

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL E MORFOMÉTRICA DA
REGENERAÇÃO NEURAL EM MODELO EXPERIMENTAL COM
NERVO MEDIANO EM RATOS

Virgínia Piúma Pólvara

Porto Alegre - RS
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL E MORFOMÉTRICA DA
REGENERAÇÃO NEURAL EM MODELO EXPERIMENTAL COM
NERVO MEDIANO EM RATOS

Virgínia Piúma Pólvora

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
-Graduação em Cirurgia, área de con-
centração Cirurgia Plástica, para obten-
ção do título de Mestre em Cirurgia.*

Orientador: Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem

Porto Alegre - RS
1998

Ficha Catalográfica

P779a Pólvora, Virgínia Piúma

Avaliação funcional e morfométrica da regeneração neural em modelo experimental com nervo mediano em ratos. A functional and morphometric analysis of nerve regeneration on the rat median model / Virgínia Piúma Pólvora ; Orient. Roberto Corrêa Chem. – Porto Alegre : UFRGS, 1998.

89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia.

1. Regeneração nervosa. 2. Nervo mediano. 3. Microneurografia. 4. Morfometria. I. Chem, Roberto Corrêa. II. Título.

NLM: WO 512

Catálogo na fonte: Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

Este trabalho é fruto da colaboração de colegas e técnicos cujo auxílio foi definitivo para sua conclusão. Aqui expresso meu sincero reconhecimento

- ao Dr. Vinícius Duval da Silva, pela análise morfométrica dos dados;
- ao Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem, pela segura orientação;
- à Cristiane de Queiroz Lopes, pela confecção das lâminas para análise histopatológica;
- ao Prof. José Rafael Rosito Coiro, pela favorável disposição no laboratório de Microscopia Eletrônica da ULBRA;
- à Luciana Bertoldi Nucci, pela análise estatística de dados;
- ao Prof. Dr. Francisco José de Lima Bocaccio, pela cedência do microscópio cirúrgico;
- aos acadêmicos de Medicina, Luis Carlos Severo e Marcelo Silveira Guimarães, pela colaboração na coleta de dados e na revisão bibliográfica;
- à Profa. Maria do Horto Motta, pela revisão de linguagem;
- à Clair Azevedo, pela arte final;

- à Profa. Leila Chimelli, pela consultoria na área de neuropatologia microscópica;
- à Profa. Dra. Maria Isabel Edelweiss, pelas sugestões na área de patologia;
- ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, pela cedência do laboratório de citopatologia para realização da análise morfométrica, e a todos funcionários do setor pela atenção e cordialidade;
- à Dra. Luise Meurer, pelo auxílio na compilação final dos dados de morfometria;
- ao Prof. Dr. Luis Fernando Moreira, pelas sugestões apresentadas na etapa de finalização;
- ao Dr. Luis Alberto Hauth, pela documentação fotográfica do trabalho experimental;
- ao Dr. Jaime Bertelli, pelas decisivas sugestões quanto ao modelo experimental;
- ao Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade, pelas sugestões iniciais referentes à análise histopatológica;
- à Dra. Mara de Souza Motta, do Instituto de Pesquisas Biológicas do Estado do Rio Grande do Sul, pela assessoria no tratamento dos animais, e ao funcionário Carlos Alberto Araújo, pela manutenção e cuidado dos mesmos;
- à Frederick Breckenridge Baldwin, pelo inestimável apoio e pela revisão da versão em inglês.

Aos meus pais, pelo amor e exemplo de perseverança.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	11
3 - MATERIAL E MÉTODO	13
3.1 - Anestesia e Cirurgia	14
3.2 - Manutenção e Sacrifício	16
3.3 - Aferição da Força de Preensão	17
3.4 - Estudo Histopatológico	18
3.5 - Análise Morfométrica	20
3.6 - Análise Estatística	24
4 - RESULTADOS	26
4.1 - Força de Preensão	35
4.2 - Número de Fibras	36
4.3 - Espessura da Bainha de Mielina	38
4.4 - Diâmetro, Perímetro e Área das Fibras Axonais	39
5 - DISCUSSÃO	45
6 - CONCLUSÕES	54
7 - ANEXOS	57
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1** – Anatomia do nervo mediano na região anterior do braço, com nervo ulnar localizado medialmente.....15
- Figura 2** – Microneurorrafia término-terminal do nervo mediano realizada com mononylon 9-0 sob microscopia óptica, proximal ao cotovelo.....16
- Figura 3** – Rato submetido ao teste de preensão com imobilização do membro contralateral, gentilmente, por fita adesiva.....17
- Figura 4** – Moldura sobreposta à microfotografia da área biopsiada do nervo mediano, para realizar quantificação bidimensional do número de fibras mielinizadas.....22
- Figura 5** – Microfotografia de área biopsiada do nervo mediano com análise digital de diâmetro, perímetro e área das fibras mielinizadas.....23
- Figura 6** – Microfotografia de área do nervo mediano com análise interativa da espessura da bainha de mielina.....24
- Figuras 7 e 8** – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano, com fibras mielinizadas em processo degenerativo.....27
- Figura 9** – Detalhe de corte ultrafino em microscopia eletrônica do 10º dia pós-operatório apresentando célula de Schwann em processo de degeneração com vilosidades e inclusões citoplasmáticas (7.000X).....28

Figura 10 – Detalhe de corte ultrafino em microscopia eletrônica do 10º dia pós-operatório apresentando célula de Schwann em processo de degeneração com vilosidades e inclusões citoplasmáticas (14.000X).....	29
Figura 11 – Detalhe de corte ultrafino da bainha de mielina com alterações degenerativas, edema axoplasmático, com perda da adesão entre as múltiplas camadas justapostas de mielina (50.000X)	30
Figura 12 – Detalhe de corte ultrafino da bainha de mielina com alterações degenerativas, edema axoplasmático, com perda da adesão entre as múltiplas camadas justapostas de mielina (29.000X)	31
Figura 13 e 14 – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano com fibras em regeneração – 20º dia pós-operatório	32
Figura 15 e 16 – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano com fibras regeneradas em formação de tênues grupamentos – 30º dia pós-operatório	33
Figura 17 e 18 – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano no 45º dia pós-operatório	34
Gráfico 1 – Distribuição comparativa da força média de preensão entre os diferentes grupos de seguimento no período pós-operatório de 45 dias	36
Gráfico 2 – Número médio de fibras mielinizadas entre os diferentes grupos de seguimento no período pós-operatório de 45 dias	37
Gráfico 3 – Espessura média das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos	39

Gráfico 4 – Diâmetro médio das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos	40
Gráfico 5 – Perímetro médio das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos	41
Gráfico 6 – Área média das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas da força de apreensão do membro operado de acordo com as diferentes datas de pós-operatório	35
Tabela 2 - Número de fibras mielinizadas de acordo com as diferentes datas de pós-operatório	37
Tabela 3 - Medidas das espessuras das bainhas de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório	38
Tabela 4 - Medidas dos diâmetros transversais das fibras de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório	40
Tabela 5 - Medidas dos perímetros das fibras de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório	41
Tabela 6 - Medidas das áreas transversais das fibras de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório	42

RESUMO

RESUMO

O processo de regeneração neural do modelo experimental em nervo mediano foi estudado em 34 ratos da raça Wistar, os quais foram submetidos à micro-neurorrafia término-terminal, sendo analisada a força de preensão do membro anterior e realizada a biópsia para análise morfométrica dos pós-operatórios 10^o (8 ratos), 20^o (5), 30^o (5), 45^o (8) e grupo controle não operado (8). Foi aferida a força negativa de preensão com o membro anterior e morfometricamente analisadas a contagem do número de fibras mielinizadas, seu diâmetro, perímetro e área bem como espessura da bainha de mielina. O teste paramétrico de análise de variância foi utilizado para avaliação do número de fibras, diâmetro, perímetro e área bem como para as comparações de força e espessura da bainha de mielina entre os diferentes grupos. Uma média de 16,62 g (10^o); 45,80 g (20^o); 91,20 g (30^o) e 106,75 g (45^o) demonstrou haver um aumento progressivo da força de preensão em cada grupo paralelamente à evolução no tempo ($p < 0,05$), exceto entre o 45^o e grupo controle com média de 116,25 g, o que denota regeneração com resultados similares à normalidade no final do período

considerado. Não foram detectadas fibras regeneradas no coto distal do 10º dia pós-operatório e a totalidade das fibras mielinizadas presentes foi desconsiderada por apresentar sinais degenerativos. Embora sem significância, o número de fibras aumentou progressivamente até o 30º dia, reduzindo-se no 45º. Quanto à espessura, diâmetro, perímetro e área, verificou-se diminuição significativa no 20º dia e progressivo aumento nos grupos posteriores. Embora a força e o número de fibras tenham apresentado correlação fortemente negativa pelo coeficiente de Spearman ($r = -0,87$) no grupo controle, não foi possível obter correlação entre os dados morfométricos e teste funcional nos demais grupos. Conclui-se que o modelo experimental do nervo mediano é válido para o estudo evolutivo da regeneração neural, no período considerado de 45 dias pós-operatórios, porém os dados morfométricos apenas refletem a evolução morfológica e cronológica do processo de regeneração do modelo experimental, não apresentando correlação direta com a função.

1 – INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Apesar da considerável evolução na área de cirurgia de nervos periféricos, com a introdução do microscópio cirúrgico, com a produção de fios de sutura extremamente finos e com os recursos de instrumental microcirúrgico, possibilitando um avanço técnico nas neurorrafias, com conseqüentes melhores resultados, fazem-se necessários, ainda, novos avanços para a obtenção da desejável recuperação funcional (1-3). Segundo CLARKE e O'MALLEY (4), as primeiras descrições da sutura de nervos seccionados datam de 1210-1277 realizadas por SALICETO, porém somente em 1873, quando HUETER (5), *apud* MILLESI (3), realizou a coaptação de cotos neurais seccionados sob a designação de “sutura epineural”, consagrou-se o método cirúrgico básico de tratamento das lesões neurais. SEDDON (6), em sua obra *Lesões Cirúrgicas dos Nervos Periféricos*, estabeleceu, em 1972, os princípios que regem o procedimento de sutura dos nervos periféricos. Em nosso meio, CHEM (7) demonstrou experimentalmente a importância de realizar microneurrafia com adequada aposição dos fascículos

entre os dois cotos seccionados, através de sutura epiperineural superficial, a fim de alcançar melhores resultados.

Atualmente, além dos progressos referidos na área cirúrgica, o nível de investigação abrange a área da neurobiologia e a correlação do sistema imunológico no processo de regeneração neural (8) bem como a influência de fatores neurotróficos, apolipoproteínas e fatores de crescimento neural após lesão neural periférica (9).

WALLER (10), em 1850, descreveu observações importantes do processo de regeneração neural, sendo o pioneiro na identificação das alterações degenerativas que ocorriam no coto distal de um nervo seccionado em sapo. NILLS (11) demonstrou as alterações celulares retrógradas e a cromatólise resultantes de uma secção neural. Por fim, no início deste século, elucidaram-se as alterações eletrofisiológicas da condução neural, a função dos neurotransmissores e a conformação ultra-estrutural do sistema nervoso periférico (12, 13).

Os períodos de guerra permitiram acompanhar melhor um grande número de lesões nervosas periféricas e observar diferentes respostas funcionais de acordo com a conduta cirúrgica adotada. Na guerra do Vietnã e II Guerra Mundial, verificou-se que muitas neurorrafias primárias necessitaram ser refeitas, posteriormente, em função do mau resultado funcional. Constatou-se que a melhor conduta era postergar a microneurorafia em vez de realizá-la em condições adversas como nos traumas complexos com destruição tecidual e lesões graves associadas. As observações desse período contribuíram para o co-

nhecimento da reação celular nervosa ao trauma e seu ciclo metabólico (14-17).

Em modelos experimentais, existem controvérsias quanto à utilização do rato para estudo da regeneração neural em função da sua capacidade acelerada nesse processo, diferente, portanto, daquela que ocorreria em primatas mais evoluídos na escala animal (18, 19). Com base nos exemplos de regeneração total de certos invertebrados marinhos e na cauda de anfíbios, verifica-se ser muito maior a capacidade regenerativa dos animais inferiores. Alguns pesquisadores afirmam que o poder de regeneração neural do rato é maior do que em primatas. KLINE e colaboradores (20) realizaram estudos comparando diversas espécies de animais e, apesar de detectarem diferenças, concluíram que seria aconselhável testar técnicas novas em primatas antes de aplicá-las em humanos. No entanto outros autores sugerem equivalência da capacidade regenerativa em ratos e primatas (21-23). MACKINNON e DELLON confirmaram a validade dos estudos de regeneração neural em ratos, salientando que a resposta celular é idêntica à apresentada nos primatas, embora não ocorra a formação de um neuroma clássico (24, 25). Em suas pesquisas, documentaram o processo de regeneração espontânea no nervo ciático do rato com 5 meses de evolução, utilizando histogramas e contagem de fibras axonais através de uma análise digitalizada. A análise histopatológica da regeneração neural oferece os subsídios de constatação morfológica desse processo. MYERS (26) destaca a semelhança da anatomia e microanatomia entre humanos e roedores, ilustrando processos

neuropatológicas causadas por isquemia e compressão. Em cortes semifinos, salienta a importância das células de Schwann, sua degeneração e desaparecimento nos processos traumáticos, permanecendo apenas a lâmina basal preservada, a qual servirá de guia para o brotamento axonal nas lesões em continuidade. Ilustra também o processo de remielinização a partir das novas células de Schwann, que se associam com axônios desmielinizados, formando tênues camadas de mielina ao seu redor, bem como as alterações da degeneração walleriana já presentes 48 horas após o trauma, com edema intra-axonal, escurecimento do conteúdo axoplasmático e atenuação das bainhas de mielina. MACKINNON e colaboradores (24) investigaram o processo de regeneração espontânea em ratos, visando esclarecer controvérsias existentes quanto à validade de sua utilização para estudo da regeneração. Constataram que, apesar da rápida velocidade regenerativa, o processo celular é similar ao do humano: embora não havendo formação de neuroma, ocorre uma brotação axonal com formação de neurofascículos dispostos longitudinalmente, paralelamente ao eixo maior do nervo, com tendência a formar pequenos grupamentos de fibras envolvidas por perineuro, formando diminutos fascículos, ao passo que, em nervos normais, existe uma distribuição uniforme. MORRIS e colaboradores (27) foram os responsáveis pela observação inicial dessa “compartimentalização” no coto proximal de nervo ciático previamente seccionado. Essa tendência parece demonstrar uma tentativa de preservação da homeostase endoneural que envolve os axônios, restaurando a barreira sangue-nervo, pós-lesão neural (28). Atual-

mente o rato é um dos modelos experimentais mais empregados para estudo da regeneração neural devido à facilidade de obtenção, manuseio e sobrevivência. Constitui uma fonte de tecido nervoso que apresenta, à microscopia eletrônica, características celulares indistinguíveis dos nervos periféricos da espécie humana.

Alguns autores recomendam extrema cautela no ato de transferir dados experimentais de ratos, principalmente no que diz respeito ao estudo dos fatores promotores da regeneração, para a aplicação clínica, em função dessas diferenças. No entanto, muitos estudos atuais utilizam com freqüência esse animal para modelo experimental, o que faz necessário cada vez mais um conhecimento detalhado da regeneração neural no rato, principalmente da velocidade de ocorrência desse processo no período inicial, a fim de que seja possível estabelecer um paralelo e transferir com maior segurança, para o homem, dados obtidos experimentalmente. Devido à sua grande importância como modelo experimental, tanto pela facilidade de obtenção como pelo manuseio facilitado, optamos pela utilização de ratos da raça Wistar para o desenvolvimento deste trabalho.

O modelo experimental mais comumente empregado é o do nervo ciático e seus ramos, nervo fibular e tibial posterior. A aferição dos dados em estudos de regeneração neural em ratos pode ser feita por avaliação funcional com eletroneuromiografia, mensurando velocidade de condução, latência e amplitude de potencial evocado ou mensurando o índice de função do ciático e

walking tracks nos membros posteriores (29-33). O índice de função ciático foi proposto por DE MEDINACELI (29), sendo que BAIN (34) e MACKINNON e colaboradores (35) acrescentaram a quantificação independente para cada músculo inervado pelos ramos acima mencionados. No entanto a lesão do nervo ciático pode acarretar contraturas articulares, perda de um ou mais dedos e autotomias, dificultando a avaliação funcional (30, 36, 37).

O membro anterior é pouco mencionado na literatura como modelo opcional, tendo sido introduzido recentemente por BERTELLI e MIRA (38) que sugerem utilizar ramos terminais do plexo braquial do rato, como os nervos mediano e musculocutâneo, realizando neste último o *grooming test* para avaliar movimentos do ombro e cotovelo. No modelo mediano, propõem como teste funcional um método simples, comportamental, o “teste da preensão”, que permite observar precisamente o início da recuperação funcional e sua evolução temporal (39). Nesse experimento, observaram que, após uma lesão neural por esmagamento compressivo, houve recuperação da força flexora no 8º dia, com aumento progressivo sensível no 10º dia, continuando estável até o 14º e alcançando a normalidade em torno da 4ª semana. Dentre 203 animais estudados, não ocorreu nenhum caso de autotomia ou contratura, demonstrando as vantagens do método.

O modelo mediano compreende o nervo e os músculos por ele inervado, o flexor radial do carpo e o flexor dos dedos. O nervo tem um diâmetro de 1 mm no braço e de 0,5 mm no antebraço, sendo formado pelas raízes de C5 a T1, recebendo três contribuições, do fascículo lateral, posterior e medial. No braço, não se ramifica; na região do cotovelo, fornece um ramo para o pronador redondo e, poucos milímetros distalmente, um ramo mais calibroso, equivalente ao interósseo no homem o qual inerva o flexor radial do carpo e o flexor dos dedos. Nas dissecções realizadas por Bertelli não houve constatação de ramos anastomóticos para esses músculos, provenientes do nervo ulnar.

No campo da histopatologia, uma grande conquista foi a introdução da morfometria, método de análise diagnóstica quantitativa com técnica semi-automatizada ou automatizada (40, 41). Esse sistema consiste de um microscópio óptico acoplado a uma câmara fotográfica que estão conectados a um microcomputador cujo programa analisa digitalmente a imagem microscópica. A maior vantagem do emprego do computador é permitir o armazenamento, a mensuração e a análise de dados histológicos numérica e objetivamente. A análise pode ser feita basicamente por dois métodos:

Análise de Imagem Interativa – necessita de um operador que controla manualmente um cursor sobre uma fotomicrografia, a qual será interpretada pelo computador, sendo calculados a partir daí as medidas e os dados solicitados.

Análise de Imagem Automatizada – mais complexa e evoluída, foi a utilizada neste estudo experimental. A imagem é captada através de uma videocâmara para ser armazenada digitalmente na memória do computador. As medidas são automaticamente realizadas e analisadas dispensando a interferência do operador e a elaboração de microfotografias. Estudos comparativos entre diferentes técnicas demonstram haver menor índice de variabilidade quando se pode trabalhar com sistema digitalizado (42).

Embora muito empregados em outras áreas, poucos são os estudos em nervos periféricos (43-45). No entanto suas vantagens se fazem notar nas medidas micrométricas da variação do diâmetro das fibras axonais e distância internodal, na regeneração neural, no processo de envelhecimento e em certas condições patológicas (46). TORCH e colaboradores (47) realizaram estudos em nervos periféricos de humanos e estabeleceu um sistema de medidas do diâmetro axonal e da espessura da bainha de mielina visando determinar um perfil referencial entre a normalidade e as neuropatias periféricas. Estudos eletrofisiológicos correlacionam-se fortemente com parâmetros morfométricos, podendo estes últimos ser uma opção segura, dispensando a realização dos primeiros em animais (48) já que a velocidade de condução tem correlação alta com o diâmetro das fibras ($r = 0,92$) e a amplitude de onda com o número de fibras ($r = 0,99$). À medida que novos estudos morfométricos venham sendo realizados com nervos periféricos, os benefícios e vantagens desta técnica possibilitarão maior confiabilidade dos dados histológicos obtidos tanto experimental como clinicamente.

Este estudo visa contribuir para um maior detalhamento da seqüência regenerativa inicial, após tratamento cirúrgico no modelo experimental do nervo mediano. Acrescenta-se a vantagem da análise histopatológica por morfometria, técnica que permite uma avaliação quantitativa do processo de regeneração. Apesar dos grandes benefícios obtidos com a morfometria em outras áreas, seu emprego no estudo do sistema nervoso periférico e suas lesões é limitado, sendo de importância a realização de projetos em centros onde haja a possibilidade do seu emprego.

2 - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos quantificar morfométrica e funcionalmente, pelo teste de preensão, o processo de regeneração em nervo mediano de ratos, bem como investigar a existência de correlação entre dados morfométricos e funcionais.

3 - MATERIAL E MÉTODO

3 - MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado em 34 ratos da raça Wistar, do sexo feminino, com peso médio de $212 \pm 22,1$ g e idade entre 100 e 120 dias. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os ratos foram distribuídos randomicamente em 5 grupos. Os animais foram submetidos a transecção do nervo mediano e microneurografia. Foram obedecidos os princípios éticos no tratamento dos animais, evitando-se dor e desconforto durante os procedimentos. No período pós-operatório, foram mantidos em gaiolas, sendo supridas as necessidades básicas de alimentação e conforto em consonância com os preceitos baseados no *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy Press. Washington, D.C. 1996.

O grupo controle referencial da normalidade foi constituído de 8 ratos não operados. Os animais foram avaliados e sacrificados na seguinte ordem: o grupo 1 (n = 8), controle; grupo 2 (n = 8) correspondente ao 10º dia pós-ope-

ratório; grupo 3 (n = 5) ao 20^o dia; grupo 4 (n = 5) ao 30^o dia e grupo 5 (n = 8) ao 45^o dia.

3.1 - Anestesia e Cirurgia

Foi aferido o peso de cada animal imediatamente antes do procedimento cirúrgico. A anestesia foi realizada com cloridrato de zolazepam (Zoletil*) 50 mg/ml, na dosagem de 1 ml/kg de peso associado à solução aquosa a 2% de cloridrato de di-hidrodiazina (Rompum*) na dosagem de 0,33 mg/kg de peso, por via intramuscular. A indução anestésica foi feita com éter etílico em campânula. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre pela mesma equipe. Após imobilização dos ratos em placas de cortiça na posição de decúbito dorsal, realizava-se tricotomia na face interna do braço, antissepsia com álcool iodado e incisão longitudinal de 1 cm na pele com exposição do nervo mediano, o qual se encontra lateral ao nervo ulnar. O mediano era isolado e seccionado perpendicularmente 5 mm acima do cotovelo proximal ao ramo da artéria braquial para o bíceps (Fig. 1). A microneurorrafia epineural, realizada com fio de náilon 9-0 e agulha romba BV130-5 (Ethicon Inc. São Paulo, SP. Brasil), constava de três pontos separados e era feita sob microscopia óptica (Microscópio D.F. Vasconcellos modelo MCM5. São Paulo, SP. Brasil) com 25 vezes de aumento. A sutura observou os princípios da técnica microcirúrgica atraumá-

tica (Fig. 2). Fazia-se hemostasia perineural apenas com compressão, e o campo cirúrgico era mantido umidecido com solução fisiológica durante todo o procedimento. Para a sutura da pele utilizava-se fio de nylon 6-0 (Ethicon), com pontos simples separados.

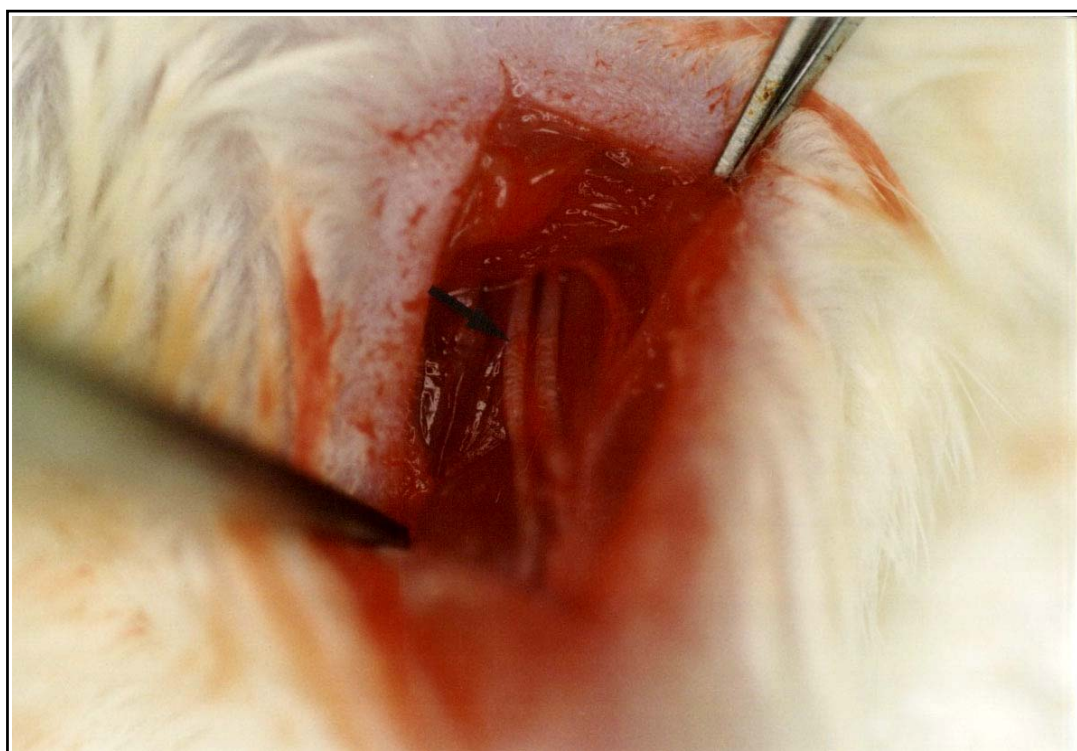


Fig. 1 - Anatomia do nervo mediano na região anterior do braço, com nervo ulnar localizado medialmente

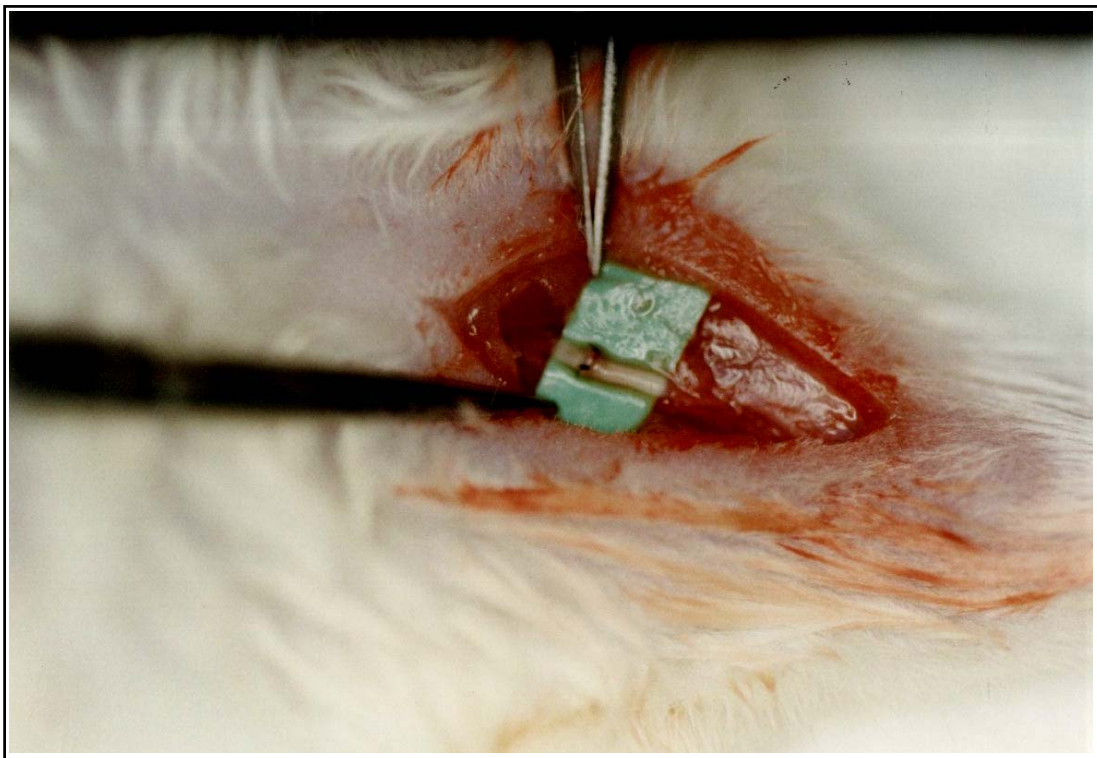


Fig. 2 – Microneurorrafia término-terminal do nervo mediano realizada com mononylon 9-0 sob microscopia óptica, proximal ao cotovelo

3.2 - Manutenção e Sacrifício

Os animais, em 5 no máximo, permaneceram em gaiolas apropriadas, recebendo ração comercial para ratos e água *ad libitum*. No final do período de tempo estipulado para cada grupo, eram sacrificados para o estudo histopatológico, após mensurada a força de preensão.

3.3 - Aferição da Força de Prensão

Os animais foram avaliados, quanto à força de prensão, de acordo com a data estipulada para cada grupo no pós-operatório: 10^o, 20^o, 30^o e 45^o dia. O grupo controle, não operado, foi também avaliado. Para aferir a força de prensão foi confeccionada uma grade de ferro com dimensões de 6 x 4,5 x 2 cm, a qual foi acoplada por meio de fita adesiva à superfície da balança eletrônica, com base no modelo proposto por BERTELLI (39). Os animais eram elevados pela cauda permitindo a proximidade do membro anterior com a grade para prensão reflexa. No exato momento da prensa eram tracionados até a força máxima negativa, a qual era mensurada. O membro contralateral era imobilizado com fita adesiva junto ao tronco (Fig. 3). Antes de cada mensuração a balança era tarada, e a medida considerada apenas para flexão dos dedos.

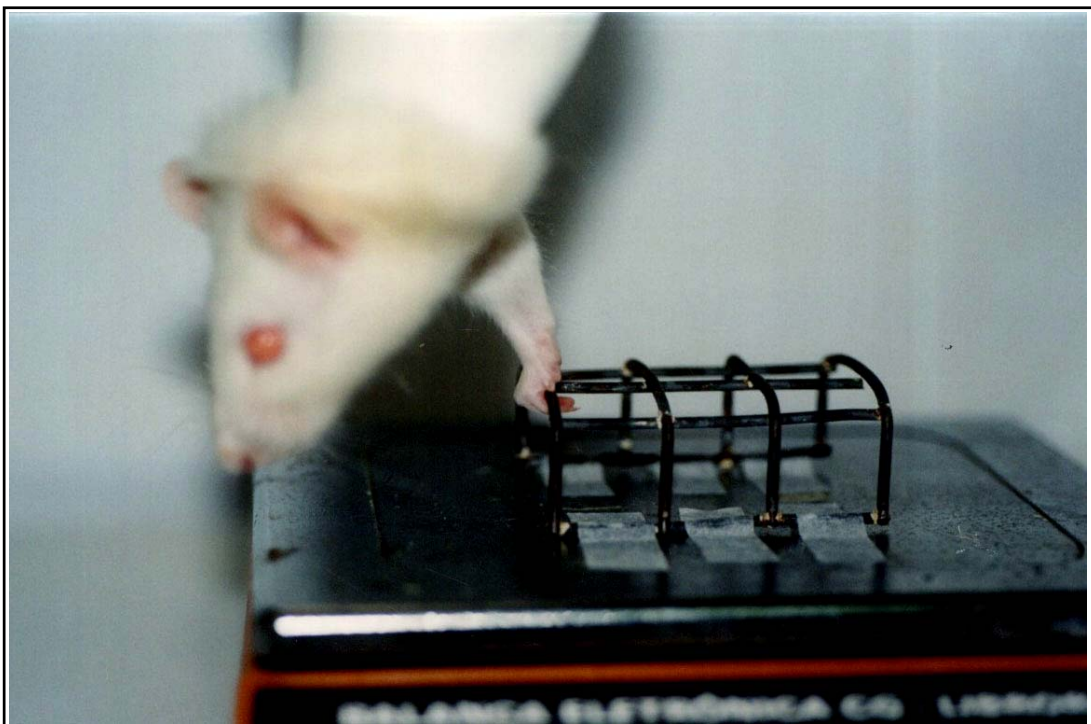


Fig. 3 - Rato submetido ao teste de prensão com imobilização do membro contralateral, gentilmente, por fita adesiva

3.4 - Estudo Histopatológico

Nos tempos estabelecidos: 10^o, 20^o, 30^o e 45^o dia pós-operatório foram obtidos espécimes de 5 mm para a biópsia dos nervos distais à microneurografia e proximalmente ao ramo da artéria braquial. As biópsias do grupo controle foram feitas no nervo mediano direito, em idêntico local e mesmas dimensões. Eram realizadas nesses espécimes, após inclusão em resina (Epon-812), secções perpendiculares semifinas (1 μ), coradas por azul de toluidina, conforme protocolo abaixo. No grupo do 10^o pós-operatório foram realizados secções ultra-finas (0,5 μ) para análise sob microscopia eletrônica. Este estudo foi realizado no laboratório de microscopia eletrônica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Protocolo de Fixação e Inclusão

O material biopsiado era imediatamente colocado em solução fixadora contendo:

- glutaraldeído a 25% – 1,2 ml;
- millonig 2x concentrado ph 7,3 – 5,0 ml;
- água destilada e deionizada – 3,8 ml.

As amostras eram lavadas em tampão millonig isotônico e, após, imersas em tetróxido de ósmio a 1% tamponado, para pós-fixação.

A desidratação processou-se na série: acetona a 30%, a 50%, a 70%, a 95% e a 100%. Todas as passagens tiveram a duração de 10 minutos, com exceção das duas últimas, com duração de 20 minutos a mais cada uma.

A pré-umbebição dos materiais era feita em uma mistura de epon 812 com acetona pura nas seguintes proporções:

- a) uma parte de epon e duas partes de acetona por 2 horas;
- b) uma parte de epon e uma parte de acetona por 24 horas;
- c) duas partes de epon e uma parte de acetona por 2 horas;

Mistura epon:

Epon 81225 ml

MNA.....17 ml

DDSA.....08 ml

DMP-3032 gotas

A umbebição era feita em epon 812 puro durante 24 horas.

Para a inclusão em silicone foram usados moldes siliconados chatos – *Embedding Molds Sigma* – para que as amostras fossem então orientadas. A polimerização foi efetuada em estufa a 60°C constantes por 72 horas.

Os cortes semifinos eram feitos no ultramicrotomo Leica Ultracut UCT (Wien, Áustria), sendo utilizada navalha de diamante, Drukker type histo with

trough 8 mm, com uma espessura de 800 nm, e corados com solução aquosa de azul de toluidina a 1%.

Os cortes ultrafinos eram confeccionados no mesmo ultramicrotomo com uma navalha de diamante, Drukker type ultra with trough 3 mm.

Para a contrastação dos cortes ultrafinos utilizou-se solução aquosa de acetato de uranila a 2% e, após, citrato de chumbo (49).

O microscópio eletrônico utilizado para a observação dos cortes ultrafinos foi EM208S Philips (Eindhoven, Noruega), pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA.

3.5 - Análise Morfométrica

A análise morfométrica das lâminas foi realizada no Serviço de Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob microscopia óptica. Uma videocâmara (Sony DXC 970 MD) era acoplada a um microscópio óptico (Olympus Bx 60) e esse conjunto era conectado a um microcomputador (Intel Pentium 166) com programa de análise de imagem Image Pro Plus 3-0 for Windows V1.4.

Essa análise foi realizada com a colaboração do Dr. Vinicius Duval Silva, no serviço acima referido. A profa. Leila Chimelli, do Departamento de Patologia e Neuropatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, prestou consultoria para a análise das fibras mielinizadas em degeneração no

grupo do 10^o dia pós-operatório. A microscopia eletrônica foi utilizada para excluir regeneração neural e confirmar a presença apenas de fibras degeneradas no coto distal do 10^o dia de pós-operatório com a demonstração de alterações citoplasmáticas, da bainha de mielina e organelas das células de Schwann.

Protocolo de Morfometria

- Aquisição da imagem:

Cada corte semifino do nervo mediano biopsiado era observado ao microscópio óptico inicialmente com objetiva de 20X para obtenção de 6 campos aleatórios de imagem $64 \times 48\mu^2$, os quais eram analisados com aumento final de 1000X (abertura numérica do condensador em 0,4, diafragma de iluminação máximo, sem uso de filtro e na escala morfométrica $1\mu = 10$ píxel). As imagens eram automaticamente captadas pela câmera Sony acoplada ao microscópio, o qual, por sua vez, estava conectado a um microcomputador com o programa de análise Image Pro Plus for Windows V 14 8000.

- Parâmetros morfométricos

Os parâmetros utilizados foram contagem de fibras mielinizadas, seu diâmetro, perímetro e área e espessura da bainha de mielina.

A contagem do número de fibras mielinizadas foi interativa, empregando-se a modificação de GUNDENSEN (50), sobrepondo-se uma moldura à imagem onde se realizava a contagem (Fig. 4), de tal forma que durante a contagem

incluímos todas as fibras mielinizadas, exceto aquelas que tangenciam ou interceptam a margem inferior e lateral esquerda da moldura.

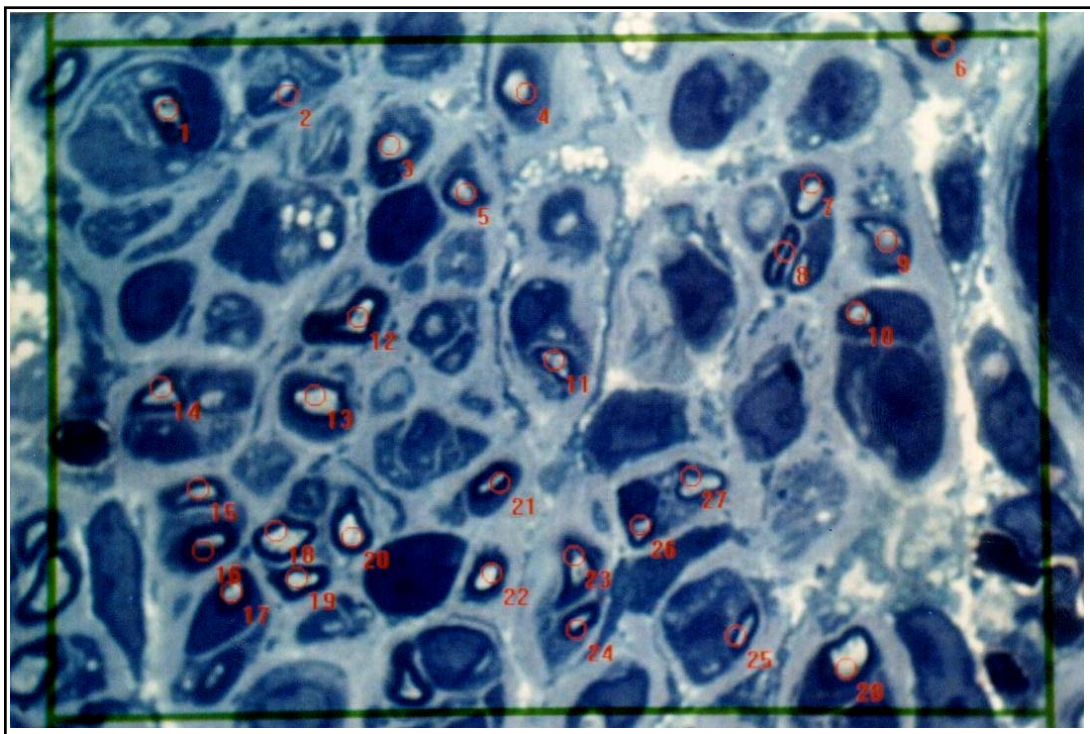


Fig. 4 – Moldura sobreposta à microfotografia da área biopsiada do nervo mediano, para realizar quantificação bidimensional do número de fibras mielinizadas

Perímetro, diâmetro e área foram aferidos automaticamente através do programa acima mencionado de análise de imagem digitalizada, com pré-seleção de todas as fibras, excluídas as paranodais e aquelas que interceptam as margens da área em estudo (Fig. 5). Em função da preponderância de não circularidade entre as fibras axonais, foram aferidos os diâmetros maior, menor e

médio, sendo este último considerado para as comparações finais, entre os diferentes grupos.

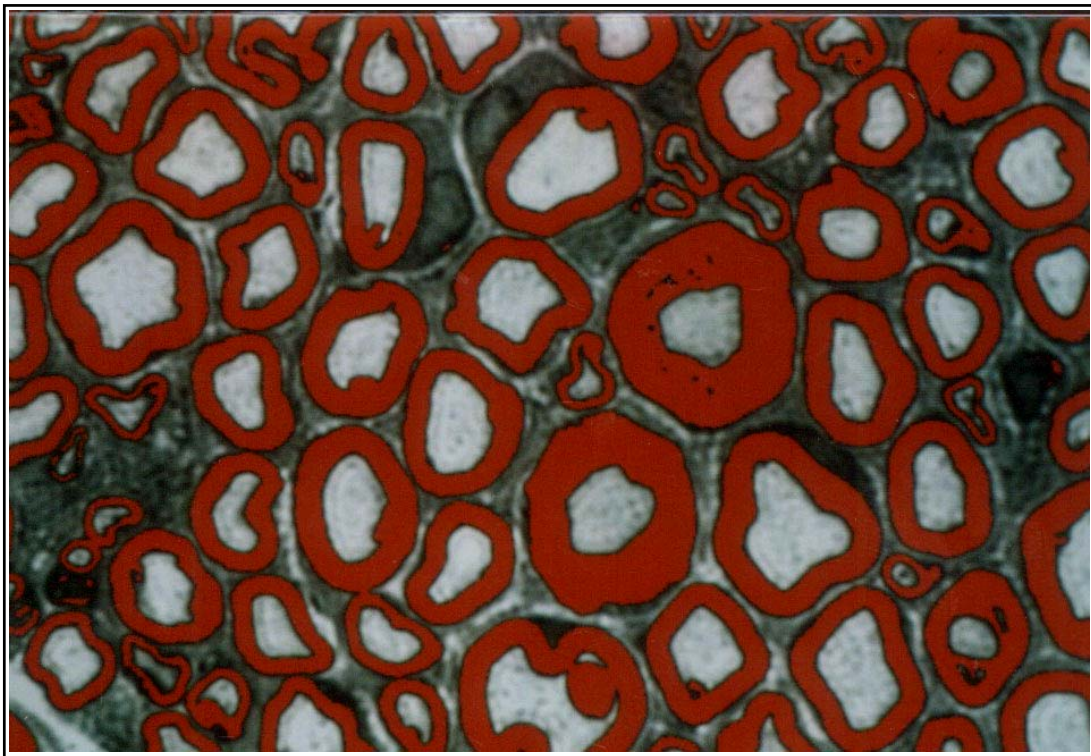


Fig. 5 - Microfotografia de área biopsiada do nervo mediano com análise digital de diâmetro, perímetro e área das fibras mielinizadas

A espessura da bainha de mielina era mensurada em 5 fibras pré-selecionadas pela maior definição de seus limites, dentro de cada campo, em zonas não paranodais, num total de 30 fibras analisadas por animal (Fig. 6).

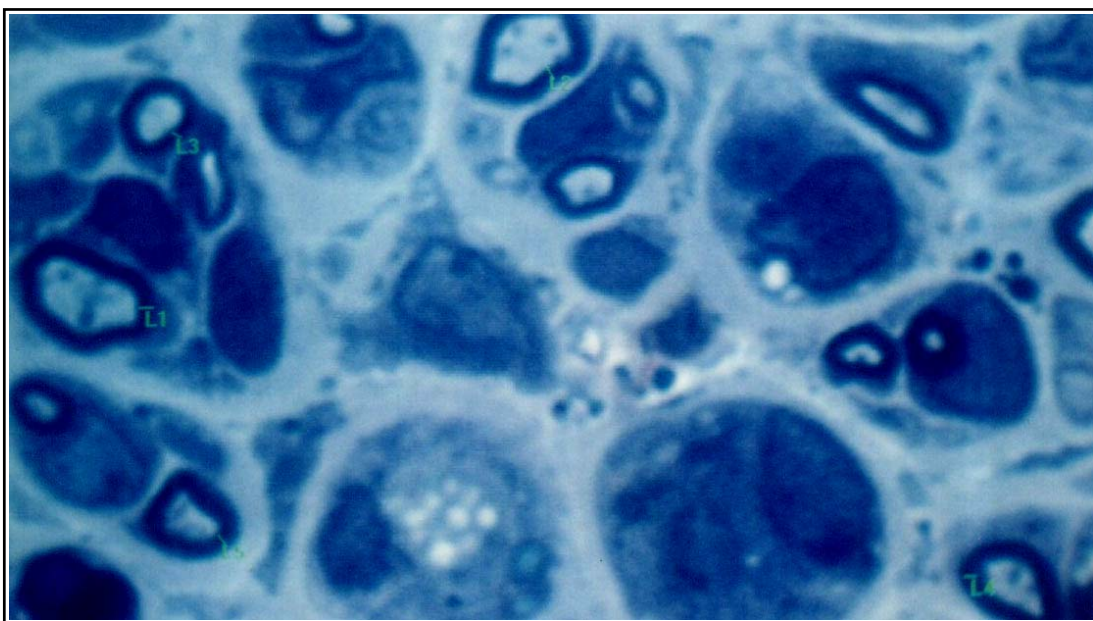


Fig. 6 - Microfotografia de área do nervo mediano com análise interativa da espessura da bainha de mielina. 30º dia pós-operatório

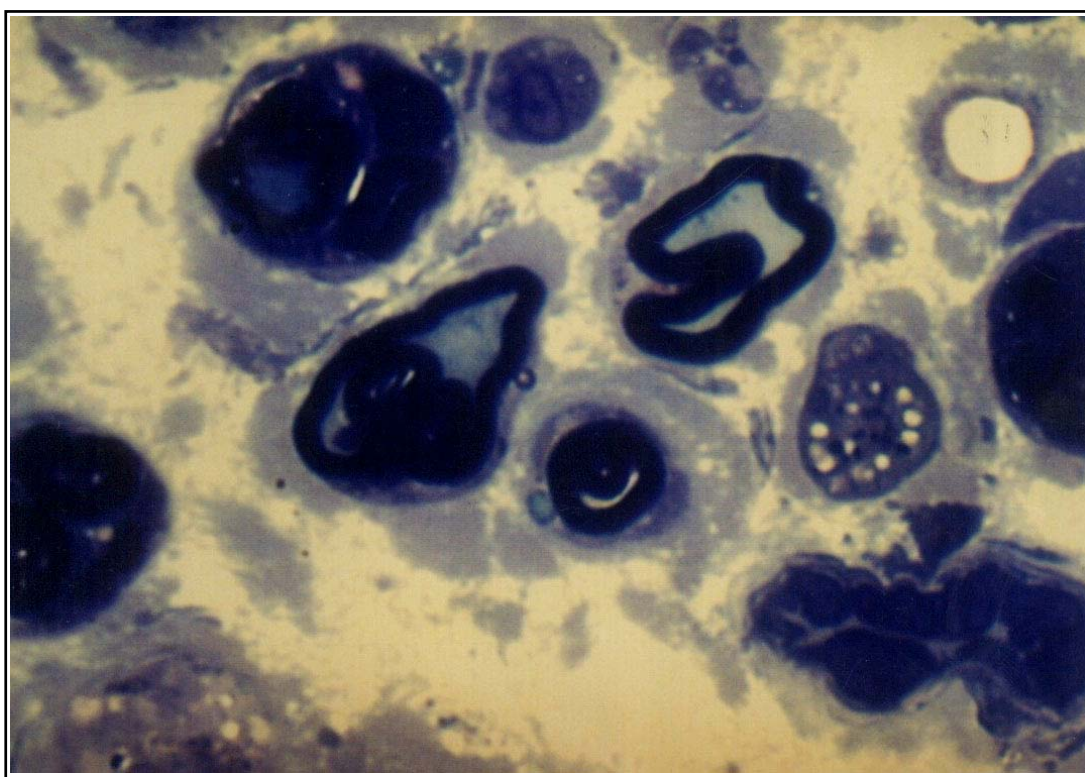
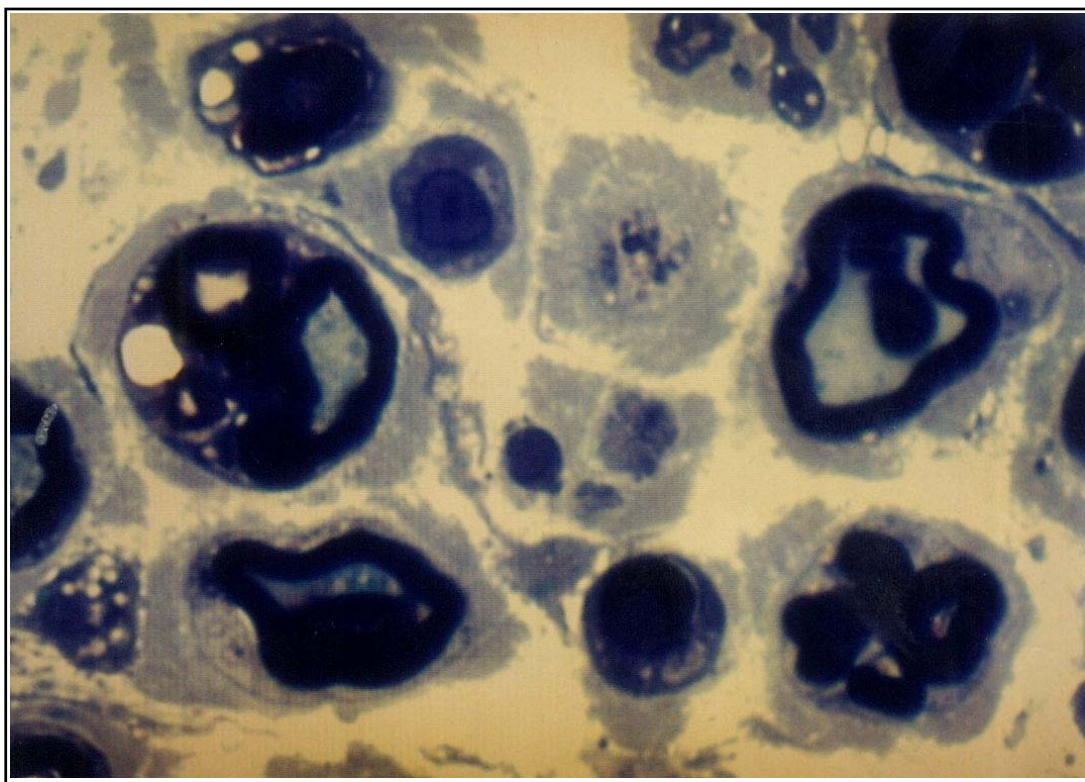
3.6 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico de análise de variância pelo método de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas entre os diferentes grupos, considerando os parâmetros: contagem do número de fibras mielinizadas, mensuração do seu diâmetro, perímetro e área, bem como análise da força de preensão e espessura da bainha de mielina. Considerou-se como nível de significância $p < 0,05$. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para comparação evolutiva do teste funcional de força com os dados morfométricos. O aplicativo estatístico utilizado foi Sigma-Stat.

4 - RESULTADOS

4 - RESULTADOS

A captação seqüencial das imagens no período pós-operatório demonstrou alterações diferenciadas de acordo com a evolução temporal. No 10º dia pós-operatório houve predomínio de fibrose e aumento do espaço intercelular (Figs. 7 e 8). As poucas fibras axonais mielinizadas presentes no coto distal foram analisadas por microscopia eletrônica, tendo sido encontradas alterações degenerativas tais como: edema intra-axonal e da célula de Schwann, alterações degenerativas das suas organelas e indefinição das camadas de mielina com perda da justaposição e do contato entre a fibra axonal e sua bainha. Somam-se a essas alterações a presença de vacúolos citoplasmáticos contendo material membranoso proveniente da degeneração da mielina pela célula de Schwann, bem como corpúsculos de inclusão globular e vilosidades adjacentes à bainha de mielina degenerada (Figs. 9 a 12). No 20º dia pós-operatório ocorreu o aparecimento de fibras regeneradas de dimensões menores porém ainda com predominância de fibrose intercelular (Figs. 13 e 14). Já foi possível notar a tendência ao grupamento dessas pequenas fibras, o qual foi visto nitidamente no 30º dia, quando então apresentavam-se definidos os neofascículos regenerados (Figs. 15 e 16). Finalmente no 45º dia pós-operatório ocorreu aumento das dimensões das fibras, diminuindo o espaço intercelular entre as mesmas (Figs. 17 e 18). Os dados aferidos funcional e morfometricamente encontram-se descritos a seguir bem como em anexo.



Figs. 7 e 8 - Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano, com fibras mielinizadas em processo degenerativo - 10^o dia pós-operatório



Fig. 9 - Detalhe de corte ultrafino em microscopia eletrônica do 10º dia pós-operatório apresentando célula de Schwann em processo de degeneração com vilosidades e inclusões citoplasmáticas (7.000X)



Fig. 10 - Detalhe de corte ultrafino em microscopia eletrônica do 10º dia pós-operatório apresentando célula de Schwann em processo de degeneração com vilosidades e inclusões citoplasmáticas (14.000X)



Fig. 11 - Detalhe de corte ultrafino da bainha de mielina com alterações degenerativas, edema axoplasmático, com perda da adesão entre as múltiplas camadas justapostas de mielina (50.000X)

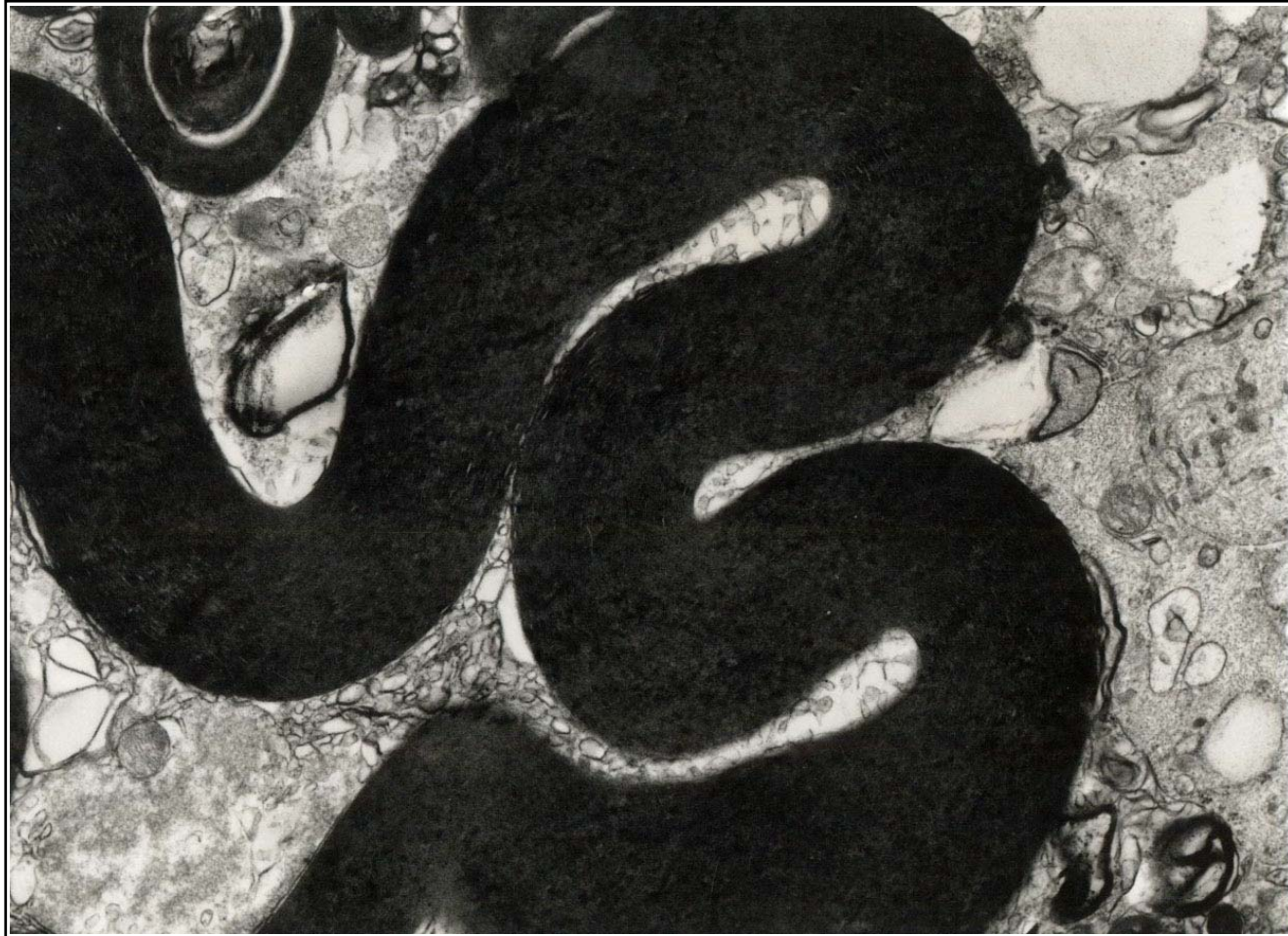
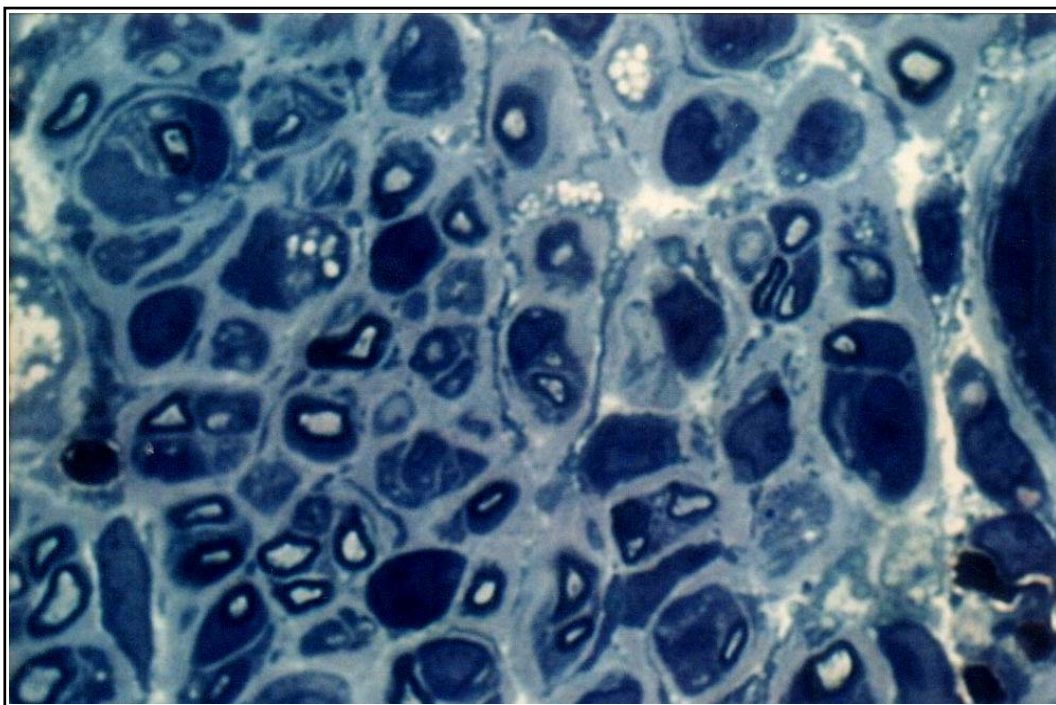
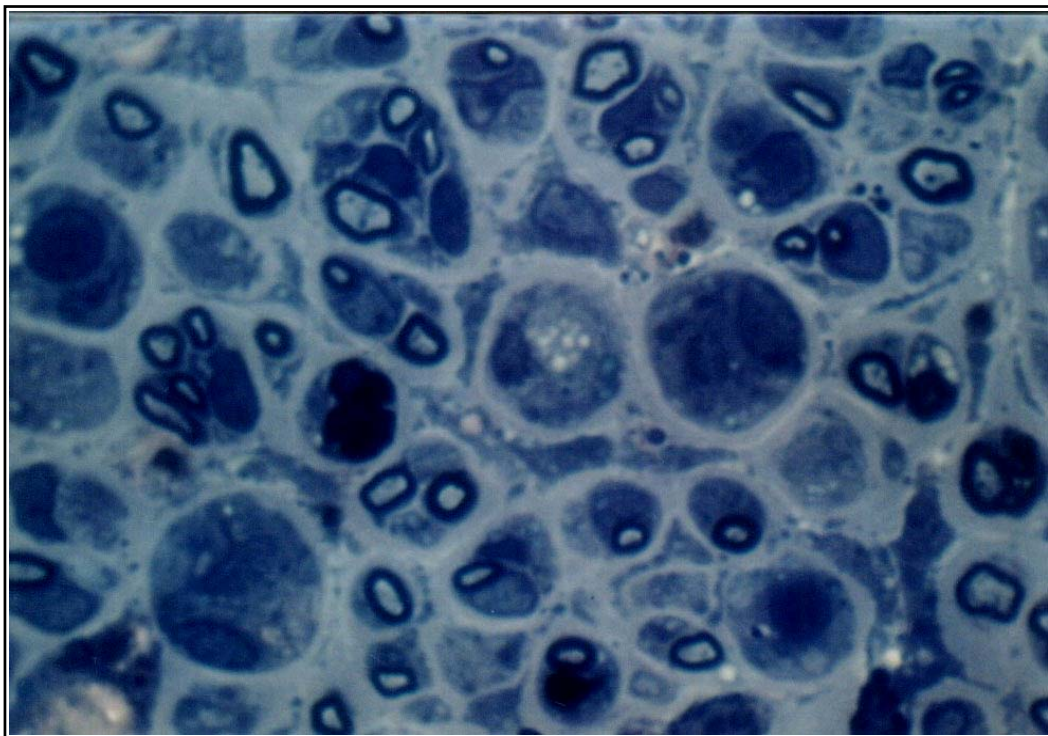
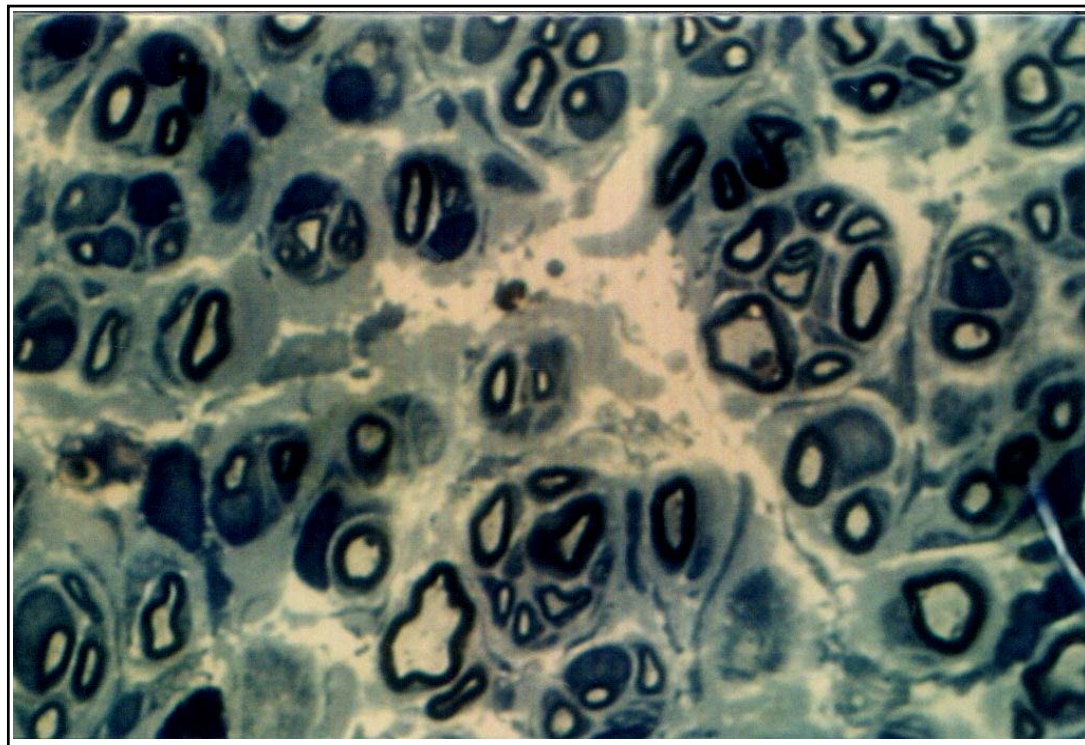
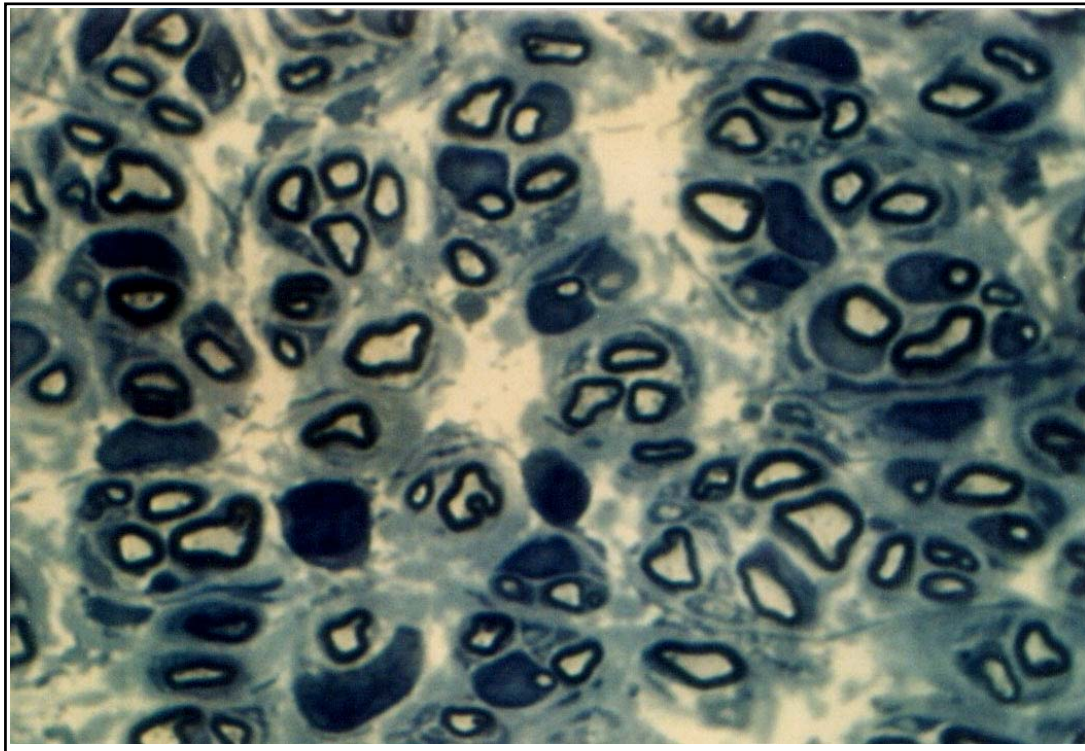


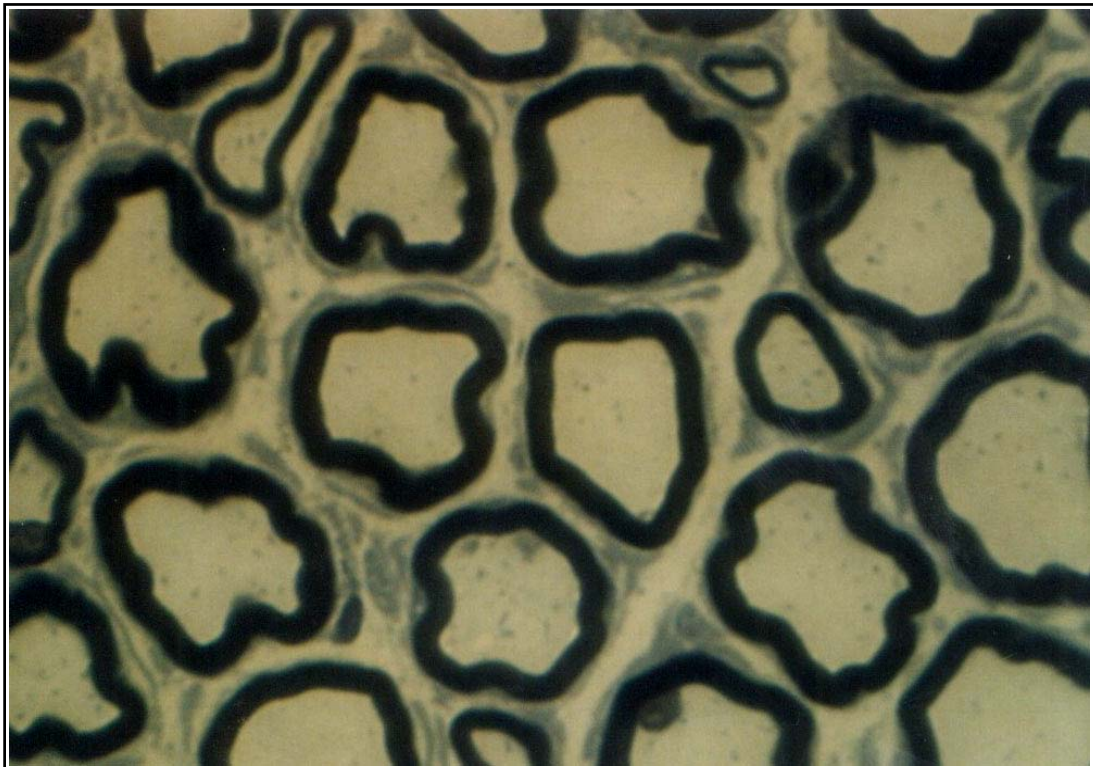
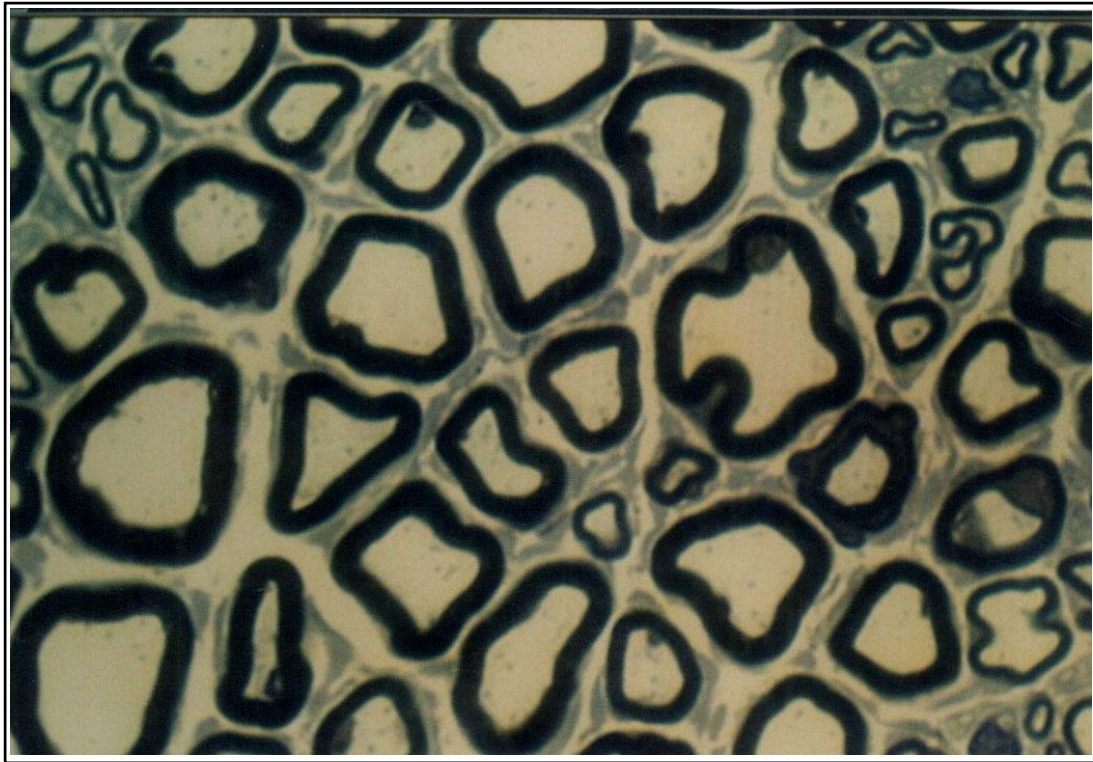
Fig. 12 - Detalhe de corte ultrafino da bainha de mielina com alterações degenerativas, edema axoplasmático, com perda da adesão entre as múltiplas camadas justapostas de mielina (29.000X)



Figs. 13 e 14 – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano com fibras em regeneração – 20^o dia pós-operatório



Figs. 15 e 16 – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano com fibras regeneradas em formação de tênues grupamentos – 30^o dia pós-operatório



Figs. 17 e 18 – Microfotografia de corte semifino do coto distal do nervo mediano no 45º dia pós-operatório

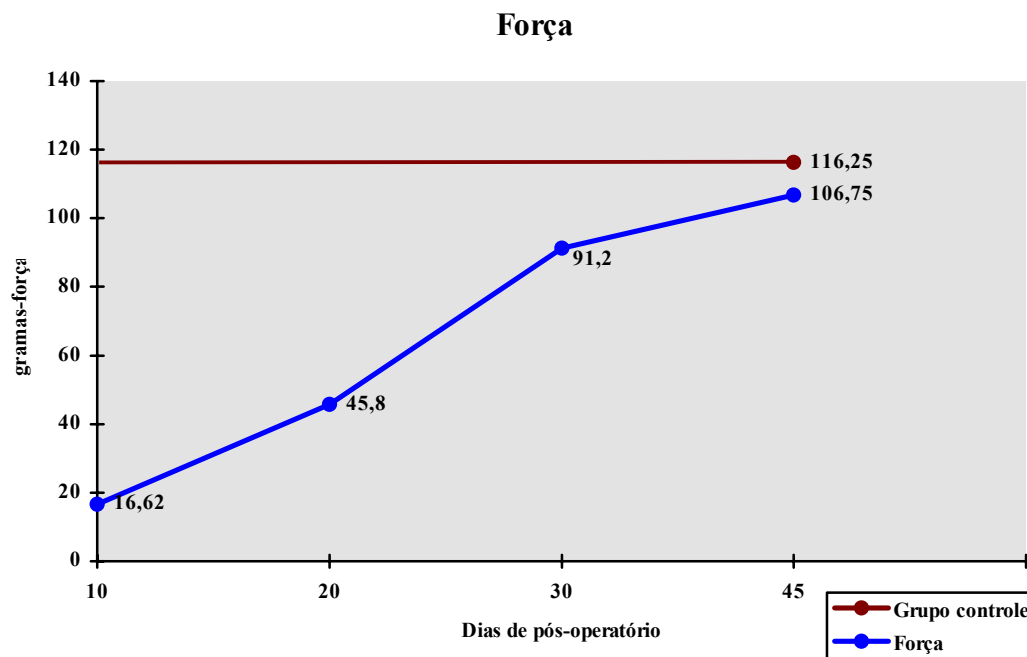
4.1 - Força de Preensão

O grupo controle (ratos não operados) apresentou uma força média de – 116,25 g, contrastando com os valores do 10^o dia pós-operatório: – 16,62 g. Houve um aumento progressivo no decorrer do período estudado (Gráfico 1) mantendo diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, exceto entre o 45^o e o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Medidas da força de preensão do membro operado de acordo com as diferentes datas de pós-operatório

Grupo	Média ± DP (g)	Mediana (g)
Controle (8)	116.25 ± 1,38	117.00
10 PO (8)	16.62 ± 11,72*	11.50
20 PO (5)	45.80 ± 15,84*	50.00
30 PO (5)	91.20 ± 12,47*	90.00
45 PO (8)	106.75 ± 12,02	111.00

DP = Desvio Padrão. * p < 0,05 (controle X operado). Análise de Variância (Student-Newman-Keulz)



Gráf. 1 – Distribuição comparativa da força média de apreensão entre os diferentes grupos de seguimento no período pós-operatório de 45 dias

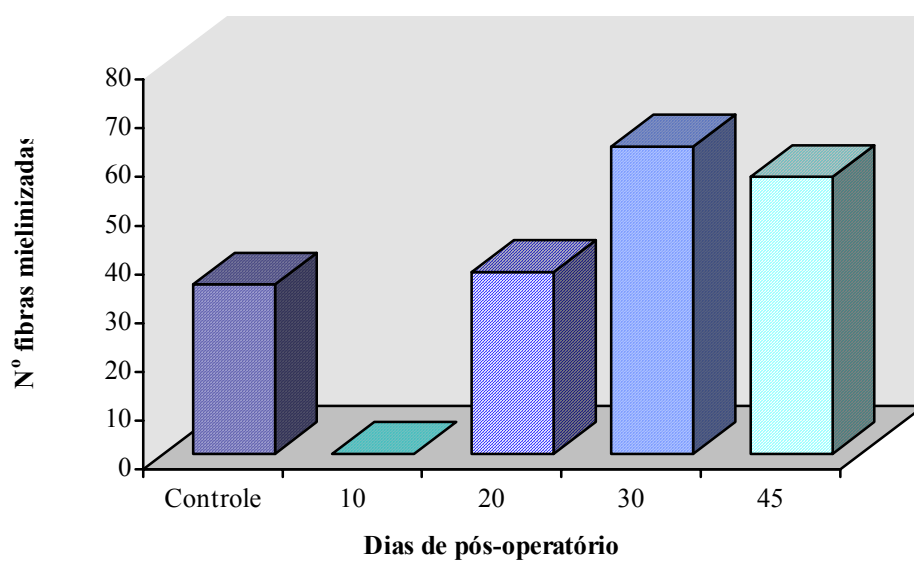
4.2 - Número de Fibras Axonais

Ocorreu um aumento estatisticamente significativo do 20^o dia até o 30^o dia pós-operatório. A diminuição no 45^o dia pós-operatório foi mínima, mantendo-se elevado o número de fibras com relação ao do grupo controle ($p < 0,05$) (Gráfico 2 e Tabela 2).

Tabela 2 - Número de fibras mielinizadas de acordo com as diferentes datas de pós-operatório

Grupo	Média ± DP	Mediana
Controle (8)	34.70 ± 4,81	35.00
10 PO (8)	–	–
20 PO (5)	37.20 ± 9,44*	40.00
30 PO (5)	63.00 ± 14,52*	66.00
45 PO (8)	56.75 ± 15,78*	54.00

DP = Desvio Padrão. *p < 0,05 (controle X operado). Análise de Variância (Student-Newman-Keulz)



Gráf. 2 – Número médio de fibras mielinizadas entre os diferentes grupos de seguimento no período pós-operatório de 45 dias

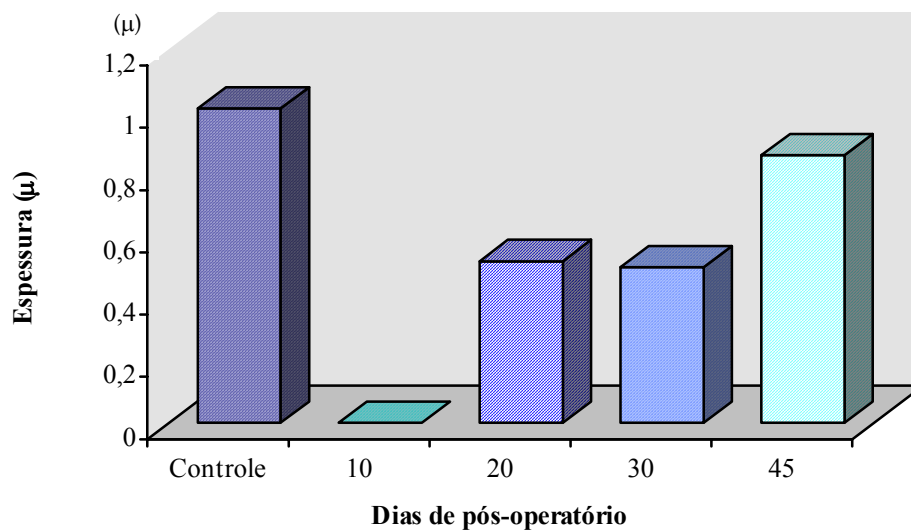
4.3 - Espessura da Bainha de Mielina

Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa, com exceção dos do 20º e 30º dia pós-operatório, comparados entre si. Foram desconsideradas as fibras do 10º dia devido a suas características de mielina em degeneração, sendo significativa a diminuição dos grupos do 20º e 30º dia pós-operatório quando comparados separadamente ao 45º (Gráfico 3 e Tabela 3) e ao grupo controle.

Tabela 3 - Medidas das espessuras das bainhas de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório

Grupo	Média ± DP (μ)	Mediana (μ)
Controle (8)	1.01 ± 0,10	1.07
10 PO (8)	–	–
20 PO (5)	0.52 ± 0,06*	0.50
30 PO (5)	0.50 ± 0,05*	0.49
45 PO (8)	0.86 ± 0,15*	0.82

DP = Desvio Padrão. *p < 0,05 (controle X operado). Análise de Variância (Student-Newman-Keulz)



Gráf. 3 – Espessura média das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos

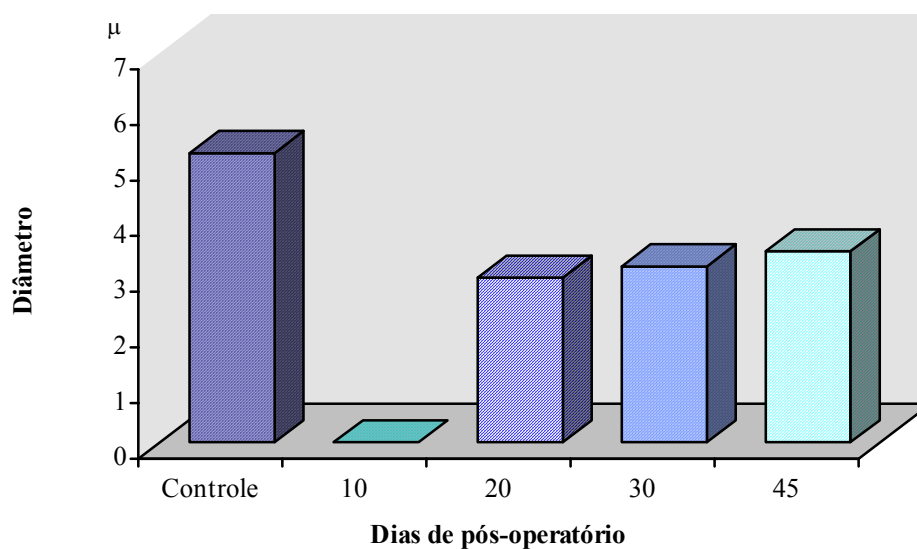
4.4 - Diâmetro, Perímetro e Área das Fibras Axonais

No período intermediário da regeneração, 20º dia pós-operatório, a média de valores demonstrou redução acentuada nas dimensões dos axônios comparativamente à normalidade ($p < 0,05$), apresentando elevação dos valores nos grupos do 30º e 45º dias pós-operatório, progressivamente, com diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos e o grupo controle (Gráficos 4, 5 e 6 e Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4 - Medidas dos diâmetros transversais das fibras de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório

Grupo	Média \pm DP (μ)	Mediana (μ)
Controle (8)	5.20 \pm 0,29	5.25
10 PO (8)	–	–
20 PO (5)	2.96 \pm 0,13*	3.00
30 PO (5)	3.16 \pm 0,16*	3.16
45 PO (5)	3.43 \pm 0,41*	3.33

DP = Desvio Padrão. * $p < 0,05$ (controle X operado). Análise de Variância (Student-Newman-Keulz)

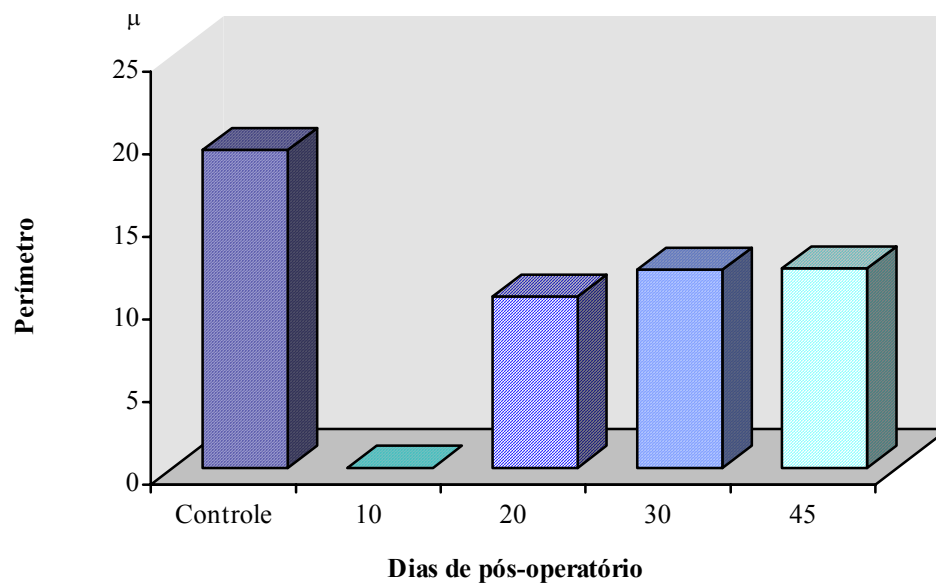


Graf. 4 – Diâmetro médio das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos

Tabela 5 - Medidas dos perímetros das fibras de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório

Grupo	Média \pm DP (μ)	Mediana (μ)
Controle (8)	19.25 \pm 1,65	18.75
10 PO (8)	–	–
20 PO (5)	10.36 \pm 0,54*	10.33
30 PO (5)	12.00 \pm 1,37*	12.16
45 PO (8)	12.08 \pm 1,66*	11.75

DP = Desvio Padrão. *p < 0,05 (controle X operado). Análise de Variância (Student-Newman-Keulz)

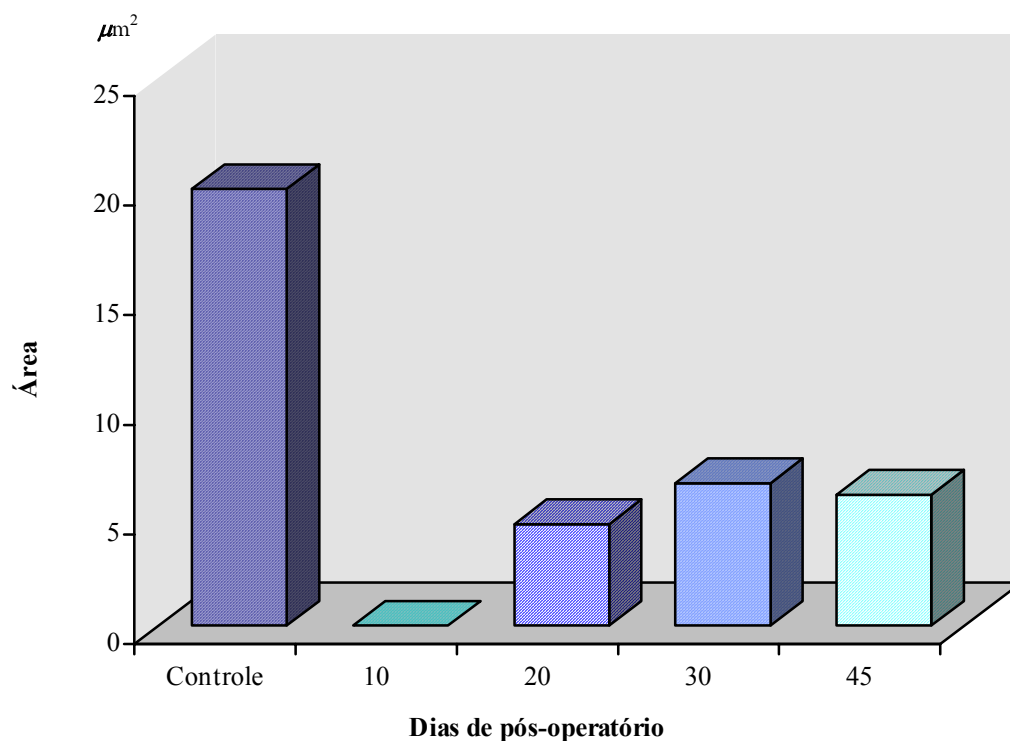


Gráf. 5 – Perímetro médio das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos

Tabela 6 - Medidas das áreas transversais das fibras de mielina de acordo com as diferentes datas de pós-operatório

Grupo	Média \pm DP (μ^2)	Mediana (μ^2)
Controle (8)	19.91 \pm 2.50	20.83
10 PO (8)	–	–
20 PO (5)	4.63 \pm 0,59*	5.00
30 PO (5)	6.50 \pm 1,86*	6.16
45 PO (8)	5.97 \pm 1,14*	5.75

DP = Desvio Padrão. *p < 0,05 (controle X operado). Análise de Variância (Student-Newman-Keulz)



Gráf. 6 – Área média das fibras mielinizadas entre os diferentes grupos

A avaliação do teste funcional de força máxima de tensão comparada aos parâmetros morfométricos, para cada um dos 5 grupos separadamente não demonstrou correlação, embora a contagem do número de fibras e a força tenham apresentado forte correlação negativa (Spearman, $r = -0,87$) apenas no grupo controle.

5 – DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Após a secção neural ocorre um aumento da síntese protéica na zona central da célula, sendo esses nutrientes transferidos mediante fluxo axonal para o local do trauma, acompanhado de edema intenso e proliferação celular de quase todos os elementos tanto no coto distal quanto no proximal (51, 52). As células de Schwann, apresentam atividade extrema, realizando fagocitose com a função de debridamento (53). No final da primeira semana inicia-se o brotamento axonal na porção do coto proximal seccionado, atingindo seu pico máximo em 2 a 3 semanas, quando então ultrapassa a zona de neurorrafia, sendo detectado depois de 6 semanas no segmento distal. Esse direcionamento das fibras axonais em regeneração depende de múltiplos fatores, como a estrutura celular de suporte mesenquimal, o tipo de trauma sofrido, a distância da secção com relação ao corpo central e a idade do paciente (54). Diferenças de resposta também são encontradas na escala animal. Nos primatas como o homem, esse retardo de 3 semanas é maior do que em mamíferos inferiores como cachorros, gatos e ratos (55). Portanto a filogenia é um fator fundamental a ser levado em consideração na interpretação dos dados experimentais. O chimpanzé parece apre-

sentar resposta similar à do homem, mas, devido à dificuldade de aquisição desse animal, o número de trabalhos com sua utilização é menor (56-59).

Um dos modelos mais empregados para estudo experimental das lesões de nervos periféricos é o rato por seu baixo custo e pela facilidade de obtenção, manuseio e conservação. Dentre as diversas áreas de investigação podemos citar a análise das diferentes técnicas de microneurorrafias e utilização de enxertos neurais (60-63), uso de condutores tubulares para orientação direcional regenerativa (64-67), verificação da resposta aos diferentes momentos de realização da neurorrafia (68-70), uso de adesivos teciduais em substituição às suturas (71, 72) e, mais recentemente, estudos de expansão neural (73, 74) e uso do laser como alternativa à sutura convencional (75-77). Outra área de utilização de ratos como modelo experimental é a de estudo de neurotrofismo e de substâncias estimuladoras da regeneração neural (78, 79).

Investigações prévias indicam que o processo regenerativo e funcional em ratos apresenta uma progressão inicial que varia de 1,5 a 2 meses, atingindo um platô após essa fase (48). Sendo o objetivo deste experimento detectar as alterações significativas do período inicial, em nosso protocolo consideramos os primeiros 45 dias de pós-operatório. No modelo experimental em questão, foi previamente constatado retorno da função motora a níveis normais dentro das primeiras 4 semanas quando na presença de lesão compressiva, sendo que animais submetidos à ressecção do nervo mediano não apresentaram evidência de flexão nesse período. Assim, para facilitar a obtenção das medidas de força, o nervo mediano contralateral à microneu-

rorrafia foi ligado e ressecado desde a axila até o cotovelo. No momento do teste, esse membro foi gentilmente imobilizado junto ao tronco com fita adesiva.

Os resultados da medida de força de preensão demonstram uma recuperação funcional normal ao final do período de 45 dias, sendo que nenhum animal apresentou autotomia ou contraturas articulares durante essa fase, confirmando as vantagens deste método frente ao do nervo ciático.

Do ponto de vista histopatológico, um dos principais obstáculos ao estudo sistemático do processo de regeneração diz respeito à dificuldade de alcançar-se a excelência na técnica de fixação. MORRIS e colaboradores (80) destacam quatro aspectos fundamentais de uma boa técnica, os quais podem ser observados nas lâminas do presente experimento, a saber:

- anéis de mielina com curvas suaves, sem angulações abruptas;
- forma das fibras não alteradas por sobreposição de outras adjacentes, com ausência de distorções de sua circularidade;
- ausência de separação das múltiplas lamelas de mielina;
- ausência de espaço entre a bainha de mielina e o axônio.

As características acima foram alcançadas pela fixação imediata do material biopsiado em solução fixadora de glutaraldeído de 25% para posterior inclusão em mistura de Epon 812, eliminando artefatos, para que as alterações celulares fossem representativas do processo de degeneração – regeneração.

Para a aferição do número de fibras foram utilizado os princípios de estereologia, um método prático de quantificar estruturas microscópicas tridimensionais por meio

de secções transversais bidimensionais com senso estatístico. Para essa informação ser verdadeira e isenta de viés, empregou-se o método proposto por GUNDERSEN e colaboradores (50), amplamente utilizado em patologia e biologia para a mensuração de partículas. Esse método simples fornece pré-requisitos estatísticos para um estudo científico das imagens, uma vez que se sistematiza a contagem independentemente do conteúdo e do observador.

As fibras mielínicas dos nervos periféricos de várias espécies apresentam uma variabilidade de forma muito grande, sendo a proporção de fibras compactas e homogêneas representada por 50% a 60% do total (81, 82). Alguns autores assumem a posição de que todos os axônios e fibras são circulares (83, 84), mas tal posicionamento pode acarretar um grande potencial de viés. Muitas fibras irregulares vistas em cortes semifinos transversais são atribuídas a zonas paranodais, onde pode ocorrer maior densidade na união do axônio com a célula de Schwann, mimetizando a bainha ou formações de invaginação da bainha de mielina, assemelhando-se a formações bulbares. CUADRAS e colaboradores (85) salientam não haver diferença na pré-seleção ou não de fibras para estudos quantitativos, não ocorrendo variações no resultado final. Neste trabalho optou-se pela não seleção para a contagem do número de fibras mielinizadas, porém foram pré-selecionados as mesmas para a obtenção do diâmetro, perímetro e área, a fim de minimizarmos o viés com a inclusão de fibras com mielina irregular e com má definição de seu contorno, por cortes na região paranodal onde há superposição de camadas invaginantes de mielina no método automatizado. Ainda segundo Cuadras, os dados mais importantes são aqueles que desconsideram

a forma, e, portanto, os parâmetros mais precisos seriam aqueles que medem diretamente o número de pixel dentro da linha referencial de contorno do objeto em estudo. O perímetro e a área são, portanto, as medidas ideais que preenchem tais requisitos. Embora tenham sido aferidos os diâmetros maior e menor, foi considerado para análise apenas o diâmetro médio, em razão da grande variação de forma das fibras.

Considerando três parâmetros – área, perímetro e diâmetro médio –, verificamos que houve diminuição nas dimensões das fibras mielinizadas no 20º dia pós-operatório, com aumento gradual no 30º e 45º dias, demonstrando uma seqüência evolutiva ao longo do período estudado. A única redução de valores ocorrida na área, do 30º para o 45º dia, não foi significativa. GUTMANN e SANDERS (86), já em 1943, estudando morfológicamente o número e o diâmetro das fibras axonais em coelhos, pós-sutura, constataram uma diminuição dos valores no coto distal, comparativamente ao coto proximal e ao nervo normal, a qual se prolongou até 365 dias de pós-operatório. Essa diferença de dimensões menores do que as normais no grupo de 45 dias também foi observada no presente estudo, com diferença estatisticamente significativa. Pode-se constatar, portanto, que a regeneração axonal com as dimensões alcançadas foi suficiente para permitir recuperação funcional próxima à normalidade, ao observarmos as medidas obtidas com o teste de preensão.

Verificamos em nosso estudo uma tendência à compartimentalização no coto distal similar àquela descrita por MORRIS e colaboradores (27) e MACKINNON e colaboradores (24) em regeneração do coto proximal e regeneração espontânea. Foi

possível evidenciá-la no grupo do 20º dia pós-operatório, porém com maior definição no grupo do 30º dia pós-operatório.

Na análise morfométrica da contagem numérica das fibras mielinizadas não foram encontradas fibras em regeneração no 10º dia pós-operatório. As fibras mielinizadas presentes encontravam-se em processo degenerativo no coto distal, o que foi corroborado pelo exame de ultramicroscopia eletrônica, sendo assim justificada a exclusão das mesmas. Resultado de recente estudo em modelos experimentais com o nervo ciático evidenciou presença de número reduzido de fibras regeneradas no 12º dia em animais sob efeito de fator de crescimento neural (87). Outro protocolo experimental com lesão por esmagamento do ciático para estudo comparativo entre duas drogas imunossupressoras detectou presença de axônios regenerados no 17º dia (88). Pode-se inferir que as fibras em regeneração ultrapassam a zona de lesão muito precocemente, no modelo mediano, a partir do 10º dia. Neste trabalho, à detecção inicial de regeneração neural verificada no 20º dia pós-operatório, seguiu-se um ápice no 30º dia, para então apresentar diminuição no 45º dia. Resultados semelhantes foram encontrados por WATTING e colaboradores (89) em estudos morfométricos, na avaliação da regeneração neural em nervo ciático de ratos com uso de nucleotídeos estimuladores após microneurografia e trauma compressivo. DUNNEN e colaboradores (90) analisando morfometricamente a regeneração do nervo ciático através de tubos biodegradáveis detectaram semelhante comportamento na proliferação das fibras mielinizadas, no coto proximal e distal, durante período inicial de 10 semanas. Postula-se que a diminuição da densidade numérica das fibras esteja associada com o

momento em que a brotação axonal atinge as células alvo, ou placa motora. Neste modelo estudado, foi corroborada essa hipótese com a mensuração de força no 45^o dia pós-operatório semelhante à do grupo controle, não operado.

Os dados morfométricos quanto à espessura da bainha de mielina demonstraram que ocorre uma tendência progressiva de aumento da sua dimensão até o 45^o dia pós-operatório, equivalente aos valores do grupo não operado, coincidindo também com a aquisição de força similar à normal.

Mesmo não havendo correlação entre teste funcional e dados morfométricos, podemos constatar que a morfometria nos diferentes grupos demonstra padrões morfológicos característicos em diferentes momentos do processo de regeneração.

Na literatura não há descrição de análise morfométrica associada ao modelo experimental do nervo mediano. MEDINACELI (91), comparando o índice funcional do ciático com morfometria em lesões traumáticas, também não encontrou correlação entre esses dois parâmetros. KANAYA e colaboradores (92), em recente estudo visando determinar o método ideal de mensuração da regeneração neural, assumindo como parâmetro ideal para o ciático o índice funcional, não encontrou forte correlação com parâmetros morfométricos e eletrofisiológicos. Possivelmente a morfometria é muito útil apenas para fornecer dados morfológicos do processo de regeneração, como, por exemplo, o número de fibras representar a velocidade do brotamento axonal, mas sem permitir inferências quanto à recuperação funcional, pois o número excessivo de axônios pode, inclusive, estar correlacionado com um teste funcional

aquém do esperado, uma vez que, não alcançando o órgão alvo, pode haver um estímulo continuado para o brotamento. É, portanto, imperativo associar diferentes técnicas de mensuração da regeneração neural a fim de se obter o maior número de dados possível referente aos diversos fenômenos envolvidos no processo.

Esta área permanece aberta à investigação científica, na busca de meios que permitam acompanhamento e detecção de parâmetros morfológicos representativos do número de fibras que atinjam a placa motora e realmente desempenhem a função adequada para o retorno da atividade motora, objetivo maior de toda microneurorrafia na lesão dos nervos periféricos.

6 - CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos a partir da investigação realizada, pode-se concluir que o modelo experimental do nervo mediano em ratos é apropriado para o estudo do período inicial da regeneração neural, apresentando fácil acesso para sua dissecação microcirúrgica e seqüela pós-secção traumática com recuperação inicial perfeitamente mensurável funcional e morfológicamente no período de 45 dias.

A análise dos dados morfométricos permitiu quantificar diferenciadamente a evolução do processo de regeneração inicial, detectando alterações significativas de número e dimensões das fibras axonais mielinizadas entre os grupos estudados, a saber:

- diâmetro, perímetro, área e espessura da bainha de mielina apresentaram diminuição significativa dos valores com posterior aumento nos grupos subseqüentes, acompanhando o processo de regeneração inicial;
- a variação significativa da contagem do número de fibras axonais mielinizadas entre os grupos ao longo do período, permite empregar esse parâmetro observacional no modelo em questão.

A quantificação da força pelo teste de preensão demonstra ser o período de 45 dias suficiente para o estudo da regeneração neural no modelo mediano, com a vantagem de não ocorrer nenhum caso de autotomia ou contratura articular nos animais.

Apesar de os dados morfométricos refletirem a evolução cronológica das alterações tróficas no modelo do nervo mediano, não é possível correlacioná-los com a função motora. Portanto, esta área permanece aberta à investigação científica, na busca de meios que permitam acompanhamento e detecção de parâmetros morfométricos representativos do número de fibras que atinjam a placa motora e realmente desempenhem a função adequada para o retorno da atividade motora, objetivo maior de toda microneurografia na lesão dos nervos periféricos.

7 - ANEXOS

7 - ANEXOS

Tabela 1 - Dados gerais e de morfometria do grupo de ratos normais

Rato	Peso (g)	Força (g)	Fibras (nº médio)	Espessura média (μ)	Diâmetro médio (μ)	Perímetro médio (μ)	Área média (μ^2)
1	221,9	112,8	11 \pm 5,7	1,03 \pm ,01	4,9 \pm 1,46	19,2 \pm 6,64	14,7 \pm 8,6
2	218,7	116,4	19,6 \pm 5,2	1,08 \pm 0,1	5,3 \pm 1,5	17,9 \pm 12,5	20,7 \pm 7,02
3	226	116,3	17 \pm 3,3	1,08 \pm 0,2	5,4 \pm 1,58	18 \pm 12,8	21,6 \pm 8,03
4	221	117	15,1 \pm 5,7	1,12 \pm 0,2	5,3 \pm 1,85	19,6 \pm 14,5	20,9 \pm 8,43
5	208,5	117,1	15,3 \pm 6,4	1,07 \pm 0,2	5,3 \pm 2,2	22,8 \pm 9,8	19,3 \pm 16,3
6	235,8	117	13,8 \pm 9,5	1,07 \pm 0,1	5,3 \pm 1,81	21,6 \pm 9,2	17,7 \pm 12,9
7	203,6	117,4	17,1 \pm 3,8	0,85 \pm 0,1	4,9 \pm 1,75	17,7 \pm 6,5	22,6 \pm 16,8
8	205	116,6	19,1 \pm 4,4	0,85 \pm 0,1	4,7 \pm 1,6	17,5 \pm 6,7	20,8 \pm 13,2

Tabela 2 – Dados gerais e de morfometria do grupo de ratos sacrificados no décimo dia pós-operatório

Rato	Peso (g)	Força (g)	Fibras (nº médio)	Espessura média (μ)	Diâmetro médio (μ)	Perímetro médio (μ)	Área média (μ^2)
1	213,5	15	–	–	–	–	–
2	194	29	–	–	–	–	–
3	209,2	31	–	–	–	–	–
4	203,9	31	–	–	–	–	–
5	239	6,2	–	–	–	–	–
6	242	6,1	–	–	–	–	–
7	216,5	8	–	–	–	–	–
8	205	7,2	–	–	–	–	–

Tabela 3 - Dados gerais e de morfometria do grupo de ratos sacrificados no vigésimo dia pós-operatório

Rato	Peso (g)	Força (g)	Fibras (nº médio)	Espessura média (μ)	Diâmetro médio (μ)	Perímetro médio (μ)	área média (μ^2)
1	145,6	67	25,6 \pm 4,2	0,48 \pm 0,07	3 \pm 0,7	11,2 \pm 2,7	5 \pm 2,9
2	162,5	50	39,5 \pm 9,5	0,52 \pm 0,09	2,6 \pm 0,5	9,5 \pm 2,0	4,1 \pm 1,6
4	179,4	30	49,5 \pm 12,9	0,64 \pm 0,09	2,8 \pm 0,65	10,1 \pm 2,7	4,8 \pm 2,4
5	172,7	30	29,5 \pm 5,5	0,49 \pm 0,12	2,8 \pm 0,63	10,1 \pm 2,9	3,8 \pm 1,6
6	186,4	52	39,5 \pm 4,7	0,5 \pm 0,11	2,9 \pm 0,61	10,4 \pm 2,8	4,9 \pm 2,03

Tabela 4 - Dados gerais e de morfometria do grupo de ratos sacrificados no trigésimo dia pós-operatório

Rato	Peso (g)	Força (g)	Fibras (nº médio)	Espessura média (μ)	Diâmetro médio (μ)	Perímetro médio (μ)	Área média (μ^2)
1	227,5	87,8	82,6 \pm 17,9	0,52 \pm 0,12	3,3 \pm 0,76	13,7 \pm 4,3	6,1 \pm 2,91
2	220	98,5	65,6 \pm 14,9	0,48 \pm 0,12	3,2 \pm 0,81	12,2 \pm 3,9	6,1 \pm 2,84
4	219,5	72,7	68,1 \pm 21,8	0,59 \pm 0,13	3,2 \pm 0,63	12,1 \pm 3,3	8,9 \pm 3,86
5	209	106,4	51,5 \pm 14,1	0,49 \pm 0,08	2,8 \pm 0,61	10,1 \pm 2,5	4 \pm 1,62
6	230	90	46 \pm 7,6	0,45 \pm 0,07	2,9 \pm 0,66	10,8 \pm 2,7	6,8 \pm 3,2

Tabela 5 - Dados gerais e de morfometria do grupo de ratos sacrificados no quadragésimo quinto dia pós-operatório

Rato	Peso (g)	Força (g)	Fibras (nº médio)	Espessura média (μ)	Diâmetro médio (μ)	Perímetro médio (μ)	Área média (μ^2)
1	228	99,4	48,3 \pm 13,9	0,88 \pm 0,49	3,2 \pm 0,95	12,2 \pm 3,5	4,2 \pm 2,83
2	214	115,7	49,5 \pm 11,2	1,21 \pm 0,33	3,7 \pm 1,23	13,1 \pm 4,8	5,9 \pm 4,4
3	235	112,5	84,6 \pm 21,4	0,8 \pm 0,12	2,9 \pm 0,87	10,3 \pm 3,2	4,4 \pm 2,4
4	228	108,5	68,5 \pm 9,0	0,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,8	10,1 \pm 3,0	4,7 \pm 2,4
5	214,5	117,9	51 \pm 8,7	0,92 \pm 0,15	3,7 \pm 1,34	13 \pm 4,3	6,7 \pm 4,76
6	245	100,2	62,3 \pm 8,0	0,85 \pm 0,14	3,3 \pm 1,04	11,5 \pm 3,8	5,6 \pm 3,28
7	221	83	57 \pm 7,6	0,72 \pm 0,16	3,4 \pm 1,04	11,9 \pm 4,0	5,8 \pm 3,37
8	218	116,4	31,6 \pm 15,7	0,71 \pm 0,11	3,9 \pm 1,35	14,6 \pm 5,8	7,7 \pm 5,3

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SMITH, J.W. Microsurgery of peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg* 1964;33:317-20.
2. MICHON, J.; NESSE, P. Le moment optimum de la suture nerveuse dans les paies du membre superieur. *Ver Chir Orthop* 1964;50:205-212.
3. MILLESI H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am* 1981;61:321-340.
4. CLARKE, E. e O'MALLEY, C.D.: The human brain and spinal cord: a historical study. Berkeley, University of California Press, 1968.
5. HUETER, K. Die algemeine. Chirurgie. Vogel Verlag, 1873.
6. SEDDON, H. Surgical disorders of peripheral nerves. William & Wilkins, Baltimore, 1972.
7. CHEM, R.C. Estudo comparativo, em ratos, de diferentes técnicas de reaproximação de nervo ciático completamente seccionado: macrocirúrgico e microcirúrgico. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina. UFRGS, 1983.
8. MACKINNON, S.E. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg* 1989;22(3):257-273.

9. TERRIS, D.J.; FEE JR., W.E. Current issues in nerve repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:725-731.
10. WALLER, A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos Trans R Soc Lond* 1850;140:423-425.
11. NISSL, F. Uber die Veranderungen der gangliezellenam Facialiskern des Kaninchens nach Ausreissung der Nerven. *Allg Z Psychiatry* 1892;48:197-204.
12. RANVIER, L. L'histologie et la physiologie des nerfs. *Arch Physiol Norm Pathol* 1871;4:427-431.
13. TERZIS, J.; DANIEL ,R. *Reconstructive Microsurgery*. Boston, Little Brown and Company, 1977.
14. DUCKER, T.B.; KEMPE, L.G.; HAYES, G.J. The metabolic background for peripheral nerve surgery. *J Neurosurg* 1969;30:270-280.
15. YAHS, M.D.; BEEBE, G.W. Recovery of motor function. *Peripheral nerve regeneration*. Woodhall B and Beebe BW Eds. Washington, D.C., US Government Printing Office, 1956.
16. DUCKER, T.B.; KAUFFMAN, F.C. Metabolic factor in surgery of peripheral nerves. *Clin Neurosurg*, 1977;24:406-424.
17. SEDDON, H.J.; HOLMES, W. Ischaemic damage in the peripheral stump of a divided nerve. *Br J Surg* 1945;32:389-391.

18. KLINE, D.G.; HAYES, G.J.; MORSE, A.S. A comparative study of the response of species to peripheral nerve injuries. II. Crush and severance with primary suture. *J Neurol* 1964;21:980-984.
19. GRABB, W.C. Primary and secondary nerve repair. *Plast Reconstr Surg* 1982;70:275-278.
20. KLINE, D.G.; HAYES, G.J.; MORSE, A.S. A comparative study of the response of species to peripheral nerve injuries. I. Severance. *J Neurosurg* 1964;21:968-971.
21. MCKINNON, S.E.; DELLON, A.L.; LUNDBORG, G. *et al.* A study of neurotropism in primate model. *J Hand Surg* 1986;11^A:888-895.
22. WONG, B.J.F.; MATTOX, D.E. Experimental nerve regeneration. *Otolaryngol Clin North Am* 1991;24:739-752.
23. WEISS, P. Nerve regeneration in the rat following tubular splicing of severed nerves. *Arch Surg* 1943;46:525-527.
24. MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; HUNTER, D.A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1985;75:384-388.
25. DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. Basic scientific and clinical applications of peripheral nerve regeneration. *Surg Ann* 1988;20:59-100.
26. MYERS, R.R. Anatomy and microanatomy of peripheral nerve. *Neurosurg Clin North Am* 1991;2(1):1-18.
27. MORRIS, J.H.; HUDSON, A.R.; WEDDEL G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. IV.

Changes in fascicular microtopography, perineurium and endoneural fibroblasts. *Z Zellforsch* 1972;124: 165-184.

28. KRINSTENSON, K; OLSSON, Y. The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers. *Acta Neuropathol* 1971;17:127-138.
29. DE MEDINACELI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. An index of functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634-639.
30. DELLON; MACKINNON, S.E. Sciatic nerve regeneration in the rat: validity of walking track assesment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery* 1989;10:220-225.
31. MARAGH, H.; MEYER, B.S.; DAVENPORT, D. *et al.* Morphofunctional evaluation of fibrin glue versus microsuture nerve repairs. *J Reconstr Microsurg* 1990;6:331-337.
32. MULLER, H.; SHIBIB, K.; FRIEDRICH, H. *et al.* Evoked muscle action potentials from regenerated rat tibial and peroneal nerves: synthetic versus autologous interfascicular grafts. *Exp Neurol* 1987;95:21-33.
33. ORGEL, M.G.; TERZIS, J.K. Epineural vs. perineural repair. An ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1977; 60:80-91.
34. BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83(1):129-136.

35. MACKINNON, S.E.;DELLON, A.L.; O'BRIEN, J.P. *et al.* Selection of optimal axon ratio for nerve regeneration. *Ann Plast Surg* 1989;23(2):129-134.
36. DELEO, J.A.; COOMBS, D.W. Autotomy and decreased spinal substance P following peripheral cryogenic nerve lesion. *Criobiology* 28: 460-466.
37. SPOREL-OZAKAT, R.E.; EDWARDS, P.M.; HEPGUL, K.T.; SAVAS, A.; GISPEN, W.H. A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. *J Neurosci. Methods* 1991;36:263-265.
38. BERTELLI, J.A.; MIRA, J.C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assesment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 1995;58:151-155.
39. BERTELLI, J.A.; TALEB, M.; SAADI, A.; MIRA, J.C; Pecot-Dechavanssine, M. The rat braquial plexus and its terminal branches: an experimental model for the study of peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1995;16:77-85.
40. HAMILTON, P.W.; ALLEN, D.C. Nervous System Diseases. *Quantitative Clinical Pathology*. Cambridge, University Press, 1995.
41. FLEEGE, J.C.; BOOK, J.P.A.; SNEWLDER, A.W.M. Analysis of measuring system parameters that influence reproducibility of morphometric assessment with a graphic table. *Hum Pathol* 1988;19: 513-517.
42. EWART, D.P.; KUZON, W.M.; FISH, J.S.; MCKEE, N.H. Nerve fibre morphometry a comparison of techniques. *J Neurosci Methods* 1989;29:143-150.
43. VIZOSO, A.D.; YOUNG, J.Z. Internode length and fibre diameter in developing and regenerating nerves. *J Anat* 1948;82:110-134.

44. BRONSON, R.T.; BISHOP, Y., HEDLEY-WHITE; E.T. A contribution to the electron microscopic morphometric analysis of peripheral nerve. *J Comp Neurol* 1978;178:177-186.
45. SELVA, J.; SCHOEVAERT-BROUSSALT, D.; SAID, G. Automated morphometric analysis of cross sections of normal and pathological sural nerve biopsy specimens. *Biol Cell* 1981;42:57-64.
46. O'SULLIVAN, D.J.; SWALLOW, M. The fibre size and content of the radial and sural nerves. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1968;31:464-470
47. TORSCH, S.; USSON, Y.; SAXOD, R. Automated morphometric study of human peripheral nerves by image analysis. *Pathol Res Pract* 1994;185: 567-571.
48. DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg* 1989;23(3):197-202.
49. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high energy ph as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol*, 17:209, 1963.
50. GUNDERSEN, H.J.G; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N. *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-394.
51. FERNANDEZ, H.L.; HUMEUS, F.C.; DANSON, P.F. Studies on the mechanisms of axoplasmatic transport in the crayfish cord. *J Neurobiolog* 1970;1:395-404.
52. DUCKER, T.B.; HAYES, G.J. Experimental improvements in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. *J Neurosurg* 1968;28:582-587.

53. HAYMAKER, W. Pathology of peripheral nerve injuries. *Military Surg* 1948;103: 448-459.
54. GUTH, L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. *Physiol Ver* 1956;36:441-478.
55. DUCKER, T.B. Metabolic factors in surgery of peripheral nerves. *Surg Clin North Am* 1972;52:1109-1122.
56. KLINE, D.G.; HAYES, G.J.; MORSE, A.S. A comparative study of response of species to peripheral nerve injuries. I. Severance. *J Neurosurg*, 1964;21: 968-970.
57. GRABB, W.C.; MICHIGAN, A.A. Median and ulnar nerve suture. An experimental study comparing primary and secondary repair in monkeys. *Bone Joint Surg* 1968;50:964-972.
58. GRABB, W. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg* 1970;46: 31-38.
59. LEHMAN, R.A.W.; HAYES, G.J. Degeneration and regeneration in peripheral nerve. *Orth Clin North Am* 1995;4:285-295.
60. MACKINNON, S.E., HUDSON A.R. The nerve allograft response: an experimental model in rat. *Ann Plast Surg*. 1985;14:334-339.
61. VITERBO, F. Neurorrafia látero-terminal: estudo experimental no rato. Botucatu: 1992. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
62. KLEINERT, H.E.; GRIFFIN, J.M. Technique of nerve anastomosis. *Orthop Clin North Am* 1973;4:907-915.

63. TERZIS, J.; FAIBISOFF, B.; WILLIAMS, H.B. The nerve gap: suture under tension versus graft. *Plast Reconstr Surg* 1994;56:166-170.
64. SECKEL, B.R.; CHIU, T.H.; NYILAS, E.; SIDMAN, R.L. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides. Regulation by the target organ. *Plast. Reconstr. Surg.* 1984;74:173-178.
65. SECKEL, B.R.; RYAAN, S.E.; GAGNE, R.G.; CHIU, T.H.; WATKINS, E. Target specific nerve regeneration through a nerve guide in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1986;78:793-798.
66. LUNDBORG, G.; HANSON, H.A. Nerve regeneration through preformed pseudosynovial tubes. *J. Hand Surg* 1980;5:35-39.
67. ROSEN, J.M.; HENTZ, V.R.; KAPLAN, E.N. Fascicular tubulization: a cellular approach to peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 1983;11(5): 397-411.
68. CLARK, W.L.; TRUMBLE, T.E.; SWIONTKOWSKI, M.F.; TENCER, A.F. Nerve tension and blood flow in rat model of immediate and delayed repairs. *J Hand Surg* 1982;17:77-87.
69. HOLMQUIST, B.; KANJE, M.; KERNS, J.M.; DANIELSEN, N. A mathematical model for regeneration rate and initial delay following surgical repair of peripheral nerves. *J Neurosci Methods* 1993;48:27-33.
70. BARANOWSKI, A.P.; PRIETSLEY, J.V.; MACMAHON, S.B. The consequence of delay versus immediate nerve repair on the properties of regenerating sensory nerve fibres in the adult rat. *Neurosci Lett* 1994;168:197-200.

71. MEDDERS, G.; MATTOX, D.E.; LYLES, A. Effects of fibrin glue on rat facial nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;100:106-109.
72. TERZIS, J.K. Tissue adhesives in peripheral nerve surgery. *Symposium on Surgical Tissue Adhesives*. Atlanta, oct, 1993.
73. SKOULIS, T.G.; LOVICE, D.; VON FRICKEN, K.; TERZIS, J. Nerve expansion. The optimal answer for the short nerve gap. Behavioral analysis. *Clin Orthop Relat Res* 1995;314:84-94.
74. HALL, G.D.; VANWAY, C.W.; KUNG, F.T.; ALLEN M.C. Peripheral nerve elongation with tissue expansion techniques. *J Trauma* 1993;34:401- 405.
75. MARAGH, H.; HAWN, R.; GOULD, J.D.; TERZIS, J.K. Is laser nerve repair comparable to microsuture coaptation? *J Reconstr Microsurg* 1988;4:189-195.
76. KORFF, M.; BENT, S.W.; HAVING, M.T.; SCHWABER, M.K.; OSSOFF, R.H.; ZEALER, D.L. An investigation of the potential for laser nerve welding. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;106: 345-350.
77. MINOVSKY, T.; BEEK, J.F.; CHAN, E.; WALCH, A.J. Laser assisted nerve repair. *Plast Reconstr Surg* 1995;95:609-610.
78. MCCULLOUGH, A.W. Studies on peripheral nerve regeneration in white rats. *J Comp Neurol* 1959;113:471-487.
79. WEISS, P.; TAYLOR, A.C. Further experimental evidence against neurotropism in nerve regeneration. *J Exp Zool* 1944;95:233-237.
80. MORRIS, J.H.; HUDSON ,A.R.; WEDDEL, G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. I

The traumatic degeneration of myelin in the proximal stump of the divided nerve. *Z Zellforsch* 1972;124: 76 - 102.

81. ARBUTHNOTT, E.R.; BALLARD, K.J.; BOYD, I.A.; KALU, K.U. Quantitative study of the non-circularity of myelinated peripheral nerve fibres in the cat. *J Physiol* 1980;308:99-123.
82. BEHSE, F. Morphometric studies on the human sural nerve. *Acta Neurol Scand Suppl* 1990;132:1-38.
83. JACOBS, J.M.; LOVE, S. Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain* 1985;108:897-924.
84. FRAHER, J.P. On methods of measuring nerve fibres. *J Anat* 1980;130: 139-151.
85. CUADRAS, J.; BUTÍ, M.; CALVET, S.; VERDÚ, E.; NAVARRO, X. Consideraciones metodológicas acerca de la morfometría de nervio periférico. *Rev Neurol (Barc)* 1994;23(121):621-626.
86. GUTMANN, E.; SANDERS, F.K. Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J Physiol* 1943;101:489-518.
87. CHEN, Z.; WANG, M. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 16:547-551 1995.
88. WANG, M.S.; ZELENY, P.M.; GOLD, B.G. Comparative dose-dependence study of FK 506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1997 aug 282(2):1084- 93.
89. WATTING, B.; SCHALOW, G.; HEYDENREICH, F.; WARZOK, R.; CERVÓS-NAVARRO, J. Enhancement of nerve fibre regeneration by nucleotides after

peripheral nerve crush damage. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1992;42(II): 1075-1078.

90. DUNNER, W.F.A.; STOKROOS, I.; BLAAUW, E.H.; HOLWERDA, A.; PENNING, A.J.; ROBINSON, P.H.; SCHAKENRAAS, J.M. Light- -microscopic and electron-microscopic evaluation of short-term nerve regeneration using a biodegradable poly (DL-lactide e caprolacton) nerve guide. *J Biomed Mater Res* 1996;31:105-115.
91. DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods* 1995;58:29-37.
92. KANAYA, F.; FIRREL, J.C.; BREIDENBACH, W.C. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast. Reconstr Surg*, 1996 dec, 98:7, 1264- 71.

ABSTRACT

ABSTRACT

This study was undertaken to assess nerve regeneration, as the result of end to end microneurotomy over 45 days, in the Median nerve on 34 Wistar rats. The grasping test was performed to evaluate function recovery in the fore limb while distal nerve specimens were harvested for morphometric analysis after 10^o (8 rats), 20^o (5), 30^o (5), 45^o (8) days of surgery in addition to unoperated control group (8). A higher negative value showed by the balance was recorded while the animal was grasping with its right forelimb, for function test and the morphometric parameters observed were number of myelinated fibers and their dimensions: diameter, perimeter, area as well as myelin sheath thickness. Comparisons of independent values between groups were done by parametric analysis of variance test for number of fibers, diameter and area for function test and myelin thickness. Results showed improvement of grasping strength for each group progressively, reaching similar values between 45 day group and controls ($p > 0.05$), which means normal neural regeneration level achieved at the end of the studied period. There was no regenerated fibers in the 10 day biopsied group. All myelinated fibers in this group present degeneration signs. The number of myelinated fibers increased at 20 and 30 days, decreasing at 45 days. The dimensions

of myelinated fibers and the myelin sheath thickness showed significant lower values between 20 day and control group, with increasing values in the subsequent groups. Even though the grasping test and number of fibers resulted in negative correlation (Spearman correlation coefficient) for the control group it was not possible to match morphometric data and function in the remaining groups. In conclusion the Median nerve experimental model is a reliable method to assess function and morphometry of peripheral nerve regeneration during the 45 days following end-to-end micro-neurotomy, but morphometric data can not be related to function recovery, they merely provide a morphologic structure chronology of regeneration events.