

## 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 obstruiriam 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 urna 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 a 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 1 $\mu$  a 2 $\mu$ , 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

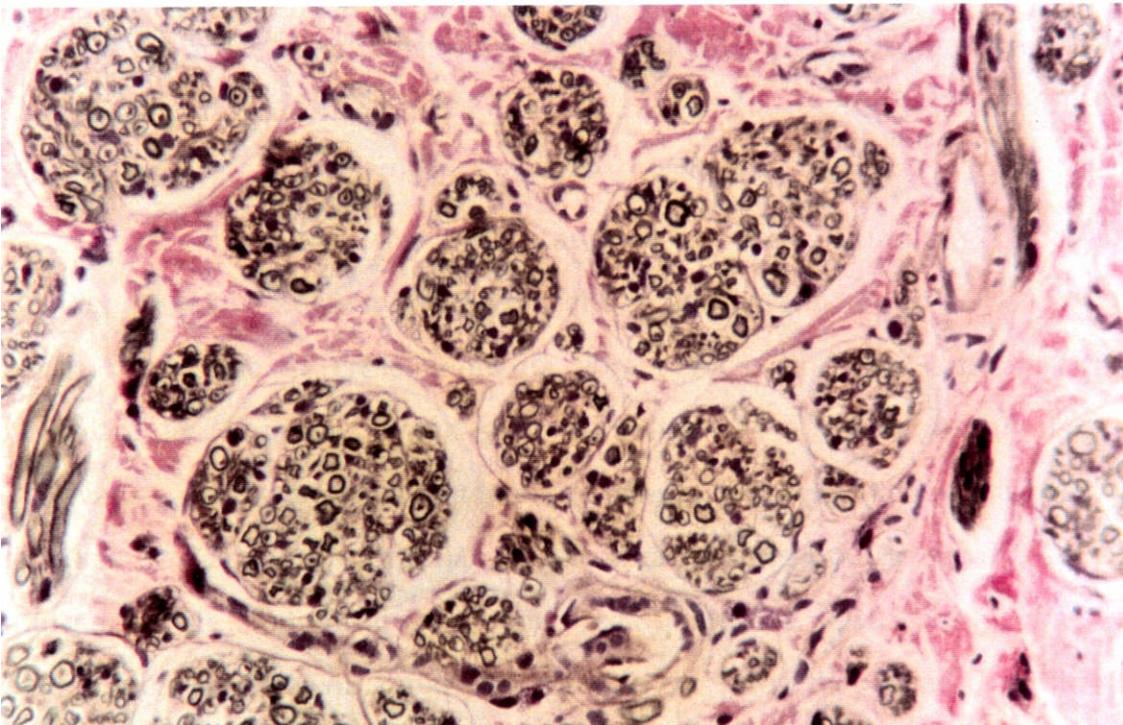


Fig. 15 — Arranjo de axônios em compartimentação com células semelhantes a células perineurais envolvendo cada grupo fascicular (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

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.

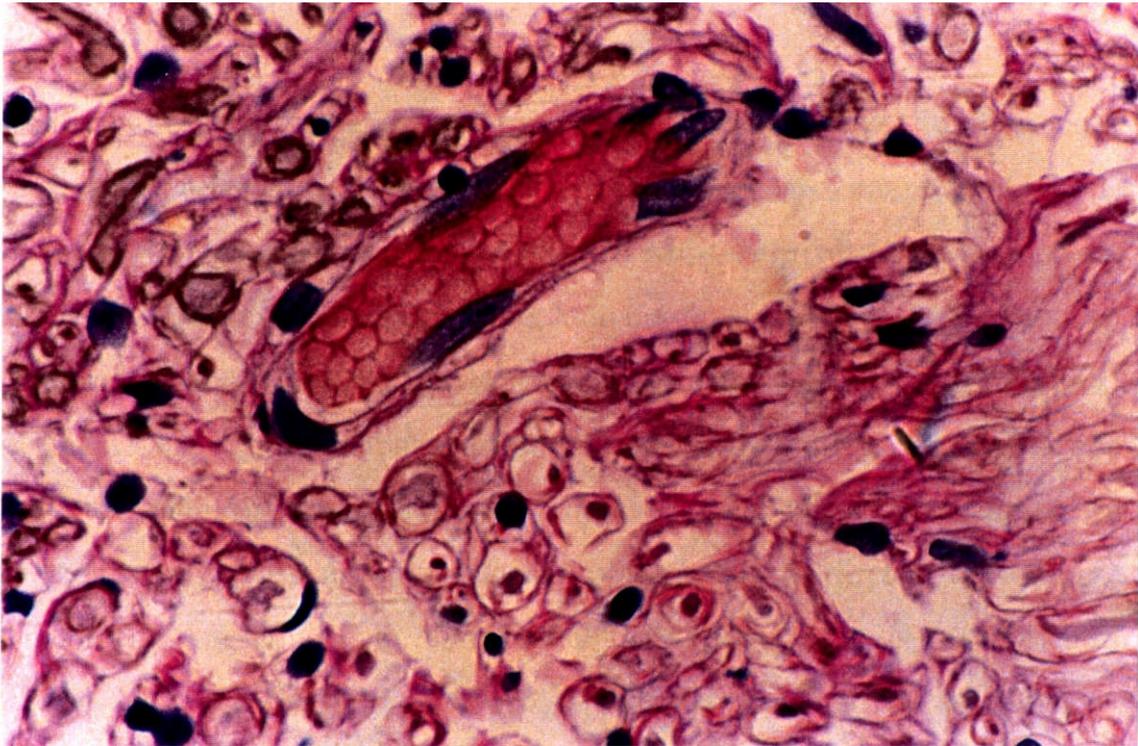


Fig. 16 — Axônios mielinizados e presença de um vaso endoneural (aumento original 1.000 x H&E, ósmio).

#### 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.

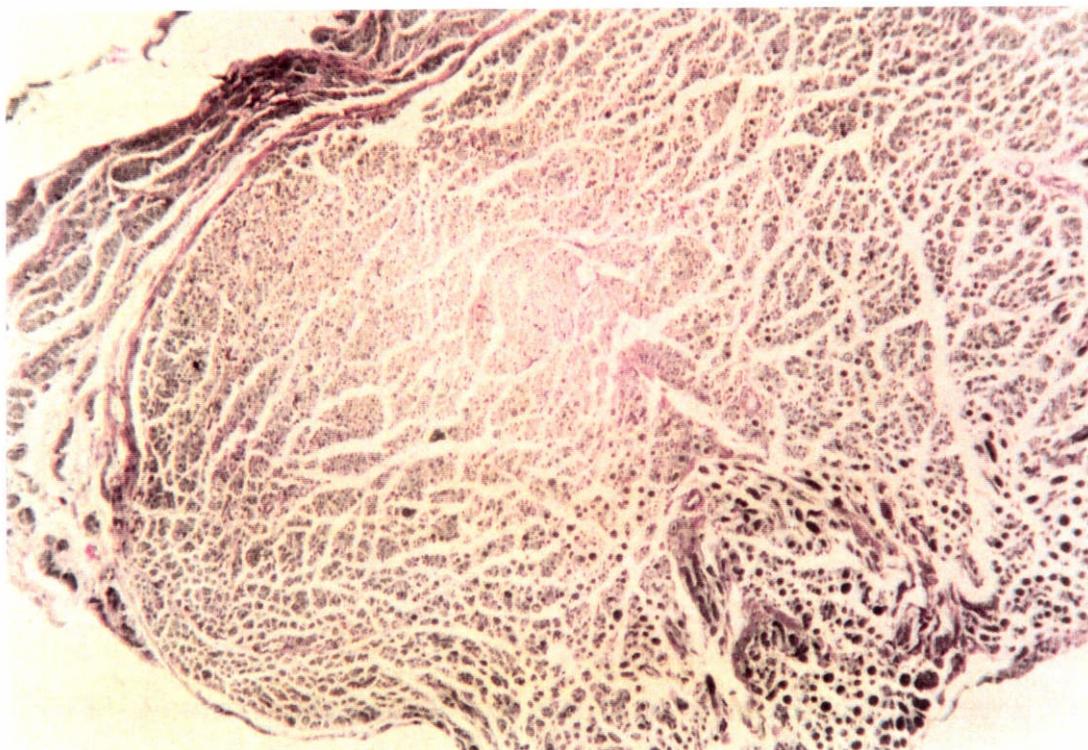


Fig. 17 — Corte no ponto proximal do caso controle onde houve crescimento neural (aumento original 50 x, H&E, ósmio).

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

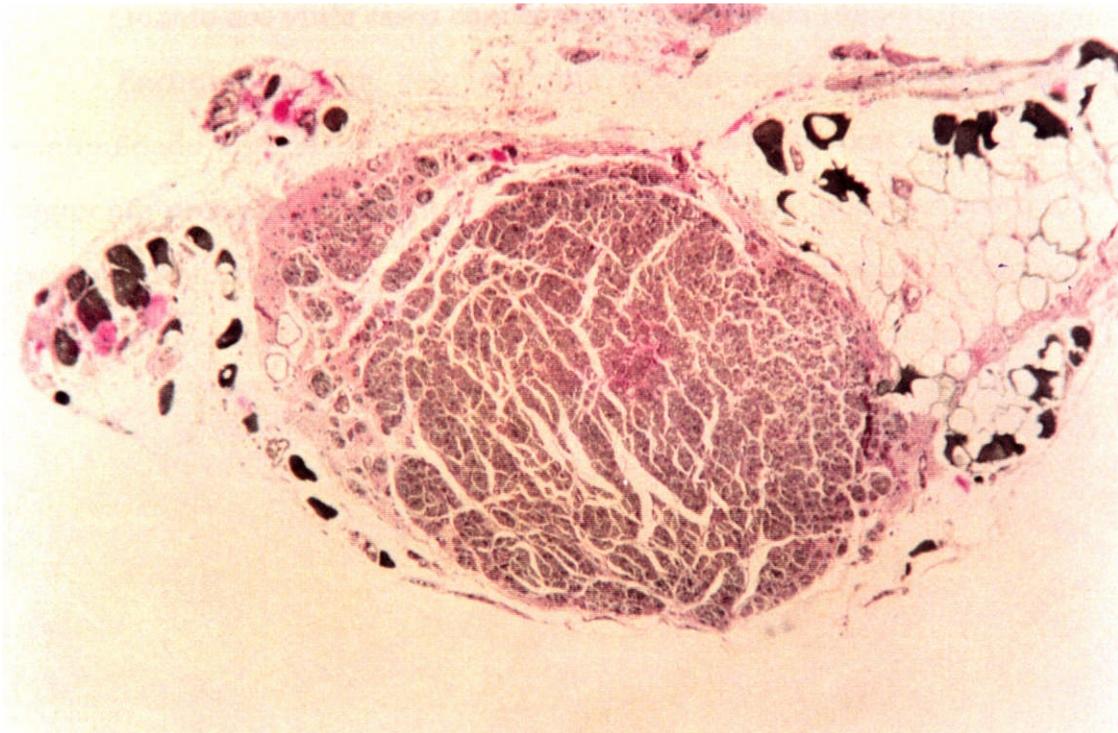


Fig. 18 - Mesmo caso da figura 16 com vista do ponto médio (aumento original 50x, H&E, ósmio).

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

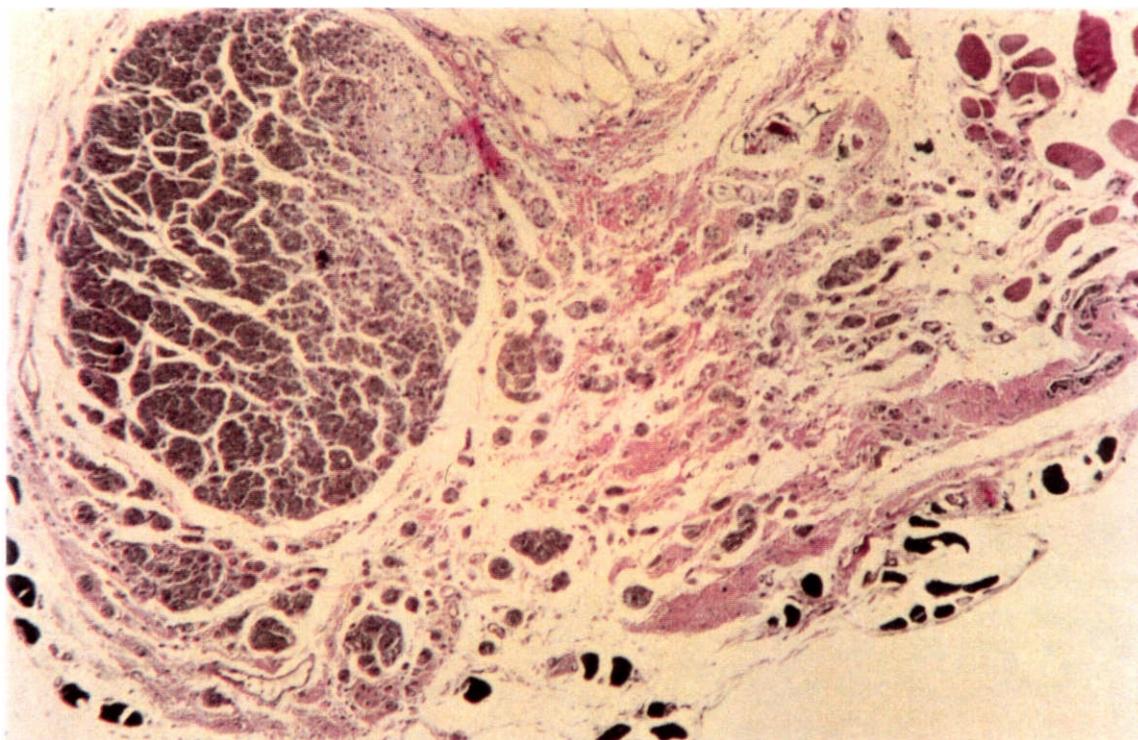


Fig. 19 — Vista do ponto distal do mesmo caso anterior. Note-se o arranjo fascicular e a presença de população axonal (aumento original 50 x, H&E, ósmio).

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.

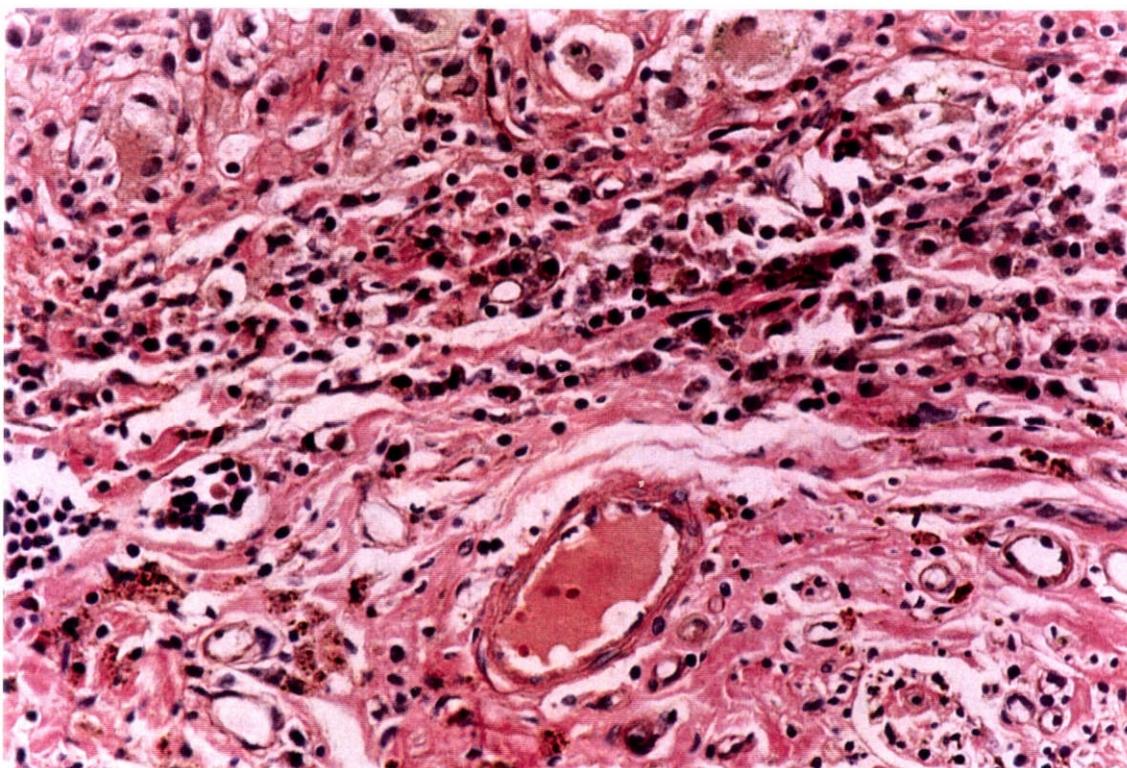


Fig. 20 – Abscesso com intenso infiltrado, depósito de hemosiderina e macrófagos (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

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).

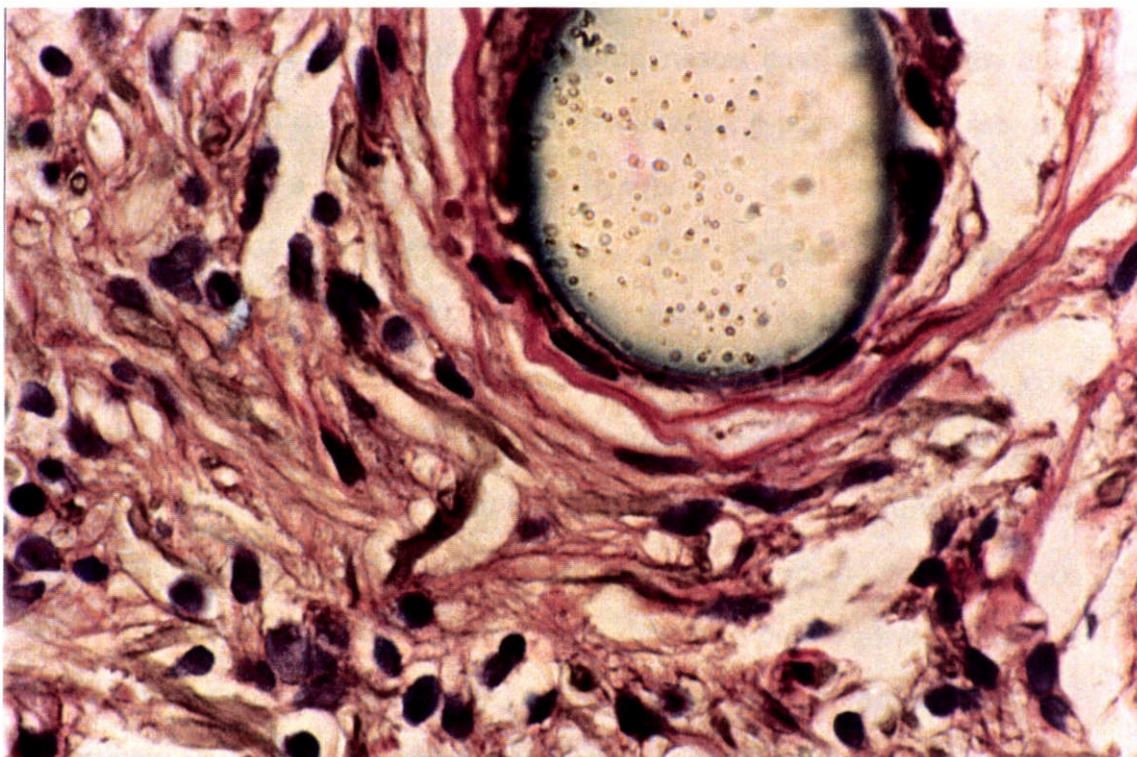


Fig. 21 — Secção de fio de náilon em meio a abscesso. (aumento original 1.000 x, H&E, ósmio).

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.

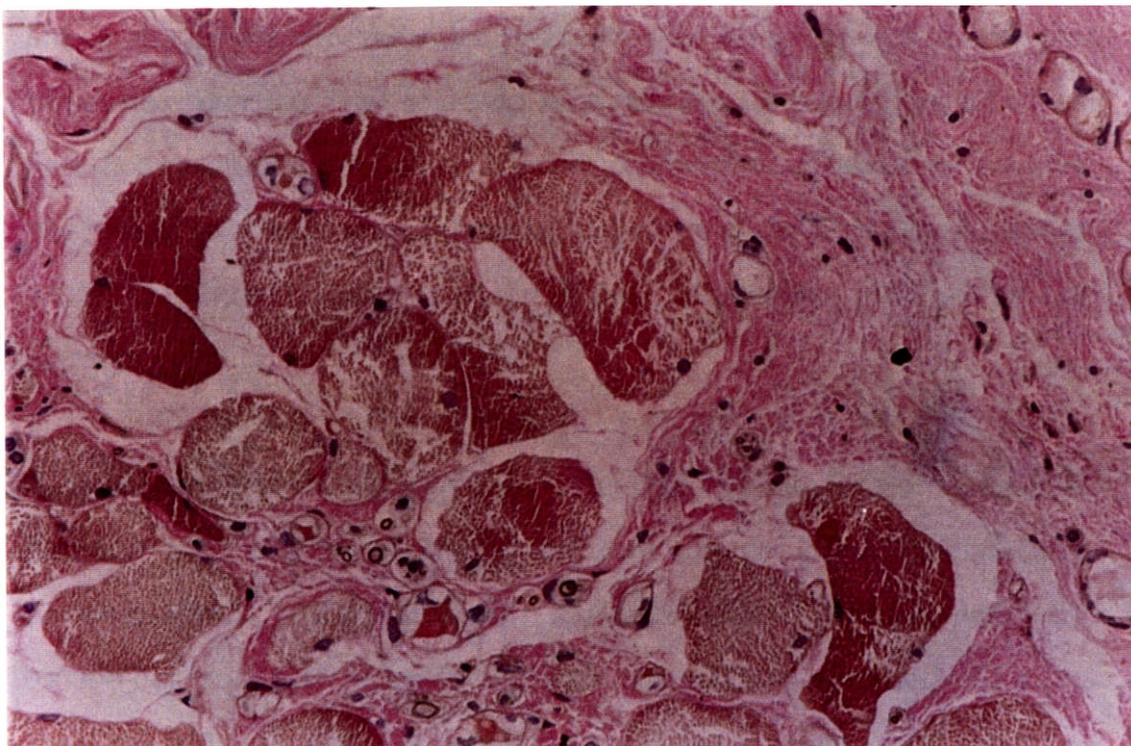


Fig.22 — Conexão entre coto proximal e distal que, à histologia revelou material compatível com tendão (aumento original 400 x, H&E, ósmio).

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.