



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA E RECUPERAÇÃO
FUNCIONAL DA LOCOMOÇÃO APÓS ESMAGAMENTO DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS ADULTOS**

Dissertação de Mestrado

Viviane Zechlinski Sacharuk

Porto Alegre
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DA
LOCOMOÇÃO APÓS ESMAGAMENTO DO NERVO CIÁTICO EM
RATOS**

Viviane Zechlinski Sacharuk

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena

Co-orientador
Prof. Dr. Milton Antônio Zaro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre
2009

AGRADECIMENTOS

- À Professora Matilde, pelo carinho com que me acolheu em seu laboratório, pela confiança e orientação, mas acima de tudo pela grande amizade;
- Ao Professor Doutor Milton Zaro pela sua co-orientação, disponibilidade e contribuição para a realização desta pesquisa;
- Ao Instituto Brasileiro de Tecnologia em Calçado (IBTEC), Novo Hamburgo, e a equipe do Laboratório de Biomecânica pelo empréstimo do termógrafo computadorizado, sem o qual não teria sido possível a coletas das imagens deste estudo, e em especial a Alexandre Severo Pinto pela sua ajuda técnica com o uso do termógrafo;
- A todos os colegas e amigos que fiz no Laboratório de Histofisiologia comparada, em especial a Gisele, Jocemar e Simone, pelo auxílio com as técnicas, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo durante este percurso;
- Ao Léder pelo auxílio, disponibilidade e contribuição na construção final desta pesquisa;
- À Flávia Martinez, pelo grande incentivo científico e profissional;
- Às minhas colegas e amigas da Acquaticus: Vanise, Lisiâne, Simone, Cristina e Liliane, que cuidaram dos meus pacientes durante minhas ausências para realização do mestrado.
- Aos professores e funcionários do PPG-Neurociências, pela transmissão de conhecimento e o auxílio durante o mestrado;
- Ao Mário pela sua paciência, compreensão e carinho apesar de minhas ausências devido à dedicação ao mestrado;
- Aos meus queridos pais, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas;
- À UFRGS por oportunizar a realização deste trabalho.

RESUMO

Os nervos periféricos são frequentemente lesionados por lesão mecânica direta, doenças metabólicas ou tumores. As lesões dos NPs resultam em perda parcial ou total das funções motoras, sensoriais e vegetativas no segmento corporal envolvido. Ratos machos adultos *Wistar* foram divididos em três grupos: controle (n=7), *sham* (n=25) e *crush* (n=25). Todos os grupos foram submetidos à avaliação termográfica, funcional e histológica. A ΔT do grupo *crush* foi diferente do grupo controle no 1º, 3º e 7º dia pós-operatório, e do grupo *sham* no 1º, 3º e 28º dia pós-operatório ($p<0.05$). No grupo *crush*, a recuperação funcional retornou ao aos valores normais entre a 3ª e 4ª semanas após a lesão, enquanto a análise morfológica do nervo mostrou uma regeneração incompleta na 4ª semana após a lesão. Este estudo é a primeira demonstração que a temperatura da pele é aumentada pela compressão do nervo ciático e esta mudança provavelmente não é correlacionada com a recuperação funcional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iii
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
TABELAS	viii
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.2 Locomoção nos vertebrados.....	02
1.3 Nervos periféricos	04
1.4 Lesões dos nervos periféricos	07
1.5 Temperatura da pele	11
1.6 Termografia Computadorizada	13
2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MÉTODOS E RESULTADOS	21
4.1 Artigo – Viviane Z. Sacharuk, Jocemar Ilha, Gisele Lovatel, Simone Marcuzzo, Léder Xavier, Milton A. Zaro, Matilde Achaval. Changes in the hind paw skin temperature and functional recovery after sciatic nerve crush in rats	21
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- BDNF Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CGRP..... Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
DW Degeneração walleriana
N-CAM..... Molécula neural de adesão celular
NGF Fator de crescimento neural
NP Nervo periférico
NPs Nervos periféricos
SNC Sistema nervoso central
SNP..... Sistema nervoso periférico
SNV Sistema nervoso vegetativo
SP Substância P
TrKA Receptor tirosino-quinase A
TrKB..... Receptor tirosino-quinase B
TrKC..... Receptor tirosino-quinase C
 ΔT Diferença de temperatura

ARTIGO

- ΔT Temperature Difference
°C Graus Celsius
SFI Sciatic Functional Index
TSI Toe Spread Index
PL Print Length
TS Toe Spread
ITS Intermediary Toe Spread
E Experimental
N Normal
PB Phosphate buffer
BV Blood vessel
D Distal
Dd Degeneration debris
LSD Least significant differences
SEM Standard error of the mean

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática mostrando os locais de interação dinâmica das aferências sensório-motoras envolvidos na locomoção.....	04
Figura 2. Imagem digitalizada de corte transversal do nervo periférico.....	06
Figura 3. Representação esquemática mostrando o processo de degeneração walleriana no SNP.....	10
Figura 4. Imagem da Câmera termográfica.....	14
Figura 5. Imagem termográfica da região plantar dos membros posteriores em rato com compressão do nervo ciático à direita, mostrando o efeito da lesão nervosa sobre a temperatura da pele da região plantar.....	16

ARTIGO

Figure 1. Digitized images of the hind paw plantar surface skin temperature measurements obtained using an infrared video camera in sham (A) and crush (B) groups	44
Figure 2. Comparison of the functional recovery determined by the Sciatic Functional Index (SFI; A) and Toe Spread index (TSI; B) on postoperative-days 7, 14, 21 and 28	45
Figure 3. Digitized images of transverse-semithin sections (1 μ m) obtained from regenerating sciatic nerves in control (A), sham (B) and crush (C) groups	46

TABELAS**ARTIGO**

Table 1. The skin temperature differences (ΔT) between experimental (right) and normal (left) sides following post-injury time	43
--	----

1 INTRODUÇÃO

As lesões dos nervos periféricos (NPs) podem ser decorrentes de diferentes fatores, tais como, traumas mecânicos diretos ou indiretos causados por esmagamento, compressão, laceração, avulsão, ou por doenças de origem metabólica ou tumoral (DAHLIN et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2004; RASO et al., 2005). Porém, a etiologia mais comum das lesões traumáticas agudas inclui lesão por objeto penetrante, esmagamento, estiramento e isquemia (CAMPBELL, 2008).

As lesões dos NPs resultam em perda parcial ou total das funções motoras, sensoriais e vegetativas no segmento corporal envolvido devido à interrupção da continuidade do axônio, a degeneração distal da fibra nervosa e a eventual morte dos neurônios lesionados (RODRÍGUEZ, 2004; NAVARRO, 2007). A alteração nas funções motoras e sensoriais provoca uma profunda perda de capacidade funcional com consequentes prejuízos para atividade profissional e qualidade de vida do indivíduo, além de um alto custo para sociedade, não só pelo gasto direto com o tratamento das lesões, mas também, pela perda da produção devido ao afastamento do indivíduo ao trabalho (DAHLIN, 2004; ROSBERG, 2005; NAVARRO et al., 2007)

Diferentemente do sistema nervoso central (SNC), o sistema nervoso periférico (SNP) apresenta uma maior capacidade de regeneração devido à presença das células de Schwann, as quais além de serem capazes de ativar fatores intrínsecos de crescimento dos neurônios proporcionam um ambiente permissivo ao crescimento axonal (IDE, 1996; BOSSE et al., 2002). Porém, além do ambiente permissivo proporcionado pelas células de Schwann, a regeneração e a recuperação da função dependerão também de outros fatores, tais como, a variação nas conexões anatômicas e funcionais do nervo afetado, local e extensão de lesão,

idade do indivíduo, reparo cirúrgico e processo de reabilitação (CHEN et al., 2002; CAMPBELL, 2008).

Os déficits funcionais causados pela lesão nervosa podem ser compensados pela reinervação dos alvos denervados em consequência da regeneração dos axônios lesionados, arborização colateral dos axônios não lesionados da vizinhança e pelo remodelamento do circuito do sistema nervoso relacionados à perda da função (NAVARRO et al., 2007). Porém, a regeneração nervosa usualmente não permite a reinervação adequada da célula alvo (RODRÍGUEZ, 2004) e, em geral, a recuperação funcional dos pacientes após lesões dos NPs é freqüentemente incompleta ou até mesmo ausente podendo ser ocasionada devido ao progressivo declínio na habilidade dos motoneurônios de promover o crescimento axonal e a consequente falha das células de Schwann em prover um ambiente favorável ao crescimento axonal (GORDON et al., 2003; NAVARRO et al., 2007).

1.1 Locomoção nos vertebrados

Uma das características essenciais dos animais é a capacidade de se locomover de um lugar para o outro (KANDEL, 1991). A locomoção consiste de um ciclo de atividade padronizada e rítmica de vários grupos musculares que asseguram o deslocamento de um organismo no ambiente. A seqüência motora para a locomoção é ativada num padrão rítmico e alternado entre a atividade flexora e extensora dos músculos dos membros inferiores coordenado pelos interneurônios espinhais localizados na medula espinhal. O programa de comando locomotor feito por esses circuitos neurais localizados na medula espinal é conhecido como gerador de padrão central (GPC) para locomoção (FOUAD, 2004, SQUIRE, 2008; KANDEL, 1991).

Os comandos motores produzidos pelo SNC são conduzidos para os músculos por meio da atividade dos motoneurônios (ou neurônios motores inferiores), considerados a via final comum do movimento (SQUIRE et al, 2008, KANDELL et al, 1991, PURVES et al, 2005). Durante a locomoção acontecem diversas interações sensoriomotoras que são provenientes da informação dos diferentes aferentes sensoriais, tais como, músculo, tendão, articulação e pele. Estas informações provenientes dos aferentes alcançam a medula espinhal e projetam-se diretamente para os motoneuronios ou através dos interneurônios (influenciados pelo GPC). Os aferentes enviam colaterais através das vias ascendentes (direta ou indiretamente pelos interneurônios) alcançando as estruturas supraespinhais (telencéfalo e tronco cerebral), os quais por sua vez, projetam-se para a medula espinhal nos interneurônios que podem ou não ser contatados pelo mesmo aferente primário. Sentidos especiais, tais como, visão, audição e equilíbrio também podem interagir dinamicamente na geração do padrão através das vias descendentes. Desta forma, o feedback aferente tem um papel crucial na adaptação e modulação da operação do GPC no ambiente podendo gerar diversos padrões motores que podem modificar a resposta motora (ROSSIGNOL et al, 2006; VAREJÃO et al, 2006; KANDELL, 1991). Assim, o padrão de resposta motora depende da integridade entre o SNC e SNP, bem como, das informações dos aferentes sensoriais.

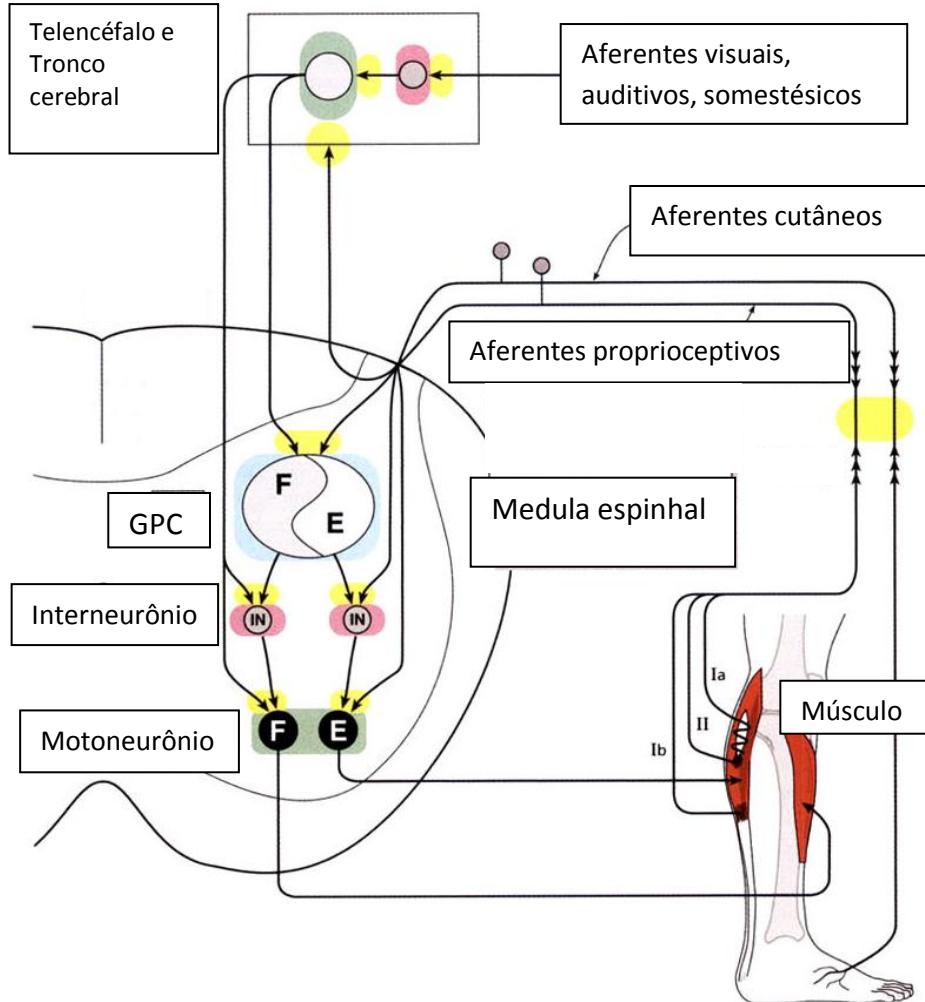


Figura 1: Representação esquemática mostrando os locais de interação dinâmica das aferências sensório-motoras envolvidos na locomoção (modificado de Rossignol et al., 2006).

1.2 Nervos periféricos

Os NPs fazem parte do SNP, tem a função de estabelecer a comunicação entre os centros nervosos e os órgãos e tecidos. São compostos de axônios de neurônios motores (eferentes), que conectam o SNC com as células ou tecidos efetores (STANDRING, 2008) e neurônios sensoriais (aferentes), que conectam os receptores periféricos com o sistema nervoso central (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; STANDRING, 2008;). Os nervos periféricos são feixes de fibras nervosas constituídas por um axônio e suas bainhas envoltórias que por sua vez estão envolvidas por tecido conjuntivo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os axônios das fibras nervosas podem ser mielinizados ou não mielinizados. Os axônios das fibras mielinizadas caracterizam-se por apresentar várias camadas de bainha de mielina formada pelas células de Schwann, interrompida apenas nos nodos de Ranvier, enquanto os axônios não mielinizados apresentam células de Schwann, porém estas não formam bainha de mielina (KIERSZENBAUM, 2008; STANDRING, 2008,).

Os NPs são envoltos por sucessivas camadas de tecido conjuntivo organizado dentro de três níveis estruturais: o epineuro reveste o nervo e preenche os espaços entre os feixes de fibras nervosas, é formado por colágeno tipo I e fibroblastos; o perineuro, tecido conjuntivo que reveste os axônios em fascículos e o endoneuro, tecido conjuntivo intrafascicular que envolve os axônios mielinizados individuais e grupos de axônios não mielinizados. Apresenta como principal constituinte celular as células de Schwann, fibroblastos e as células endoteliais (CAMPBELL, 2008; KIERSZENBAUM, 2008; STANDRING, 2008;).

Os NPs se unem na proximidade da medula espinhal para constituir os plexos, e estes dão origem aos nervos espinhais ou raquidianos (PAZO, 2004). As fibras nervosas que constituem os NPs são classificadas em grupos A, B e C de acordo com a sua velocidade de condução, sendo as fibras do grupo A subdivididas em α , β , δ e γ . As fibras $A\alpha$ são as fibras mais largas e com velocidade de condução mais rápida, inervam o tecido muscular esquelético, os mecanorreceptores encapsulados, os órgãos tendinosos de Golgi e os fusos musculares. As fibras $A\beta$ formam as terminações secundárias de algumas fibras intrafusais e também inervam os músculos, mecanorreceptores cutâneos e a cápsula articular. As fibras $A\delta$ inervam os termorreceptores, as terminações nervosas livres sensíveis ao estiramento, nociceptores da pele e tecido conjuntivo. As fibras $A\gamma$ são exclusivas do fuso muscular. As fibras B são fibras mielinizadas eferentes preganglionícias vegetativas. As fibras C são fibras

não mielinizadas, menores e mais lentas e tem função termoreceptiva, nociceptiva e interoceptiva (GANONG, 2006; PAZO, 2004; STANDRING, 2008).

Os troncos nervosos são vascularizados pelos vasos linfáticos, sanguíneos e vasa nervorum, os quais percorrem longitudinalmente no epineuro. O vasa nervorum passa através do perineuro emitindo arborizações que formam a rede vascular de capilares do tecido conjuntivo perineural e do endoneuro (CAMPBELL, 2008; STANDRING, 2008). O trauma nervoso aumenta a permeabilidade dos vasos epineurais, os quais são mais susceptíveis ao trauma de compressão do que os vasos endoneurais (CAMPBELL, 2008).

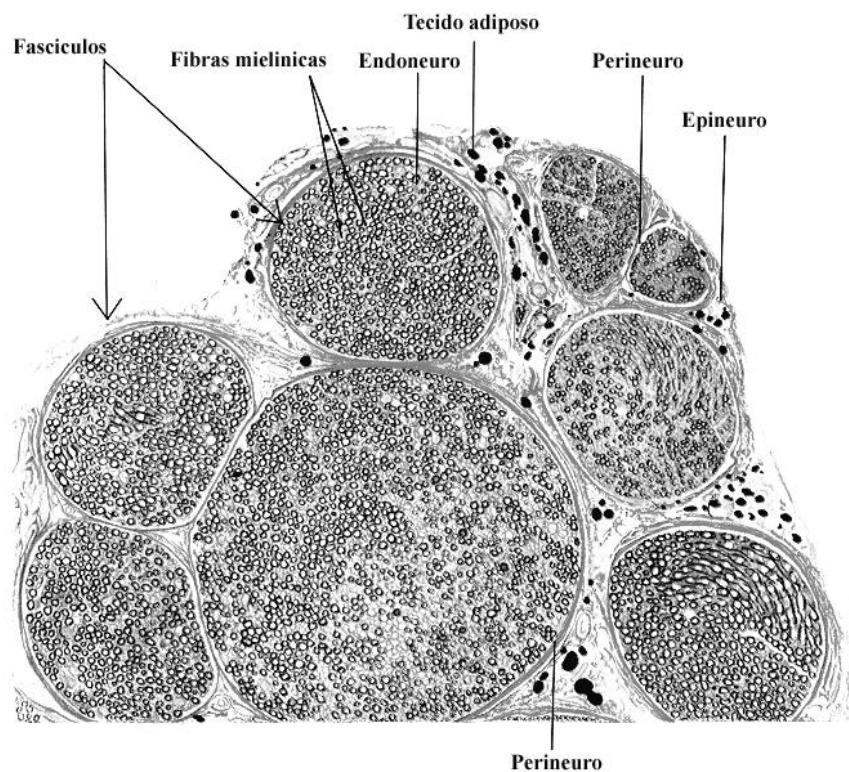


Figura 2: Imagem digitalizada de corte transversal do nervo periférico (modificado de Williams, 1995).

1.3 Lesões dos nervos periféricos

As lesões dos nervos periféricos foram classificadas por Seddon (1943) em três tipos: neuropatia, axonotmese e neurotmese. Na neuropatia ocorre apenas uma interrupção da condução nervosa por uma lesão exclusivamente na bainha de mielina do nervo, não existindo perda da continuidade axonal entre o neurônio e o músculo (CAMPBELL, 2008). Na axonotmese o axônio é danificado ou interrompido, mas a maioria do tecido conjuntivo é mantida. Na neurotmese, o nervo é completamente rompido e não existe nenhuma continuidade anatômica (BRIDGE et al., 1994).

O modelo de esmagamento do nervo ciático, além de reproduzir de forma confiável uma lesão do tipo axonotmese (BRIDGE et al., 1994; CAMPBELL, 2008) é um modelo bem característico de regeneração e plasticidade do nervo periférico (MEETEREN et al., 1997; SNIDER et al., 2002; VOGELAAR et al., 2004). A axonotmese conduz a uma imediata perda da condutividade nervosa e da transmissão neuromuscular (BOSSE et al., 2001), porém a lesão axonal normalmente resulta em regeneração (MAKWANA et al., 2005).

Após a lesão do nervo periférico tanto o segmento proximal quanto o segmento distal do axônio se retraem, o axoplasma extravasa e as membranas lesadas se colapsam (DAHLIN, 2004). Potenciais de ação gerados após a lesão atingem o corpo neuronal, promovendo um influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependente, ativando várias proteínas cinases que irão provocar mudanças tanto no segmento proximal quanto no segmento distal à lesão (NAVARRO et al., 2007).

No segmento proximal, o corpo neuronal dos neurônios lesionados sofre uma série de mudanças fenotípicas conhecidas como reação neuronal ou cromatólise. A cromatólise inicia-se dentro das primeiras horas após a lesão e é caracterizada morfologicamente pela dissolução dos corpúsculos de Nissl, deslocamento do núcleo para uma posição excêntrica ou periférica, aumento do volume nuclear, edema da célula, retração

dos dendritos e desorganização ou rompimento do retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e ribossomos (BOSSE et al., 2001; DAHLIN, 2004; NAVARRO et al., 2007).

No segmento distal do axônio, a ativação de proteases devido ao influxo de cálcio desintegra gradualmente o axônio, desencadeando uma cascata de várias ações celulares e moleculares conhecida coletivamente como degeneração walleriana (BOSSE et al., 2001; NISHIO et al., 2002; DAHLIN et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2004; CHEN et al., 2007; CAMPBELL, 2008). A degeneração walleriana inicia-se dentro das primeiras horas após a lesão (se completa por volta de 6 a 8 semanas) e é caracterizada pela remoção dos restos de axônios degenerados e dos fragmentos da bainha de mielina pela ação cooperativa entre as células de Schwann e os macrófagos infiltrados no local da lesão (NISHIO et al., 2002; KARANTH et al., 2006; CAMPBELL, 2008).

A degeneração walleriana serve para criar um microambiente distal à lesão que favoreça o recrescimento axonal dos neurônios sobreviventes e as células de Schwann, neste sentido, são essenciais para a regeneração nervosa uma vez que elas promovem o ambiente permissivo à regeneração axonal e favorecem tanto a sobrevivência como o crescimento neuronal (IDE, 1996; BOSSE et al., 2001; CHEN et al., 2007).

Eliminados os restos celulares pelas células de Schwann e macrófagos, inicia-se o processo de regeneração (CHEN et al., 2007; NAVARRO, 2007). Os macrófagos infiltrados no segmento distal à lesão estimulam a proliferação das células de Schwann (NISHIO et al., 2002; CAMPBELL, 2008). As células de Schwann proliferadas diferenciam-se e em seguida alinharam-se dentro da lámina basal formando as colunas de células de Schwann ou bandas de Büngner (persistem até 18 meses após a lesão), as quais fornecem o suporte mecânico para os axônios em regeneração guiando-os em direção à célula alvo (IDE, 1996; TORIGOE et al., 1999; LANCELOTA et al., 2003; CHEN et al., 2004; DAHLIN et al., 2004; NAVARRO, 2007; CAMPBELL, 2008). As células de Schwann diferenciadas

aumentam a expressão de diversos fatores neurotróficos, tais como, o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT3) entre outros, que se dispersam difusamente ao redor dos axônios em regeneração para promover a sobrevivência neuronal e o crescimento axonal (IDE, 1996; BOSSE et al., 2001; CHEN et al., 2004; DAHLIN et al., 2004; MAKWANA et al., 2005; VARGAS & BARRES, 2007). Esses fatores neurotróficos atuam através de receptores de baixa afinidade p75 e receptores tirosino-quinase A, B e C (TrKA, TrKB e TrKC, respectivamente), possibilitando a ação trófica das neurotrofinas.

Os axônios em regeneração, localizados nas proximidades do segmento proximal à lesão emitem prolongamentos (cone de crescimento) que se aderem às células de Schwann e à lâmina basal através das moléculas de adesão: molécula neural de adesão celular (N-CAM), L1, N-caderina, E-caderina e laminina e orientam o crescimento axonal (IDE, 1996; NAVARRO, 2007; CAMPBELL, 2008). Quando os axônios em regeneração contatam a célula alvo, as células de Schwann fixadas ao cone de crescimento começam então a expressar RNAm para síntese de mielina e iniciam o processo de embainhamento e remielinização do axônio formado. O sucesso do processo de regeneração ou recuperação inclui a correta reinervação dos tecidos alvos e o adequado retorno da função (CAMPBELL, 2008).

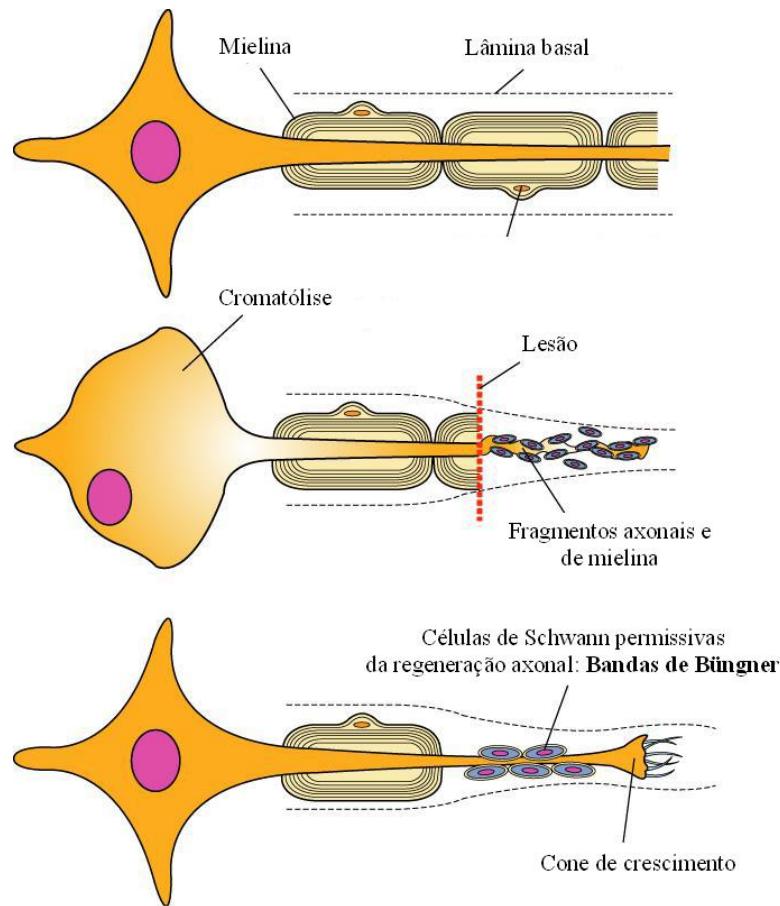


Figura 3: Representação esquemática mostrando resumidamente o processo de degeneração walleriana e regeneração no SNP (modificado de Kartje; Schwab, 2006).

Após a lesão nervosa a fisiologia dos neurônios aferentes se altera (BESTER et al., 1998; DILLEY, 2008). A lesão axonal causa mudanças inflamatórias agudas no local da lesão, na parte distal do nervo e ao redor do corpo celular dos neurônios lesionados (MAKWANA, 2005). Ocorre uma rápida liberação de NGF pelas células de Schwann que estimula o *sprouting* das fibras simpáticas (RAMER et al., 1997) e liberação pelos macrófagos de citocinas ou mediadores inflamatórios, que ativam e sensibilizam os aferentes primários tanto no local da lesão como próximo ao respectivo tronco nervoso afetado (BIRKLEIN, 2008; SCHATTSCHEIDER et al., 2008). Os neurônios aferentes primários sensoriais (fibras A e C) desenvolvem descargas ectópicas que entram na medula espinhal e sensibilizam os neurônios do corno dorsal, alterando o processamento sensorial dos neurônios

nociceptivos (BLENK et al., 1996; MICHAELIS, 1999; RAMER et al., 1999; TAL, 1999; HAN, 2000; LIU et al., 2000; MICHAELIS, 2000; GORODETSKAYA et al., 2003). Este aumento na excitabilidade dos neurônios aferentes primários associados à sensibilização dos nociceptores induz ao reflexo axonal. No reflexo axonal, potenciais de ação derivados dos nociceptores invadem antidromicamente as arborizações dos neurônios aferentes primários e causam a liberação dos neuropeptídeos CGRP e SP na região do corpo afetada pela lesão (LEMBECK, 1979; HORNYAK, 1990; HAN et al., 2000; KOYAMA, 2000; STEINHOFF et al., 2003; BOSTOCK et al., 2005; BIRKLEIN, 2008). A liberação do CGRP e SP causa vasodilatação e extravasamento de proteínas, respectivamente, provocando assim a inflamação neurogênica. O CGRP e a SP alcançam as arteríolas e disparam uma cascata de eventos que atuam diretamente no músculo liso vascular, provocando a dilatação das arteríolas (LEMBECK, 1979; CLINE, 1989; JÄNIG, 1989; BENNET, 1991; WAKISAKA, 1991; OCHOA, 1993; BENNETT et al., 1998; BESTER et al., 1998; KOYAMA, 2000). A estimulação antidiadrômica dos nervos sensoriais conduz a um aumento transitório no fluxo sanguíneo da pele, provocando vasodilatação cutânea (BAYLISS, 1901; JÄNIG, 1989).

1.4 Temperatura da pele

As lesões dos NPs em humanos podem induzir às neuropatias periféricas, caracterizadas clinicamente por dor espontânea, hiperalgesia, alodinia, parestesia e disestesia (BLENK et al., 1996; TAL et al., 1999; HAN et al., 2000). Além desses sintomas, os pacientes podem apresentar uma alteração na temperatura da pele na região do corpo inervada pelo nervo afetado (BENNET, 1991; WAKISAKA, 1991).

A pele cobre a superfície externa do corpo e é o principal local de intercomunicação com o meio ambiente. É constituída por uma porção epitelial, a epiderme, e uma porção conjuntiva vascular a derme. Desempenha múltiplas funções, tais como, proteger

o organismo contra a desidratação e atrito, receber informações constantes sobre o ambiente e as enviar para o SNC, e colaborar para a termorregulação do corpo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A pele é constituída por uma rede de vasos e por densas fibras nervosas relacionadas com a termorregulação (UEMATSU, 1988; STANDRING, 2008). O fluxo sanguíneo cutâneo é regulado de acordo com a necessidade termorregulatória e o suprimento sanguíneo para a pele é determinado pelas camadas superficiais e profundas da pele através da circulação proveniente das arteríolas, vênulas, capilares e anastomoses arteriovenosas (TAKAHASHI et al., 1999; WRIGHT et al., 2006; STANDRING, 2008).

A temperatura da pele depende do fluxo sanguíneo cutâneo e do tono simpático das fibras vasomotoras, os quais são controlados pelo sistema nervoso simpático (BRELSFORD, 1985; OCHOA, 1993; SUN et al., 2006) e este, por sua vez, é governado por impulsos nervosos gerados pelo hipotálamo e por áreas do encéfalo, e ambos os sistemas são anatômica e fisiologicamente simétricos (UEMATSU, 1988). Desta forma, em indivíduos normais não existe variação na temperatura da pele entre os lados do corpo e a detecção de uma significativa diferença de temperatura da pele de um lado do corpo, comparado com o lado contralateral pode ser altamente sugestivo de muitas lesões, tal como a lesão nervosa (HALLER, 1981; BRELSFORD et al., 1985; UEMATSU, 1985; OCHOA, 1993; HERRY, 2004; ZIPROUDINA 2005; WRIGHT et al., 2006). Em circunstâncias patológicas a temperatura da pele pode apresentar-se aquecida (hipertermia) ou fria (hipotérmica) e essa anormalidade na temperatura da pele pode ser devido a distúrbios no sistema nervoso simpático ou a vasodilatação antidrômica (WAKISAKA, 1991; OCHOA, 1993).

Anatomicamente, a lesão nervosa pode provocar um distúrbio na inervação simpática devido ao fato das fibras simpáticas percorrerem de forma paralela a distribuição sensorial somática dos nervos (PULST, 1981; BRELSFORD et al., 1985; UEMATSU, 1985;

OCHOA, 1993). Além da distribuição paralela, o distúrbio na função das fibras simpáticas pode ser ocasionado pelo atraso no transporte axoplasmático após a lesão nervosa, o qual induz a diminuição na liberação dos neurotransmissores das fibras simpáticas vasoconstritoras pós-ganglionares, desencadeando mudanças na ação modulatória das vias adrenérgicas e na atividade neuronal (WAKISAKA, 1991; WASNER, 1999; RAHMAN, 2008).

A temperatura da superfície da pele pode ser registrada por câmeras especiais conhecidas como termógrafos, os quais apresentam alta resolução e sensibilidade capazes de detectar pequenas variações na temperatura da pele (0.001°C) (VIANNA et al., 2005; SUN et al., 2006).

1.5 Termografia Computadorizada

A termografia é um método não-invasivo capaz de avaliar a temperatura através da energia emitida pela superfície do corpo humano ou de qualquer objeto e transformá-la em uma imagem visível ao olho humano (FRANCIS, 1979; BRELSFORD et al., 1985; ROCHA, 2001; KASTBERGER et al., 2003; ZIPROUDINA et al., 2005; SÜMBERA et al., 2007; NG, 2009).

Os termógrafos são câmeras (Figura 3) capazes de captar por meio de uma rede de sensores, a radiação infravermelha emitida pelo corpo e convertê-la em sinais elétricos. Os sinais elétricos são processados através de um *software* e mostrados na forma de imagens na tela do computador, tornando possível a mensuração da temperatura superficial dos corpos (BRELSFORD et al., 1985; UEMATSU et al., 1988; ROCHA, 2001; KASTBERGER et al., 2003; ZIPROUDINA et al., 2005; NG, 2009).



Figura 4: Câmera termográfica ELETROPHYSICS, PV320T. USA

Os corpos podem absorver, refletir ou transmitir a energia radiante que incide sobre eles. Porém, a energia absorvida pode ser ainda reemitida em diferentes comprimentos de onda, como, por exemplo, calor (BALBINOT, 2008). Um corpo negro é definido como um corpo que não reflete, mas sim absorve toda energia incidente. Ao absorver esta energia, o corpo negro aquece e emite radiação obedecendo ao modelo físico-matemático especial mostrado pela equação de Stephan-Boltzaman (eq 1). Já um corpo cinza, como são considerados os animais, reflete a radiação infravermelha (KATSBERGER et al, 2003).

Qualquer corpo ou objeto com temperatura acima de zero absoluto (0 Kelvin) produz movimento interno das moléculas e emissão de radiação infravermelha (CHRISTIANSEN, 1991; KATSBERGER et al., 2003; NG, 2009). A radiação infravermelha emitida por um corpo depende da sua emissividade, a qual está relacionada com a condição da sua superfície, como por exemplo, no caso de metais, depende da oxidação ou polimento da sua superfície. No caso de seres vivos, a emissividade pode ser afetada por diversos fatores tais como, a circulação sanguínea, presença de ar e umidade (BRELSFORD et al., 1985).

A quantidade de energia radiante emitida é proporcional à quarta potência da temperatura absoluta (CHRISTIANSEN, 1991; NG, 2009) como mostra a equação de Stephan-Boltzaman, abaixo:

$$E = \varepsilon \cdot \sigma \cdot T^4 \quad (1)$$

Onde:

E = potência total emitida (W/cm²)

ε = emissividade característica para cada material, adimensional

σ = constante de proporcionalidade, igual a 5.672×10^{-8} W.m⁻²K⁻⁴

T^4 = corresponde à temperatura absoluta do corpo ou objeto em graus Kelvin.

No entanto, como a transferência de energia de um corpo para outro (ou o próprio meio ambiente) depende da diferença de temperatura entre eles, a equação mais importante para determinação quantidade de energia radiante emitida por um corpo é a fórmula expandida de Stephan-Boltzaman, descrita abaixo, a qual considera a temperatura do corpo e do ambiente:

$$E = \varepsilon \cdot \sigma \cdot (T_b^4 - T_e^4) \quad (2)$$

Onde:

E = potência total emitida (W/cm²)

ε = emissividade

σ = constante de proporcionalidade

T_b = temperatura corpo

T_e = temperatura ambiente

Desta forma, a energia emitida sob a forma de calor por determinado corpo pode ser captada para mapeamento térmico, possibilitando a determinação da temperatura em múltiplos pontos ou áreas de interesse (CHRISTIANSEN, 1991).

O mapeamento térmico (interpretação das imagens) é realizado através de um *software* que permite a medição e análise da temperatura absoluta, máxima, média e mínima da região de interesse. A região de interesse pode ser definida através da criação de *spots* ou áreas nos locais a ser analisados, como mostra a Figura 4.

A imagem exibida na tela do computador pode ser monocromática, tipicamente em preto e branca (tons de cinza) ou multicolorida dependendo da escala de cores selecionadas. Na exibição monocromática, a cor preta indica as áreas mais frias e a cor branca (tons de cinza) às áreas mais aquecidas (Figura 4) (BRESLFORD et al., 1985, BALBINOT, 2008; NG, 2009). Na exibição multicolorida, cada cor pode representar uma faixa de temperatura (BRESLFORD et al., 1985, NG, 2009).

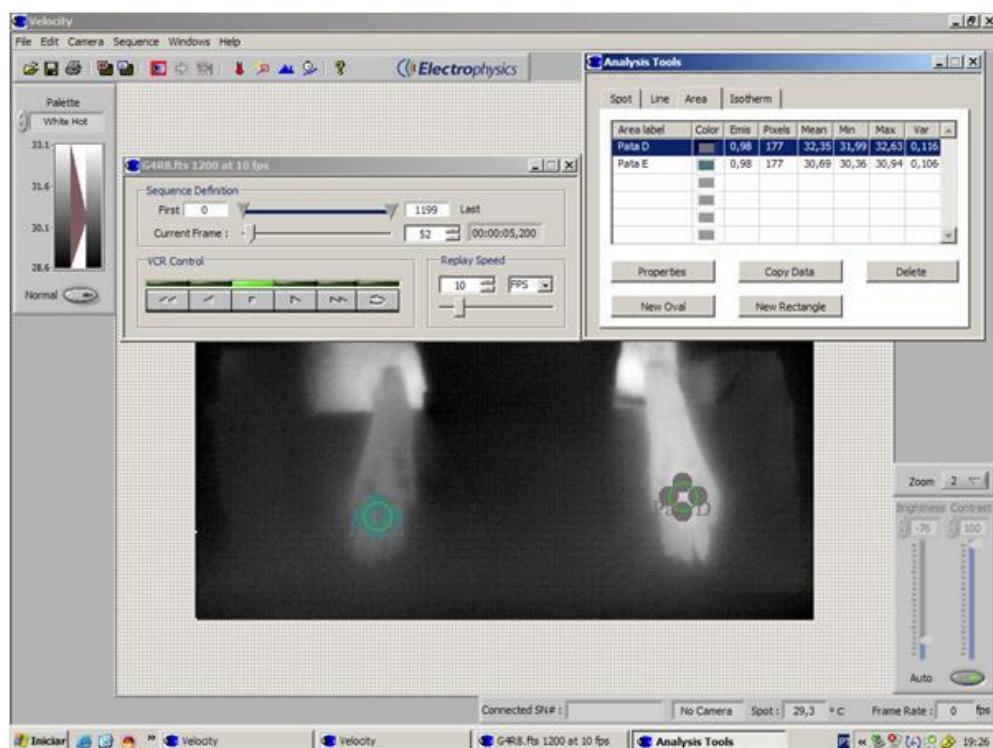


Figura 5: Imagem termográfica da região plantar dos membros posteriores em rato com compressão do nervo ciático à direita, mostrando o efeito da lesão nervosa sobre a temperatura de pele da região plantar. O marcador circular descrito como *spot* correspondente à região analisada e os valores da temperatura para cada área marcada consta na tabela na própria imagem. A escala de cor varia do preto ao branco. Quanto mais quente mais próximo do branco e, quanto mais frio, mais próximo do preto.

A termografia através de câmeras infravermelho foi desenvolvida originalmente para uso militar, mas recentemente a aplicação desta técnica tem sido empregada em diversas áreas (NG, 2008), como, por exemplo, astronomia, engenharia, medicina e veterinária (KASTBERGER & STACHL, 2003). Em geral, é utilizada como uma medida indireta do fluxo sanguíneo, capaz de detectar pequenas alterações ou variações na temperatura da pele em qualquer doença ou lesão que afete a microcirculação da pele (WRIGHT, 2006). Porém, a mensuração da temperatura da pele sozinha pode não ser suficiente para fazer diagnósticos médicos (NG, 2009), mas pode auxiliar tanto no diagnóstico, como no monitoramento de determinadas condições patológicas, tais como a síndrome dolorosa regional complexa, neuropatia diabética, insuficiência vascular, desordens vasoespásticas, lesões inflamatórias, tumores, entre outras (BENNETT et al., 1991; TAKAHASHI et al., 2002; KASTBERGER et al, 2003; ZAPROUDINA et al., 2006; NG, 2008) auxiliando assim a prática médica.

A termografia tem sido utilizada em diversos estudos experimentais sobre vários tipos de patologias: lesão nervosa periférica focal (PULST et al., 1981; BRELSFORD et al., 1985; UEMATSU et al., 1985; BENNET et al.,1991; WAKISAKA et al., 1991), distrofia simpático reflexa (WASNER et al.,1999, 2001); reflexo axonal e vasodilatação antidômica (Cline 1989; OCHOA et al., 1993; HABLER et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1999; KOYAMA et al., 2000), dor lombar (UEMATSU et al., 1988; ZAPROUDINA et al., 2006), dor miofascial (ZHANG et al., 2009) e detecção de câncer de glândula mamária (NG, 2009).

Os resultados experimentais referentes aos estudos sobre lesão nervosa periférica demonstraram uma significativa correlação entre a alteração na temperatura da superfície da pele com a lesão periférica focal (PULST et al., 1981; BRELSFORD et al., 1985; UEMATSU et al., 1985; BENNET et al.,1991; WAKISAKA et al., 1991).

Nas lesões periféricas focais, a termografia, além de permitir a visualização e o mapeamento da área afetada pela lesão do nervo periférico, ela é capaz de avaliar a atividade funcional das fibras nervosas simpáticas, possibilitando a detecção de possíveis disfunções sistema nervoso simpático (PULST et al., 1981; BRELSFORD, et al., 1985; UEMATSU et al., 1985; UMETSU et al., 1988; ZIPROUDINA et al., 2006). Assim, diferentemente dos métodos convencionais como tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM) que avaliam as mudanças morfológicas que ocorrem após a lesão, a termografia permite a avaliação do estado normal e patológico do sistema nervoso, vascular, muscular, além de processos inflamatórios locais (UMETSU et al., 1988; ZIPROUDINA et al., 2006; NG, 2009).

2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Embora existam vários estudos que avaliem os efeitos da lesão nervosa sobre a temperatura da pele, em geral, estes estudos utilizam como modelo experimental a constrição crônica do nervo ciático, a qual não apresenta um bom prognóstico para regeneração. Como o conhecimento dos efeitos da lesão por compressão do nervo ciático sobre a temperatura da pele é um tema pouco abordado na literatura, este estudo busca avaliar quais são os efeitos da lesão nervosa aguda, que apresenta um bom prognóstico de regeneração, sobre a temperatura da pele.

Diversos estudos experimentais e clínicos têm utilizado a termografia para fazer a avaliação da temperatura da pele. Assim, no intuito de ampliar os conhecimentos da utilização da termografia, este estudo busca também demonstrar como a termografia pode auxiliar no diagnóstico da lesão nervosa podendo servir como uma ferramenta eficaz capaz de fornecer informações que auxiliem tanto o manejo clínico de determinadas condições patológicas, como também a programação e reprogramação das estratégias terapêuticas de reabilitação das seqüelas funcionais das lesões nervosas periféricas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da compressão unilateral no nervo ciático em ratos machos adultos sobre a temperatura da pele da região plantar dos membros posteriores.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar um acompanhamento temporal da temperatura da pele dos membros posteriores através do uso da termografia durante período pré e pós-operatório da compressão do nervo ciático direito de ratos *Wistar* machos adultos;
- Avaliar a recuperação funcional da locomoção através da quantificação do índice de funcionalidade do nervo ciático de ratos *Wistar* machos adultos após compressão do nervo ciático direito;
- Avaliar a regeneração da porção distal à lesão do nervo ciático através da análise histológica, após quatro semanas da lesão em ratos machos adultos com compressão do nervo ciático direito.
- Avaliar inter-relação entre temperatura da pata do membro posterior experimental e a recuperação funcional após a compressão do nervo ciático.

4 MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 Artigo – Viviane Z. Sacharuk, Gisele Lovatel, Jocemar Ilha, Simone Marcuzzo, Léder L. Xavier, Milton Antônio Zaro, Matilde Achaval.

Thermographic evaluation of hind paw skin and functional recovery of locomotion after sciatic nerve crush in rats

Submetido à Revista “Muscle and Nerve”

Thermographic evaluation of hindpaw skin and functional recovery of locomotion after sciatic nerve crush in rats

Authors: Viviane Z. Sacharuk^{a,b}, Gisele Lovatel^{a,b}, Jocemar Ilha^{a,b}, Simone Marcuzzo^{a,b}, Léder L. Xavier^{a,c}, Milton Antônio Zaro^{a,d}, Matilde Achaval^{a,b}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brasil;

^dInstituto Brasileiro de Tecnologia em Calçado (IBTEC), Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

Corresponding author: Matilde Achaval, MD, PhD, Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55-51-33083624

Fax: +55-51-33083092/33083148

E-mail: achaval@ufrgs.br

Abstract

Introduction: Peripheral nerves are often damaged by direct mechanical injury, diseases and/or tumors. Peripheral nerve injury results in partial or total loss of motor, sensory and autonomic functions in the involved segments of the body¹. *Methods:* Wistar rats were divided into three groups: control (n=7), sham (n=25) and crush (n=25). All groups were submitted to thermographic, functional and histological assessment. *Results:* ΔT in the crush group was different from the control on the 1st, 3rd and 7rd postoperative days and from sham group on the 1st, 3rd and 28th postoperative days ($p<0.05$). In the crush group, functional recovery returned to normal values between the 3rd and 4th weeks post injury while morphological analysis of the nerve showed incomplete regeneration at the 4th week after injury. *Discussion:* This study is the first demonstration that hind paw skin temperature is increased by sciatic nerve crush and this change is probably not closely correlated to functional recovery.

Keywords: Thermography, Skin temperature, Nerve crush, Functional recovery

Introduction

Peripheral nerves are often damaged by direct mechanical injury, diseases, tumors or iatrogenic lesions.¹ The most common etiologies of acute traumatic peripheral nerve injury include penetrating injury, crush, stretch and ischemia². The incidence of traumatic injuries in the USA is estimated to be > 500,000 new patients annually¹. Nerve injury has a profound impact on the life of the patient and the cost to society is felt not only in direct health sector expenses, but also the loss of production³. Many human and animal studies have shown that peripheral nerve injury may be accompanied by variation in the skin temperature on the region innervated by the injured nerve^{4,5,6,7,8,9,11,12}. Skin temperature is determined by the diameter of skin blood vessels, which is controlled neurogenically by two opposing mechanisms, one mediated by the sympathetic system which exerts a vasoconstrictor effect, and the other influenced by antidromic stimulation which exerts a vasodilator action. Thus, under pathological circumstances, variations in skin temperature may occur due to changes in the activity of the sympathetic nervous system or may come about due to neurogenic inflammation mediated by antidromic stimulation^{11,13}.

While animal models using sciatic nerve chronic constriction have shown variations in skin temperature after nerve injury^{9,11,14}, there are no reports in the literature showing the effect of nerve crush injury on skin temperature. Variations in skin temperature are easily documented using thermography, a highly sensitive non-invasive technique capable of detecting alterations in skin surface temperature^{4,5,6,9,11,12,15,16,17,18,19,20,21,22}. Measurement of skin temperature using thermography could be of use in following the temporal evolution of nerve injury, because it allows clinical quantification of the peripheral nerve injury^{5,6}, facilitating evaluation, diagnosis and treatment follow-up.

This study consists of an investigation into the effects of sciatic nerve injury on hind paw skin temperature. Temporal analyzes of the hind paw skin temperature were made by

means of infrared thermography on different days after lesion and the findings were correlated with functional recovery indexes (SFI and TSI). To verify whether the recovery was only functional or also morphological, histological analyzes were also performed.

Material and Methods

Subjects

The experiment was performed on 57, 3-month old male Wistar rats, weighing 265 – 400 g (initial age and weight), from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). The rats were housed in standard plexiglass boxes, under a 12:12h h light/dark cycle, at a controlled temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), with food and water available *ad libitum*. All the animals were cared for in accordance with Brazilian law and in compliance with the National Institute of Health's Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (publication no. 85-23, revised 1985). This study was approved by the Ethics Committee of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, RS – Brazil.

Experimental Protocol

The animals were randomly divided into three groups: (1) control rats, without surgical procedure (CONTROL, n=7); (2) rats submitted to surgical procedure without sciatic nerve crush (SHAM, n=25) and (3) rats submitted to surgical procedure with sciatic nerve crush (CRUSH, n = 25). For the surgical procedures, the animals were anesthetized using ketamine and xylazine (90 and 15 mg/kg, i.p.; respectively) and the right sciatic nerve was exposed through a skin incision extending from the greater trochanter to the mid-thigh, followed by splitting the overlying gluteal muscle. The nerve crush injury was performed with 1 mm haemostatic forceps for 30 seconds, as previously described by Bridge and coworkers (1994). The muscle and skin were then closed with 4-0 nylon sutures, and the animals returned to their cages.

Assessment of Skin Temperature

The hind paw plantar surface skin temperature measurements were obtained using an infrared videocamera (ELECTROPHYSICS - PV320T, USA) placed at approximately 90° from the surface and 25 cm from the plantar region of the hindlimb and 75 cm above the floor. This camera has a thermal sensitivity of approximately 0.08 °C, (error 2 °C) and the images were digitally recorded at 30-second intervals. The thermographic procedures were conducted in a room maintained at a constant-temperature of 23°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity between 30 and 50% (Thermo/hydro/clock, MT-230, Minipa, Brazil). Surface temperature was measured from 09:00 to 12:00 a.m., after at least 1h acclimation of the animal to the ambient temperature. The animals were lightly anesthetized with sodium pentobarbital (30 - 40 mg/kg, i.p Cristália, Brazil) in order to suppress the righting reflex while preserving the withdrawal reflex and returned to Plexiglass boxes. The anesthetized rats were gently placed in a prone position using a body-shaped depression and the dorsal surface of the hind paw was fixed with adhesive tape. The hind paws were positioned and the infrared detector picked up the heat emitted from the plantar region (Fig. 1).

Temperature maps were obtained before the surgical procedure and after 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days post injury. The body core temperature was measured using a digital thermometer inserted 2 cm into the rectum, prior to and immediately after infrared thermographic measurement. Then the animals were replaced in the Plexiglas boxes. Infrared images were evaluated using analytical software (*Velocity*, USA). The area of interest was the region of the plantar surface of the hindlimb corresponding to the thermatomes regulated by the L₄-L₅ levels¹⁰. The skin temperature of the plantar region was calculated using the mean of the temperature obtained at 10, 20 and 30 second intervals. The skin temperature difference between sides was calculated as $\Delta T = \text{skin temperature of plantar region of experimental side (right)} - \text{skin temperature of the plantar region of the contralateral side (left)}$. The ΔT is shown

in °C. If the experimental side was hotter than the contralateral side, the temperature difference was considered to be positive. If the experimental side was colder, temperature difference was negative¹¹.

Assessment of Functional Recovery

All animals were submitted to a series of motor activity assessments at 7, 14, 21 and 28 days after lesion. Recovery of locomotor activity, monitored by analysis of the sciatic functional index (SFI)³⁹ and toe spread index (TSI)⁴⁰ was considered proof of adequate reinnervation of the right hindlimb.

Both indexes were based on measurements of the footprints of walking rats, which provides a reliable and easily quantifiable method of evaluating the functional condition of the sciatic nerve. For this test, the rats were trained to walk over a white sheet of paper covering the bottom of a 100-cm-long, 8.5-cm-wide track ending in a dark box. Afterwards, the animals had the ventral portion of the hind feet painted with dark dye and, then, they were placed on the track to walk.

The rats' footprints were used to determine the following measurements: (1) distance from the heel to the third toe, the print length (PL); (2) distance from the first to the fifth toe, the toe spread (TS); and (3) distance from the second to the fourth toe, the intermediary toe spread (ITS). For the TSI, only parameter (2) TS was measured. All measurements were obtained from the experimental (E) and normal (N) sides⁵. Several prints of each foot were obtained on each track, but only three of them were used to determine the mean measurements in the E and N sides.

The SFI and TSI were calculated respectively according to the equations below:

$$1) \text{ } SFI = -38.3(EPL - NPL) / NPL + 109.5(ETS - NTS) / NTS + 13.3(EIT - NIT) / NIT - 8.8^{42}$$

$$2) TSI = (ETS - NTS)/NTS^{41}$$

In the SFI, an index of zero (± 11) represents normal function and an index of about – 100 indicates total impairment⁴⁰. In the TSI, normal function is represented by an index of zero.

Histological Assessment

After 28 days post lesion the animals were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil) and transcardially perfused using a peristaltic pump (Milan, Brazil) with 300 mL of saline solution, followed by 400 mL of 0.5% glutaraldehyde (Merck, Germany) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) at room temperature. Afterwards, for nerve regeneration analysis, short segments (~ 3 mm) of the right sciatic nerve were rapidly excised from 5 mm of the distal portion of the nerve. The specimens were maintained in the same fixative solution for 1h at room temperature and at 4 °C until processed. After, they were post-fixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., USA) in PB, dehydrated in a graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Science, USA), embedded in resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60° C (Ilha et al., 2006). Transverse-semithin sections (1 μ m) were obtained using an ultramicrotome (MT 6000-XL, RMC, Tucson, USA) and stained with 1% toluidine blue (Merck, Germany) in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil). Afterwards, images of the nerve were captured and digitalized (100% in oil immersion) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Tokyo, Japan) coupled to a digital camera for morphological analysis.

Statistical analysis

Differences in data from ΔT were examined using the Kruskal-Wallis Test and the temporal evolution of ΔT in each group was analyzed using Friedman Test. The SFI and TSI were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by the Bonferroni test. These data were run on SPSS® 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, Illinois) with significance set at $P \leq 0.05$. All data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Skin Temperature

Thermographic data are presented as mean \pm SEM in Table 1. Thermographic measurements showed that before the surgical procedure no alterations were found in the ΔT between hind paws between the groups. In this evaluation the average ΔT was close to zero (calculated as the skin temperature on the right side minus that on the left side). It is noteworthy that no differences were found between the control and sham throughout the postoperative period. However, the ΔT in the crush group was different from that of the control and sham groups on the 1st and 3rd postoperative days ($P < 0.05$; Table 1); when the ΔT of the crush group was higher, showing that the experimental side was hotter than the normal side (Figure 1). Moreover, the ΔT in the crush group was also higher than the control and sham groups on the 7th and 28th postoperative days, respectively ($P \leq 0.05$; Table 1). When analyzing the temporal evolution in the ΔT of the crush group, we found a significant difference between hind paws throughout the whole experiment, after the crush procedure ($P < 0.05$ the Friedman test). This difference was not observed in the control or sham group ($P > 0.05$ the Friedman test).

Functional Recovery

The SFI and TSI were measured on postoperative-days 7, 14, 21 and 28 and the data are presented as mean \pm SEM in figure 2.

In the control and sham groups, the SFI and TSI were considered normal throughout the experiment, with SFI around -10 and the TSI around zero. No differences were found between the non-operated control and sham-operated groups following the survival period after surgery.

In the crush group, the SFI and TSI values on postoperative-days 7, 14 and 21 were significantly lower than in the control and sham groups ($P < 0.05$; figure 2). This result indicated a loss of motor function in the right hindlimb in all the animals that received sciatic crush which confirms that the sciatic nerve crush was fully effective.

On postoperative-day 28, no statistical differences were found between the groups in either the SFI or TSI, indicating almost complete restoration of hindlimb motor function.

Histological Studies

Sections from the distal portion of the sciatic nerve were qualitatively analyzed and the histological appearance was essentially normal for the sham and control groups with a similar distribution of small and large diameter myelinated and unmyelinated nerve fibers, Schwann cells, each surrounded by a well-defined perineurium, and a regular proportion between myelin sheath thickness and fiber diameter (Figure 3). Moreover, in the crush group, the histological appearance showed an apparent unimodal fiber spectrum with the predominance of small-diameter thin myelin sheath fibers, a reduction in size and alteration in the shape of nerve fibers, an increase in endoneurium between the nerve fibers and the presence of degeneration debris (Figure 3).

Discussion

The present study investigated the effects of sciatic nerve crush on hind paw skin surface temperature and the findings were compared with functional recovery (SFI and TSI). To verify whether the recovery was only functional or also morphological, histological analyzes were also performed. We used thermography to examine skin temperature in three groups of animals: 1) control group 2) sham group, without sciatic nerve crush and 3) crush group, with sciatic nerve crush. Thermography demonstrated that sciatic nerve crush is able to change hind paw skin temperature. Several experimental studies of peripheral nerve injuries have identified variations in skin temperature after nerve injury, but this study is the first detailed description in the literature that shows that sciatic nerve crush provokes variation in the skin temperature of the plantar region of hind paw^{4,5,9,11,12,23}.

In our results, we observed a slight increase in the ΔT in the sham group, characterized by increases in the temperature of the manipulated paw. However, no statistical difference was found between the sham and control groups. In fact, the surgical procedure and some related complications, such as a mild inflammatory process in the manipulated paw, could be associated with this temperature increase in the sham group. However, observing this basal increase in the ΔT of the sham group, we are unable to deny the effects of the crush, because the increases in the ΔT induced by crush are statistically higher when compared with the sham group, showing a clear effect of the crush in the paw temperature changes.

Our study shows that after sciatic nerve crush, the average skin temperature difference (ΔT) of the plantar surface was positive, with the experimental side being hotter than the contralateral side in the first week post nerve injury. Some studies have reported two different states after nerve injury: a hot state that represents the positive difference between skin temperatures of the experimental paw minus the contralateral side; and a cold state that represents the negative difference between skin temperatures of the experimental paw minus

the contralateral side. The hot state reflects vasodilatation while the cold reflects vasoconstriction^{4, 5, 9,11, 23,12}.

Similarly to our results, previous studies^{9,11}, using chronic constriction of the sciatic nerve and thermography, reported that the skin temperature in the experimental side was hotter during the first week. However, in contrast to our results, in the chronic constriction model the skin temperature of the experimental side became progressively colder than the contralateral side after the first week post nerve injury. This difference between the findings presented in our study and previous studies^{9,11} may be due to the different experimental models used. The chronic constriction model is a more aggressive approach, with some similarities and important differences when compared with the crush model. In contrast to the chronic constriction model, the crush model is characterized by increased nervous fiber regeneration²⁴, while both models present decreases in the release of catecholamines, mainly adrenaline and noradrenaline, from postganglionic sympathetic vasoconstrictor fibers²⁵,
^{26,11,27,28} in the first days after lesion^{25,26,11,29,30} which can explain the warmth in the experimental side during the first week with both the crush and chronic constriction of the sciatic nerve. However, in the chronic constriction model this decrease in catecholaminergic release is compensated by increases in sensitivity to these neurotransmitters^{12, 31}, mainly in blood vessels, probably induced by an over expression of the catecholamine receptor in these tissues^{32,33}. This increase in catecholamine sensitivity is probably related to increased vasoconstriction and consequent decreases in the skin temperature observed after the first week in the chronic constriction model. To our knowledge, to date, no increase in catecholamine sensitivity has been described in the crush model. This normal sensitivity to catecholamines, probably associated with decreases in the level of adrenaline and noradrenaline induced by crush, could be responsible for vasodilatation and maintenance of the increased skin temperature on the experimental side observed in our study. Another

mechanism that may explain the warming of the skin on the experimental side observed in this experiment could be the antidromic activation of the type-C cutaneous nociceptor nerve terminals. This activation causes a release of vasoactive neuropeptides, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP), that reach arterioles by diffusion and trigger a chemical cascade that acts directly on vascular smooth muscle, culminating in the dilatation of arterioles^{9,11,13,15,17,34,35,36,37} and cutaneous vasodilatation, inducing an increase in local temperature^{38,39}.

Functional recovery was evaluated by walking track analysis using SFI⁴⁰ and TSI⁴⁰. The SFI and TSI methods are commonly used to evaluate peripheral nerve regeneration^{42,43,44,45,46,47} and represent a combination of sensory input, motor response and cortical integration, indicating that reduced cutaneous information of the plantar aspect of the hind paw leads to a significant functional deficit^{42,43,44,46}. SFI and TSI in the present study indicated significant hind paw impairment after sciatic crush and the changes were significant at postoperative day 21. At postoperative day 28, both SFI and TSI showed no statistical differences from the baseline value, indicating almost complete restoration of paw function. These results are in accordance with a recent study by our group⁴⁷ and with previous studies^{41,48,49,50,51,52} that reported an almost complete restoration of hind limb function by the 3rd or 4th week after injury.

The recovery of the peripheral nerve was evaluated by qualitative histological study of the distal portion of the sciatic nerve. Histological analysis is commonly used to evaluate recovery from nerve injuries^{40,47,48,53}. In the present study, analysis of histological sections from the distal portion of the sciatic nerve indicated that sciatic nerve crush produced changes with apparent predominance of small-diameter thin myelin sheath fibers and an increase in endoneurial space. These results are consistent with a recent study by our group⁴⁷ and with previous studies^{48,53,54} that show similar changes in the nerve morphology after sciatic nerve

crush. In their histological studies, Bridge and coworkers (1994) reported that an increase in myelination and a decrease in endoneurial space were only identified at 8 weeks after nerve injury. As the period of the present experiment was 4 weeks, this may explain why signs of nerve degeneration between the regenerated fibers were still found.

Our results from the histological study and regarding functional recovery show that almost complete functional recovery can occur without complete nerve regeneration. This discrepancy between the results can be explained by the fact that histological analysis only provided a picture of the trophic conditions of the nerve but cannot measure neither the proportion of regenerated fibers that reach an appropriate peripheral target nor the conduction capacity of the nerve^{40,41}.

In summary, our data provide evidence that sciatic nerve crush provokes an increase in the plantar surface hind paw skin temperature and important functional deficits in the injured hind limb. However, this increase in the skin temperature of the experimental side after nerve injury tends to return to normal values after the first week post injury. On the other hand, the functional recovery only returns to normal values between the 3rd and 4th weeks post injury. Furthermore, even at the end of the experiment (4 weeks after the crush) the skin temperature and motor function of the experimental hind limb were similar to normal values, the morphological study of the distal portion of the sciatic nerve showed incomplete regeneration at that time.

The results of this research have clinical relevance because further studies can be carried out in order to apply thermography in humans for the diagnosis and evolution of peripheral nerve injury. This knowledge can help clinicians to develop more efficient therapeutic strategies for this pathological condition.

Acknowledgments

This research was supported by UFRGS, IBTEC and the Brazilian funding agencies CNPq, CAPES and FINEP/Rede IBN 01060842-00; M. Achaval is a CNPq investigator.

References

1. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Dis Today: Disease Models* 2004; 1:177-185.
2. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology* 2008; 119:1951-1965.
3. Rosberg HE, Carlsson KS, Dahlin LB. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function and general health. *Scand J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg* 2005; 39:360-369.
4. Pulst M, Haller P. Thermographic assessment of impaired sympathetic function in peripheral nerve injuries. *J Neurol* 1981; 226:35-42.
5. Breelsford KV, Uematsu S. Thermographic presentation of cutaneou sensory and vasomotor activity in the injured peripheral nerve. *J Neurosurg* 1985; 62:711-715.
6. Uematsu S. Thermographic imaging of cutaneous sensory segment in patients with peripheral nerve injury. *J. Neurosurg* 1985; 62:716-720.
7. Uematsu S, Edwin DH, Jankel WR, Kozikowski J, Trattner M. Quantification of thermal asymmetry- Part 1: Normal values and reproducibility. *J Neurosurg* 1988; 69:552-555.
8. Uematsu, S, Jankel WR, Edwin DH, Kim W, Kozikowski J, Rosenbaum A, Lomg DM. Quantification of thermal asymmetry- Part 2: Application in low-back pain and sciatica. *J Neurosurg* 1988; 69:556-661.
9. Bennet J.G, Ochoa JL. Thermographic observations in rat with experimental neuropathic pain. *Pain* 1991; 45:61-67.
10. Takahashi, Y., Hirayama, J., Nakajima, Y.. Segmental regulation pattern of body surface temperature in the rat hindlimb

11. Wakisaka S, Kajander K, Bennet G. Abnormal skin temperature and abnormal sympathetic vasomotor innervation in an experimental painful peripheral neuropathy. *Pain* 1991; 46:299-313.
12. Ziproudina N, Ming Z, Hänninen OOP. Plantar infrared thermography measurements and low back pain intensity. *J Manipulative Physiol Ther* 2006; March/April: 219- 223.
13. Ochoa JL, Yarnitsky D, Marchettini P, Dotson R, Cline, M. Interactions between sympathetic vasoconstrictor outflow and C nociceptor-induced antidromic vasodilatation. *Pain* 1993; 54:191-196.
14. Hord AH, Denson, DD, Huerkamp MJ, Seiler JG. Changes in rat paw perfusion after experimental mononeuropathy: assessment by Laser Doppler Fluxmetry. *Anesth Analg* 1999; 88:103-108.
15. Cline M, Ochoa J, Torebjörk E. Chronic hyperalgesia and skin warming caused by sensitized C nociceptors. *Brain* 1989; 112:621-647.
16. Takahashi Y, Murata A, Nakajima Y. Dilatation of subcutaneous perforating blood vessels associated with capsaicin-induced cutaneous axon reflex: demonstration with subtraction thermography. *J Auton Nerv. Sys.* 1999; 75:87-92.
17. Koyama N, Hirata K, Hori K, Dan K, Yokota T. Computer-assisted infrared thermographic study of axon reflex induced by intradermal melittin. *Pain* 2000; 84:133-139.
18. Herry C, Frize M. Quantitative assessment of pain-related thermal dysfunction through clinical digital infrared thermal imaging. *BioMedical Engineering OnLine* 2004; (June):1-14.
19. Viana DML, Carrive P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci* 2005; 21:2505-2512.
20. Sümbera R, Zelová J, Kunc P, Kníková I, Burda H. Patterns of surface temperatures in two mole-rats (Bathyergidae) with different social systems as revealed by IR-thermography. *Physiol Behav* 2007;(April): 1-6.

21. Ng EYK. A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor. *International Journal of Thermal Sciences* 2009; 48:849-859.
22. Zhang Y, Ge H, Yue S, Kimura Y, Nielsen LA. Attenuated skin blood flow response to nociceptive stimulation of latent myofascial trigger points. *Arch Phys Med Rehabil* 2009; 90:325-332.
23. Häbler HJ, Stegmann JU, Timmermann L. Functional evidence for the differential control of superficial and deep blood vessels by sympathetic vasoconstrictor and primary afferent vasodilator fibers in rat hairless skin. *Exp Brain Res* 1998; 118:230-234.
24. Lancelotta MP, Sheth RN, Meyer RA, Belzberg AJ, Griffin JW, Campbell JN. Severity and duration of hyperalgesia in rat varies with type of nerve lesion. *Neurosurgery* 2003; 53:1200-1209.
25. Eranko O, Härkönen M. Effect of axon division on the distribution of noradrenaline and acetylcholinesterase in sympathetic neurons of the rat. *Acta Physiol Scand* 1965; 63:411-412.
26. Boyle FC, Gillespie JS. Accumulation and loss of noradrenaline central to a constriction on adrenergic nerves. *Eur J Pharmacol* 1970; 12:77-84.
27. Wasner G, Heckmann K, Maier C, Baron R. Vascular abnormalities in acute reflex sympathetic dystrophy (CRPS I). *Arch Neurol* 1999; 56:613-620.
28. Wasner G, Schattschneider, Heckmann K, Maier C, Baron R. Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): mechanism and diagnostic value. *Brain* 2001; 124:587-599.
29. Koitstinao J, Wadhwan KC, Balbo A, Rapoport SI. Regeneration of perivascular adrenergic innervations in rat tibial nerve after nerve crush. *Acta Neuropathol* 1991; 81:486-490.

30. Desmeules JA, Kayser V, Weil-Fuggaza J, Bertrand A, Guilbaud G. Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviours in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 1995; 67:941-951.
31. Kurves, H., Daemen, M., Slaaf, D., Stassen, F., Van Den Wildenberg, F., Kitslaar, P., De Mey, J., Partial peripheral neuropathy and denervation induced adrenoceptor supersensitivity. *Acta Orthop Bel* 1998; 64:64-70.
32. Sato J, Perl ER. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science* 1991; 251:1608-1610.
33. Tracey DJ, Cunningham JE, Romm MA. Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy:mediation by α 2-adrenoreceptors on post-ganglionic sympathetic terminals. *Pain* 1995; 60:317-327.
34. Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1979; 310:175-183.
35. Jänig W, Lisney SJW. Small diameter myelinated afferents produce vasodilatation but not plasma extravasation in rat skin. *J Physiol* 1989; 415:477-486.
36. Hornyak MF, Naver HK, Rydenhag B, Wallin BG. Sympathetic activity influences the vascular axon reflex in the skin. *Acta Physiol Scand* 1990; 139:77-84.
37. Birklein F, Schmels M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett* 2008; 437:199-202.
38. Bayliss WM. On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibers of the hind limb and on the nature of these fibers. *J Physiol* 1901; 26:173-209.
39. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 2003; 139:1479-1487.

40. De Medinaceli. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. J Neurosci Methods 1995; 58:29-37.
41. Smit X, De Kool BS, Blok JH, Visser GH, Hovius SER, Neck JWV. Recovery of neurophysiological features with time after rat sciatic nerve repair: a magneto neurographic study. J Peripher Nerv Syst 2006; 11:126-134.
42. Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neurosci Methods 2001; 108:1-9.
43. Varejão ASP, Cabrita AMS, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. Exp Neurol 2003; 183:695-699.
44. Varejão ASP, Filipe VM. Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion in rats. Behav Brain Res 2007; 176:193-201.
45. Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. Arq Neuropsiquiatr 2006; 64(3-B):750-756.
46. Luís AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, Simões MJ, Santos JD, Fregnani F, Raimundo S, Veloso PA, Ferreira AJA, Armada-da-Silva PAS, Varejão ASP, Maurício AC. Long-term functional ADN morphological assessments of standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. J Neurosci Methods 2007; 163:92-104.
47. Ilha J, Araujo R, Talysz T, Hermel ES, Rigon P, Xavier LL, Achaval M. Endurance and resistance exercise training programs elicits specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. Neurorehabil Neural Repair 2008; 22(4):355- 366.
48. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries- A model for axonotmesis. Exp Neurol 1994; 127:284-290.

49. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and withdrawal reflex. *J Neurosci* 2000; 96:89-96.
50. Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Helders PJM, Croiset G, Gispen WH, Wiegant VM. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. *Neurosci Lett* 1997; 238:131-134.
51. Van Meeteren NLU, Brakkee JH, Helders PJM, Gispen WH. The effects of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J. Periph Nerve Syst* 1998; 3: 277-282.
52. Vogelaar CF, Vrinten DH, Hoekman MFM, Brakkee JH, Burbach JPH, Hamers FPT. Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervations is followed by a slowly retracting neuropathic pain-like syndrome. *Brain Res* 2001; 1027: 67-72.
53. Röyattä M, Wei H, Pertovaara A. Spinal nerve ligation-induced neuropathy in the rat: sensory disorders and correlation between histology of the peripheral nerves. *Pain* 1999; 80:161-170.
54. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of sciatic nerve of rats. *J Neurosci Methods* 2008; 173:249-258.

Legends

Table 1. The skin temperature differences (ΔT) between experimental (right) and normal (left) sides following post-injury time. The ΔT is showing in $^{\circ}\text{C}$. Non-parametric statistic analysis using Kruskal-Wallis Test with significance set at $P \leq 0.05$. All means are presented \pm standard error of the mean (SEM). Letter “a” corresponds to $P \leq 0.05$ compared to the Control group and “b” corresponds to $P \leq 0.05$ compared to the Sham group.

Fig 1. Digitized images of the hind paw plantar surface skin temperature measurements were obtained using an infrared video camera in sham (A) and crush (B) groups at 3 post operative days. Note the higher intensity of the infrared in the experimental paw in the crush group when compared with normal paw in the same group or with the sham group. E, experimental side; N, normal side.

Fig 2. Comparison of the functional recovery determined by the Sciatic Functional Index (SFI; A) and Toe Spread index (TSI; B) on postoperative-days 7, 14, 21 and 28. The points of the curves represent the group mean \pm SEM. Letter “a” corresponds to $P \leq .05$ compared to the Control group and “b” corresponds to $P \leq 0.05$ compared to the Sham group.

Fig 3. Digitized images of transverse-semithin sections (1 μm) obtained from regenerating sciatic nerves in control (A), sham (B) and crush (C) groups. Note the similarity and apparent bimodal fiber spectrum, the large and small myelinated fibers, and the scanty space of endoneurium between the myelinated fibers, when the clusters of unmyelinated fibers are present in the control and sham groups. Moreover, note that the crush group shows an apparent unimodal fiber spectrum with the predominance of small-diameter thin myelin

sheath fibers and the increase in endoneurium between the nerve fibers and the presence of degeneration debris in this group. Mf indicates myelinated nerve fiber; Uf, unmyelinated nerve fiber; Sc, Schwann cell; * (asterisk), endoneurium; Dd, degeneration debris; Bv, blood vessel. Semithin sections were stained with toluidine blue. Scale bar = 20 μm .Table 1.

Table 1

Groups	Days Post-crush						
	Pre-crush	1 day	3 days	7 days	14 days	21 days	28 days
Control	.024 ± .045	.192 ± .052	-.091 ± .185	.027 ± .022	.082 ± .088	.002 ± .063	.217 ± .146
Sham	-.126 ± .169	.370 ± .159	.304 ± .130	.504 ± .284	.274 ± .119	.061 ± .125	-.002 ± .075
Crush	.100 ± .201	.849 ± .150 ^{ab}	.669 ± .160 ^{ab}	.869 ± .299 ^a	.219 ± .091	.476 ± .140 ^a	.420 ± .180 ^b

Figura 1

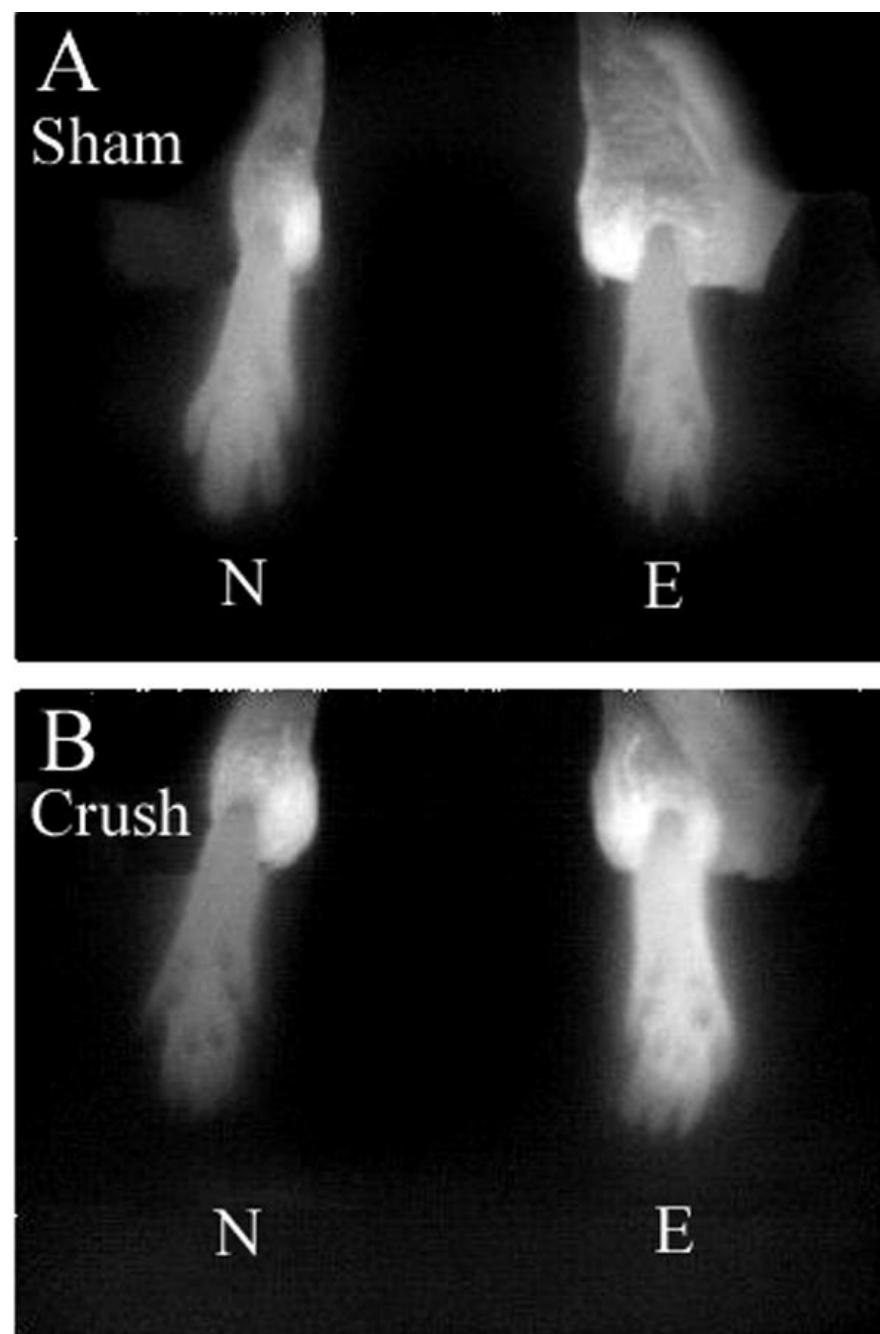


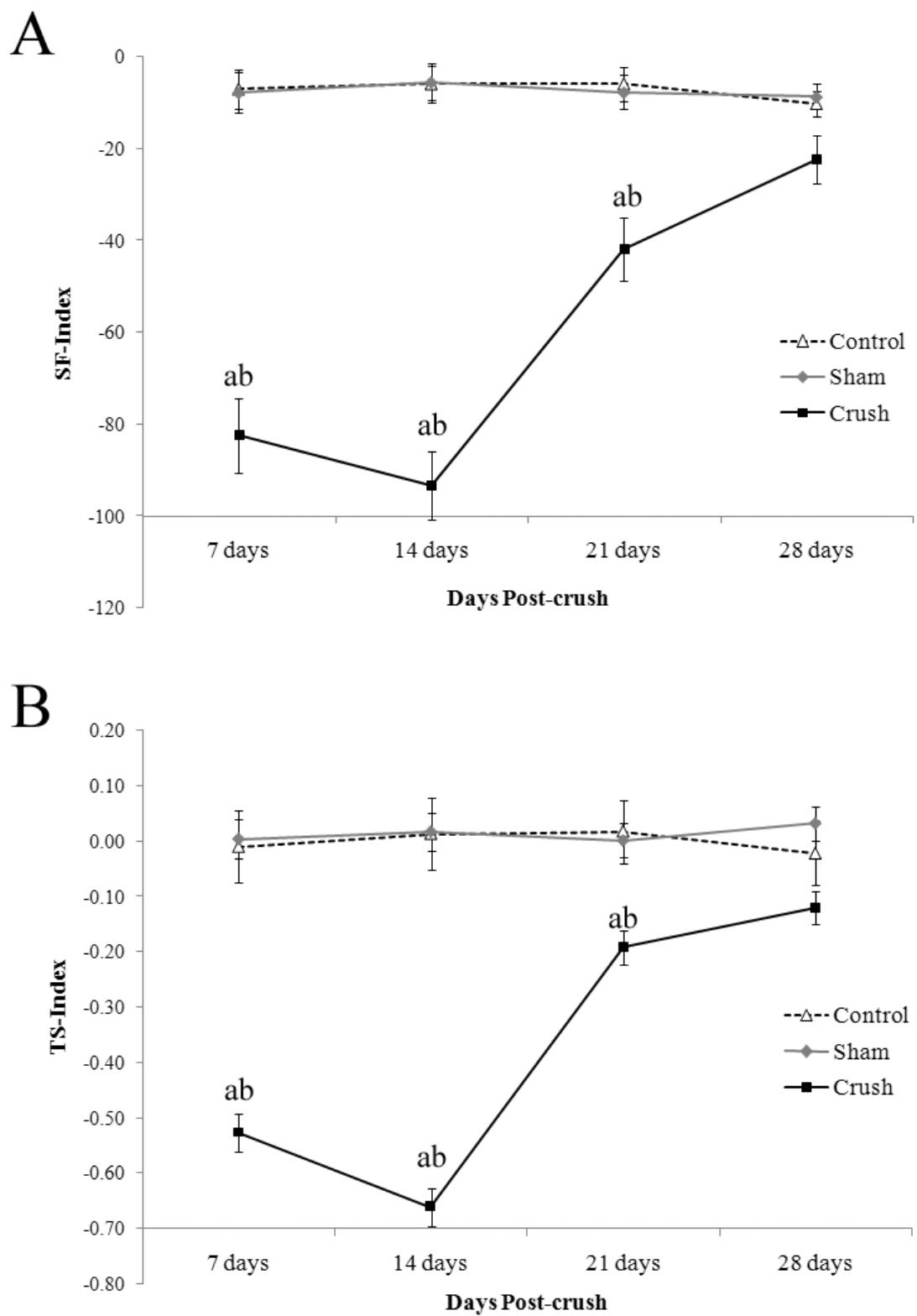
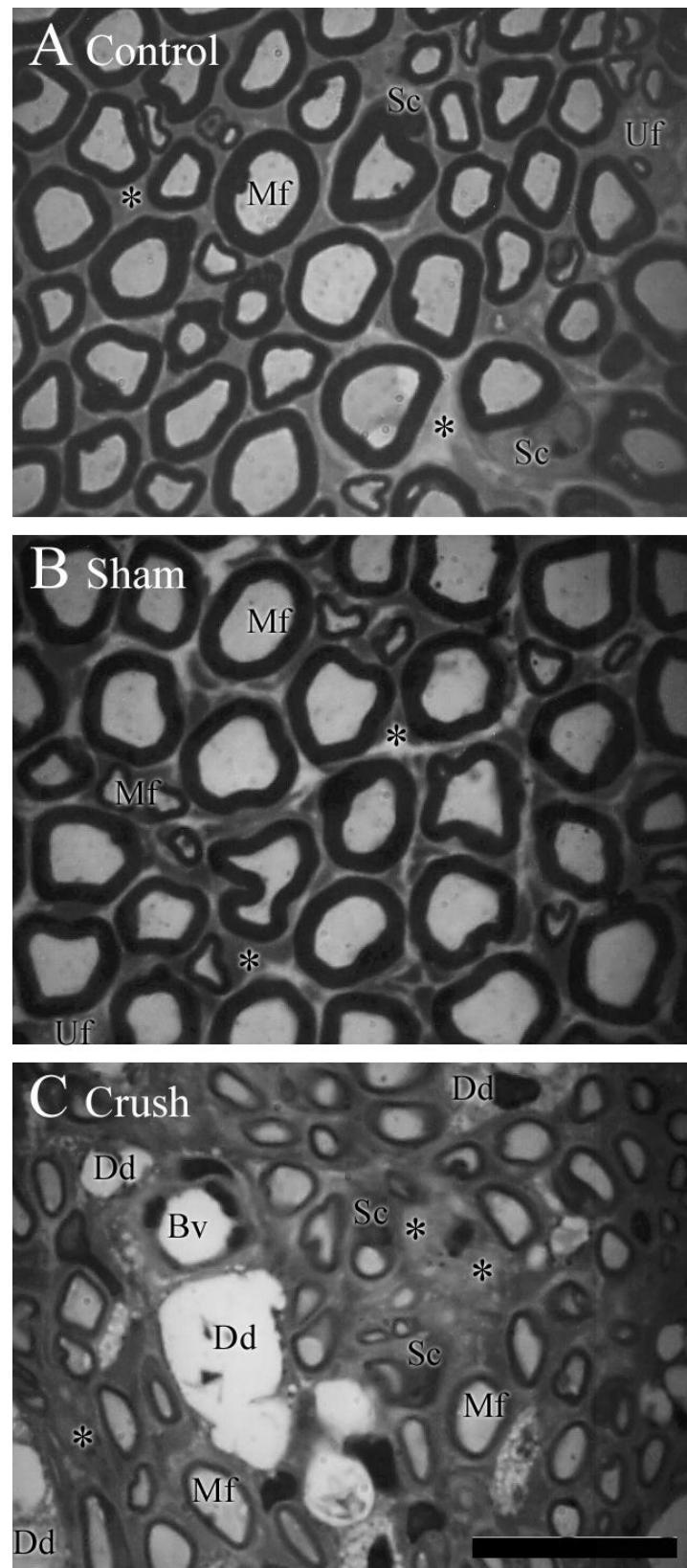
Figura 2

Figura 3

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste estudo sugerem que a compressão unilateral do nervo ciático em ratos machos adultos provoca um aumento na temperatura da pele da superfície plantar do membro posterior lesado e um importante déficit funcional na locomoção. No entanto, o aumento na temperatura da pele do membro posterior lesado tende a retornar aos valores normais uma semana após a lesão. Por outro lado, a recuperação funcional da locomoção retorna aos valores normais somente entre a 3^a e 4^a semana após a lesão. Além disso, mesmo que ao final do experimento (4 semanas após o esmagamento do nervo ciático) a temperatura a pele e a função motora do membro posterior lesado tenham sido semelhantes aos valores normais, a análise histológica da porção distal do nervo ciático mostrou uma regeneração parcial neste período.

Considerando-se a inter-relação entre a temperatura da pele da superfície plantar do membro posterior lesado e a recuperação funcional após a compressão unilateral do nervo ciático os encontrados neste estudo sugerem que o aumento na temperatura da pele da superfície plantar do membro posterior lesado parece não influenciar a recuperação funcional da locomoção após a lesão.

O resultado deste estudo demonstra que a termografia é um método com alta sensibilidade capaz de contribuir para o diagnóstico e avaliação da evolução temporal das alterações na temperatura da pele decorrentes das lesões nervosas periféricas. Dentro deste contexto, os resultados encontrados neste estudo servem como referência para futuras pesquisas que busquem ampliar os conhecimentos dos efeitos da lesão nervosa sobre a temperatura da pele, bem como, elucidar os mecanismos responsáveis pela alteração de temperatura através da quantificação de catecolaminas e citocinas após as lesões nervosas periféricas.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

BALBINOT, L.F. Termografia na identificação de *trigger points* miofasciais, São Paulo: Blucher acadêmico, 2008, 31-50.

BAYLISS W.M. On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibers of the hind limb and on the nature of these fibers. *Journal Physiology*, 26: 173-209, 1901.

BENNET, J.G., OCHOA, J.L. Thermographic observations on rat with experimental neuropatic pain. *Pain*, 45: 61-67, 1991.

BENNETT, G.S., GARRET, N.E., DIEMEL, L.T., BRAIN, S.D., TOMLINSON, D.R. Neurogenic cutaneous vasodilatation and plasma extravasation in diabetic rats: effect of insulin and nerve growth factor. *British Journal of Pharmacology*, 124: 1573-1579, 1998.

BESTER, H., ALLCHORNE, A.J., WOOLF, C. Recovery of C-fiber- induced extravasation following peripheral nerve injury in the rat. *Experimental Neurology*, 154: 628-636, 1998.

BIRKLEIN F, SCHMELS M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neuroscience Letters*, 437:199-202, 2008.

BLENK, K.H.; JÄNIG, W.; MICHAELIS, M., VOGEL, C. Prolonged injury in unmyelinated fiber following transaction of sural nerve in rats. *Neuroscience Letters*, 215:185-188, 1996.

BOSSE, F., KÜRY P., MÜLLER, H.W. Gene expression profiling and molecular in peripheral nerve regeneration. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 19:5-18, 2001.

BOSTOCK, H., CAMPERO, M., OCHOA, J.L. Temperature-dependent double spikes in C-nociceptors of neuropathic pain patients. *Brain*, 128:2154-2163, 2005.

BRELSFORD, K.V., UEMATSU, S. Thermographic presentation of cutaneous sensory and vasomotor activity in the injured peripheral nerve. *Journal of Neurosurgery*, 62: 711-715, 1985.

BRIDGE, P.M., BALL, D.J., MACKINNON, S.E., NAKAO, Y., BRANDT, K., HUNTER, D.A., HERTL, C. Nerve crush injuries- A model for axonotmesis. *Experimental Neurology*, 127:284-290, 1994.

BRIOSCHI, M.L., MORAES E SILVA, F.M.R., FRANÇA, G.V., TEIXEIRA, M.J. *Termografia no diagnóstico da dor. in Dor Princípios e Prática.* NETO, O.A., COSTA, C.M.C., SIQUEIRA, J.T.T., TEIXEIRA, M.J & cols. Porto Alegre: Artmed, pp. 1338-1344, 2009.

CAMPBELL, W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology*, 119:1951-1965, 2008.

CHEN, R., COHEN, L.G., HALLETT, M. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, 111:761-773, 2002.

CHEN, ZU-LIN, YU, WEI-MING, STRICKLAND, S. Peripheral Regeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 30:209-233, 2007.

CLINE, M., OCHOA, J., TOREBJÖRK, E. Chronic hyperalgesia and skin warming caused by sensitized C nociceptors. *Brain*, 112:621-647, 1989.

CHRISTIANSEN, J., GEROW, G. Thermography. Seminars in chiropractic, 1990.1 Williams & Wilkins. Citado em BALBINOT, L.F. **Termografia na identificação de trigger points miofasciais**, São Paulo: Blucher academico, 2008, 31-50.

DAHLIN, L.B. The biology of nerve injury and repair. Journal of the American society for Surgery of the Hand, 4:143-154, 2004.

DAHLIN, L.B., BRANDT, J. Basic science of peripheral nerver repair: Wallerian degeneration/growth cones. Operative Tecniques in Orthopaedics, 14: 138-145, 2004.

DE MEDINACELI. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. Journal of Neuroscience Methods, 58:29-37, 1995.

DESMEULES, J.A., KAYSER, V., WEIL-FUGGAZA, J., BERTRAND, A., GUILBAUD, G. Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviors in a rat model of neuropathic pain. Neuroscience, 67: 941-951, 1995.

DIJKSTRA, J.R., MEEK, M.F., ROBINSON, P. H., GRAMSBERGEN, A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and withdrawal reflex. Journal of Neuroscience, 96: 89- 96, 2000.

DILLEY, A., BOVE, G.M. Resolution of inflammation-induced axonal mechanical sensitivity and conduction slowing in C-fibers nociceptors. The Journal of Pain, 9: 185-192, 2008.

ERANKO O, HÄRKÖNEN M. Effect of axon division on the distribution of noradrenaline and acetylcholinesterase in sympathetic neurons of the rat. Acta Physiologica Scandinavica, 63: 411-412, 1965.

FRANCIS, J.E., ROGGLI, R., LOVE, T.J. Thermography as a means of blood perfusion measurement. *Journal of Biomechanical Engineering*, 101: 246- 249, 1979.

GANONG, W.F. **Fisiología médica**. 22 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, pp 53-56.

GORDON, T., SULAIMAN, O., BOYD, J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *Journal of Peripheral Nervous System*, 8: 236-250, 2003.

GORODETSKAYA, N., CONSTANTIN, C., JÄNIG, W. Ectopic activity in cutaneous regenerating afferent nerve fibers following nerve lesion in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 18: 2487-2497, 2003.

HÄBLER, H. J., WASNER, G., JÄNIG, W. Interaction of sympathetic vasoconstriction and antidromic vasodilatation in the control of skin blood flow. *Experimental Brain Research*, 113: 402-410, 1997.

HÄBLER, H. J., STEGMANN, J. U., TIMMERMANN, L. Functional evidence for the differential control of superficial and deep blood vessels by sympathetic vasoconstrictor and primary afferent vasodilator fibers in rat hairless skin. *Experimental Brain Research*, 118: 230-234, 1998.

HAN, C. H., LEE, D. H. CHUNG. J.M. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain*, 84: 253-261, 2000.

HORD, A. H., DENSON, D. D., HUERKAMP, M. J., SEILER, J.G. Changes in rat paw perfusion after experimental mononeuropathy: assessment by Laser Doppler Fluxometry. Anesthesia and Analgesia, 88:103-108, 1999.

HORNYAK, M. F., NAVER, H. K., RYDENHAG, B., WALLIN, B. G. Sympathetic activity influences the vascular axon reflex in the skin. Acta Physiologica Scandinavica, 139: 77-84, 1990.

IDE, C. Peripheral nerve regeneration. Neuroscience Research, 25:101-121, 1996.

ILHA, J., ARAUJO, R. T., MALYSZ, T., HERMEL, E. S., RIGON, P., XAVIER, L. L., ACHAVAL, M. Endurance and resistance exercise training programs elicits specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. Neurorehabilitation and Neural Repair, 22 (4):355-366, 2008.

JÄNIG, W.; LISNEY S.J.W. Small diameter myelinated afferents produce vasodilatation but not plasma extravasation in rat skin. Journal of Physiology, 415: 477-486, 1989.

JUNQUEIRA, L. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a edição, São Paulo: Guanabara Koogan, pp 359-370, 2008.

KANDEL, E.R., SCHAWARTZ, J.H., JESSELL, T.M. **Principles of Neural Science**. 4^a ed, USA, McGraw-Hill, pp 737 – 755, , 2000.

KARANTH, S., YEH, G.Y., RICHARDSON, P.M. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. Experimental Neurology, 202:161-166, 2006.

KASTBERGER, G., STACHL, R. Infrared imaging technology and biological applications. Behavior Research Methods, Instruments, & Computers, 35: 429-429, 2003.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia.** 2^a edição, Rio de Janeiro: Elsevier, pp 243-247, 2008.

KOITSTINAHO J, WADHWANI KC, BALBO A, RAPOPORT SI. Regeneration of perivascular adrenergic innervations in rat tibial nerve after nerve crush. Acta Neuropathologica, 81: 486-490, 1991.

KOYAMA, N., HIRATA, K., HORI, K., DAN, K., YOKOTA, T. Computer-assisted infrared thermographic study of axon reflex induced by intradermal melittin. Pain, 84:133-139, 2000.

KOLOSOVA, L.I., NOZDRACHEV, A.D., AKOEV, G.N., MOISEEVA, A.B., RIABCHIKOVA, V. Activity of foot skin mechanoreceptors and efferent nerve fibers in the adult rat sciatic nerve are altered after central axotomy of sensory neurons. Neuroscience, 96: 215-219, 2000.

KUNKEL-BADGEN, E., DAI, HAI-NING, BREGMAN, B. S. Methods assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. Experimental Neurology, 119: 153-164, 1993.

KURVES, H., DAEMEN, M., SLAAF, D., STASSEN, F., VAN DEN WILDENBERG, F., KITSLAAR, P., DE MEY, J. Partial peripheral neuropathy and denervation induced adrenoreceptor supersensitivity. Acta Orthopaedica Belgica, 64: 64-70, 1998.

LANCELOTTA, M. P., SHETH, R. N., MEYER, R. A., BELZBERG, A. J., GRIFFIN, J. W., CAMPBELL, J. N. Severity and duration of hyperalgesia in rat varies with type of nerve lesion. *Neurosurgery*, 53: 1200-1209, 2003.

LEMBECK, F & HOLZER, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 310: 175-183, 1979.

LIU, X., ESCHENFELDER, S., BLENL, K.H., JÄNIG, W., HÄBLER, J.H. Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain*, 84: 309-318, 2000.

LUÍS, A.L.; AMADO, S., GEUNA, S., RODRIGUES, J.M., SIMÕES, M.J., SANTOS, J.D., FREGNAN, F., RAIMONDO, S., VELOSO, P.A., FERREIRA, A.J.A., ARMADA-DA-SILVA, P.A.S., VAREJÃO, A.S.P., MAURÍCIO, A.C. Long-term functional ADN morphological assessments of standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *Journal of Neuroscience Methods*, 163: 92-104, 2007.

MARTINS, R.S., SIQUEIRA, M.G., DA SILVA, C.F., PLESE, J. P. P. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 64:750-756, 2006.

MAKWANA, M., RAIVICH, G. Molecular mechanisms is successful peripheral regeneration. *The FEBS Journal*, 272: 2626-2638, 2005.

MAZZER PYCN, BARBIERI CH, MAZZER N, FAZAN VPS. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of sciatic nerve of rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 173: 249-258, 2008.

METZ, G.A.S., MERKLER, D., DEITZ, V., SCHWAB, M.E., FOUAD, K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research*, 883: 165-177, 2000.

MICHAELIS, M., BLENK, K.H., VOGEL, C., JÄNIG, W. Distribution of sensory properties among axotomized cutaneous C-fibers in adult rats. *Neuroscience*, 94: 7-10, 1999.

MICHAELIS, M., LIU, X., JÄNIG, W. Axotomized and intact muscle afferents but not skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *The Journal of Neuroscience*, 20: 2742-2748, 2000.

NAVARRO, X., VERDÚ, E., BUTÍ, M.. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Experimental Neurology*, 129: 217-224, 1994.

NAVARRO, X., VIVÓ, M., CABRÉ-VALERO, A.. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology*, 82: 163-201, 2007.

NG, E.Y.K. A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor. *International Journal of Thermal Sciences*, 48:849-859, 2009.

NISHIO, Y., NISHIHARA, J., ISHIBASHI, T., KATO, H., MINAMI, A. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in peripheral nerve regeneration: Anti-MIF antibody induces delay of nerve regeneration and de apoptosis of Schwann cells. *Molecular Medicine*, 8: 509- 20, 2002.

OCHOA, J. L., YARNITSKY, D., MARCHETTINI, P., DOTSON, R., CLINE, M.. Interactions between sympathetic vasoconstrictor outflow and C nociceptor-induced antidromic vasodilatation. Pain, 54: 191-196, 1993.

PAZO, J.H. *Fisiologia do sistema somatossensorial*, pp 818- 822. in CINGOLANI, H. E., HOUSSAY, A. B. & cols. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7^a edição, Porto Alegre: Artmed, 2004.

PULST, M., HALLER, P.. Thermographic assessment of impaired sympathetic function in peripheral nerve injuries. Journal Neurology, 226: 35-42, 1981.

PURVES, D., AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D., KATZ, L.C., LAMANTIA, A., MCNAMARA, J.O., WILLIAMS, S.M. **Neurociências – circuitos do neurônio motor inferior e controle motor**. 2^a edição, 347-367, 2005.

RAHMAN, W., D'MELLO, R., DICKENSON, A.H. Peripheral nerve injury-induced changes in spinal α_2 -adrenoreceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses. The Journal of Pain, 9: 350-359, 2008.

RAMER, M.S., THOMPSON, S. W. N., MCMAHON, T. S. Causes and consequences of sympathetic basket formation on dorsal root ganglion. Pain, 6:111-120, 1999.

RAMER, M.S., FRENCH, G.D., BISBY, M.A. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sprouting into DRG. Pain, 72: 71-78, 1997.

RASO, V.V.M.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N., FASAN, V.S.; Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? Journal of Neuroscience Methods, 142:185-192, 2005.

RENDEL, M.S.; FINNEGAN, M.F.; HEALY, J.C.; LIND, ANNE; MILLIKEN B.K.; FINNEY, D.E.; BONNER, R. F.. The relationship of Laser-Doppler skin blood flow measurements to the cutaneous microvascular anatomy. *Microvascular Research*, 55: 3-13, 1998.

RODRÍGUEZ, F.J., VALERO-CABRÉ, A., NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1: 177-185, 2004.

ROSBERG HE, CARLSSON KS, DAHLIN LB. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function and general health. *Scandinavian Journal of Plastic Reconstructive Surgery of Hand*, 39:360-369, 2005.

RÖYATTÄ M, WEI H, PERTOVAARA A. Spinal nerve ligation-induced neuropathy in the rat: sensory disorders and correlation between histology of the peripheral nerves. *Pain*; 80: 161-170,1999.

SATO, A., SCHMIDT, R. Somatosympathetic reflexes: afferent fibers central pathway, discharge characteristics. *Physiological Reviews*, 53: 916-947, 1973.

SATO, J. & PERL E.R. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science*; 251:1608-1610, 1991.

SCHATTSCHNEIDER, J., SCARANO, M., BINDER, A., WASNER, G., BARON, R. Modulation of sensitized by adrenergic stimulation in human neuropathic pain. *European Journal of Pain*, 12: 517-524, 2008.

SEDDON, H. Three types of nerve injury. *Brain*, 66: 237-288, 1943.

- SMIT, X., DE KOOL, B.S., BLOK, J.H., VISSER, G.H., HOVUIS, S.E.R., NECK, J.W.V. Recovery of neurophysiological features with time after rat sciatic nerve repair: a magneto neurographic study. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 11:126-134, 2006.
- SNIDER, W. D., ZHOU, FENG-QUAN, ZHONG, J., MARKUS, A. Signaling the pathway to regeneration. *Neuron*, 35:13-16, 2002.
- SQUIRE, L. R.; BERG, D., BLOOM, F., DU LAC, S., GHOSH, A., SPITZER, N. **Fundamental Neuroscience: The Spinal and Peripheral Motor System**. 3^aed., Canadá, Elsevier, pp 677-603, 2008.
- STEINHOFF, M., STÄNDER, S., SEELIGER, S., ANSEL, J. C., SCHMELZ, M., LUGER, T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Archives Dermatology*, 139:1479-1487, 2003.
- SÜMBERA, R., ZELOVÁ, J., KUNC, P., KNÍKOVÁ, I., BURDA, H. Patterns of surface temperatures in two mole-rats (Bathyergidae) with different social systems as revealed by IR-thermography. *Physiology & Behavior*, 92:526-532, 2007.
- SUN, PI-CHANG, LIN, HONG-DA, JAO, SHYH-HUA, KU, YAN-CHIOU, CHAN, RAI-CHI, CHENG, CHENG-KUNG. Relationship of skin temperature to sympathetic dysfunction in diabetic at-risk feet. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 73:41- 46, 2006.
- STANDRING, SUSAN. **Gray's Anatomy: The anatomical Basic of Clinical Practice**. 4^a ed. London, Churchill Livingstone, pp. 52-54, 2008.

TAKAHASHI, Y., MURATA, A., NAKAJIMA, Y. Dilatation of subcutaneous perforating blood vessels associated with capsaicin-induced cutaneous axon reflex: demonstration with subtraction thermography. *Journal of the Autonomic Nervous system*, 75: 87-92, 1999.

TAKAHASHI, Y., HIRAYAMA, J., NAKAJIMA, Y. Segmental regulation patterns of body surface temperature in the rat hindlimb. *Brain Research*, 947:100-109, 2002.

TAL, M., WALL, P. D., DEVOR, M. Myelinated afferent fiber types that become spontaneously active and mechanosensitive following nerve transaction in the rat. *Brain Research*, 824: 218- 223, 1999.

TOROGOE, K., HASHIMOTO, K., LUNDBORG, G. A role of migratory in a conditioning effect of peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*, 160: 99-108, 1999.

TRACEY DJ, CUNNINGHAM JE, ROMM MA. Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: mediation by α_2 -adrenoreceptors on post-ganglionic sympathetic terminals. *Pain*, 60:317-327, 1995.

UEMTASU, S. Thermographic imaging of cutaneous sensory segment in patients with peripheral nerve injury. *Journal of Neurosurgery* 62: 716-720, 1985.

UEMATSU, S., EDWIN, D.H.; JANKEL, W.R.; KOZIKOWSKI, J.; TRATTNER, M.. Quantification of thermal asymmetry- Part 1: Normal values and reproducility. *Journal of Neurosurgery*, 69:552-555, 1988.

UEMATSU, S., JANKEL, W.R.; EDWIN, D.H.; KIM, W., KOZIKOWSKI, J.; ROSENBAUM, A., LONG, D. M. Quantification of thermal asymmetry. Part 2: application in low-back pain and sciatica. *Journal of Neurosurgery*, 69:556- 561, 1988.

VAN MEETEREN, N. L. U., BRAKKEE, J. H., HELDERS, P. J. M., CROISET, G., GISPEN, W. H., WIEGANT, V. M.. Recovery of function after sciatic nerve crush lesion in rats selected for diverging locomotor activity in the open field. *Neuroscience Letters*, 238: 131-134, 1997.

VAN MEETEREN, N.L.U., BRAKKEE, J.H., HELDERS, P.J.M., GISPEN, W.H. The effects of exercise training on functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J. Peripheral Nervous System*, 3: 277-282, 1998.

VARGAS, M. E., BARRES, B. A. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annual Review of Neuroscience*, 30:153-159, 2007.

VAREJÃO, A. S. P., MEEK, M. F., FERREIRA, A. J. A., PATRÍCIO, J. A.B., CABRITA, A. M. S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 108:1-9, 2001.

VAREJÃO, A. S. P., CABRITA, A. M. S., GEUNA, S., MELO-PINTO, P., FILIPE, V. M., GRAMSBERGEN, A., MEEK, M. F. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Experimental Neurology*, 183: 695-699, 2003.

VAREJÃO, A. S. P., FILIPE, V. M. Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion in rats. *Behavioral Brain Research*, 176: 93- 101, 2007.

VIANA, D. M. L., CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 21: 2505-2512, 2005.

VOGELAAR, C.F., VRINTEN, D.H., HOEKMAN, M.F.M., BRAKKEE, J.H., BURBACH J.P.H., HAMERS, F. P. T. Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervations is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome. *Brain Research*, 1027: 67-72, 2004.

ZHANG, Y., GE, H., YUE, S., KIMURA, Y., NIELSEN, L.A. Attenuated skin blood flow response to nociceptive stimulation of latent myofascial trigger points. *Archives Physical Medicine Rehabilitation*, 90: 325-332, 2009.

ZIPROUDINA, N., MING, Z., HÄNNINEN, O.O.P. Plantar infrared thermography measurements and low back pain intensity. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutic*, March/april: 219-223, 2006.

WAKISAKA, S., KAJANDER, K., BENNET, G. Abnormal skin temperature and abnormal sympathetic vasomotor innervation in an experimental painful peripheral neuropathy. *Pain*, 46: 299-313, 1991.

WRIGHT, C. I.; KRONER, C. I.; DRAIJER, R. Non-invasive methods and stimuli for evaluating the skin's microcirculation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54:1-25, 2006.