

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 pentobarbital¹ 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.

¹Thionembutal (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 preservado¹, 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 zeros² 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 ²
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).

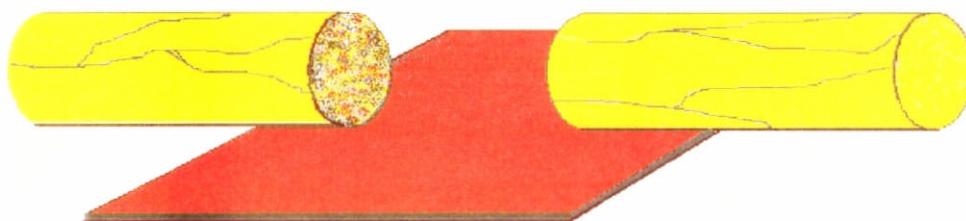


Fig. 1 — Desenho esquemático mostrando a lâmina de pericárdio bovino em fase de fixação aos cotos seccionados.



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 mononáilon¹ 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.

¹ 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 p². 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 p². 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.