu o coto distal, o segmento foi globalmente retirado e enviado para processamento com fixação em tetróxido de ósmio visando investigação sob microscopia óptica.

Quadro 4- Identificação do processamento histopatológico.

Número	Segmento	Fixação	Coloração
1	proximal	ósmio	H&E
2	médio	ósmio	H&E
3	distal	ósmio	H&E

11. Contagem de axônios mielinizados nos segmentos proximal, médio e distal.

As laminas processadas, conforme explanado no item anterior, foram focalizadas em aumento de 50 X em um microscópio Zeiss Axioplan 2 gerenciado por um computador Dell Latitude XPi. A imagem digitalizada captada por uma camera SONY Hyper HAD digital foi enviada e congelada no monitor de vídeo de um segundo microcomputador por meio do programa de sistema de imagens KS 100 versão 2.0 da Kontron Elektronik. Após calibração pertinente, traçou-se com mouse o perímetro integral do nervo contido no espaço delimitado pelo tubo de pericárdio bovino e sua area foi medida em p<sup>2</sup>. Imediatamente, ajustou-se o valor da objetiva para obter-se aumento de 400X. Uma vez focalizada, a imagem assim obtida foi novamente enviada a. tela do monitor e congelada. Por meio do mesmo programa desenhou-se uma grade com lado padronizado de 50p, correspondendo cada quadrado a uma area de 2.500 p<sup>2</sup>. Ao acaso foram selecionados três quadrados e todos os axônios mielinizados foram contados. Para tal, utilizou - se o

mouse com cursor em cruz que executa a marcação de cada axônio mielinizado e automaticamente numera e acumula os valores resultando no somatório de todos os axônios contados em cada quadrado.

Com estes valores obteve-se a média do número de axônios mielinizados numa área de  $2.500 \mu^2$  para cada caso estudado. Em interação com a área total do nervo anteriormente calculada, obteve-se a estimativa do número total de axônios mielinizados no caso em estudo, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$NA = \bar{X}_a \times At / 2.500 \mu^2$$

sendo que NA corresponde ao número total de axônios mielinizados para o caso em estudo,  $\bar{X}_a$  a média da contagem de axônios nas grades e At a área total do nervo em análise.

## 12. Análise de complicações

As complicações identificadas no momento da coleta de dados, foram anotadas, tabuladas e discutidas quanto à sua relevância aos objetivos do estudo.

## 13. Análise estatística

A análise do peso avaliado no início e final do experimento foi realizada através da estatísticas multivariada dos perfis médios de grupos independentes ((Wichern et al., 1992).

Quanto ao resultado da inspeção do trofismo do tegumento do coxim plantar, utilizou-se o teste de Goodman (1964,1965) para contrastes entre e dentro de proporções binomiais

Para a goniometria do angulo passivo de flexão plantar da articulação do tornozelo, a comparação dos dois grupos foi realizada através do teste de Mann-Withney.

O resultado quanto A presença de axônios nos segmentos proximal, médio e distal foi tratado pelo teste de Friedmann (Siegel et al., 1988).

Todas as discussões no presente estudo foram realizadas em um nível de 5% de significância.

**RESULTADOS**

Preliminarmente esclarece-se que, do início do experimento até a coleta final dos dados, ocorreram fatos relevantes que justificaram uma particularização da amostra para cada atributo estudado. Tais particularidades se encontram consolidadas nas tabelas 1 e 2. Para o caso do peso corpóreo, inspeção do tegumento da região plantar e goniometria da articulação do tornozelo, excluíram-se apenas os casos falecidos durante o período de observação. Para o estudo histológico, excluídos estes, tomaram-se apenas os casos nos quais houve conexão macroscópica entre o coto proximal e o distal. Desta forma, estão incluídos aqui mesmo os casos com complicação nos quais este requisito foi cumprido.

Tabela 1 — Particularização da amostra de acordo com os atributos estudados no grupo tratado.

Atributos	Tamanho da amostra		Total
	Amostra utilizada	Não incluídos	
Peso corpóreo	58	7	65
Inspeção plantar	58	7	65
Goniometria	58	7	65
Histologia	50	15	65
Contagem axonal	11	54	65

Tabela 2 — Particularização da amostra de acordo com os atributos estudados no grupo controle.

Atributos	Tamanho da amostra		Total
	Amostra utilizada	Não incluídos	
Peso corpóreo	16	1	17
Inspeção plantar	16	1	17
Goniometria	16	1	17
Histologia	1	16	17
Contagem axonal	0	17	17

Em relação aos atributos estudados, relatam-se os seguintes resultados:

#### **Quanto ao peso corpóreo:**

O ganho de peso dos animais do grupo tratado e do grupo controle pode ser visto na Tabela 3. A tabela 4 apresenta o resultado da análise de perfil quanto ao peso nos dois grupos. A figura 3 demonstra, em gráfico de linha, o perfil médio de cada grupo.

Tabela 3 - Média e desvio padrão (DP) do peso em gramas (g) segundo grupo e momento de avaliação.

Grupo	Momento de avaliação	
	Peso inicial e DP	Peso final e DP
Tratado	188,53 ± 17,32	597,16 ± 61,46
Controle	199,25 ± 19,21	470,81 ± 114,22

Tabela 4 - Resultado da análise de perfil da variável peso nos dois grupos de estudo (controle = C; tratado = T), avaliados em dois momentos (Inicial = I; final = F).

Hipótese estatística	Resultado do teste estatístico ("P-value")	Comentário
Semelhança dos perfis médios	I / F = 32,45 (p < 0,01)	Os perfis médios não têm comportamento semelhante ao longo dos momentos
Efeitos de grupos	I : F = 4,58 (p < 0,05)	C ≠ T
	I : F = 35,07 (p < 0,01)	C ≠ T
Efeito de momentos	C : F = 162,52 (p < 0,01)	I ≠ F
	T : F = 1333,92 (p < 0,01)	I ≠ F

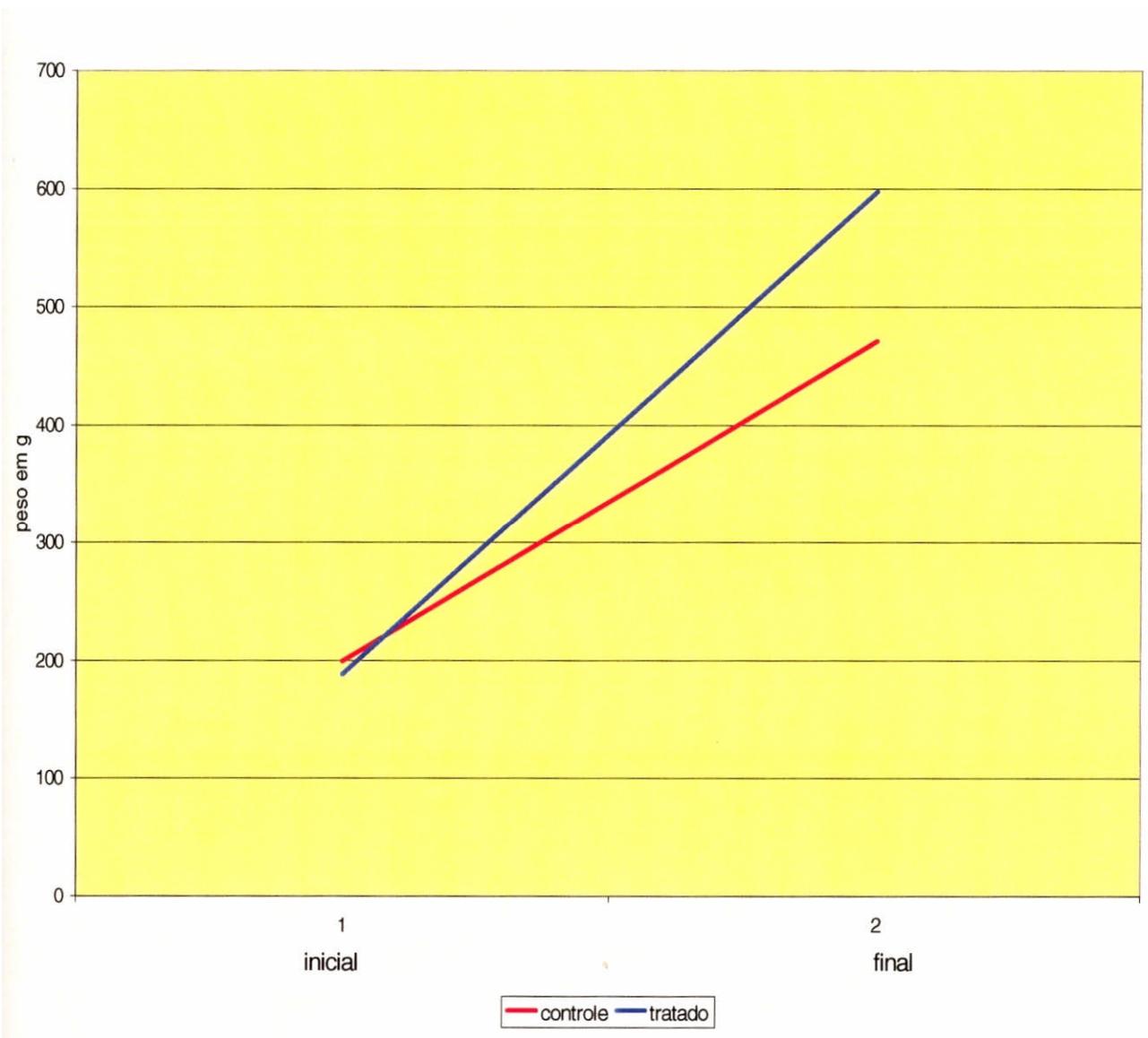


Figura 3 - Gráfico de linha dos perfis médios dos pesos inicial e final dos grupos tratado e controle.

**Quanto à inspeção do tegumento da região plantar do membro posterior direito:**

Tabela 5: - Achados de inspeção quanto à presença ou ausência de úlcera plantar no membro posterior direito dos animais tratados e de controle.

Presença de úlcera	Grupo tratado		Grupo controle	
	sim	10	17,2	05
não	48	82,8	12	70,6
total	58	100	17	100

A tabela 5 revela, através do teste estatístico de Goodmann, que não há diferença entre os grupos tratado e controle quanto à ocorrência de úlcera ( $P < 0,05$ ). Desta forma, não se detectou associação entre a presença de úlcera e o tratamento dos animais. Porém, em ambos os grupos, a ausência de úlcera tem predominância significativa em relação a sua presença ( $P < 0,05$ ).

### Na goniometria efetuada na articulação do tornozelo:

Tabela 6. Resultado da goniometria da articulação do tornozelo no momento da eutanásia entre os animais do grupo tratado que apresentaram ou não complicações no período de observação.

Complicações	0° - 49°		50° e mais		Total	
	N	%	N	%	N	%
sem	34	89,5	4	10,5	38	100,0
com	11	55,0	9	45,0	20	100,0
total	45	77,5	13	22,5	58	100,0

Considerando-se a faixa de ângulos de valores aceitáveis (0° - 49°), houve predominância de indivíduos sem complicações ( $P < 0,05$ ). O contrário ocorreu em relação à faixa de ângulos de valores não aceitáveis (50° e mais). No grupo com complicações, há equilíbrio de ocorrência de indivíduos com ângulos dentro dos valores aceitáveis e não aceitáveis. No grupo sem complicações, a ocorrência de indivíduos com ângulos de 0° a 49° (aceitáveis) é significativamente maior ( $P < 0,01$ ) que os com ângulos igual ou acima de 50° (não aceitáveis).

Tabela 7 - Distribuição dos indivíduos do grupo controle e tratado quanto à faixa de ângulos aceitáveis e não aceitáveis.

Grupo	0° - 49°		50° e mais		total	
	Controle	11	68,8	5	31,2	16
Tratado	45	77,6	13	22,4	58	100

Não existe associação do ângulo com o fato do animal ser tratado ou não. Em ambos os grupos, há predominância significativa ( $P < 0,05$ ) dos ângulos aceitáveis em relação aos não aceitáveis.

Tabela 8 - Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico da comparação dos grupos em relação à goniometria da articulação do tornozelo.

Variável	Grupo		Resultado do teste estatístico	"P-value"
	Controle (16)	Tratado (58)		
Ângulo	41,50 ± 28,50	22,50 ± 61,50	2,03	$P < 0,05$

Existe um efeito significativo da medida do ângulo do tornozelo nos dois grupos (tratado e controle), sendo que a resposta mediana do grupo controle foi, significativamente, maior ( $P < 0,05$ ) do que a do grupo tratado.

### **Quanto à histologia de ponto proximal, médio e distal do segmento experimental do nervo:**

Encontram-se os resultados relatados nas tabelas 9, 10 e 11. Nas duas últimas, para melhor visualização, se diferenciam, no grupo tratado, um conjunto com a totalidade dos casos possíveis de serem estudados pela histologia e um conjunto com todos os casos nos quais não ocorreram complicações que pudessem criar empecilhos exógenos ao processo de regeneração neural.

Em relação ao grupo controle, à inspeção macroscópica durante a eutanásia, verificou-se que apenas um dos casos apresentava conexão entre os cotos proximal e distal por um filamento de tecido (Fig.4). Assim, procedeu-se à coleta de todo o segmento, que foi submetido à histologia nos mesmos padrões para os casos tratados. O resultado revelou presença de axônios mielinizados nos segmentos proximal, médio e distal. Cabe explicar que os animais do grupo controle não foram submetidos à histologia, com exceção do caso acima mencionado, por não apresentarem material passível deste procedimento.

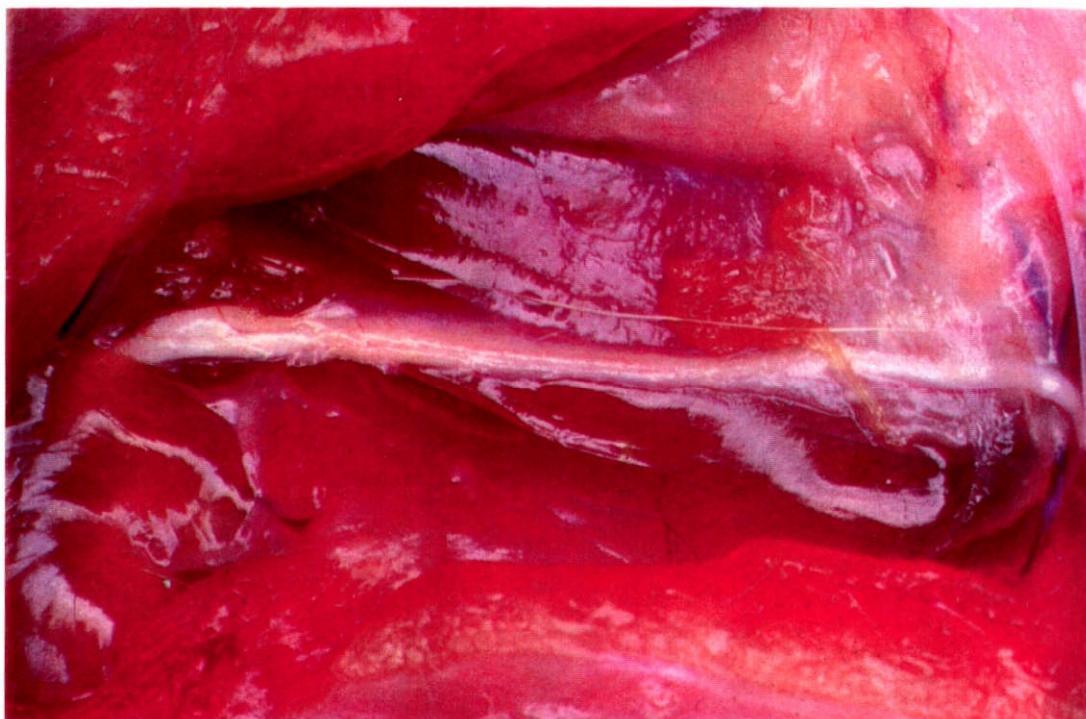


Fig. 4 – Demonstração da conexão macroscópica entre coto proximal e distal em um único caso do grupo controle.

Tabela 9 — Resultado da inspeção macroscópica do nervo ciático dos animais do grupo controle, referida como presença ou ausência de conexão entre o coto proximal e distal.

Conexão	N	%
Presente	1	6,2
Ausente	15	93,8
Total	16	100,0

A análise estatística dos achados para o segmento proximal revela que existe diferença entre os grupos tratado e controle ( $P < 0,05$ ), sendo a resposta do grupo tratado para a presença de conexão neural maior que

no grupo controle. Da mesma forma, são estes os resultados da análise para os segmentos médio e distal.

No grupo controle há predominância significativa da ausência de conexão neural enquanto o inverso ocorre no grupo tratado ( $P < 0,05$ ).

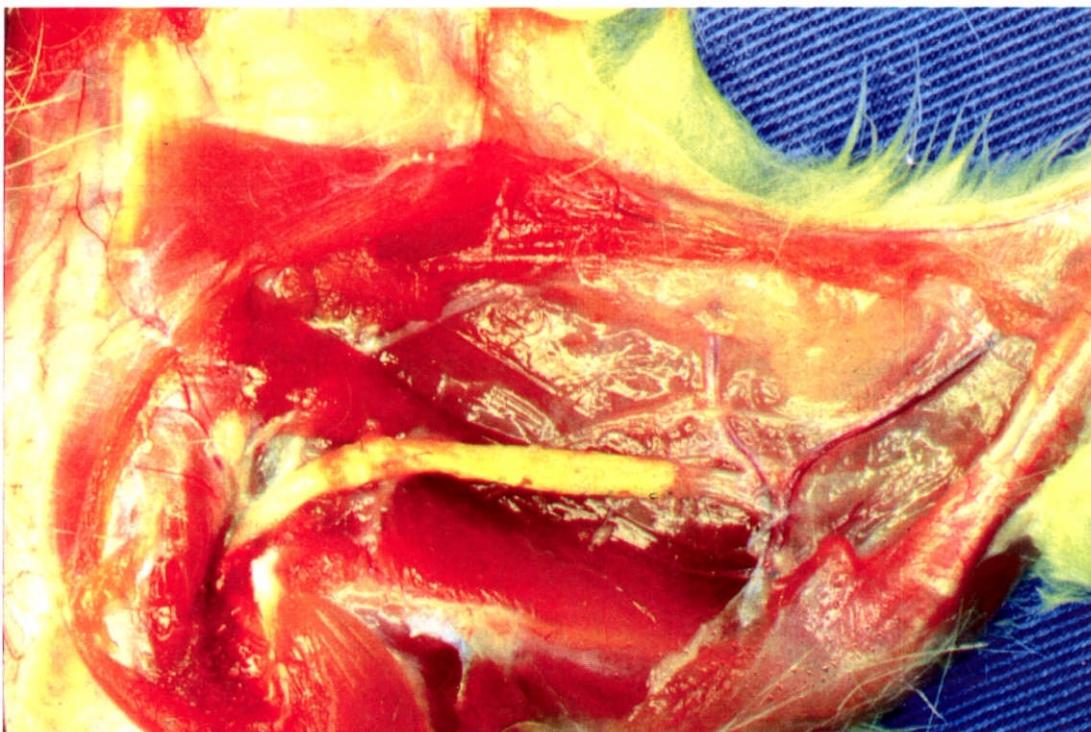


Fig. 5 — O tubo de pericárdio pode ser visto ao centro da figura, com os cotos proximal e distal.

Nas figuras 5,6,7,8,9,10,11,12 e 13 podem ser vistos exemplos dos achados macro e microscópicos após a eutanásia dos animais.



Fig. 6 - Vista em maior aumento do coto distal emergindo do tubo.



Fig. 7. - A forma do tubo e a sutura de fechamento.

Tabela 10. Resultado do exame histológico em microscopia ótica nos pontos proximal, médio e distal do segmento do nervo tratado (grupo tratado) quanto à presença ou não de axônios e a inferência com o grupo controle.

grupo	proximal				médio				distal							
	presença		ausência		presença		ausência		presença		ausência		total			
T	44	88,0%	6	12,0%	50	100,0%	38	76,0%	12	24,0%	50	100,0%	12	24,0%	50	100,0%
C	1	6,2%	15	93,8%	16	100,0%	1	6,2%	15	93,8%	16	100,0%	1	6,2%	15	93,8%

Como complemento, apresenta-se a seguir a tabela 11 que demonstra os resultados em que se retiram da análise os indivíduos que apresentaram complicações, todas elas incompatíveis com a viabilidade de efetuar-se conexão neural entre os segmentos.

Tabela 11 - Resultado do exame histopatológico em microscopia ótica nos segmentos proximal, médio e distal do segmento do nervo tratado quanto à presença ou não de axônios em 38 casos nos quais não ocorreram complicações.

	Segmento Proximal		Segmento Médio		Segmento Distal	
c/ axônios	38	100%	37	97,3%	37	97,3%
s/ axônios	0	0%	1	2,7%	1	2,7%
Total	38	100%	38	100%	38	100%



Fig. 8 – Corte no segmento proximal em aumento original de 50 x (H&E, ósmio).

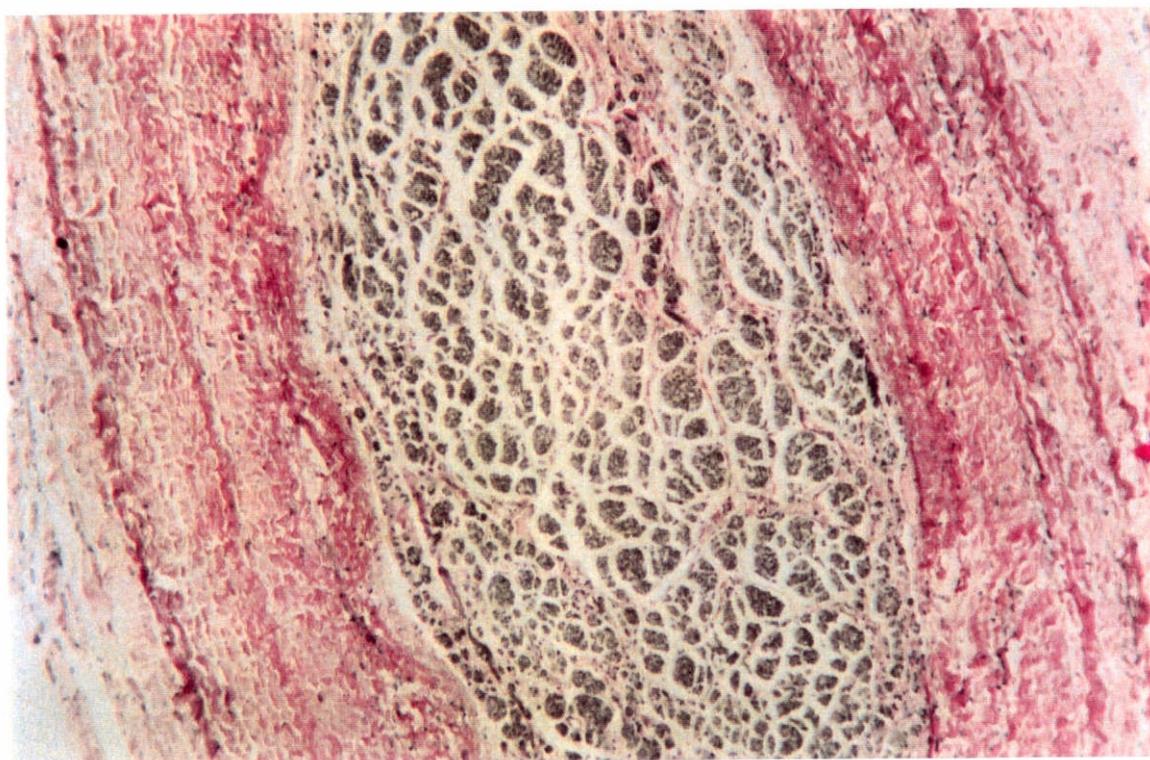


Fig. 9 – O mesmo caso em corte no segmento médio (aumento original 50X, H&E, ósmio)

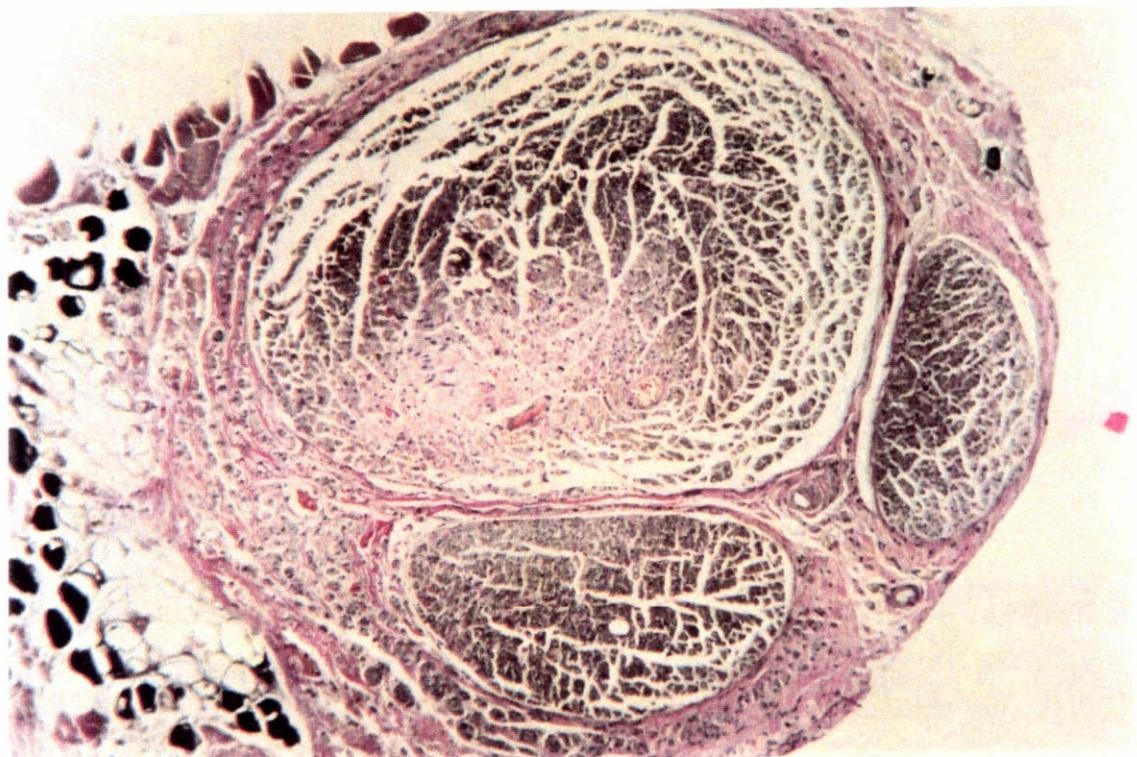


Fig. 10 – Corte no segmento distal onde se vêem os arranjos fasciculares (aumento original 50 x, H&E, ósmio)

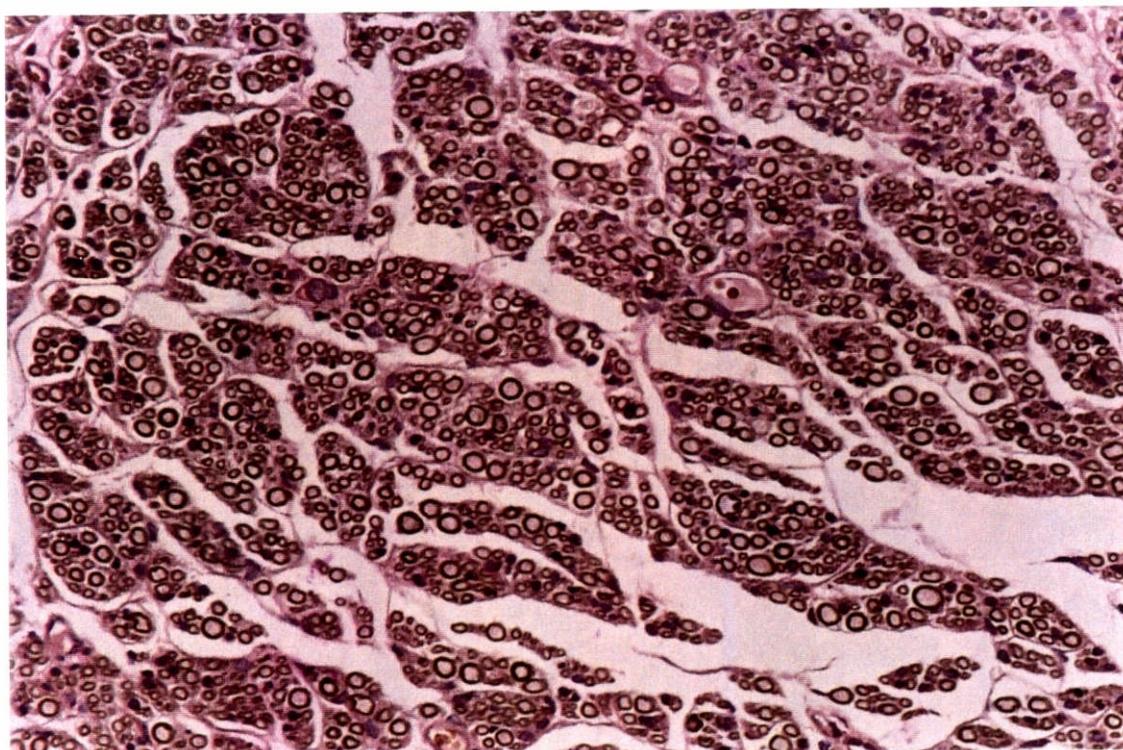


Fig. 11 – Em maior aumento, intensa população de axônios mielinizados em corte do segmento médio (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

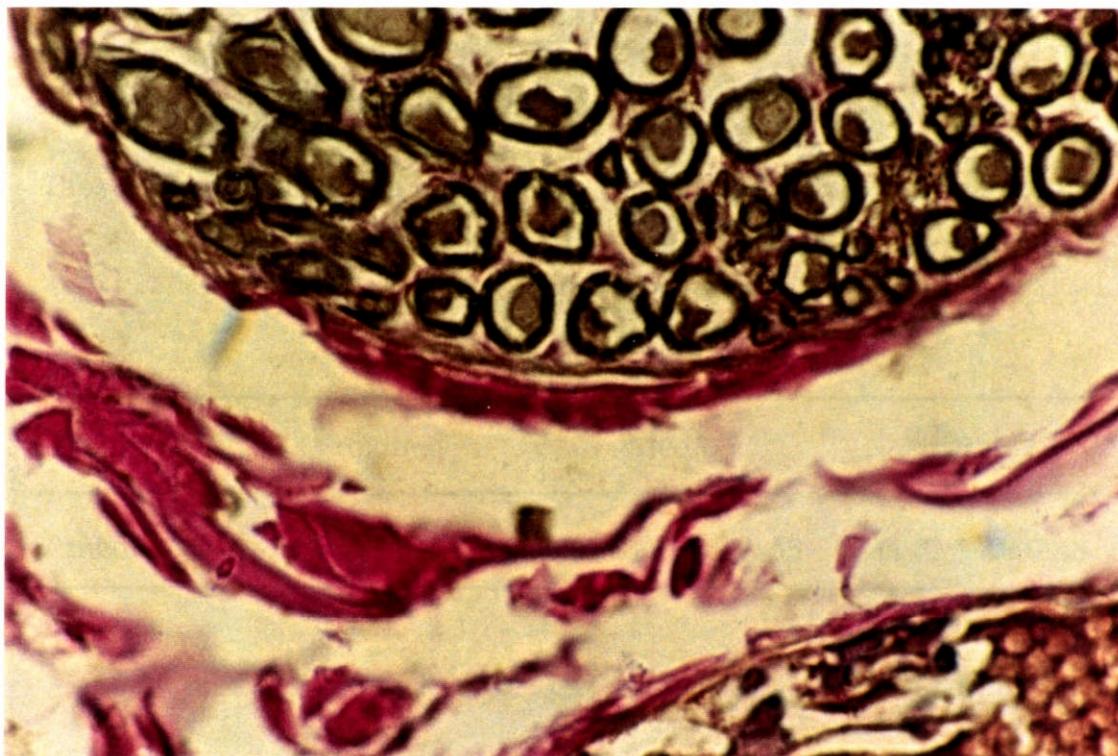


Fig. 12 – Detalhe mostrando intensa população de axônios mielinizados próximos à parede do tubo de pericárdio bovino. (aumento original 1.000x, H&E, ósmio)

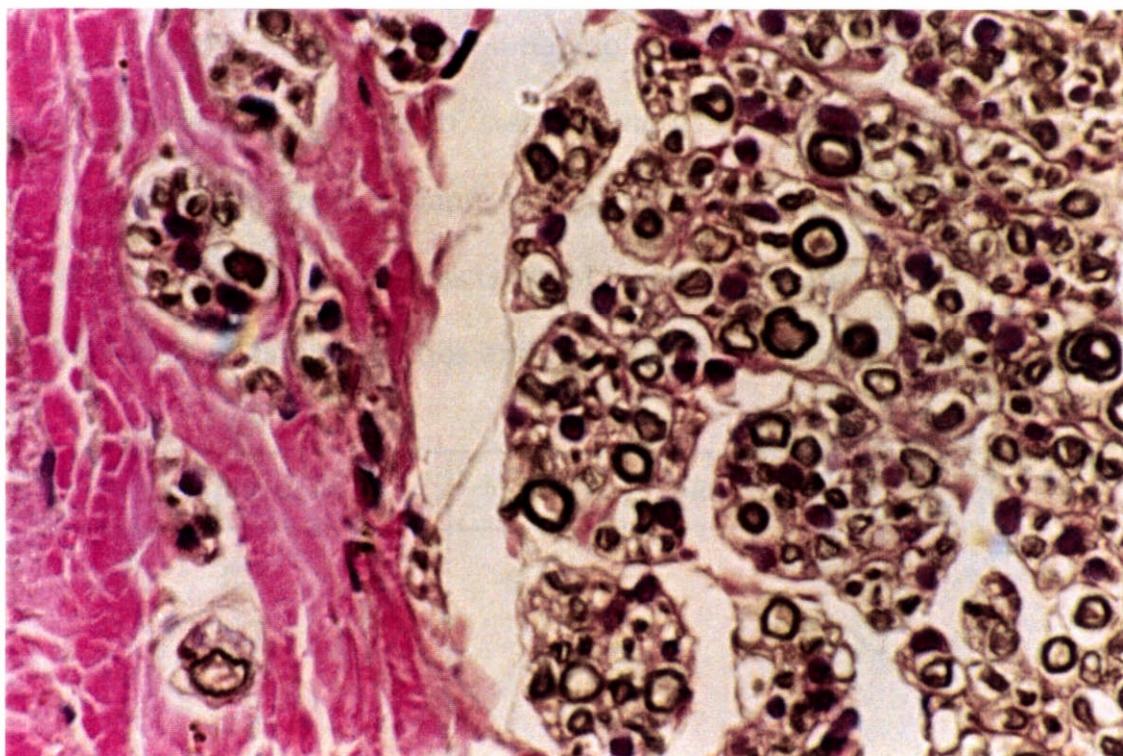


Fig. 13 – Alguns fascículos cresceram entre as fibras colágenas da parede do tubo de pericárdio. À direita, vê-se a luz do tubo com maior conteúdo de axônios mielinizados (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

### Quanto à contagem de axônios:

Tabela 12 - Resultado da mediana da contagem de axônios mielinizados nos segmentos proximal, médio e distal com as respectivas semi-amplitudes totais.

Segmento	Proximal	Médio	Distal
mediana	6.611,88 ± 8.258,97	3.846,34 ± 3.959,65	3.311,42 ± 3.697,48

A tabela 12 revela que os segmentos médio e distal são significativamente diferentes do proximal ( $P < 0,05$ ).

### Quanto às complicações observadas:

Dos 65 animais do grupo tratado, sete faleceram durante o período de observação, não sendo assim computados para a discussão dos resultados. Do grupo restante (58 animais), as complicações observadas são descritas e analisadas nas tabelas 13,14 e 15 (Fig. 14).

Tabela 13 - Distribuição dos animais quanto a presença ou ausência de complicações.

Complicações	número de animais
Sem	38
Com	20
Total	58

Tabela 14 — Distribuição dos animais tratados em relação ao tipo de complicação identificada.

complicações	coto distal fora do tubo		abcesso		desaparecimento do tubo		total	
	número de casos	1	5%	8	40%	11	55%	20

Tabela 15 - Distribuição dos animais tratados em relação à ocorrência de úlceras e complicações no período de observação

Úlceras	complicações				total	
	com		sem			
Com	7	35,0%	4	10,5%	11	18,8%
Sem	13	65,0%	34	89,5%	47	81,2%
Total	20	100,0%	38	100,0%	58	100,0%

Em relação a esta última tabela, existe diferença significativa entre os grupos com e sem complicações em relação à presença de úlcera. O grupo sem complicações apresentou uma menor porcentagem de úlceras do que o grupo com complicações ( $P < 0,05$ ).

Por outro lado, tomando-se o grupo com complicações, não há uma distribuição preferencial de úlceras, enquanto que no grupo sem complicações existe uma predominância significativa da ausência de úlceras ( $P < 0,05$ ).

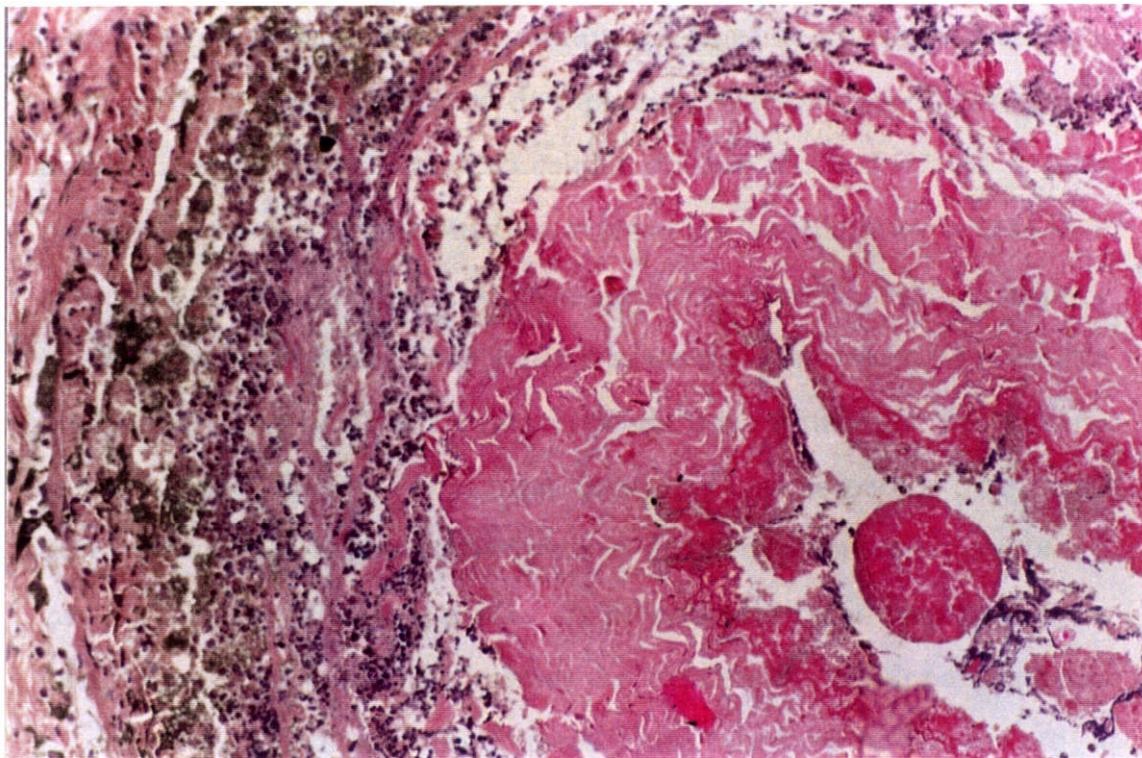


Fig. 14 – Abscesso, podendo se ver o intenso infiltrado neutrofílico na parede do tubo. Não há fibras nervosas em sua luz (aumento original 100 x, H&E, ósmio).

## DISCUSSÃO

### 1. Quanto à metodologia

#### 1.1. A reparação tubular

Sempre que ocorre a descontinuidade física de um nervo periférico, inicia-se um processo biológico de reparação. Este processo é único, pois trata-se mais de uma reparação celular do que tecidual. Desde o cabo proximal há uma progressão dos axônios em regeneração tendendo a atingir o cabo distal do nervo seccionado. No presente contexto, ao espaço existente entre estes dois cabos dá-se o nome de *defeito neural*. O resultado final desta regeneração em muito depende dos eventos que ocorrem no ambiente deste defeito. As técnicas cirúrgicas básicas para o tratamento destes defeitos (sutura término-terminal e enxerto) têm como objetivo a garantia de condições adequadas ao processo de regeneração, seja por garantir orientação física aos axônios em crescimento, como para impedir o excessivo afluxo de fibroblastos que obstruíam fisicamente a progressão axonal, ou otimizar a atuação de fatores neuronotróficos e neuronotrópicos, fundamentais a um efetivo processo de regeneração.

De menor visibilidade clínica, o reparo tubular também contempla as finalidades acima descritas. Como relata Lundborg (1988), o processo inicia-se pela presença de uma matriz de fibrina no interior do tubo. Secundariamente, esta matriz é invadida por fibroblastos, capilares e células de Schwann que migram tanto do coto proximal como do distal. O cone de crescimento axonal surge a partir do coto proximal, apoiando-se na parte interna da membrana basal das células de Schwann e alonga-se em sentido distal. Este conjunto de células de Schwann, sua membrana

basal e o depósito de colágeno endoneural sobre sua superfície externa recebe o nome de Tubos de Büngner.

O conceito da técnica de reparo tubular é antigo. As primeiras referências remontam à 1880 (Weiss, 1944; Suematsu, 1989). De forma simples, considerava-se a hipótese de se obter recuperação da função neural pela interposição de algum tipo de tubo entre os cotos do nervo seccionado. A presença do tubo permitiria um local abrigado para o crescimento das fibras nervosas, impedindo a invasão de fibroblastos e a conseqüente ocorrência de fibrose que bloqueasse mecanicamente a progressão das fibras em regeneração. Os resultados obtidos foram alentadores e os pesquisadores preocuparam-se em diversificar os tipos de materiais utilizados para a confecção do tubo. Os quadros 1 e 2 são eloqüentes na demonstração deste interesse.

Entretanto, a hipótese de que um tubo interposto, como simples elemento de passagem, poderia favorecer o processo de regeneração neural, não basta por si. Existem outros dois conceitos que se associam intimamente a esta hipótese puramente mecânica — a orientação por contato e os fatores quimiotáxicos.

#### Orientação por contato

Para a progressão da fibra nervosa em regeneração, há necessidade de uma interface entre meios de diferente densidades. Como refere Weiss (1944), o crescimento não progride em um meio homogêneo à maneira das raízes de uma planta. Nesta interface, o alongamento se daria pela tensão de superfície, semelhante ao óleo que se dispersa ao ser derramado na interface formada entre a água e o ar. Na seqüência, a pressão intra-axonal

preencheria com axoplasma a extensão axonal puxada pela tensão da interface. Desta forma, a progressão do axônio se daria por um mecanismo de avanço, e preenchimento (*pull-push*). A tensão interfacial se encarregaria do avanço e a pressão intra-axonal pelo preenchimento. Assim, o crescimento axonal só poderá ocorrer ao longo de uma superfície. Entretanto, a orientação deste crescimento estaria na dependência do arranjo celular deste substrato, estando esta direção de acordo com a orientação das unidades fibrilares que compõem o substrato.

O cone de crescimento prefere alongar-se em substratos em que possa melhor se aderir, e fibras colágenas se identificam entre alguns dos substratos preferidos para uma adequada alongação, tais como células da glia, células de Schwann, fibrina, entre outros (Weiss, 1944; Lundborg, 1988). Desta forma, entende-se porque a presença de um tubo de material adequado, efetivamente, promova a regeneração de forma ordenada, o que justifica os resultados positivos encontrados em muitas publicações sobre reparo tubular. No que concerne ao estudo em discussão, deve ser lembrado que o pericárdio bovino preservado apresenta um alto conteúdo de fibras colágenas em sua parede.

#### Quimiotaxia

Proposto principalmente por Cajal (1908), este conceito baseia-se na existência de substâncias produzidas pelo coto distal que direcionariam o crescimento axonal a partir do coto proximal. Como referido por Sunderland (1991), os resultados mais significantes dos trabalhos produzidos por Cajal e seus associados se resumem nos seguintes pontos:

- as substâncias quimiotáticas são produzidas pelo coto distal do nervo seccionado.
- a dificuldade que axônios podem apresentar para orientar-se, quando distantes do coto distal, sugerem que as substâncias de orientação podem ter um pequeno poder de difusão.
- o cone de crescimento axonal é extremamente sensível tanto às influências físicas como químicas do ambiente do defeito neural.
- a elaboração dos fatores quimiotáticos no coto distal pode ser imputada, de forma genérica, aos vários tecidos que constituem o nervo.

Apesar da descrença nesta teoria logo após proposta por Cajal (Weiss, 1944), atualmente o conceito de que substâncias difusíveis produzidas pelo coto distal têm um vital papel na regeneração axonal não pode ser mais negado (Scaravilli et al., 1984; Seckel et al., 1984; Lundborg, 1988. Mackinnon et al., 1988b).

Para que melhor se possa entender a relação entre quimiotaxia e a técnica de reparação tubular, convém citar um conceito mais atualizado da função da quimiotaxia conforme Lundborg (1988): trata-se do crescimento direcionado de fibras nervosas ao longo de um gradiente de concentração em direção a uma fonte de algum tipo de substância difusível. Desta forma, entende-se que a presença do tubo atuaria como um facilitador para a manutenção de um microambiente favorável à regeneração neural, uma vez que limitaria a evasão destas substâncias quimiotáticas e poderia favorecer um gradiente de concentração quantitativamente mais adequado às suas finalidades.

Em resumo, a efetividade demonstrada em diversos estudos com reparo tubular permite ser atribuída ao fato deste método atender tanto ao requisito da orientação por contato como ao da quimiotaxia.

## 1.2. Material de Experimentação

### 1.2.1 Pericárdio bovino preservado

Inicialmente, pensou-se em reprisar os estudos de Chiu et al. (1982) com o uso de veia, adicionando-se uma significativa modificação que consistiria na abertura longitudinal do segmento e o enrolamento de tal segmento com posterior fixação dos cotos, distal e proximal, do nervo seccionado. Com isto, pretendia-se eliminar o inconveniente desta técnica que é o do colapso da veia com obstrução de sua luz e, adicionalmente, proporcionar um suporte tecidual, particularmente pelas fibras colágenas, para orientar o crescimento das fibras nervosas em regeneração. Entretanto, tal tentativa demonstrou-se impraticável dada a dificuldade de se obter, no animal de experimentação (*Ratus norvegicus*), segmentos de veia de comprimento suficiente para cobrir a integralidade dos defeitos pretendidos (9 mm e 13 mm). Além disto, o motivo do abandono de tal tentativa foi a impraticabilidade em conseguir-se o enrolamento do segmento de veia da maneira desejada, mormente pela desproporção entre sua espessura e largura.

Surgiu a idéia da utilização do pericárdio bovino preservado. Este material tem várias aplicações na área cirúrgica, particularmente na confecção de próteses valvulares em cirurgia cardíaca (Puig et al., 1983; Braile, 1990) e, experimentalmente, de origem bovina ou eqüina, na reparação de defeitos de parede torácica e abdominal (Stopiglia et al.,

1986; Marques et al., 1986; Paulino et al., 1987) , esofagoplastias (Alvarenga et al., 1986), enxerto de tendão (Silvares et al., 1992), angioplastias, como substituto dural (Marques et al., 1988), entre outras.

Como se verá adiante, as características do pericárdio bovino preservado em glutaraldeído contribuíram decisivamente para o interesse em utilizar este material na confecção de um tubo visando a reparação de um defeito neural.

Como referido anteriormente, a reparação tubular é método conhecido e extensivamente estudado. A principal questão a ser discutida é a utilização de um novo material para tal fim, com características que antecipam uma possível utilização clínica, isto é, com baixa imunogenicidade, excelente maleabilidade para a confecção do tubo, ausência de colabamento, desenvolvimento de mínima reação tecidual e fácil e imediata disponibilidades. Tais atributos são integralmente encontrados no pericárdio bovino preservado.

De fato, tomando-se os experimentos similares mais representativos dos últimos anos, os materiais propostos são de preparo complexo ou custosa obtenção. A bainha pseudo-sinovial (Lundborg et al.,1980) requer uma intervenção cirúrgica prévia para a introdução de um bastão de silicone ao redor do qual se formará o tubo mesotelial onde, num segundo procedimento, serão incluídos os cotos do nervo seccionado. O tubo confeccionado com polietilalanato, imidazolifosfazeno (PEIP) (Langone et al.,1995) requer laboriosa manipulação de solventes orgânicos.

Ao lado destas questões operacionais, cabe ressaltar que a lâmina de pericárdio se encontra disponível comercialmente, o que garante sua acessibilidade e tem um custo viável. O material é oferecido

comercialmente em tubos contendo uma lâmina com cerca de 65 cm<sup>2</sup>, tamanho que permite uma ampla flexibilidade em um possível uso clínico.

A lâmina (*path*) de pericárdio bovino preservado segue um longo processamento que se inicia com a coleta do material em frigoríficos imediatamente após o abate dos animais. Após transporte ao laboratório em uma solução de limpeza à base de doreto de sódio com sulfato de magnésio tamponado, a peça de pericárdio é montada em um bastidor onde inicia-se o processo de curtimento pelo glutaraldeído. Visa-se a manutenção do paralelismo ou alinhamento dos feixes colágenos para que não percam sua ondulação natural. Desta forma, a lâmina de pericárdio mantém sua elasticidade. Em seguida, o material é tratado com solução oxidante para a retirada de substâncias antigênicas, restos celulares e impurezas. Para sua comercialização, as lâminas são conservadas em solução de formaldeído a 4%.

A análise histológica da lâmina de pericárdio revela uma estrutura composta por três camadas: a serosa, a fibrosa e a camada epicárdica. A serosa apresenta células mesoteliais, a camada fibrosa constitui-se de feixes ondulados de fibras colágenas e o epicárdio por tecido conectivo. No pericárdio preservado, a camada mesotelial está ausente, permanecendo apenas o tecido conjuntivo. No processo industrial, os critérios de descartes do material incluem, na microscopia ótica, a presença de retificação ou ruptura dos feixes de fibras colágenas, alterações degenerativas destas fibras, fragmentação ou irregularidades das fibras elásticas, aumento da substância fundamental entre os feixes colágenos de uma mesma camada, presença de vasos com parede espessa e existência de qualquer infiltrado celular. Assim, garantem-se as qualidades

principais da lâmina de pericárdio bovino preservado no que se refere à baixa imunogenicidade e adequada maleabilidade (Braile, 1990).

### 1.2.2 O animal de experimentação

A escolha do *Ratus norvegicus* como animal de experimentação se deu pela sua fácil disponibilidade no Biotério Central do Campus da UNESP-Botucatu, pela tradição de seu uso em experimentações envolvendo nervos periféricos, pelo fácil acesso cirúrgico de um tronco relevante como o nervo ciático, pelas dimensões satisfatórias deste nervo, tanto para a questão de se obterem os defeitos desejados como para seu manuseio microcirúrgico e pelo excelente comportamento desta espécie como animais de experimentação envolvendo procedimentos cirúrgicos.

O uso de animais de peso entre 180g e 215g permitiu garantir o uso de animais jovens e que, com o tempo de observação pretendido (5 meses) atingissem peso final que não comprometeria sua manutenção em coletividade dentro de um mesmo ambiente, isto é, quatro animais em cada caixa.

A manutenção de uma mesma faixa etária permitiu manter homogeneidade quanto à velocidade do processo de regeneração neural, uma vez que em ratos com marcada diferença de idade há modificação nesta velocidade. Em animais jovens o processo de regeneração tende a ser significativamente mais rápido do que em grupos mais velhos. Tal fato parece estar relacionado com diferenças na velocidade da degeneração Walleriana, na regeneração axonal e da bainha de mielina (Choi et al., 1995).

Os animais eram todos do sexo masculino e tal escolha se deu unicamente por necessidade de uniformidade metodológica.

### 1.3. Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram estabelecidos em função de informações da literatura e dos limites de segmentos de nervo ciático disponível para manipulação cirúrgica.

Na literatura existem variadas referências quanto aos defeitos criados para posterior reparação tubular. No experimento proposto, optou-se pelo defeito de nove milímetros nos sub-grupos A e C por ser superior a cinco milímetros, o qual é referido na literatura como sendo um defeito onde poderia se esperar uma regeneração axonal espontânea. O defeito de 13 mm, nos sub-grupos B e D, foi assim definido por ser superior ao de dez milímetros, o que é referido, por alguns autores, como sendo o comprimento máximo de defeito possível de ser corrigido pelo reparo tubular (Seckel et al., 1984) e, ao mesmo tempo, foi o limite máximo de defeito possível de ser criado nos ratos com o peso utilizados em que permitia-se a existência de um coto proximal e distal de comprimento suficiente para o manuseio cirúrgico no mesmo membro posterior.

O tempo de observação foi arbitrariamente determinado em cinco meses (aproximadamente), tomando-se o cuidado que fosse superior a um limite de 3 meses para o preenchimento de uma reparação tubular por tecido neural conforme refere Scaravilli (1984b). Em verdade, anteriormente realizou-se estudo piloto com período de observação de 12 meses e, em uma amostra particularizada, não se encontrou diferença histológica marcante no aspecto dos axônios mielinizados se comparados

com o presente estudo, idêntico na sua metodologia cirúrgica, mas com tempo de observação menor.

#### 1.4 Atributos estudados

##### 1.4.1. Peso corpóreo .

A análise do peso corpóreo toma-se necessária por dois motivos. No caso do peso inicial, como requisito de homogeneidade da amostra, particularmente no que se refere ao diâmetro do nervo para a confecção do tubo e para a criação dos diferentes defeitos. Posteriormente, para a análise do ganho ponderal com vistas a tentar garantir esta mesma homogeneidade da amostra.

##### 1.4.2. Trofismo do tegumento da região plantar do membro posterior direito.

Pela secção completa do tronco do nervo ciático, a produção de anestesia da região plantar do membro posterior seria um achado normal. Levando-se em conta que a presença de anestesia é um dos principais fatores no desenvolvimento de úlcera plantar e tratando-se de um estudo de reparação neural, a investigação da presença ou não de úlcera nesta região poderia ser oportuna para a discussão dos resultados de tal reparação.

##### 1.4.3. Mobilidade passiva da flexão plantar da articulação do tornozelo do membro posterior direito.

A paralisia muscular decorrente da lesão neural provocada pelo experimento induz à contratura tecidual nas articulações pertinentes.

Assim, o estudo da mobilidade da articulação do tornozelo do membro posterior é coerente, haja vista o comprometimento e provável recuperação dos grupos musculares afetados pelo experimento.

1.4.4. Histologia de ponto proximal, médio e distal do segmento experimental do nervo tratado.

Em se tratando de estudo que pretende verificar a ocorrência de regeneração neural através de uma prótese tubular, aí incluído o comportamento desta prótese em relação ao ambiente de sua implantação, entende-se como principal atributo a análise da presença ou não de axônios em regeneração nos pontos proximal, médio e distal do tubo, assim como a análise histológica da reação tecidual ao material empregado.

Ainda que na literatura seja mais referida a utilização da técnica de cortes semi-finos a partir de emblocamento do segmento de nervo embebido em resina, pós-fixados com tetróxido de ósmio e corados com azul de toluidina, optou-se pela tecnologia para microscopia ótica com cortes de 1µ a 2µ, obtidos a partir de emblocamento do segmento neural em parafina e corados pela hematoxilina-eosina, por ser esta a tecnologia disponível no momento. Tomando-se em conta este último fator e o escopo deste estudo, a sensibilidade de tal metodologia foi considerada suficiente.

#### 1.4.5. Contagem de axônios mielinizados nos segmentos proximal, médio e distal.

Trata-se de um atributo clássico nos estudos de regeneração neural. Anteriormente utilizavam-se processos mais artesanais, incluindo a obtenção de fotos das lâminas, o desenho de grade sobre as fotos e a contagem manual dos axônios. Atualmente, existem diferentes sistemas computadorizados para executar esta tarefa de forma mais prática e confiável. Cabe ressaltar que, usualmente, o estudo da densidade axonal é mais adequadamente executado em cortes semi-finos, o que não foi utilizado no presente estudo. Entretanto, a qualidade das lâminas obtidas pelo processamento histológico adotado permitiu a realização da contagem axonal em 33 lâminas.

Sendo extensivamente utilizado em estudos similares, optou-se por tomar como valores normais de contagem axonal para o nervo ciático de rato a informação disponível na literatura. Utilizou-se particularmente o referido por Mackinnon (1989) por apresentar valores para o segmento de nervo ciático semelhante ao envolvido no presente estudo.

## 2. Quanto aos resultados

### 2.1 - Peso Corpóreo

Todos os animais da amostra apresentaram um aumento do peso corpóreo. Entretanto, o estudo comparativo entre os dois grupos em relação ao ganho de peso revela que o ganho no grupo tratado foi maior do que no grupo controle e nota-se que o perfil médio dos grupos não tem comportamento semelhante ao longo dos momentos de avaliação do peso. Este fato, no entanto, não significou, macroscopicamente ou

microscopicamente, modificação nos achados comparativos entre os casos do grupo tratado e o único caso do grupo controle onde se identificou crescimento neural. Por outro lado, fica patente que, dentro de cada grupo, o ganho ponderal foi homogêneo, isto é, os indivíduos do grupo tratado, no momento da eutanásia, não apresentavam dispersão importante em relação aos seus pesos individuais. O mesmo comentário vale para o grupo controle.

Resta comentar a questão da falta de semelhança entre o perfil médio entre os dois grupos. Uma impressão inicial seria a de que o tratamento induziu um ganho ponderal maior do que a ausência de tratamento. Tal fato é especulativo e não existe nenhuma base para apoiar tal suposição. Destarte, a intenção de analisar este atributo era a de garantir que, à eutanásia, os grupos apresentassem precípua e internamente uma homogeneidade quanto ao peso, o que restou comprovado pela análise estatística dos resultados deste atributo, garantindo que diferenças nos achados histológicos não pudessem ser atribuídas à diferenças significativas no peso dos animais no momento da eutanásia.

## 2.2 - Trofismo do tegumento da região plantar do membro posterior direito.

Distúrbios de sensibilidade na região plantar podem levar ao surgimento de úlcera plantar e a disestesia que acompanha o processo de regeneração pode induzir à autofagia. O canibalismo entre animais mantidos em uma mesma caixa também é citado. Na amostra estudada,

verificou-se apenas em um caso a amputação de dedo da pata em comparação às úlceras plantares que foram os achados mais freqüentes.

A maior parte da amostra do grupo tratado (82,2%) não apresentou úlcera no coxim plantar e 17,2% demonstraram úlceras.

A presença ou ausência de complicações está intimamente relacionada com a questão da presença ou ausência de regeneração neural neste estudo. Faz-se necessário, então, incluir este fator no prosseguimento desta discussão.

Ressalta-se que nem todos os animais que apresentaram úlcera pertencem ao grupo com complicações. Da mesma forma, a ausência de úlcera não significou necessariamente a ausência de complicações como pode ser visto na tabela 13.

Todos os animais com complicações não apresentaram crescimento neural, ainda que em três deles não tenham sido constatadas úlcera. Por outro lado, três animais que tiveram crescimento neural também apresentaram úlcera. Desta forma, a presença ou ausência de úlcera plantar deve ser vista com certa reserva como parâmetro para a análise do sucesso ou não de reparação de nervos periféricos.

Reforçando esta questão, verifica-se que 70% dos animais do grupo controle não apresentavam úlcera plantar no momento do eutanásia. O fato importante neste achado é que em 93,7 % dos animais deste grupo não se encontrou evidência de crescimento neural entre os cotos proximal e distal, fato que, teoricamente, deveria determinar um maior número de casos com úlcera. Paradoxalmente, estes achados são diametralmente opostos aos de Chiu (1982) onde seu grupo controle (ressecção do

nervo ciático sem nenhuma reparação) apresentou úlceras em todos os casos.

De qualquer modo, em relação aos casos do presente estudo que não apresentaram úlcera plantar, mesmo com evidente falha de regeneração neural, pode-se sugerir como explicação a cicatrização de uma possível úlcera surgida em algum momento ao longo do experimento, justificando assim a sua não detecção na avaliação pontual na eutanásia. Porém, note-se que Seckel (1984), em uma série de reparação tubular com metodologia semelhante, relata úlceras plantares e outras deformidades em todos os casos em que não ocorreu regeneração neural.

Entretanto, não se pode desprezar o fato de que a ausência de sensibilidade ou sua diminuição não são fatores absolutos e exclusivos na determinação do surgimento de úlceras. Em consequência, é lícito esperar que um determinado número de animais sem presença de regeneração neural efetiva deixem de apresentar úlcera plantar. O pequeno número de casos que se enquadram nesta situação na presente série permite admitir esta hipótese.

A presença de úlceras nos casos nos quais a histologia revelou regeneração neural poderia ser explicada por uma deficiente qualidade desta regeneração, que não teria atingido o nível mínimo de prover uma sensibilidade protetora ao coxim plantar. Além disto, a disestesia que acompanha o processo de regeneração poderia ser um fator relevante para o surgimento destas úlceras. A autofagia, um caso na amostra, também não pode ser diretamente relacionada com o insucesso da regeneração neural, uma vez que este achado pode ser atribuído à mesma disestesia. Em apoio a esta hipótese, cita-se Langone et al. (1995) em que todos os

animais de seu experimento com prótese tubular de poliorganofosfazeno apresentaram amputação dos dedos do pé devido à autofagia, ainda que presente o teste de recolhimento do membro ao toque no pé, revelando algum grau de reinervação.

Por último, a análise estatística pelo teste de Goodmann ( $P < 0,05$ ) corrobora esta linha de discussão, uma vez que ela não detectou associação entre a presença de úlcera e o tratamento dos animais. Para os animais com úlcera o percentual dos que pertenciam ao grupo controle não diferiu do grupo tratado.

Em resumo, o atributo discutido não pode ser recomendado como parâmetro conclusivo para avaliação de regeneração neural em experimentos semelhantes.

### 2.3 - Mobilidade passiva da flexão plantar da articulação do tornozelo do membro posterior direito.

A paralisia muscular decorrente da desnervação induz à imobilidade articular com adaptação dos tecidos periarticulares levando a uma menor amplitude de movimento ( Fritschi, 1971), podendo atingir um grau máximo onde encontramos rigidez das articulações envolvidas (Dellon,1989). Assim, o grau de contratura articular poderia ser utilizado como um parâmetro do estado funcional do nervo pertinente.

Como ocorreu no atributo anterior, a mobilidade da articulação do tornozelo aparentemente não demonstrou ser um parâmetro absoluto em uma correlação com função neural.

Na coleta de dados, encontrou-se um grau muito variado de ângulo passivo na articulação estudada. Por esta razão, estabeleceram-se duas

faixas de valores. A primeira considerou-se como sendo de **valores aceitáveis** e para ela definiu-se uma goniometria variando entre 0° e 49°. A segunda corresponderia à faixa de valores **não aceitáveis** e considerou-se qualquer grau acima de 49°. Estas faixas foram determinadas a partir da verificação da tendência de distribuição dos achados no grupo em estudo e entende-se como aceitável uma gama de ângulos de repercussão funcional não severa, compatível com deambulação dentro do aceitável. Para a faixa de não aceitável entenda-se o oposto.

Tal definição foi necessária uma vez que múltiplos fatores influem na ocorrência de contratura articular. Assim, todos os animais, durante um determinado período, apresentaram imobilidade articular com provável desenvolvimento de um determinado grau de contratura articular, uma vez que todos eles tiveram uma lesão completa do nervo ciático provocada experimentalmente. A possibilidade de redução ou recuperação desta contratura inicial está, primariamente, relacionada com a reinervação parcial ou total dos grupos musculares desnervados. O ritmo próprio de movimentação de cada animal dentro da caixa pode ser outro fator relevante para o estabelecimento e recuperação do grau de retração articular, uma vez que nenhuma atividade fisioterápica de mobilização passiva desta articulação foi praticada durante o período de observação.

Inicialmente, seria esperado que todos os animais que apresentassem evidências histológicas de regeneração neural viessem a apresentar um grau de retração dentro da faixa determinada como aceitável (0° a 49°) e que nos animais nos quais isto não ocorresse, o grau de retração se situasse acima deste último valor. De fato, 77,5% dos

animais apresentaram retração dentro da faixa aceitável contra apenas 22,5% na faixa acima de 49° de ângulo passivo. Como a evidência histológica de regeneração neural, no presente estudo, está nitidamente ligada à ocorrência ou não de complicações (que será relatada adiante), deve-se conduzir a discussão tomando-se em conta esta dicotomia. Dos 45 casos dentro da faixa aceitável, 11 eram casos incluídos naqueles com complicações de técnica ou evolução pós-operatória incompatíveis com regeneração neural. Assim, estes 11 casos contrariaram a hipótese mencionada anteriormente. Por outro lado, dos 13 animais cujo ângulo passivo situou-se fora da faixa de aceitabilidade ( acima de 49° ), quatro casos não apresentaram problemas de técnica ou evolução, isto é, os achados histológicos demonstraram regeneração neural através do tubo de pericárdio bovino preservado. Estes quatro casos também contrariaram a hipótese apresentada. De qualquer forma, deve-se salientar que todos os casos de retração mais acentuada ( ente 100° e 130°) ocorreram no grupo de casos em que houve complicações.

A análise estatística confirma que no grupo sem complicações a ocorrência de ângulos aceitáveis é significativamente maior ( $P < 0,01$ ) do que os com ângulos não aceitáveis.

Dos poucos casos que contrariaram a hipótese, pode-se sugerir como explicação para os que desenvolveram retração fora da normalidade mesmo apresentando regeneração neural, uma qualidade ou quantidade inadequada desta regeneração enquanto tentativa de conexão com as placas motoras. Naqueles casos que não desenvolveram retração fora da aceitabilidade mesmo não apresentando regeneração neural, condições peculiares de sua mobilidade dentro da caixa no período de observação

poderiam ter determinado uma mobilidade passiva e com freqüência que garantiu a não instalação de retração fora da faixa de aceitabilidade.

Isto fica ainda mais patente se for analisada a medida da goniometria no grupo controle. Aqui, apenas cinco (31,3%) animais ficaram fora da faixa de aceitabilidade, enquanto os 11 (68,8%) restantes situaram-se com ângulos entre 15° e 45°. Recorde-se que todos eles tiveram ressecção de segmento do nervo ciático e que em apenas um caso demonstrou-se regeneração entre os cotos proximal e distal ( caso com goniometria de 15° ).

Em ambas estas suposições deve-se rememorar uma discussão relevante apresentada por Sunderland (1991) que chama a atenção para a necessidade de diferenciar entre regeneração axonal e o resultado funcional desta regeneração. O processo de recuperação funcional é mais abrangente e complexo do que o processo de regeneração axonal . O primeiro envolve, além do crescimento da fibra nervosa, sua organização fascicular e seu amadurecimento pelo aumento de diâmetro da fibra e da camada de mielina, a efetiva reinervação dos órgãos efetores terminais. No segundo caso, interessa apenas o efetivo crescimento e desenvolvimento da fibra nervosa, seja transpondo uma linha de sutura termino-terminal, um cabo de enxerto, um músculo desnaturado ou um tubo que lhe serve como guia e câmara para que as substâncias neuronotróficas do cabo distal possam atuar no complexo processo da regeneração. Por estes motivos, a presença de retração fora da aceitabilidade não implica necessariamente em ausência da regeneração neural. Exatamente neste caso ela deve ser enquadrada naquilo que o autor acima mencionado refere puramente como regeneração axonal, uma vez que, além da

necessidade de crescimento das fibras nervosas pelo tubo de pericárdio preenchendo o defeito criado, haveria necessidade de reinervação das placas das unidades motoras comprometidas pela desnervação, evento este que não depende exclusivamente da regeneração neural dentro do tubo experimental. A orientação e direcionamento das fibras após vencido o defeito e atingido o coto distal e o próprio estado das placas motoras são fatores determinantes na reinervação das fibras musculares e, em última análise, da reinstalação do movimento articular e da recuperação da amplitude articular.

Pelo resultado da análise estatística entre os dois grupos há uma predominância significativa dos ângulos aceitáveis em relação aos não aceitáveis ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, detectou-se não existir associação do ângulo com o fato do animal pertencer ao grupo tratado e controle. Pelas discussões aqui apresentadas e as evidências estatísticas acima comentadas, reconhecesse-se que a avaliação da mobilidade passiva na articulação do tornozelo pode ser usada apenas como medida auxiliar e indireta da regeneração neural experimental no modelo proposto.

#### 2.4 - Achados histológicos do segmento proximal, médio e distal do nervo tratado.

Sob microscopia ótica, a presença de axônios mielinizados é a característica mais patente da ocorrência de regeneração neural. Tais axônios podem ser evidenciados pela coloração da bainha de mielina pela impregnação pelo tetróxido de ósmio e pela forma em vírgula, característica do núcleo da célula de Schwann (Chiu, 1982). Este princípio foi utilizado para responder a principal questão deste estudo e pode-se

constatar que, na amostra final de 50 casos, 76,0% dos indivíduos apresentaram regeneração neural nos segmentos proximal, médio e distal (tabela 10). Nestes 38 casos, depreende-se que houve conexão entre os cabos proximal e distal do nervo seccionado por meio de regeneração efetiva através do defeito neural reparado pelo tubo de pericárdio bovino preservado (figuras 7, 8, 9,10,11 e 12).

Como referido anteriormente, os achados de regeneração neural no presente estudo estão intimamente relacionados com a ocorrência ou não de complicações. As complicações encontradas são incompatíveis com um processo efetivo de regeneração neural e podem ser atribuídas a defeitos de execução de procedimentos, isto é, não são intrínsecos à técnica proposta. Diante destes fatos, a discussão dos achados histológicos pode ser feita primordialmente sobre o grupo de animais que não apresentou complicações.

Neste grupo de 38 casos sem complicações, relata-se 97,3% dos casos com presença de axônios nos segmentos proximal, médio e distal, evidenciando reconexão axonal efetiva entre os cotos proximal e distal do nervo seccionado. Assim, apenas um caso não apresentou evidências de axônios no ponto médio e distal (2,7%), ainda que os apresentasse no segmento proximal mesmo que em pequeno número, se comparado com o mesmo segmento dos casos restantes. A fibrose encontrada nos cortes pode ser a causa da não progressão das fibras nervosas. A causa disto possivelmente decorreu de hemorragia intensa no pós-operatório ou infecção secundária no período de observação, ainda que não tenha sido detectado abscesso no momento da eutanásia.

A principal característica dos achados nesta série de 37 casos é a presença de axônios mielinizados, em diferentes graus de maturidade, agrupados em fascículos com maior ou menor organização. Em alguns casos, estes axônios se apresentam formando agrupamentos ou compartimentos com axônios, célula de Schwann e sua bainha de

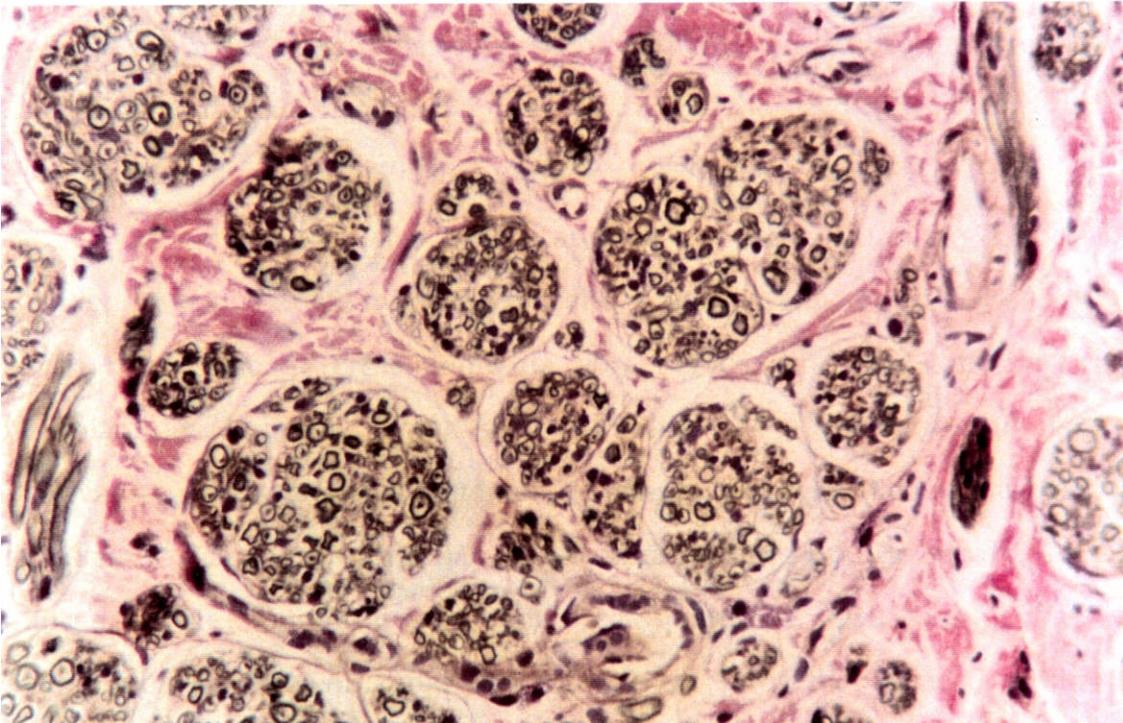


Fig. 15 — Arranjo de axônios em compartimentação com células semelhantes a células perineurais envolvendo cada grupo fascicular (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

mielina envolvidos por células perineurais na forma de um microfascículo e dispendo-se em alinhamento paralelo ao sentido do eixo maior do tubo de pericárdio bovino (Fig. 15). Estes achados são semelhantes aos referidos por Mackinnon et al. (1985) e Urabe et al. (1996) e trata-se de um arranjo característico de efetiva regeneração neural em progresso. Como menciona

Lundborg (1988), o estímulo para a compartimentação é, provavelmente, um distúrbio do meio endoneural resultante de dano ao perineuro. A formação de numerosos fascículos em miniatura expressa a necessidade de restituição do ambiente endoneural em torno da fibra nervosa, o mais rápido possível, pela restauração da barreira perineural. Este fenômeno parece ser mais evidente nas reparações tubulares que utilizam materiais permeáveis do que nos não permeáveis, como é o caso de um tubo de silicone (Scaravilli et al., 1984b; Lundborg, 1988).

Em consonância com outros autores, entre eles Lundborg (1988), evidencia-se que existe migração de células de Schwann, o que é essencial para o processo de crescimento da fibra nervosa. Tal fato contraria a opinião de Hargrave (1988) que refere não ser a reparação tubular relevante, uma vez que a regeneração neural necessita da presença de células de Schwann, o que não se encontraria neste tipo de reparo. Tal ausência de migração é vista em algumas situações como, experimentalmente, na reparação tubular em ratos diabéticos (Vrijesh, 1997).

A presença de vasos endoneurais (Figura 16), encontrada na maioria dos cortes, também é considerada como fato característico de um adequado processo de regeneração fascicular.

Excetuando-se os casos de complicação, não se detectou presença de macrófagos, linfócitos ou neutrófilos que significasse uma reação celular à presença do pericárdio bovino, o que confirma sua baixa imunogenicidade e mínima reação tecidual, garantindo segurança para uma possível aplicação clínica como material para reparos tubulares de lesões neurais selecionadas.

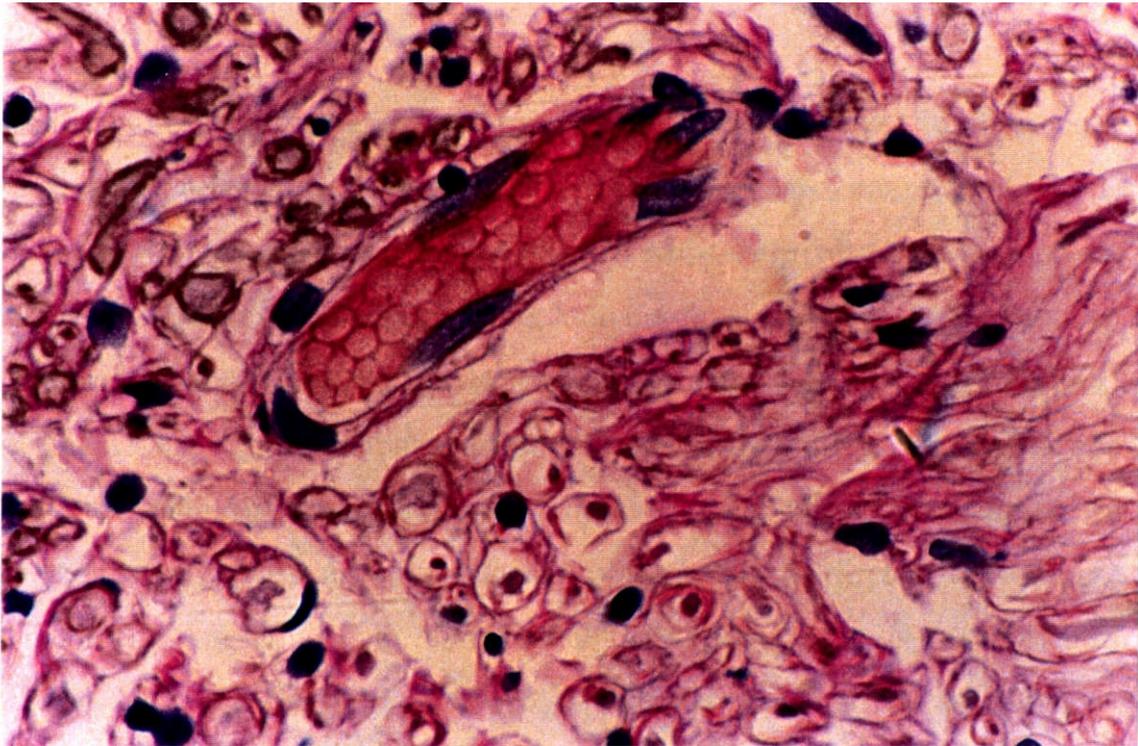


Fig. 16 — Axônios mielinizados e presença de um vaso endoneural (aumento original 1.000 x H&E, ósmio).

#### 2.5. Contagem axonal nos segmentos proximal, médio e distal dos nervos do grupo tratado.

Para a contagem de axônios mielinizados em nervo ciático de camundongos normais, Mackinnon (1989) propõe o valor de  $7.115 \pm 413$  e Sölch(1989), 8.700,4 por mm. Em um estudo de reparo tubular com desenho experimental semelhante ao presente trabalho, Seckel (1984) apresenta valores entre 4.500 e 6.500 axônios mielinizados contados no grupo tratado.

No presente estudo, os valores obtidos para os segmentos proximais são semelhantes ao padrão de normalidade conforme sugerido pelos autores citados. Os valores do segmento médio e distal, ainda que menores, encontram-se próximos da faixa relatada pelo último autor. Esta

diminuição na contagem pode ser explicada pelo tempo de observação (aproximadamente 5 meses). Como bem refere Mackinnon et al. (1991) estudando especificamente a contagem axonal em relação ao tempo de observação dos animais experimentados, a densidade axonal só retorna ao normal após 24 meses. Em outro experimento, Lundborg et al. (1997) mencionam que o diâmetro do nervo regenerado em um tubo de silicone tende a diminuir com a distância. Uma vez que o cálculo da contagem de axônios envolve a área total do nervo numa relação direta, depreende-se que nos segmentos com menor diâmetro a contagem axonal será menor, mesmo que a média do número de axônios contados nas unidades da grade seja semelhante. Nos casos em discussão isto foi uma realidade, podendo-se utilizar tal explicação para justificar o gradiente decrescente de contagem axonal relatado.

Os estudos morfométricos são muito utilizados em experimentos envolvendo regeneração neural. Sendo necessária uma perfeita identificação das estruturas, particularmente o axônio e sua bainha de mielina, uma adequada técnica histológica é fundamental. Por esta razão, os cortes semi-finos se apresentam como técnica de excelência pois garantem o predicado acima referido. Neste experimento, por razões operacionais, não foi possível processar o material com esta tecnologia. Entretanto, em um amostra particularizada de 11 indivíduos, a qualidade do processamento histológico utilizado permitiu, pelo menos, a contagem de axônios mielinizados. Pelas mesmas razões já expostas, deixou-se de realizar a medida do diâmetro axonal e da bainha de mielina.

Existe controvérsia quanto a considerar a contagem axonal como atributo essencial para experimentos deste tipo. Lundborg (1988, p.161)<sup>1</sup> é muito ilustrativo neste aspecto e merece ser citado na íntegra:

"Desde que um excesso de alongamentos invade a coluna distal de células de Schwann (Sanders et al., 1946; Aguayo et al., 1973), o número total de axônios no segmento distal pode inicialmente exceder consideravelmente o número no mesmo nervo em ponto proximal à lesão. Com o tempo, o número de axônios no segmento distal diminui, uma vez que os alongamentos que não fazem conexão com a periferia se atrofiam e desaparecem. O excesso de alongamentos no segmento distal significa que a contagem de axônios não é um método confiável para avaliar a qualidade da regeneração neural: um grande número de axônios distais no segmento distal pode não indicar necessariamente uma melhor regeneração — ao contrário, múltiplas ramificações podem significar uma resposta a obstáculos tais como cicatrizes na zona de avanço axonal."

No presente estudo, a contagem axonal foi utilizada como parâmetro acessório aos achados da histologia e os resultados obtidos revelam uma repopulação axonal compatível com uma regeneração bem sucedida do ponto de vista anatômico.

---

<sup>1</sup>Tradução do autor

**Quanto ao grupo controle:**

Faz-se mister esclarecer de imediato um possível paradoxo. No momento da eutanásia, os mesmos procedimentos determinados para o grupo tratado foram observados neste grupo. Os atributos estudados tiveram seus dados coletados conforme as técnicas propostas. Entretanto, os atributos 4.4.e.4.5 (achados histológicos e densidade axonal) não puderam ser estudados, com exceção de um indivíduo como será adiante discutido. Esta impossibilidade se prende à inexistência de material que pudesses atender às necessidades próprias das técnicas propostas para estes atributos.

Ao exame macroscópico do segmento de nervo ciático, não se encontrou nenhum indício de material que contemplasse a técnica proposta. O achado constante foi a normalidade dos planos anatômicos sobrejacentes ao nervo ciático, a ausência de fibrose, a ausência de qualquer tecido que unisse o coto proximal ao segmento distal do nervo, a presença do coto proximal sem características de formação de neuroma e, em poucos casos, apenas vestígios do coto distal representado por tênue filamento transparente. Esta discussão se faz necessária uma vez que o atributo mais pertinente à comprovação da hipótese do presente estudo é o 4.4 (achados histológicos compatíveis com regeneração nos segmentos proximal, médio e distal) e tal atributo não pode ser investigado no grupo controle para pertinente comparação com o grupo tratado.

Como referido anteriormente, excetua-se destes comentários um caso em que, macroscopicamente, identificou-se uma conexão entre os cotos proximal e distal. Desta forma, este caso preenchia os requisitos para que se seguissem os demais procedimentos. Trata-se de um caso com

defeito neural de 9 mm. Após coleta e processamento desta conexão, verificou-se à histologia a presença de axônios mielinizados com arranjo organizado em todos os segmentos (Figura 17, 18 e 19). Ainda que este achado contrarie a hipótese da reparação tubular como facilitados da regeneração neural, o achado não é paradoxal. Está descrita a regeneração espontânea de segmentos de nervos seccionados.

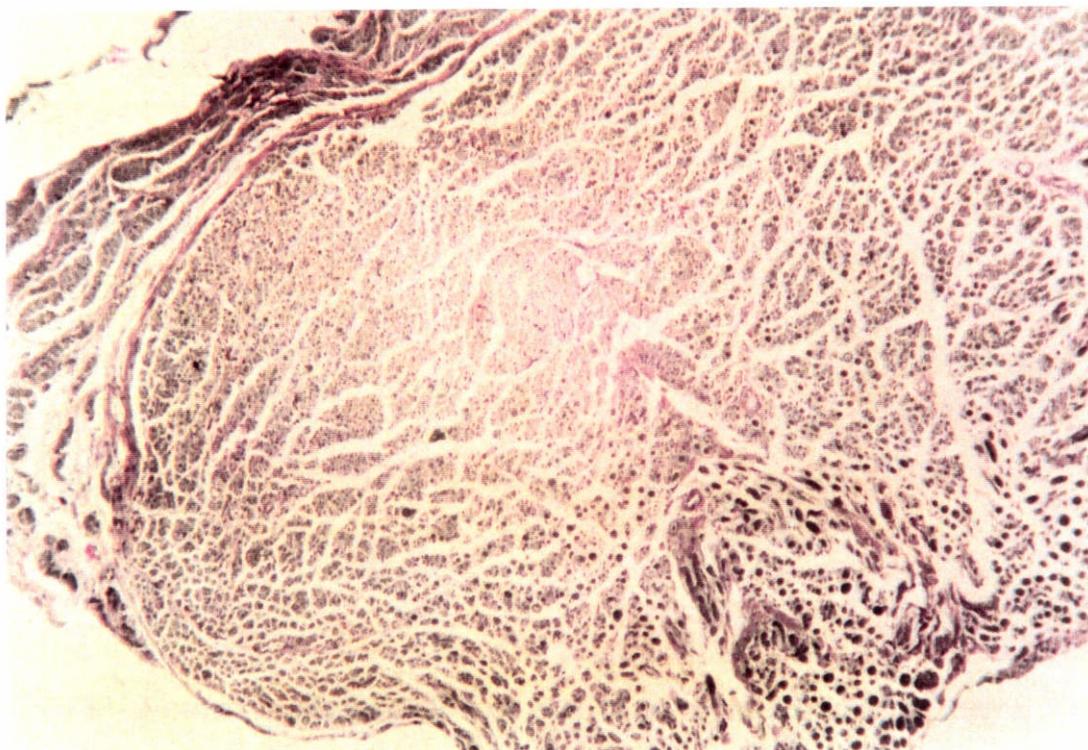


Fig. 17 — Corte no ponto proximal do caso controle onde houve crescimento neural (aumento original 50 x, H&E, ósmio).

Por outro lado, considera-se como muito eficaz o potencial de regeneração neural nos ratos, fato que é tomado como argumento de cautela para a extrapolação de achados de experimentação nesta área para a aplicação clínica no homem. Justamente tentando esclarecer esta controvérsia, Mackinnon et al. (1985) demonstraram que segmentos de

nervos ressecados, com tamanho médio de 23 mm , podem apresentar regeneração e conectar-se com o coto distal sem que tenha sido feita qualquer interferência reparadora do ponto de vista cirúrgico. Assim sendo, recomenda que experimentos feitos nestes animais sejam

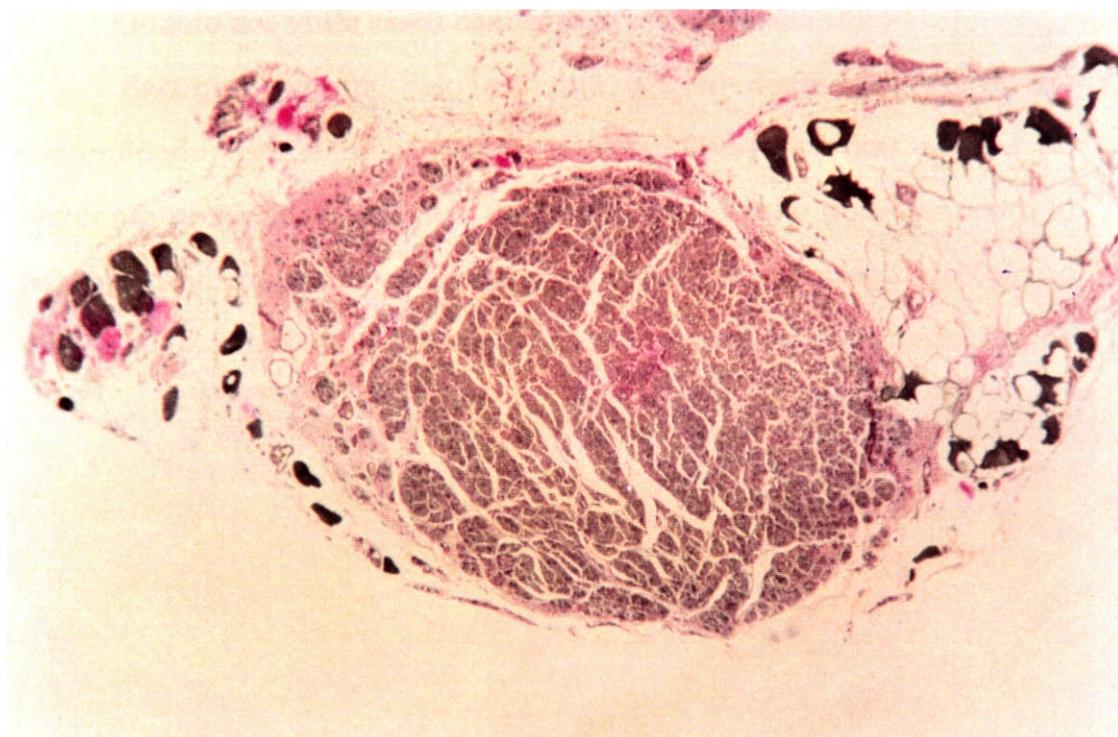


Fig. 18 - Mesmo caso da figura 16 com vista do ponto médio (aumento original 50x, H&E, ósmio).

confirmados em modelos que utilizem primatas. Por outro lado, os resultados desta autora não podem ser tomados de maneira rígida, haja vista que em estudos de comparação entre diferentes técnicas de reparo em nervo ciático de ratos, usualmente o grupo não tratado é o que apresenta os piores resultados em qualquer dos parâmetros alocados para o estudo (Buehler, 1990).

O achado de apenas um caso do grupo controle com conexão espontânea entre os cotos não invalida os resultados consistentemente obtidos de regeneração neural com uso do pericárdio bovino para o reparo tubular, conforme constatado pela análise estatística na comparação entre os dois grupos.

**Quanto aos vinte casos com complicação** (Tabela 14):

Encontrou-se um caso em que o coto distal não estava em continuidade com o tubo, identificando-se fibras nervosas apenas no segmento proximal. A ausência do coto distal no tubo pode ter ocorrido por erro de técnica com perda do ponto epineural de fixação do coto ao tubo o qual, com a movimentação livre do animal, ter-se-ia deslocado de

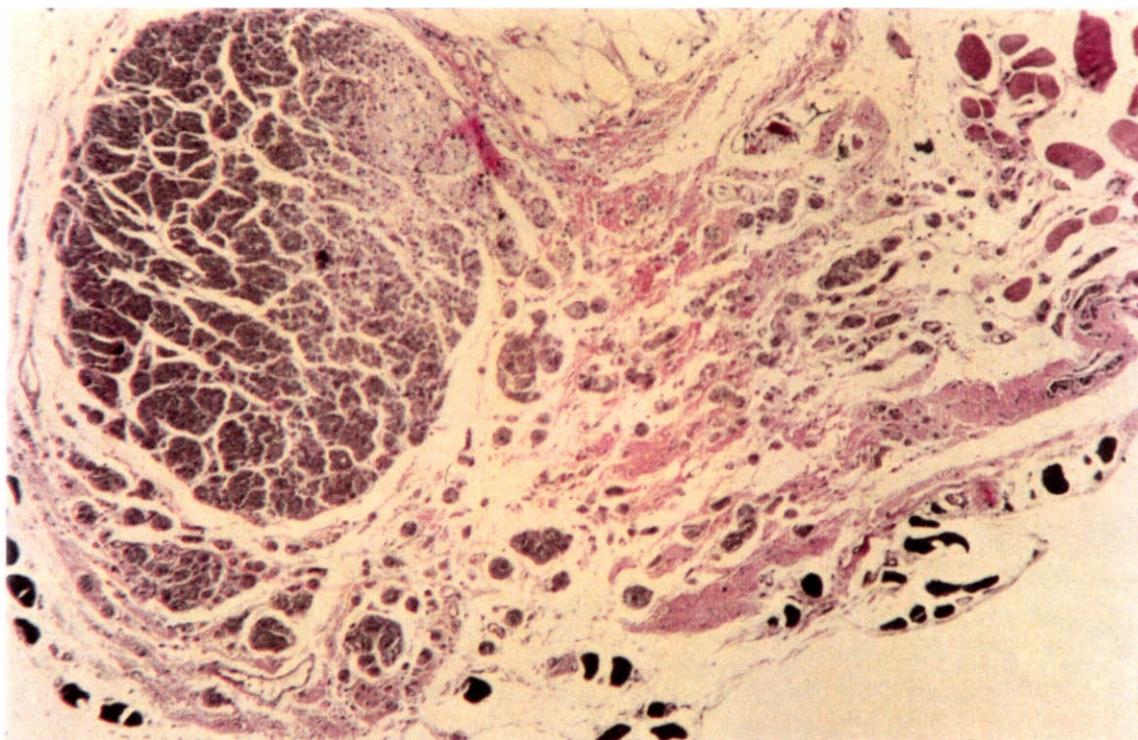


Fig. 19 — Vista do ponto distal do mesmo caso anterior. Note-se o arranjo fascicular e a presença de população axonal (aumento original 50 x, H&E, ósmio).

dentro do tubo. Considerando-se a importância da presença do coto distal dentro do tubo para uma adequada regeneração na técnica do reparo tubular (Seckel, 1984), podemos entender porque não houve crescimento axonal neste caso. A ausência do segmento distal representa a falta de liberação de fatores neurotróficos que orientam o alongamento do cone de crescimento.

O achado macroscópico de abscesso em oito casos foi caracterizado pela deformação do tubo, seu importante aumento de volume, a presença de nodularidades anarquicamente distribuídas em sua periferia e a fibrose conectando o tubo com os tecidos circunvizinhos. A causa destes achados podem ser atribuídas à infecção supurativa por colonização de bactérias no sítio cirúrgico, uma vez que o procedimento não foi asséptico.

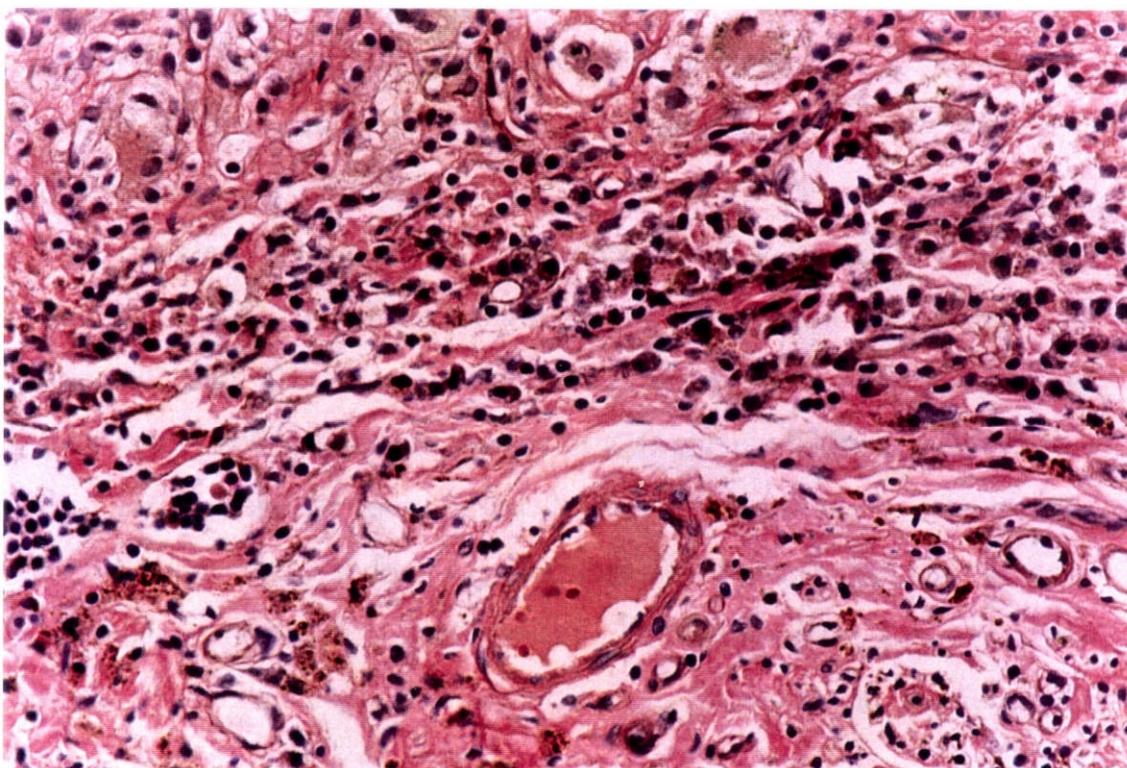


Fig. 20 – Abscesso com intenso infiltrado, depósito de hemosiderina e macrófagos (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

O exame histológico destes casos revela um mesmo padrão que, ao longo dos casos, se modifica apenas temporalmente como alterações evolutivas de um mesmo processo (Fig. 20). No pequeno aumento (50x) verifica-se a luz do tubo preenchida por exsudato neutrofílico, a parede do tubo pericárdico parcialmente preservada, seguida centrifugamente por uma região de exsudato neutrofílico que compromete severamente as camadas mais externas do tubo de pericárdio, e, finalmente e mais na periferia, uma tentativa de formação de uma cápsula fibrosa. Em maiores aumentos, identifica-se presença de reação inflamatória aguda com grande número de neutrófilos fragmentados na luz ou apresentando-se externamente ao tubo. Observam-se também focos de calcificação na parede do tubo e desagregação das fibras colágenas pelo exsudato neutrofílico com necrose, visualizando-se, algumas vezes, restos do tubo de pericárdio em meio ao abscesso. Na periferia deste arranjo vê-se reação histiocitária com células de padrão xantomatoso em arranjo compacto contornando o tubo e tendo de permeio focos de exsudato neutrofílico fragmentado. Os macrófagos mais em contato com o exsudato mostram material osmiofílico no citoplasma- (células xantomatosas), enquanto os mais periféricos apresentam uma tintura de cor acastanhada mais difusa e com raros grânulos osmiofílicos. Mais perifericamente a este arranjo, esboça-se ou define-se uma cápsula fibro-membranosa. Em alguns cortes identifica-se reação tipo corpo estranho à fio de sutura e, em outros, esta reação está relacionada a material ovóide, cilíndrico ou em forma de ampulheta, de caráter refringente, sugestivo de se tratar de secção de pelo do animal (Fig.21).

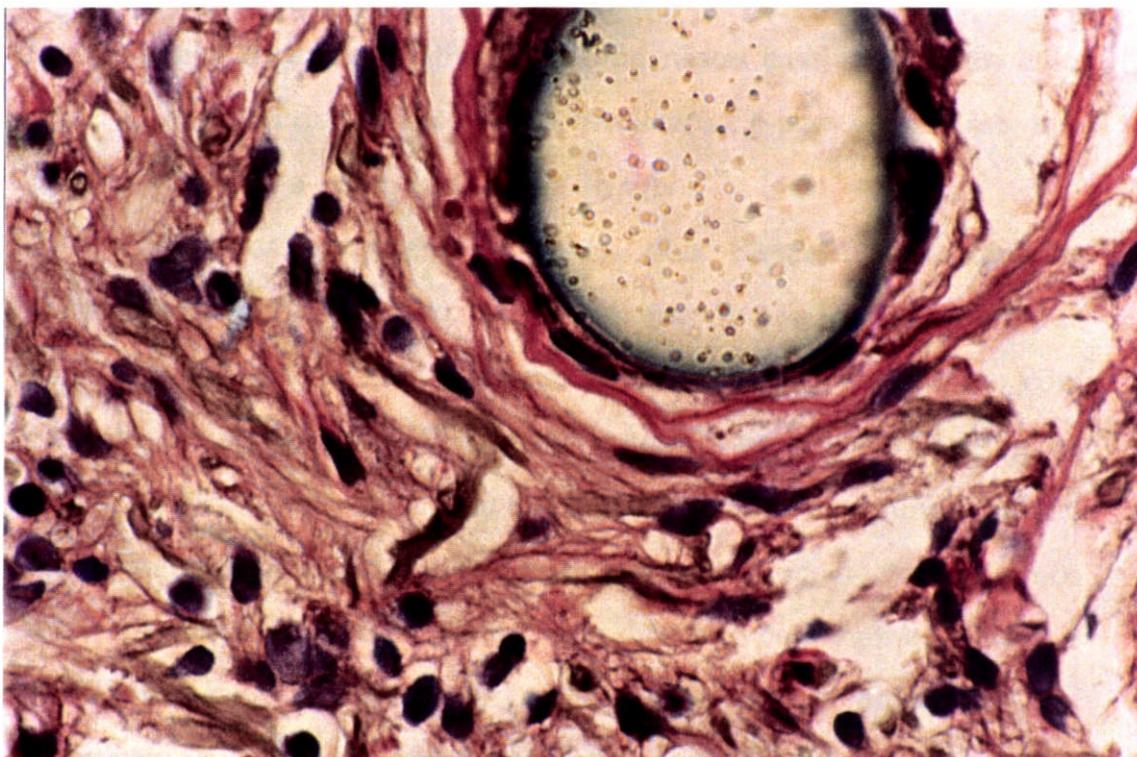


Fig. 21 — Secção de fio de náilon em meio a abscesso. (aumento original 1.000 x, H&E, ósmio).

Nos cortes examinados não se encontraram evidências de fibras nervosas normais. No coto distal, verificou-se a presença de tubos vazios, escleróticos e sem vestígios de mielina. Assim, a obstrução da luz do tubo pelo evento do abscesso causou interrupção do trajeto do alongamento neuronal, não se permitindo a migração/regeneração dos axônios até o coto distal para que estes axônios pudessem ocupar os túbulos distais e completar o processo de regeneração.

Tais achados são suficientes para justificar a impossibilidade de regeneração neural nestes casos.

Quanto aos casos em que houve desaparecimento do tubo, pela descrição dos achados histopatológicos anteriores, entende-se que é possível ocorrer este desaparecimento. Em certos cortes encontra-se uma importante destruição do tubo e, talvez, uma reação exsudativa mais

intensa tenha digerido totalmente o tubo nestes casos. Por outro lado, como a tendência de um abscesso é a fistulização, é possível que este fato também possa ser a causa da ausência do tubo.

Dentre os casos em discussão, dois merecem considerações particularizadas. No primeiro, (animal 34) encontrou-se apenas um tênue filamento que unia o coto proximal ao distal, sendo este último com diâmetro muito reduzido. Processado o tecido, os achados histológicos revelaram tecido compatível com tendão (Figura 22 ). No segundo (animal 47) , apesar da ausência do tubo, o aspecto macroscópico da união entre os cotos era similar ao anterior, porém com diâmetro bem mais acentuado e semelhante a um nervo normal. Neste, os cortes histológicos nos três segmentos revelaram presença significativa de axônios de regeneração.

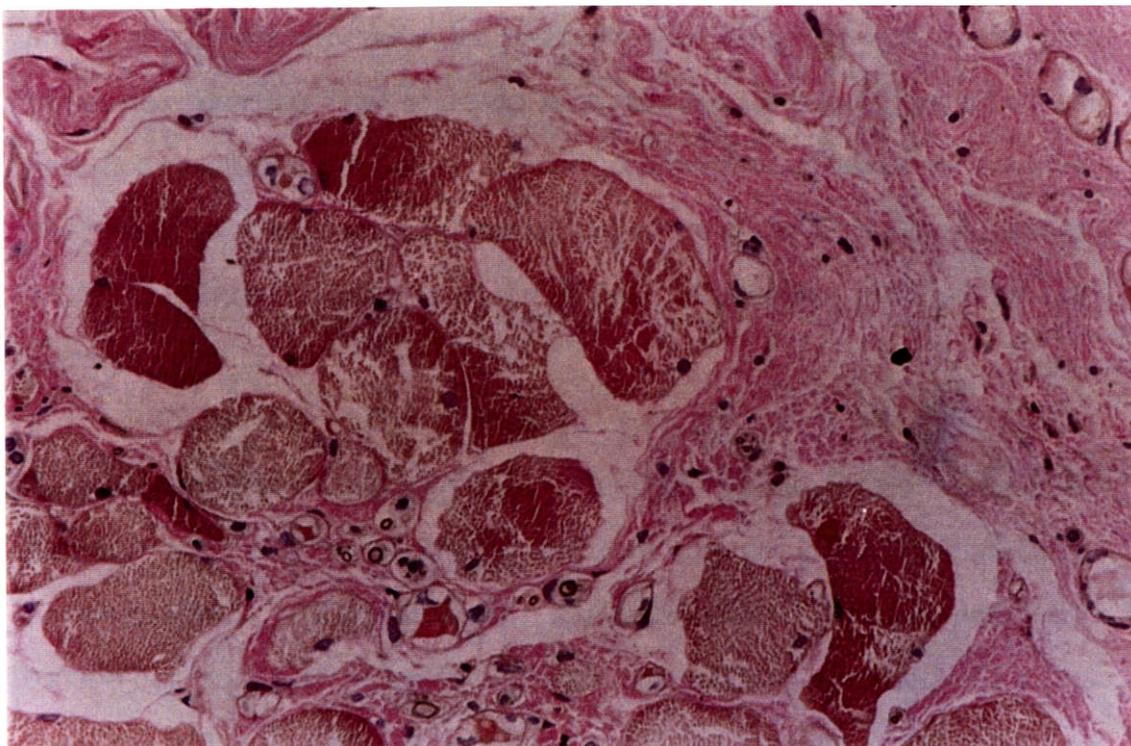


Fig.22 — Conexão entre coto proximal e distal que, à histologia revelou material compatível com tendão (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

Em resumo, a falta do tubo poderia ser explicada por diferentes tempos e intensidades na evolução do mesmo tipo de processo. Em alguns casos a ocorrência mais precoce da necrose e degeneração permitiu que no momento da eutanásia, o processo de digestão já tivesse atingido o ponto de detectar-se apenas fibrose residual, ao contrario dos demais casos de abscesso, em que este processo sofreu cronificação, permitindo sua detecção no ato da eutanásia e com as características histopatológicas mencionadas acima. Desta forma, pode tratar-se de um mesmo evento — o processo inflamatório desencadeado por infecção secundária decorrente de procedimento experimental cirúrgico sem assepsia — com diferentes tempos de resolução, mas que foram observados pontualmente. Tratar-se-iam, pois, de achados espectrais relativos ao tempo, o que justifica os diferentes cenários, isto é, desde uma absoluta ausência do tubo sem vestígios de fibrose residual até a presença marcante do abscesso, passando por um caso onde, possivelmente, o processo de regeneração neural conseguiu lograr êxito independentemente do processo inflamatório que eliminou o envoltório de pericárdio.

Cabe o comentário adicional que, os focos de calcificação mencionados em alguns dos quadros inflamatórios descritos anteriormente, não devem ser confundidos com complicação relatada na literatura (Braille, 1990). Este autor relata calcificação da folha de pericárdio bovino decorrente do processamento do material com glutaraldeído e, nos casos das próteses cardíacas, à pressão exercida sobre o material pelo fluxo sanguíneo ventricular.

**Quanto à diferença do tamanho do defeito experimental:**

Pode-se afirmar que o exame microscópico das lâminas de ambos os subgrupos A e C não revela disparidades histológicas que permitam concluir que esta diferença de tamanho seja fator relevante para o processo de regeneração neural nas condições do estudo. A qualidade dos achados histológicos é idêntica em ambos os subgrupos. Em corroboração, num estudo anterior com mesmo delineamento e com uma amostra de 37 animais, os achados foram idênticos. Desta forma, justifica-se o fato de, durante a apresentação dos resultados e sua discussão, não se ter dado maior atenção à questão do tamanho do defeito (Tabela 15). Entretanto, convém salientar neste campo, que presentes achados contrariam os de Seckel et al. (1984), Lundborg (1988) e Francel et al. (1997), uma vez que o grupo tratado com defeito de 13 mm, demonstrou crescimento axonal efetivo, ao contrário da afirmação dos primeiros autores de que o reparo tubular não é efetivo em um defeito experimental superior a 10 mm, e, pelos demais autores, que não houve nenhum crescimento em tubo de silicone preenchendo um defeito entre 13 mm e 15 mm.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca de novas soluções é um imperativo da insatisfação do homem com os recursos insuficientes. O deparar-se com uma grande perda neural, principalmente as decorrentes de traumas, é momento de angústia e questionamento para o cirurgião ético - aquele que se preocupa com a integralidade de uma solução para a perda do indivíduo. A insatisfação com os resultados das técnicas clássicas é patente.

Não conformar-se com o disponível é salutar e a busca de alternativas, oportuna. Tenta-se com este estudo a busca de uma delas.

O princípio da reparação tubular, em si, não é seu escopo principal. Ele está definido e com aplicação clínica possível, ainda que limitada. A possibilidade de um material facilmente disponível, com custo aceitável, pronto para uso e que não tenha efeitos deletérios aos princípios da reparação neural é o alvo desejado. O pericárdio bovino preservado preenche estes requisitos e, em alguns quesitos, supera outros materiais pois não necessita preparo antecipado, como as membranas pseudo-sinoviais (Lundborg et al., 1980, 1985 ), é material disponível facilmente, uma vez que industrializado para outras finalidades médicas de rotina, o que não ocorre com outros citados (Langone et al., 1995 ), e não deixa seqüelas por ser exógeno, o que ocorre em maior ou menor monta com materiais autólogos (Chiu et al., 1982; Sunderland, 1991).

Trata-se, pois, de uma alternativa que deve ser explorada em termos experimentais com maior detalhamento, para que melhor se defina o seu alto potencial como alternativa de reparação. A gravidade das conseqüências das lesões neurais periféricas para o homem, enquanto ser social e produtivo, a insatisfação constante com os resultados das técnicas

clássicas, particularmente em quadros mais complexos, e os achados promissores aqui relatados justificam a ampliação de seu estudo.

## CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho, relatam-se as seguintes conclusões:

1 - O pericárdio bovino preservado é importante alternativa para a reparação tubular de defeitos neurais em nervos periféricos estabelecidos experimentalmente em ratos.

2 - Há regeneração neural em 97,3 % dos casos considerados como amostra que exclui ocorrência de complicações nitidamente incompatíveis com a possibilidade de regeneração.

3 — Não detectou-se resposta inflamatória importante à presença do tubo de pericárdio bovino.

4 — O trofismo da região plantar e a goniometria passiva do tornozelo não demonstraram-se conclusivos como atributos para avaliação de regeneração neural em experimentos com ratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENITO-RUIZ, J., NAVARRO-MONZONIS, A., PIQUERAS, A., BAENA-MONTILLA, P. Invaginated vein graft as nerve conduit: an experimental study. *Microsurgery*, v.15, n.2, p.105-115, 1994.
- BRAME, D.M. Prótese valvular de pericárdio bovino, desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral. (Tese) IMC-Biomédica. São José do Rio Preto, 1990.
- BRUNELLI, G., MONINI, L., BRUNELLI, F. Problems in nerve lesions surgery. *Microsurgery*, v.6, p.187-198, 1985.
- BUEHLER, M.J., SEABER, A.V., URBANIAK, J.R. The relationship of functional return to varying methods of nerve repair. *J. reconstr microsurg.*, v.6, n.1, p.61-69, 1990.
- CHIU, D.T.W., JANECKA, I., KRIZEK, T.J., WOLFF, M., LOVELACE, R.E. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*, v.91, n.2, p.226-233, 1982.
- CHOI, S.J., HARI, K., LEE, M.J., FURUYA, F., UEDA, K. Electrophysiological, morphological and morphometric effects of aging on nerve regeneration in rats. *Scand. j. plast. reconstr. hand sur.*, v.29, n.2, p.133-140, 1995.
- COLLIN, W., DONOFF, R.B. Nerve regeneration through collagen tubes. *J. dent. Res.*, v.63, n.7, p.987-993, 1984.
- COSTA, R.F.B. Angioplastia com enxerto de pericárdio bovino: estudo experimental em cães. (Tese) EPM - UNIFESP. São Paulo, 59p. 1996.
- DANIEL, R.K., TERZIS, J.K. *Reconstr. microsurg.* Boston, Little Brown, 1977. p.360-361.

- DELLON, A.L., MACKINNON, S.E. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*, v.10, n.3, p.220-225, 1989.
- FRANCEL, P.C., FRANCEL, T.J., MACKINNON, S.E., HERTL, C. Enhancing nerve regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. *J. Neurosurg.*, v.87, n.6, p.887-892, 1997.
- FRISTCHI, E.P. *Reconstructive surgery in leprosy*. Bristol: John Wright & Sons LTD., 1971. p.34-35
- GIBBY, W.A., KOERBER, H.R., HORCH, K.W. A quantitative evaluation of suture and tubulization nerve repair technique. *J. Neurosurg.*, v.58, p.574-579, 1983.
- GLASBY, M.A. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. *Clin. anatomy*, v.3, p.161-182, 1990.
- GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann. Mathematical Statistics*, v.35, n.2, p.716-725, 1964.
- GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*, v.7, n.2, p.247-254, 1965.
- HARGRAVE, J.C. Nerve grafts in leprosy. In: OFICINA SOBRE REABILITAÇÃO. CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPRA, 13º, Haia, 11 a 17 de setembro de 1998.

- LANGONE, F., LORA, S., VERONESE, F.M., CALICETI, P., ARNIGOTTO, P.P., VALENTI, F., PALMA, G. Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials*, v.16, p.347-353, 1995.
- LUMBORG, G., HANSSON, H.A. Nerve regeneration through performed pseudosynovial tubes. *J. Hand Surgery*, v.5, n.1, p.35-38, 1980.
- LUMBORG, G. *Nerve injury and repair*. New York: Churchill Livingstone, New York, 1988.
- LUMBORG, G., DAHLIN, L.B., DANIELSEN, N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. *Scand. j. plast. reconstr. surg hand surg*, v.25, p.79-82,1990.
- LUMBORG, G., ROSEN, B., ABRAHAMSSON, S.O., DAHLIN, L.B. DANIELSEN, N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J Hand Surg.*, v.19B, p. 273-276,1994.
- LUMBORG, G., DAHLIN, L., DOHI,D., KANJE, M., TERADA, N. A new type of "bioartificial" nerve graft for bridging extended defects in nerves. *J. Hand Surg.*, v.22B, n.3, p.299-303,1997.
- MACKINNON, S.E., DELLON, A.L., HUDSON, A.R., HUNTER, D.A. Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model. *Plastic reconstr. surgery*, v.75, n.6, p. 833-839,1985.
- MACKINNON, S.E., DELLON, A.L. *Surgery of the peripheral nerve*. New York: Thieme, 1988a. p: 551-570

- MACKINNON, S.E., DELON, A.L., HUNTER, D.A. Histological assessment of the effects of the distal nerve in determining regeneration across a nerve graft. *Microsurgery*, v.9, p.46-51, 1988b.
- MACKINNON S.E., DELLON, A.L. Selection of optimal axon ratio for nerve regeneration. *Ann. plastic surgery*, v.23, n.1, p.129-134, 1989.
- MACKINNON, S.E., DELLON, A.L., O'BRIEN, J.P. Change in the nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle nerve*, v.14, n.11, p.1116-1122, 1991.
- MAEDA, T., MACKINNON, S.E., BEST, T.J., EVANS, P.J. HUNTER, D.A. MIDHA, R.T. Regeneration across "stepping-stone" nerve grafts. *Brain Res.*, v.618, n.2, p.196202,1993.
- MARQUES, A.F. Pericárdio bovino na reparação da parede abdominal de cães. *Acta cir. bras.* v.1, n.1, p.2-9, 1986.
- MARQUES, A.F. Pericárdio bovino como substituto dural. *Acta cir. bras.* v.3 n.2, p.49-53, 1988.
- PAULINO, L.A.F. Pericárdio bovino fixado em glutaraldeído como substituto peritônio-aponeurótico. *Rev bras cir.*, v.77, n.1, p. 21-24,1987.
- POWELL, H.C., VARON, S. Nerve regeneration in silicone tubes: influence of gap length and presence of distal stump components. *Exp. Neurol.*, v.76, p.361-375, 1982.
- SCARAVILLI, F. The influence of distal environment on peripheral nerve regeneration across a gap. *J. neurocytol.*, v.13, p.1027-1041, 1984 (a).

- SCARAVILLI, F. Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in a nerve encased in a plastic tube. *J.anat.*, v.139, p.411-424, 1984 (b).
- SECKEL, B.R., CHIU, T.H., NYILAS, E., SIDMAN, R.L. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guide: regulation by target organ. *Plast. reconstr. surg.*, v.74, n.2, p.173-181, 1984
- SEDDON, H.J. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. Churchill Livingstone: New York, 1975
- SIEGEL, S., CASTELLAN Jr., N.J. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2. ed. McGraw-Hill: New York, 1988.
- SILVARES, P.R.de A., SILVA, M.A.M. PEREIRA, H.R. Enxerto de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído em tendão calcâneo. Escudo experimental em ratos. *Rev. bras. Ortop.*, v.27, n.7, p.513-519, 1992.
- SÖLCH, O., MÜHLAU, G., HALBHUBER, K.H., SCHUBERT, H., SCHWARZ, J., RÖSSGER, G. Electrophysiologic and histomorphological studies on the nervus ischiadicus of rats. *Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe.*, v.22, n.2, p.112-124, 1989.
- STOPIGLIA, A.J., ALVARENGA, J.,MORAES BARROS, P.S., GUERRA, J.L. Reparation chirurgicale de la paroi thoracique du chien. *Le Point Vétérinaire*, v.18(97), p.239-243, 1986.
- SUEMATSU, N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. *Microsurgery*, v.10, p.71-74, 1989.
- SUNDERLAND, S. *Nerves and nerve injuries*. Churchill Livingstone: New York, 1978. p.483-650.

- SUNDERLAND, S. *Nerve injuries and their repair*. Churchill Livingstone: New York, 1991. 486-487.
- URBE, T, ZHAO, Q, DANIELSEN, N., LUMDBORG, G. Regeneration across a partial defect in rat sciatic nerve encased in a silicone chamber. *Scand. J. plast. reconstr. hand surg.*, v.30, p.7-15,1996.
- WALTON, R.L., BROWN, R.E., MATORY, E.E., BORAH, G.L. DOLPH, J.L. Autogenous vein graft repair of digital nerve defect in the finger: a retrospective clinical study. *Plastic. reconstr. surg.*, v.84, n.6, p.944-949, 1989.
- WEISS, P. The technology of nerve regeneration: a review. sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *J. Neurol.*, v.1, p.400-450, 1944.
- WICHERN, D.W., JOHNSON, R.A.. *Applied multivariate statistical analysis*. 3. ed. New York: Prentice Hall, 1992.

ANEXO 1. Quadro com os valores individuais de peso inicial e peso final em gramas na amostra do grupo tratado e do grupo controle.

Grupo tratado			Grupo controle		
Número	peso inicial	peso final	Número	peso inicial	peso final
1	205	550	1	210	365
2	200	520	2	215	392
3	190	590	3	205	310
4	205	590	4	213	387
5	205	490	5	210	370
6	190	560	6	210	410
7	185	550	7	210	360
8	200	525	8	205	490
9	185	600	9	200	412
10	200	620	10	220	477
11	200	640	11	210	630
12	200	560	12	170	670
13	195	590	13	160	470
14	210	610	15	200	580
15	185	500	16	190	570
16	200	530	17	160	640
18	205	610			
19	190	490			
20	200	630			
21	200	490			
22	215	580			
23	190	530			
24	200	540			
25	205	550			
26	190	570			
27	190	690			
28	190	570			

Grupo tratado		
Número	Peso inicial	Peso final
29	195	590
30	200	580
31	180	625
32	180	570
33	210	650
34	200	530
35	210	640
36	190	550
38	205	630
39	180	575
41	200	600
42	210	650
43	190	580
44	165	650
45	160	600
46	195	640
47	190	570
48	160	570
49	165	550
50	200	560
51	165	700
52	160	630
53	165	570
54	210	650
55	160	700
56	160	670
58	160	760
60	160	660
61	160	700
62	160	730
63	160	680

ANEXO 2. - Resultado da goniometria inicial e final efetuada na articulação do tornozelo dos animais do grupo tratado e do grupo controle.

Grupo tratado			Grupo controle		
Número do animal	Gonio- metria inicial em graus <sup>(*)</sup>	Gonio- metria final em graus	Número do animal	Gonio- metria inicial em graus <sup>(*)</sup>	Gonio- metria final em graus
1	0	25	1	0	20
2	0	20	2	0	43
3	0	0	3	0	65
4	0	0	4	0	25
5	0	20	5	0	70
6	0	25	6	0	35
7	0	60	7	0	45
8	0	90	8	0	13
9	0	100	9	0	35
10	0	45	10	0	55
11	0	10	11	0	20
12	0	0	12	0	70
13	0	0	13	0	45
14	0	20	14	0	falecido
15	0	0	15	0	20
16	0	65	16	0	65
17	0	falecido	17	0	40

Grupo tratado		
Número do animal	Gonio-metria inicial em graus <sup>(*)</sup>	Gonio-metria final em graus
18	0	0
19	0	70
20	0	0
21	0	0
22	0	35
23	0	25
24	0	0
25	0	0
26	0	15
27	0	0
28	0	40
29	0	60
30	0	45
31	0	40
32	0	50
33	0	120
34	0	130
35	0	30
36	0	110
37	0	falecido

Grupo tratado		
Número do animal	Gonio-metria inicial em graus <sup>(*)</sup>	Gonio-metria final em graus
38	0	0
39	0	30
40	0	falecido
41	0	80
42	0	40
43	0	68
44	0	45
45	0	20
46	0	40
47	0	45
48	0	50
49	0	35
50	0	10
51	0	5
52	0	15
53	0	20
54	0	30
55	0	0
56	0	0
57	0	falecido

Grupo tratado		
Número do animal	Gonio-metria inicial em graus <sup>(*)</sup>	Gonio-metria final em graus
58	0	10
59	0	falecido
60	0	0
61	0	0
62	0	15
63	0	0
64	0	falecido
65	0	falecido

(\*) Na aferição inicial da goniometria verificou-se que todos os animais apresentavam ampla mobilidade da articulação do tornozelo com medidas variando entre 0° e 10°. Assim, consideramos como normal este intervalo de medida e na tabela optou-se por declarar o valor de base, isto é, zero graus, ou seja, articulação em posição de forma que os ossos da perna se encontravam numa mesma linha horizontal com o alinhamento geral dos ossos da pata.



Número do animal	Segmento Proximal		Segmento Médio		Segmento Distal		Histologia	Evento Associado
	com axônios	sem axônios	com axônios	sem axônios	com axônios	sem axônios		
32							Sim	Abcesso
33							Sim	Abcesso
34							Sim	Sem tubo
35							Não	Sem tubo
36							Sim	Abcesso
37	falecido						Não	
38							Sim	
39							Sim	
40	falecido						Não	
41							Sim	
42							Sim	
43							Não	Sem tubo
44							Sim	
45							Não	Sem tubo
46							Sim	
47							Sim	Sem tubo
48							Sim	Sem tubo
49							Não	Sem tubo
50							Sim	
51							Não	Sem tubo
52							Sim	Abcesso
53							Sim	Abcesso
54							Sim	Abcesso
55							Sim	
56							Sim	
57	falecido						Não	
58							Sim	
59	falecido						Não	
60							Sim	
61							Sim	
62							Sim	
63							Sim	Abcesso
64	falecido						Não	
65	falecido						Não	

(\*) Com ou sem axônios, neste contexto, significa a presença ou ausência de axônios mielinizados devidamente evidenciados ao exame em microscopia ótica.



Número de animais	Número do animal	Segmento Proximal		Segmento Médio		Segmento Distal		Histologia	Evento Associado
		C/axônios	s/axônios	c/axônios	s/axônios	c/axônios	s/axônios		
33	39							Sim	
34	41							Sim	
35	42							Sim	
36	44							Sim	
37	46							Sim	
38	47							Sim	Sem tubo
39	48							Sim	Sem tubo
40	50							Sim	
41	52							Sim	Abcesso
42	53							Sim	Abcesso
43	54							Sim	Abcesso
44	55							Sim	
45	56							Sim	
46	58							Sim	
47	60							Sim	
48	61							Sim	
49	62							Sim	
50	63							Sim	Abcesso
	Total	44	6	38	12	38	12		
	%	88,0	12,0	76,0	24,0	76,0	24,0		

ANEXO 5 — Tabela onde se apresentam os resultados de histologia dos casos que não apresentaram nenhuma complicação.

Número de animais	Número do animal	Segmento Proximal		Segmento Médio		Segmento Distal	
		c/axônios	s/axônios	c/axônios	s/axônios	c/axônios	s/axônios
1	2						
2	4						
3	5						
4	6						
5	7						
6	8						
7	10						
8	11						
9	12						
10	13						
11	14						
12	15						
13	18						
14	19						
15	20						
16	21						
17	22						
18	23						
19	24						
20	25						
21	26						
22	27						
23	28						
24	30						
25	31						
26	38						
27	39						
28	41						
29	42						
30	44						
31	46						
32	50						
33	55						

Número de animais	Número do animal	Segmento Proximal		Segmento Médio		Segmento Distal	
		c/ axônios	s/ axônios	c/ axônios	s/ axônios	c/ axônios	s/ axônios
34	56						
35	58						
36	60						
37	61						
38	62						
	Total	38	0	37	1	37	1
	%	100	0	97,3	2,7	97,3	2,7

ANEXO 6 — Distribuição dos casos do grupo tratado em relação ao grau obtido na goniometria da articulação do tornozelo, de acordo a as faixas definidas, presença ou ausência de úlcera plantar e o tipo de complicação.

Número de animais	Número do animal	Goniometria		Úlcera plantar		Complicação
		Aceitável	Fora do aceitável			
1	1	25		S		Coto distal fora do tubo
2	2	20		N		
3	3	0		N		Sem tubo
4	4	0		N		
5	5	20		N		
6	6	25		N		
7	7		60	N		
8	8		90	S		
9	9		100	S		Sem tubo
10	10	45		N		
11	11	10		N		
12	12	0		N		
13	13	0		N		
14	14	20		N		
15	15	0		N		
16	16		65	S		Abcesso
17	18	0		N		
18	19		70	S		
19	20	0		N		
20	21	0		N		
21	22	35		N		
22	23	25		N		
23	24	0		N		
24	25	0		N		
25	26	15		N		
26	27	0		N		
27	28	40		S		
28	29		60	S		Sem tubo
29	30	45		N		
30	31	40		N		

Número de animais	Número do animal	Goniometria		Úlcera plantar		Complicação
		Aceitável	Fora do aceitável			
31	32		50	N		Abcesso
32	33		120	S		Abcesso
33	34		130	S		Sem tubo
34	35	30		N		Sem tubo
35	36		110	S		Abcesso
36	38	0		N		
37	39	30		N		
38	41		80	S		
39	42	40		N		
40	43		68	N		Sem tubo
41	44	45		N		
42	45	20		N		Sem tubo
43	46	40		N		
44	47	45		N		Sem tubo mas nervo perfeito
45	48		50	N		Sem tubo
46	49	35		N		Sem tubo
47	50	10		N		
48	51	5		N		Sem tubo
49	52	15		N		Abcesso
50	53	20		N		Abcesso
51	54	30		N		Abcesso
52	55	0		N		
53	56	0		N		
54	58	10		N		
55	60	0		N		
56	61	0		N		
57	62	15		N		
58	63	0		N		Abcesso

## **ABSTRACT**

Preserved bovine pericardium sheet was used as material for tubular repair of experimental nerve gaps in sciatic nerves of *Ratus norvegicus*. In a final sample of animals that did not show complications(38), results revealed nerve regeneration from the proximal stump through the tube and connecting with the distal stump in 97.3 % of cases. The author concluded that preserved bovine pericardium has good surgical handling, is easily obtainable, lead to negligible tissue reaction and can be used as material for tubular repair of experimental gaps in sciatic nerve of mice. Its is suggested that this study should be expanded regarding future clinical use of this material in tubular nerve repair.