

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**CLEUBER RODRIGO DE SOUZA BUENO**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA UTILIZAÇÃO DO ENXERTO  
VENOSO NORMAL E AO AVESSE NA TÉCNICA DE  
TUBULIZAÇÃO PARA REPARO DE LESÃO NERVOSA  
PERIFÉRICA COM PERDA DE TECIDO**

BAURU  
2016

**CLEUBER RODRIGO DE SOUZA BUENO**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA UTILIZAÇÃO DO ENXERTO  
VENOSO NORMAL E AO AVESSO NA TÉCNICA DE  
TUBULIZAÇÃO PARA REPARO DE LESÃO NERVOSA  
PERIFÉRICA COM PERDA DE TECIDO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade do Sagrado Coração como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
bacharel em Odontologia, sob orientação do  
Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior

BAURU  
2016

B9285a

Bueno, Cleuber Rodrigo de Souza

Análise comparativa da utilização do enxerto venoso normal e ao avesso na técnica de tubulização para reparo de lesão nervosa periférica com perda de tecido / Cleuber Rodrigo de Souza Bueno. -- 2016.

62f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

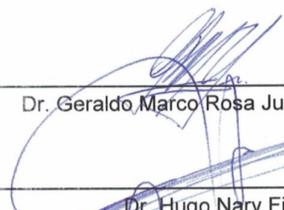
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Tubulização. 2. Reparo de nervo. 3. Músculo esquelético. I. Rosa Junior, Geraldo Marco. II. Título.

## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Cleuber Rodrigo de Souza Buen.

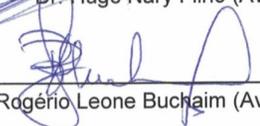
Ao dia nove de dezembro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Cleuber Rodrigo de Souza Buen intitulado: **"Análise comparativa da utilização do enxerto venoso normal e ao avesso na técnica de tubulização para reparo de lesão nervosa periférica com perda de tecido"**. Compuseram a banca examinadora os professores Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, Dr. Hugo Nary Filho e Dr. Rogério Leone Buchaim. Após a exposição oral, o candidato foi arguido pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, Aprouvar, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.



\_\_\_\_\_  
Dr. Geraldo Marco Rosa Junior (Orientador)



\_\_\_\_\_  
Dr. Hugo Nary Filho (Avaliador 1)



\_\_\_\_\_  
Dr. Rogério Leone Buchaim (Avaliador 2)

## DEDICATÓRIA

**Á Deus**, por sempre me dar forças para seguir em frente em todas as dificuldades,

**A minha mãe**, Jeni, mulher exemplar e guerreira, a quem devo todas minhas realizações,

**A meu pai**, José (*in memoriam*), por tudo e, principalmente, aos ensinamentos de vida, caráter e seriedade no trabalho,

**Aos meus irmãos**, Bernardo e Clerison, meus portos seguros, os quais posso contar e confiar de olhos fechados sempre,

**A minha namorada**, Raíssa, minha melhor amiga, obrigado pelo companheirismo em todos os momentos, atenção e compreensão.

# Meu respeito e gratidão

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior**, orientador e amigo, pessoa de coração que não cabe no peito, pelos ensinamentos profissional e pessoal, apoio, incentivo e por todas as oportunidades que me deu durante esses sete anos de convívio e aprendizado. Professor exemplar, o qual tem o dom da docência e poder de mudar a vida de seus alunos.

A minhas mentoras na odontologia, **Jéssica Gonçalves e Rosemary Oliveira Camargo**, obrigado por tudo, por toda ajuda durante todo curso, desde o ponta pé inicial até o final, vocês ficaram sempre marcadas na minha trajetória (e nos instrumentais), sem vocês nada disso seria fácil.

Ao **Prof. Dr. Rogerio Leone Buchaim**, banca examinadora do trabalho e amigo, agradeço aos ensinamentos, conselhos e ajuda ativa durante todo o curso de odontologia.

Ao **Prof. Hugo Nary Filho** pelos ensinamentos, conselhos e aceite para ser banca examinadora deste trabalho.

A todos do laboratório da Faculdade Anhanguera de Bauru, companheiros de trabalho, em especial a **Giovana de Azevedo Paiva**, chefe e amiga, obrigado por sempre fazer de tudo para que eu pudesse conciliar trabalho-faculdade, sem sua ajuda não seria fácil, e **Claudia Sessílio**, uma mãe aqui em Bauru, sem palavras pela amizade, conselhos e companheirismo.

Ao meu amigo **João Henrique Izidoro**, companheiro de curso e de clínica obrigado pelo apoio, amizade e os cafés após as clínicas.

A professora **Pâmela Santos**, obrigado pelo aceite para a banca examinadora, pelos ensinamentos de cirurgia durante toda faculdade, acessibilidade e humildade que demonstra com todos os alunos.

Aos amigos de Bauru, **Mizael Pereira e Idvaldo Junior**, parceiros de estágio, anatomia e pesquisa, obrigado pela amizade.

**Daniel Ventura Dias e Letícia Rossí Daré**, dois grandes amigos que conheci em Bauru e com certeza levarei pra toda vida, dotados de corações enormes, obrigado

por tudo, pelos grandes ensinamentos de laboratório, pelas risadas e pelas broncas (Letícia).

Ao Prof. **Marco Breasaola** pelos ensinamentos em planejamentos cirúrgicos, apresentações e amizade aprendida durante o estágio.

Os meus amigos de Jaú, **Diego Mageste, Carlos Eduardo, Felipe Jandussi, Guilherme Castro** pela amizade de berço e os churrascos na baliza!

A todos os professores da Universidade do Sagrado Coração (USC) por todo conhecimento dispendido, amizade, conselhos e ensinamentos durante todo o curso.

A técnica de laboratório **Maíra** da USC pelo apoio e toda ajuda no processamento e realização da coloração de Tricomico de Masson.

A Universidade de São Paulo (FOB/USP), departamento de Anatomia Humana, pelo auxílio e parceria, utilização dos equipamentos que ajudaram na realização deste trabalho.

A todos familiares, amigos, os quais torcem pelo meu sucesso, agradeço de coração.

E a todas as pessoas que diretamente e indiretamente auxiliaram minha trajetória durante o curso.

A Universidade do Sagrado Coração pelo auxílio e bolsa de iniciação científica FAP/USC.

# Meu eterno agradecimento

## EPÍGRAFE

“Não existe esta coisa de homem feito por si mesmo. Somos formados por milhares de outros. Cada pessoa que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou dito uma palavra de encorajamento para nós, entrou na formação do nosso carácter e nossos pensamentos, tanto quanto do nosso sucesso.”

**George Matthew Adam**

## RESUMO

**Introdução:** As lesões de nervos periféricos com perda de tecido nervoso são usuais e sempre ocasionam comprometimento de partes do organismo. O tratamento considerado padrão ouro é o enxerto de nervo autólogo, embora esta técnica apresente resultado favorável, exhibe em alguns casos fatores limitantes. A técnica de tubulização tem demonstrado ser um método apropriado e alternativo na prática clínica proporcionando direcionamento e ambiente favorável à regeneração. Vários autores defendem o emprego de enxertos venosos na reparação das lacunas de nervos periféricos. Entretanto, sua potencialidade funcional é discutida. Por outro lado, a laminina e o colágeno considerados fatores tróficos para o processo regenerativo estão presentes na região externa das veias, e desta forma, pensou-se ao inverter a veia e expor esses elementos tróficos para a luz do enxerto poderia gerar-se um meio mais favorável a regeneração nervosa. Então, a comparação faz-se necessária para a obtenção de respostas acerca dos reais benefícios de se inverter a veia no âmbito morfológico quanto no funcional para o órgão-alvo.

**Objetivo:** Comparar os resultados obtidos na regeneração nervosa utilizando-se enxerto venoso ao avesso e enxerto venoso normal na tentativa de se estabelecer qual proporciona um melhor micromeio para tal processo de regeneração muscular, tanto no âmbito morfológico quanto funcional. **Metodologia:** Os animais foram divididos em 4 grupos (n=12), sendo o GD, o controle de desnervação, GVI, o grupo experimental que receberá a veia jugular ao avesso, GVN, o grupo experimental que receberá a veia jugular normal e o GC, o grupo controle normal. As avaliações foram realizadas em dois períodos, em 6 e 12 semanas pós-cirúrgicas, subdividindo-se os grupos (n=6) para cada período estudado. Os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise morfométrica por meio do diâmetro menor e área da fibra muscular e a área de tecido conjuntivo. Para a análise funcional utilizou-se o Índice Funcional do Ciático. **Resultados:** Os resultados da morfometria, da densidade do tecido conjuntivo e da análise funcional mostram que não existiu diferença entre os grupos GVI e GVN nos músculos estudados e que o músculo sóleo sofre uma maior atrofia quando comparado com o músculo EDL. **Conclusão:** Tanto a veia normal quanto a invertida são alternativas para a regeneração nervosa e parece não existir diferença ao se inverter a veia ou não na resposta da regeneração muscular e funcional.

**Palavras Chave:** tubulização, reparo de nervo, músculo esquelético

## ABSTRACT

**Introduction:** Lesions of peripheral nerves with loss of nervous tissue are common and always cause impairment of parts of the body. The treatment considered gold standard is the autologous nerve graft, although this technique presents a favorable result, it exhibits in some cases limiting factors. The tubulization technique has been shown to be an appropriate and alternative method in clinical practice, providing guidance and an environment conducive to regeneration. Several authors defend the use of venous grafts in the repair of the peripheral nerve gaps. However, its functional potentiality is discussed. On the other hand, laminin and collagen considered as trophic factors for the regenerative process are present in the external region of the veins, and in this way, it was thought by inverting the vein and exposing these trophic elements to the graft lumen could generate a More conducive to nerve regeneration. Therefore, the comparison is necessary to obtain answers about the real benefits of inverting the vein at the morphological and functional levels for the target organ. **Objective:** To compare the results obtained in nerve regeneration using intravenous venous graft and normal venous graft in an attempt to establish which provides a better micromion for this process of muscle regeneration, both morphologically and functionally. **Method:** The animals were divided into 4 groups (n = 12), the GD, the denervation control, GVI, the experimental group receiving the jugular vein inside out, GVN, the experimental group that will receive the normal jugular vein and the GC, the normal control group. The evaluations were performed in two periods, at 6 and 12 weeks postoperatively, subdividing the groups (n = 6) for each period studied. The results were evaluated by morphometric analysis using the smaller diameter and muscle fiber area and the connective tissue area. Functional analysis was performed using the Functional Sciatic Index. **Results:** The results of morphometry, connective tissue density and functional analysis show that there was no difference between the GVI and GVN groups in the studied muscles and that the soleus muscle suffers a greater atrophy when compared to the EDL muscle. **Conclusion:** Both the normal and inverted veins are alternatives for nerve regeneration and there seems to be no difference in whether to reverse the vein or not in the response of muscle and functional regeneration.

**Keywords:** tubulization, nerve repair, muscle

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da distribuição dos grupos do experimento. .....	13
Figura 2 - Cirurgia de tubulização. Sendo, A: Secção do nervo isquiático de aproximadamente 10mm, B: Enxerto de veia, como tubo entre os cotos do nervo isquiático .....	15
Figura 3 - Processamento histológico. Sendo A: Criostato marca Leica CM 1850, B: Bateria usada na coloração das lâminas em Hematoxilina e Eosina. ....	16
Figura 4 - Fotomicrografia do equipamento usado para análise das amostras.Sendo, A: Computador e monitores usados para a análise das fotos, B: Fotomicroscópio acoplado ao computador.....	17
Figura 5 - Fotomicrografia dos animais passando pela passarela de acrílico, durante a filmagem para a mensuração do IFC. Sendo, A: GC; B: GD; C: GVI; D: GVN.....	18
Figura 6 - Fotomicrografia das patas da perna dos animais submetida à cirurgia dos no período experimental. Sendo, A: GC; B: GVN; C: GVI; D: GD. ....	19
Figura 7 - Fotomicrografia dos músculos EDL e Sóleo retirados dos ratos na fase experimental. Sendo, A: GC; B: GVN; C: GVI; D: GD. ....	21
Figura 8 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVI6. ....	25
Figura 9 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVI12. ....	26
Figura 10 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVI6. ....	27
Figura 11 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVI12. ....	28
Figura 12 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVN6. .....	30
Figura 13 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVN12.....	31
Figura 14 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVI6. ....	32

Figura 15 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVI12. ....33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso corpóreo dos animais do experimento em 6 semanas. ....	20
Tabela 2 – Peso do músculo Sóleo dos animais no período de 6 e 12 semanas.....	22
Tabela 3 – Peso do músculo EDL dos animais no período de 6 e 12 semanas.....	23
Tabela 4 - Diâmetro mínimo do músculo Sóleo dos animais em 6 e 12 semanas.....	34
Tabela 5 - Diâmetro mínimo do músculo EDL dos animais em 6 e 12 semanas.....	35
Tabela 6 - Área da secção transversal do músculo Sóleo dos animais em 6 e 12 semanas.....	36
Tabela 7 - Área da secção transversal do músculo EDL dos animais em 6 e 12 semanas.....	37
Tabela 8 - Percentagem de tecido conjuntivo em corte transversal do músculo Sóleo dos animais em 6 e 12 semanas.....	38
Tabela 9 - Percentagem de tecido conjuntivo em corte transversal do músculo EDL dos animais em 6 e 12 semanas.....	39
Tabela 10 - Índice funcional do ciático dos animais em um período de 6 semanas pós-cirúrgico.....	40

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 - MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>13</b>
3.2 - PROCEDIMENTO CIRURGICO .....	14
3.3 - SACRIFÍCIO.....	15
3.4 PESO DOS MÚSCULOS .....	15
3.5 - PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	15
3.6 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	16
3.7 DENSIDADE DE TECIDO CONJUNTIVO.....	16
3.8 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO (IFC).....	17
3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
<b>4 - RESULTADOS E ANÁLISES</b> .....	<b>19</b>
4.1 - OBSERVAÇÕES EXTERNAS .....	19
4.2 - PESO DOS ANIMAIS.....	20
4.3 - PESO DOS MÚSCULOS.....	21
<b>4.3.1 - MÚSCULO SÓLEO</b> .....	22
<b>4.3.2 - MÚSCULO EDL</b> .....	23
4.4 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FIBRAS MUSCULARES SUBMETIDAS À COLORAÇÃO EM HE. ....	24
4.5 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO TECIDO CONJUNTIVO.....	29
4.6 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO DIÂMETRO MÍNIMO DAS FIBRAS MUSCULARES SUBMETIDAS À COLORAÇÃO EM HE. ....	34
<b>4.6.1 - MÚSCULO SÓLEO</b> .....	34
<b>4.6.2 - MÚSCULO EDL</b> .....	35
4.7 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL DAS FIBRAS MUSCULARES SUBMETIDAS À COLORAÇÃO EM HE. ....	36
<b>4.7.1 - MÚSCULO SÓLEO</b> .....	36
<b>4.7.2 - MÚSCULO EDL</b> .....	37
4.8 - TRICOMICO DE MASSON.....	38
<b>4.8.1 - MÚSCULO SÓLEO</b> .....	38
<b>4.8.2 - MÚSCULO EDL</b> .....	39
4.9 - ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC) .....	40
<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1 - MODELO ANIMAL.....	41
5.2 - AUTOFAGIA .....	41

5.2 - ANESTÉSICO E VIA DE ADMINISTRAÇÃO .....	42
5.3 - NERVO E MÚSCULO ESTUDADOS .....	42
5.4 - LESÃO NERVOSA E "GAP" .....	43
5.5 - TÉCNICA CIRÚRGICA .....	44
5.6 ENXERTO VENOSO .....	45
5.6 - RESULTADOS FUNCIONAIS .....	46
5.7 - RESULTADOS HISTOLÓGICOS .....	48
5.8 - RESULTADOS DA DENSIDADE DE TECIDO CONJUNTIVO.....	49
5.9 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	51
5.10 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
<b>6 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

As lesões de nervos periféricos com perda de tecido nervoso (neurotmesa) são usuais e sempre ocasionam comprometimento da sensibilidade e motricidade de partes do organismo (SUNDERLAND, 1951; SUNDERLAND, 1978), além de impacto negativo nas esferas previdenciária e social (MELLO JORGE; LATORRE, 1994).

Muitas vezes essas lesões diminuem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, aos quais associam-se com perdas de produtividade e mudança de trabalho e/ou função e maiores gastos com a saúde devido as sequelas (ROSBURG et al., 2005).

Estima-se que nos Estados Unidos 20 milhões de pessoas sofram de lesões de nervos periféricos ocasionados pelos diversos tipos de traumas e desordens médicas (LUNDBORG, 2003).

As causas mais comuns das lesões de nervos periféricos ocorrem por projeteis de armas de fogo, quedas, traumas contusos ou penetrantes e principalmente por acidentes automobilísticos (MARIN; QUEIROZ, 2000; KOUYOUMDJIAN, 2006).

As causas iatrogênicas também devem ser mencionadas. Na área odontológica, falhas e/ou motivos acidentais em procedimentos odontológicos como: exodontia de terceiros molares (SARIKOV; JUODZBALYS, 2014), colocação de implantes (YILMAZ et al., 2016), osteotomias em cirurgia ortognática (LEE et al., 2016) e até mesmo a endodontia (LAMPERT et al., 2016), podem lesar permanentemente nervos cranianos importantes da região de cabeça e pescoço (HUPP, 2000).

O tratamento considerado padrão ouro para reparo de nervos periféricos é o enxerto de nervo autólogo com auxílio de microscópio cirúrgico, embora esta técnica apresente resultado favorável, exhibe como principais fatores negativos: a limitação de calibres, comprimentos e áreas de nervos doadores e a morbidade secundária (TOS et al., 2012).

A técnica de tubulização tem demonstrado ser um método apropriado e alternativo na prática clínica, que consiste na fixação de um segmento tubular, o qual pode ser de origem biológica ou sintética, entre os cotos do nervo lesado,

proporcionando direcionamento e ambiente favorável à regeneração (DAHLIN, 2004; BATTISTON et al., 2005).

Vários autores, defendem o emprego de enxertos venosos na reparação das lacunas de nervos periféricos, justificada pela facilidade de acesso sem danos ao paciente, abundancia de calibres e sítios doadores, além de não apresentar custo financeiro (GEUNA et al., 2014; ZHANG et al., 2015; SÉNÈS et al., 2015).

Entretanto, sua potencialidade funcional é discutida, alguns autores relatam que o contato entre o endotélio da veia com os segmentos nervosos poderia ocasionar desenvolvimento de tecido conjuntivo e retardo no processo regenerativo.

Por outro lado, a laminina e o colágeno considerados fatores tróficos para o processo regenerativo, estão presentes na túnica média e externa (adventícia) das veias (FERRARI et al., 1999) e deste modo invertendo-se a veia e expondo-a para a luz do enxerto poderia gerar um meio mais favorável a regeneração nervosa.

E considerando que estudos comparando a regeneração nervosa com veia normal e ao avesso são escassos, principalmente investigando a resposta na musculatura reinervada, é importante e faz-se necessária esta comparação, para que se obtenham respostas acerca dos reais benefícios de se inverter a veia e se há diferença significativa no âmbito morfológico quanto no funcional para o órgão-alvo.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - OBJETIVO GERAL**

Deste modo, buscamos comparar os resultados obtidos na técnica de tubulização utilizando o enxerto venoso invertido e enxerto venoso normal, na tentativa de se estabelecer o melhor micromeio para o processo de regeneração do nervo e assim avaliar a consequência nos músculos por ele inervados por meio da avaliação morfológica, morfométrica e funcional.

### **2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar morfometricamente a provável regeneração da musculatura branca (EDL) e vermelha (SO)
- Verificar qual tipo de musculatura apresenta melhor regeneração utilizando veia normal
- Verificar qual tipo de musculatura apresenta melhor regeneração utilizando veia ao avesso
- Verificar qual técnica propicia melhor recuperação funcional

### 3 - MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética, com o protocolo 032/2011.

Foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com peso médio de 200 gramas com aproximadamente dois meses de idade. O estudo foi desenvolvido em dois períodos de experimentação, os quais foram de 6 semanas e 12 semanas pós-cirúrgicas. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=6), três experimentais: Grupo Desnervado (GD), Grupo Veia Inverta (GVI) e Grupo Veia Normal (GVN) e um grupo controle: Grupo Controle (GC).

Em todos os grupos o nervo isquiático direito foi utilizado para o estudo experimental. Os Grupos GVI e GVN receberam enxerto venoso da veia jugular externa do lado esquerdo autólogo, sendo que o GVI com a veia jugular invertida.

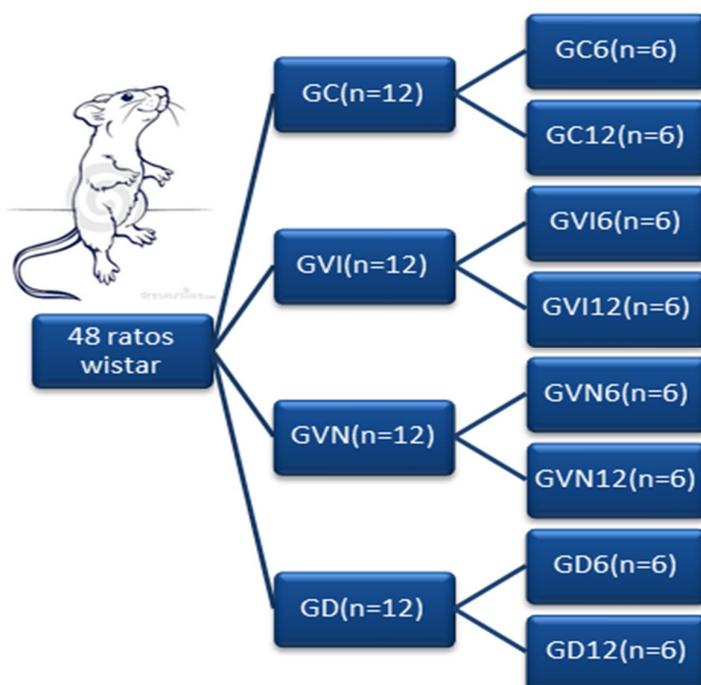


Figura 1 - Representação esquemática da distribuição dos grupos do experimento.

### 3.2 - PROCEDIMENTO CIRURGICO

Os animais foram anestesiados com uma combinação de Cloridato de Ketamina e Cloridato de Xilazina, aplicada por via intramuscular na dose de 0,10ml/100g de peso corporal na região dorso-lateral da pata esquerda do animal. Posteriormente foi feita a tricotomia na face ventral direita do pescoço em todos os animais e limpeza do local com solução antisséptica, seguida de incisão da pele e com auxílio do microscópio cirúrgico (DV Vasconcelos) foi exposta a veia jugular externa esquerda, para promover seu isolamento e ligadura de suas tributárias, após isso, foi introduzido um fio ortodôntico para a canulação da veia para posteriormente seccionar as duas extremidades. Este segmento de 12 mm de veia foi mantido em soro fisiológico até o momento de sua colocação como enxerto entre os cotos nervosos lesados.

Na segunda fase foi realizada a tricotomia da coxa direita do animal para a realização da incisão dorso lateral do membro pélvico de aproximadamente 3 centímetros, para o acesso ao nervo isquiático.

O grupo GD foi submetido somente à cirurgia para seccionamento do nervo isquiático. A fim de evitar a regeneração espontânea, o coto proximal, foi manipulado 180° graus e suturado na fáscia muscular adjacente; já o coto distal, foi manipulado 180° graus e suturado na musculatura adjacente.

O grupo GVI após seccionamento e retirada de um gap de aproximadamente 10 mm do nervo isquiático direito e recebeu o enxerto da veia jugular externa ao avesso, realizando-se a rafia através do epineuro com fio de sutura de *Nylon* 10-0, posicionando os cotos nas extremidades da luz da veia (Figura 2).

O grupo GVN recebeu como enxerto a veia jugular externa normal, sendo suturado como os animais do grupo GVI, citado acima.

O grupo GC recebeu apenas a incisão na região posterior da pata direita e teve a musculatura divulsionada até a exposição do nervo isquiático. Todavia, não recebeu nenhuma intervenção no nervo e serviu como controle do experimento, passando pelo mesmo estresse cirúrgico dos outros animais.

Os animais após as cirurgias foram mantidos em gaiolas coletivas, com 4 animais por caixa onde receberam alimentação e água *ad libidum* e observação periódica.

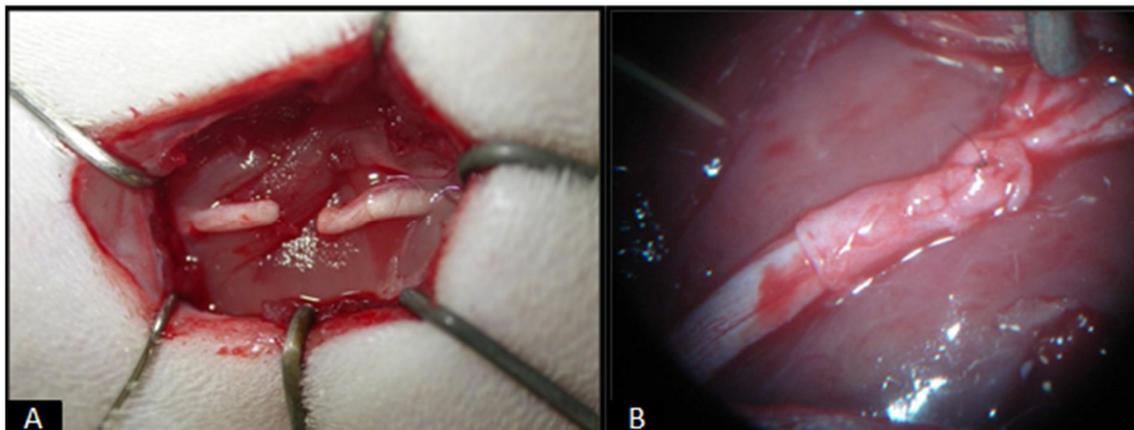


Figura 2 - Cirurgia de tubulização. Sendo, A: Secção do nervo isquiático de aproximadamente 10mm, B: Enxerto de veia, como tubo entre os cotos do nervo isquiático

### 3.3 - SACRIFÍCIO

Os animais foram sacrificados ao curso de 6 e 12 semanas pós-cirurgias através de *over dose* de anestésico (Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina) para a retirada dos músculos Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (EDL).

### 3.4 PESO DOS MÚSCULOS

Foi realizada a dissecação dos músculos EDL e Sóleo dos animais, a retirada foi feita estendendo-se da sua origem até sua inserção, de modo que sua originalidade e integridade fossem mantidas. Antes de submeter às amostras ao protocolo de criopreservação, foi realizada a pesagem em balança.

### 3.5 - PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As amostras dos músculos Sóleo (SO) e Extensor Longo dos Dedos (EDL), foram reduzidas a fragmentos cilíndricos preservando o ventre muscular de aproximadamente 8mm de comprimento e 3mm de espessura, envoltos em talco cirúrgico e imersos em nitrogênio líquido até que a efervescência se detivesse, após esse processo foi usado um adesivo especial chamado Optimal Critical Temperature Tissue-Tek® (O.C.T., Sakura Finetek, Torrance, USA), como meio de inclusão. Os músculos foram mantidos em um freezer à -80°C até o momento que foram obtidos os cortes histológicos de dez micrômetros de espessura em criostato marca Leica -

Modelo CM 1850 a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e realizada a coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricômico de Masson. (Figura 3).



Figura 3 - Processamento histológico. Sendo A: Criostato marca Leica CM 1850, B: Bateria usada na coloração das lâminas em Hematoxilina e Eosina.

### 3.6 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Foi feita a captura das imagens com o auxílio de um fotomicroscópio Olympus BX 50, acoplado ao computador (Figura 4), foram tiradas 3 fotos de campos diferentes de cada animal, na objetiva de 20x, para análise morfométrica das fibras musculares, aferindo a área e o diâmetro mínimo de 220 fibras musculares de cada animal, com o auxílio do programa Image Pro-Plus<sup>®</sup> 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) utilizando a coloração em HE.

### 3.7 DENSIDADE DE TECIDO CONJUNTIVO

Com o uso da coloração de Tricômico de Masson foi capturada uma foto da área de secção transversal do músculo inteiro usando a objetiva de 2x, para aferição de sua área total e em seguida foi capturada fotos com a objetiva de 20x de toda a totalidade do músculo com o objetivo de conseguir detalhes finos da coloração, para que o programa Image Pro-Plus<sup>®</sup> 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) reconhecesse com mais fidelidade o Azul de Anilina, que é o responsável pela

marcação do tecido conjuntivo nesta técnica. Após as aferições, foi realizado o cálculo para obtenção da percentagem de tecido conjuntivo existente no músculo.



Figura 4 - Fotomicrografia do equipamento usado para análise das amostras. Sendo, A: Computador e monitores usados para a análise das fotos, B: Fotomicroscópio acoplado ao computador.

### 3.8 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO (IFC)

Antes dos animais serem sacrificados para coleta do material, cada grupo foi submetido à avaliação funcional do nervo isquiático, exceto os animais com sinais de autofagia do membro pélvico direito. Para esta avaliação os animais caminharam por uma passarela de acrílico transparente onde as pegadas no assoalho foram filmadas para posterior análise funcional.

Os vídeos foram descarregados e transformados em imagem (Figura 5), através do programa Free Video to JPG v.5.0.20, para captura do momento exato da pegada das patas posteriores dos animais. Para a análise das pegadas dos animais foi seguida as medidas e a equação descrita por Bain, Mackinon e Hunter (1989), com base nos resultados de De Medinaceli; Fred e Wyatt (1984). Através do programa Image Pro-Plus<sup>®</sup> 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) foram captadas as medidas das patas posteriores dos ratos, realizada o cálculo da equação que gerou um fator de regressão do nervo, sendo que o valor de -100, em animais com nervo isquiático seccionado e de valores próximos à zero em animais com função normal.

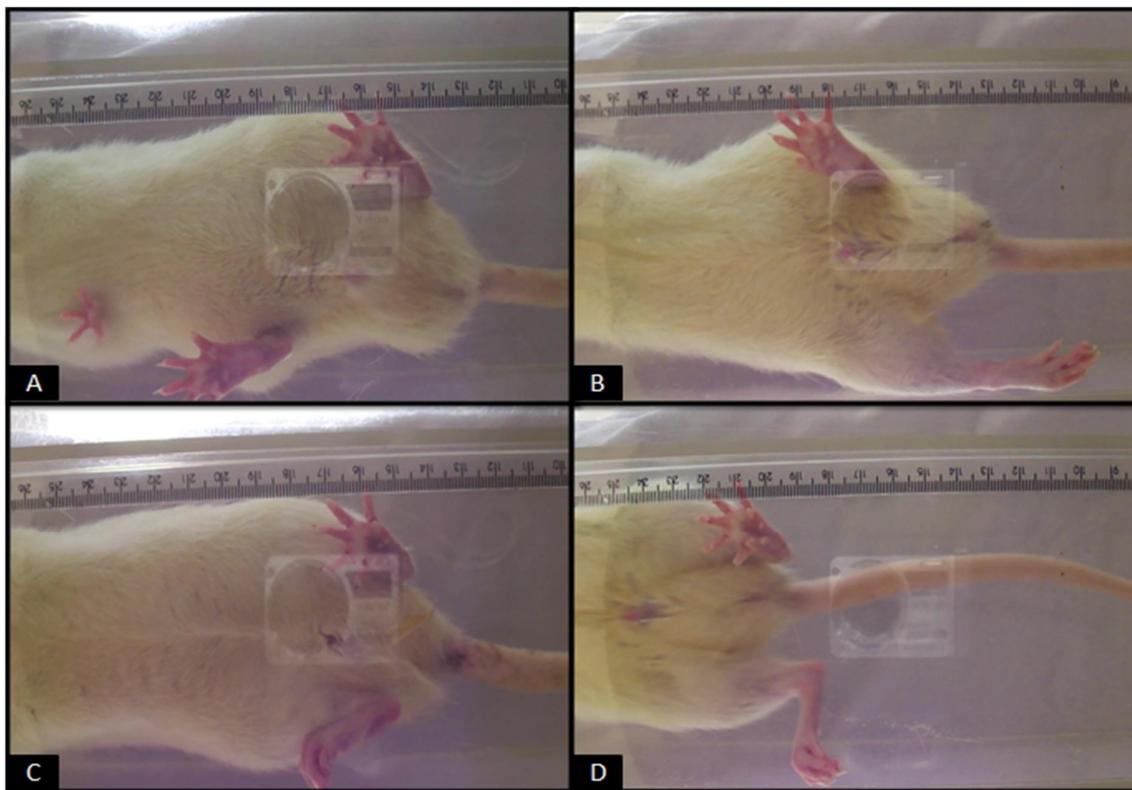


Figura 5 - Fotomicrografia dos animais passando pela passarela de acrílico, durante a filmagem para a mensuração do IFC. Sendo, A: GC; B: GD; C: GVI; D: GVN.

### 3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística os grupos foram comparados pelo teste da análise de variância (ANOVA) e quando essa análise detectou diferença significativa, foram aplicados os testes de Tukey para as comparações múltiplas entre as médias. Foi considerado significativo um  $p \leq 0,05$ .

## 4 - RESULTADOS E ANÁLISES

### 4.1 - OBSERVAÇÕES EXTERNAS

Em todos os animais dos grupos GD, GVI e GVN na fase experimental foram observadas paralisia da pata direita dos animais (operada) submetidos à secção total do nervo isquiático (Figura 5), semelhante à chamada “Waiters tip hand” (mão de garçom), como nas lesões altas do plexo braquial (C5; C6). Um animal de cada grupo GD, GVI e GVN, realizou autofagia na pata do membro pélvico que foi realizada a cirurgia (Figura 6). Esse acontecido, provavelmente se deve ao fato da perda de sensibilidade da região pelo seccionamento total do nervo isquiático. Observa-se uma grande autofagia de dedos no animal do grupo desnervado (GD), provavelmente pelo fato da perda de inervação definitiva, diferente dos grupos que passaram pela cirurgia de tubulização (GVI e GVN), que após alguns dias a inervação voltou a ser reestabelecida.



Figura 6 - Fotomicrografia das patas da perna dos animais submetida à cirurgia dos no período experimental. Sendo, A: GC; B: GVN; C: GVI; D: GD.

## 4.2 - PESO DOS ANIMAIS

Tabela 1 - Massa corpórea dos animais do experimento em 6 e 12 semanas.

<b>MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS NO PERÍODO DE 6 E 12 SEMANAS(g)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	347,12 <sup>a</sup>	36,85	395,50 <sup>a</sup>	24,85
<b>GVI</b>	304,80 <sup>ab</sup>	18,12	396,78 <sup>a</sup>	49,11
<b>GVN</b>	321,33 <sup>a</sup>	55,51	406,92 <sup>a</sup>	17,63
<b>GC</b>	388,62 <sup>ab</sup>	34,96	379,60 <sup>a</sup>	33,17

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Observando os resultados obtidos na tabela 1 podemos interpretar que:

- Os grupos estudados mostraram estão distribuídos de forma homogênea;
- Os animais apresentaram uma evolução no peso, comparando-se de 6 para 12 semanas.

### 4.3 - PESO DOS MÚSCULOS

Os músculos retirados dos animais (Figura 7) apresentaram aspectos diferentes entre o GC e os demais grupos. O GC apresentou-se com maior volume e com a clara distinção de coloração entre os músculos, o músculo Sóleo com um vermelho mais escuro (músculo vermelho) e o músculo EDL, vermelho mais claro (músculo branco).

Nos demais grupos, observou-se menor volume quando comparado ao GC, com destaque ao grupo desnervado que a atrofia foi mais visível, mesmo macroscopicamente.

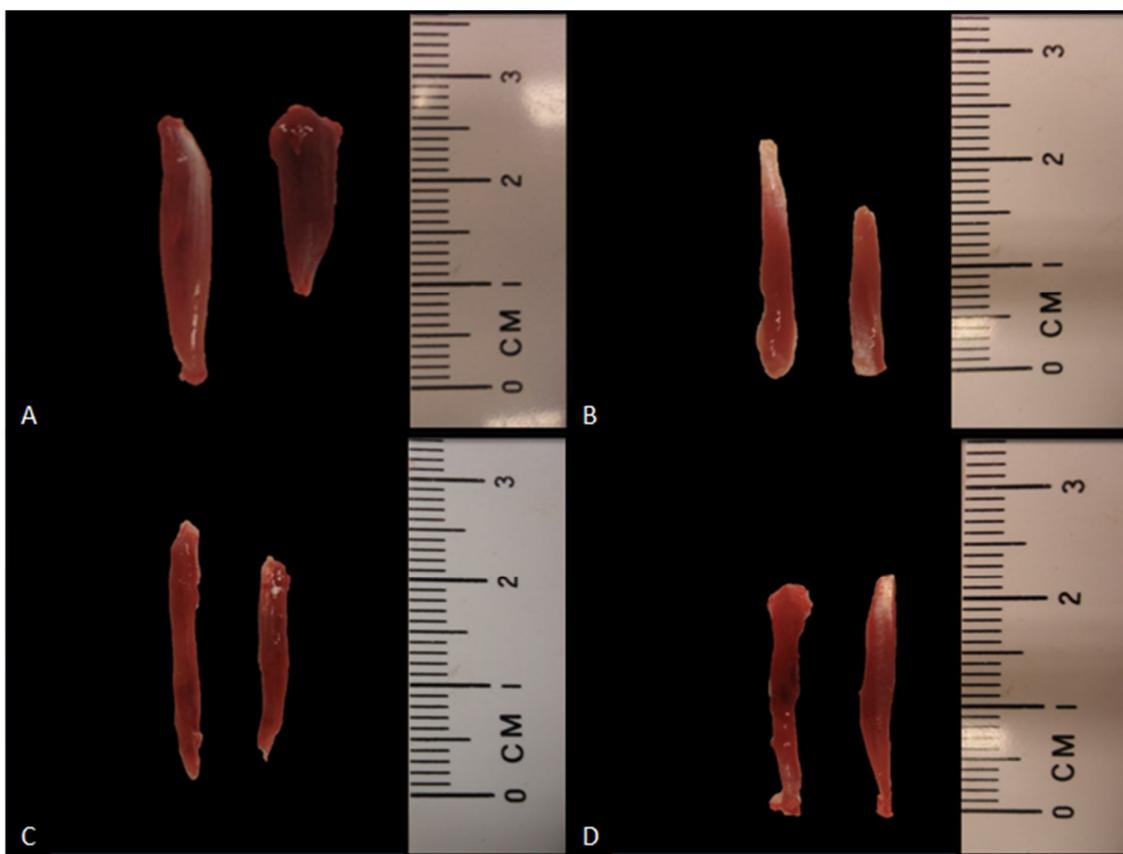


Figura 7 - Fotomicrografia dos músculos EDL e Sóleo retirados dos ratos na fase experimental. Sendo, A: GC; B: GVN; C: GVI; D: GD.

#### 4.3.1 - MÚSCULO SÓLEO

Tabela 2 – Massa do músculo Sóleo dos animais no período de 6 e 12 semanas.

<b>MASSA DO MÚSCULO SÓLEO NO PERÍODO DE 6 E 12 SEMANAS(g)</b>				
<b>Grupos</b>	<b>6 semanas</b>		<b>12 semanas</b>	
	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD6</b>	0,04 <sup>b</sup>	0,002	0,04 <sup>c</sup>	0,02
<b>GVI6</b>	0,06 <sup>b</sup>	0,007	0,09 <sup>b</sup>	0,02
<b>GVN6</b>	0,06 <sup>b</sup>	0,01	0,09 <sup>b</sup>	0,01
<b>GC6</b>	0,19 <sup>a</sup>	0,02	0,18 <sup>a</sup>	0,024

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 2, podemos observar que:

- O peso do músculo do GC foi o maior dentre os grupos e manteve-se estável no período de 6 para 12 semanas;
- O peso do músculo do GD foi o menor dentre os grupos estudados e se manteve estável do período de 6 para 12 semanas;
- Obteve-se um aumento de peso dos músculos dos grupos experimentais GVI e GVN, se observando do período de 6 para 12 semanas;
- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se uma ambiguidade entre os grupos, com resultados muito próximos um do outro e;
- Os grupos GVI e GVN apresentam peso do músculo mais próximo ao GD do que o GC nos dois períodos de tempo estudados.

### 4.3.2 – MÚSCULO EDL

Tabela 3 – Massa do músculo EDL dos animais no período de 6 e 12 semanas.

<b>MASSA DO MÚSCULO EDL NO PERÍODO DE 6 E 12 SEMANAS(g)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD6</b>	0,04 <sup>b</sup>	0,01	0,04 <sup>c</sup>	0,01
<b>GVI6</b>	0,06 <sup>b</sup>	0,01	0,12 <sup>b</sup>	0,02
<b>GVN6</b>	0,07 <sup>b</sup>	0,02	0,14 <sup>b</sup>	0,01
<b>GC6</b>	0,18 <sup>a</sup>	0,02	0,17 <sup>a</sup>	0,01

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 3, podemos observar que:

- O peso do músculo do GC foi o maior dentre os grupos e manteve-se estável no período de 6 para 12 semanas;
- O peso do músculo do GD foi o menor dentre os grupos estudados e se manteve estável do período de 6 para 12 semanas;
- Obteve-se um aumento de peso dos músculos dos grupos experimentais GVI e GVN, se observando do período de 6 para 12 semanas;
- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se uma ambiguidade entre os grupos, com resultados muito próximos um do outro e;
- Os grupos GVI e GVN apresentam peso do músculo mais próximo ao GD no período de 6 semanas e;
- Os grupos GVI e GVN apresentam peso do músculo mais próximo ao GC no término do experimento.

#### **4.4 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FIBRAS MUSCULARES SUBMETIDAS À COLORAÇÃO EM HE.**

Nas observações histológicas em cortes transversais, verificam-se no GC tanto no músculo EDL, quanto no músculo Sóleo fibras musculares poligonais, com núcleos periféricos, padrão fascicular normal, com arquitetura histológica organizada pela presença de envoltórios conjuntivos, perimísio e endomísio delimitando cada fascículo e fibra muscular, respectivamente, evidenciando a morfologia normal do tecido muscular esquelético (Fotos A, das Figuras 8 a 11).

Já o GD apresenta grande invasão de tecido conjuntivo no perimísio e endomísio, núcleos centrais, fibras com pequeno diâmetro, caracterizando fibras musculares que sofreram desnervação e estão em processo de atrofia ou hipotrofia, observando-se o agravamento deste quadro de 6 semanas para 12 semanas (Fotos B, das Figuras 8 a 11).

Os grupos GVI e GVN apresentam semelhança morfológica entre os mesmos, e uma grande melhora histológica no período de 6 para 12 semanas quando comparada ao GD (Figura C e D, das Figuras 8 a 11), mas ainda apresenta alguns núcleos centrais e uma pequena desorganização fascicular, comparado com os GC.

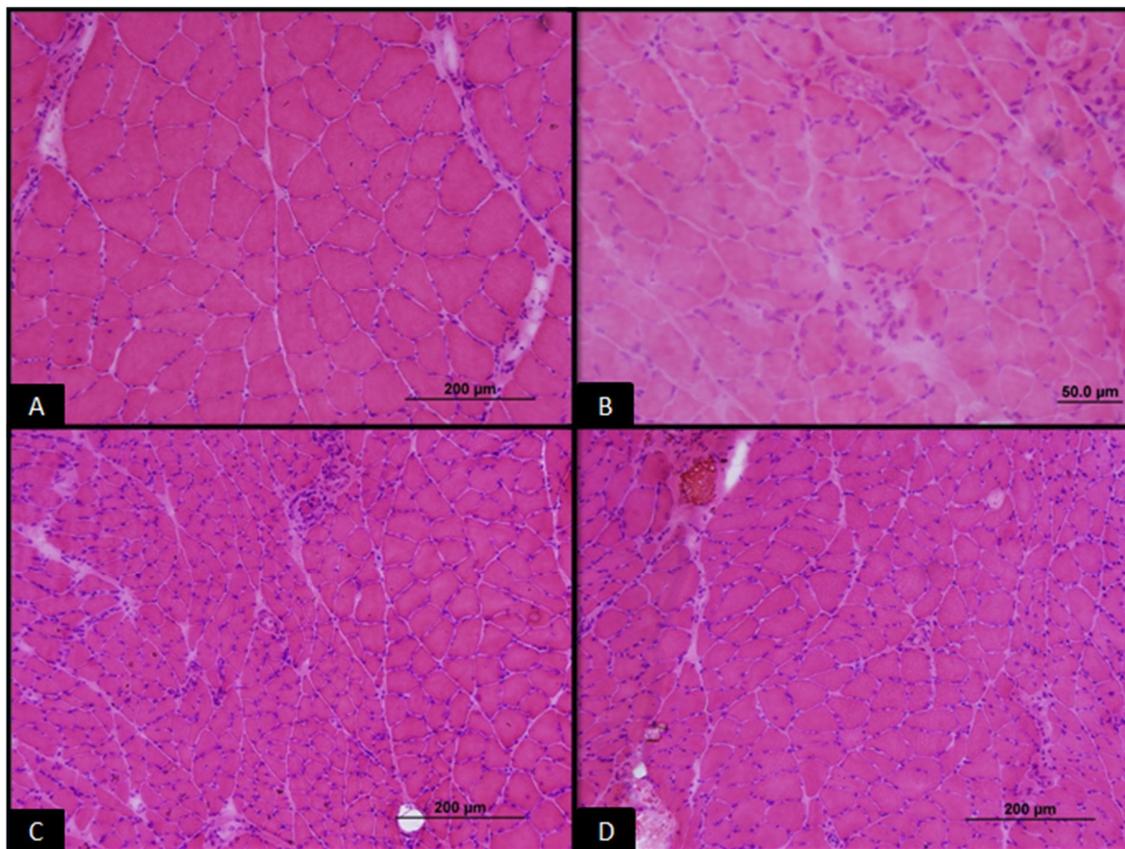


Figura 8 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVI6.

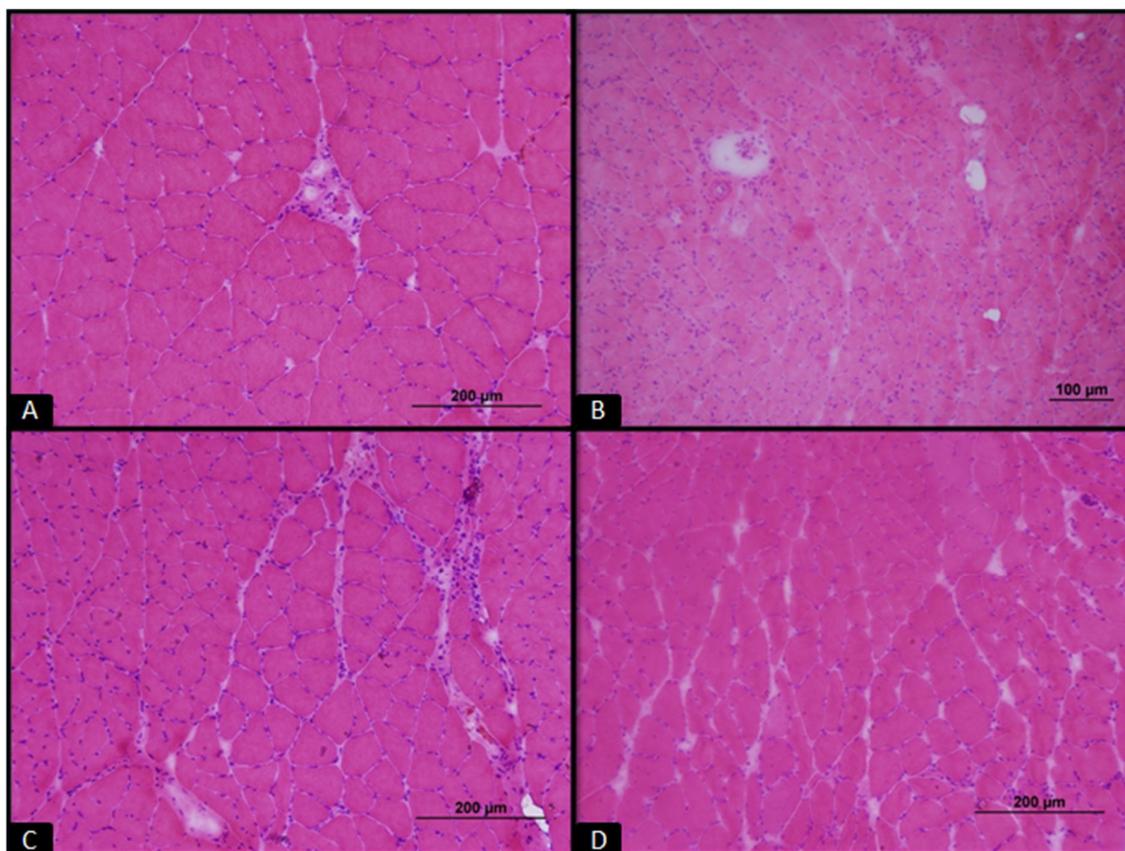


Figura 9 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVI12.

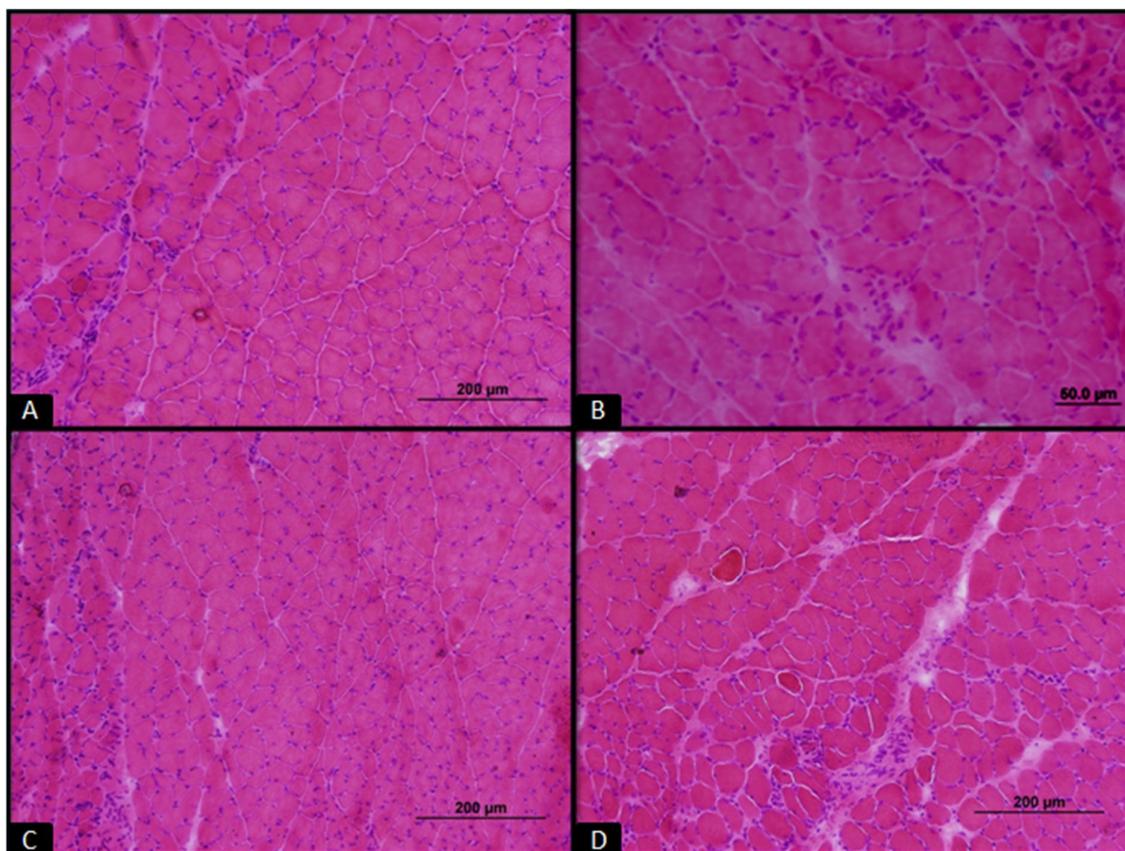


Figura 10 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVI6.

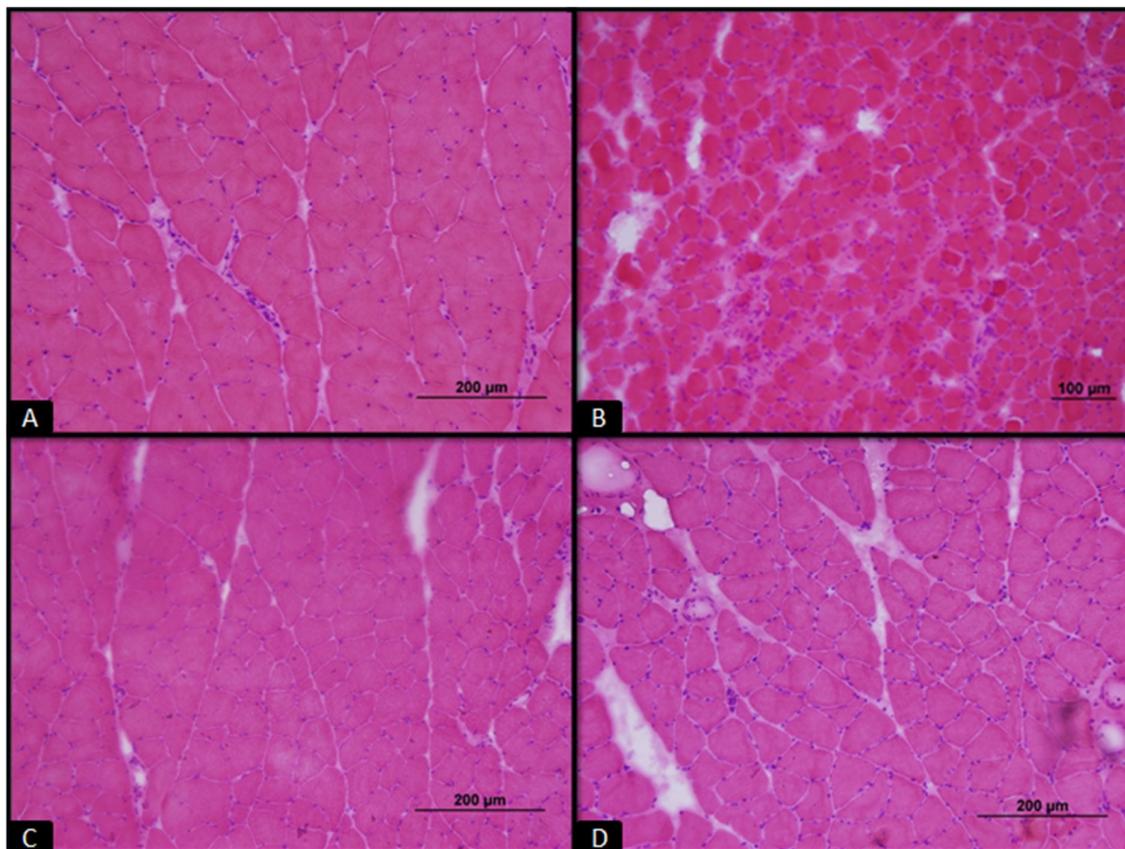


Figura 11 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de HE. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVI12.

#### 4.5 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO TECIDO CONJUNTIVO

As lâminas coradas com Tricômico de Masson para a análise da densidade de tecido conjuntivo em relação às fibras musculares do músculo Sóleo e EDL dos animais no período de 6 e 12 semanas, estão representadas nas Figuras 12,13, 14 e 15, respectivamente. A análise qualitativa revela que o GC nos dois períodos estudados em ambos os músculos, por apresentarem arquitetura histológica organizada, com arranjos estruturais padrões como mencionado na análise com a coloração em HE, apresenta baixa quantidade de tecido conjuntivo interposto entre as fibras musculares, ao contrário do grupo GD que em ambos os períodos apresentaram uma grande quantidade de tecido conjuntivo interposto entre as fibras, e progredindo a invasão do período de 6 para 12 semanas, fato que corrobora com os achados da análise histologia em HE, em que observa-se um quadro de atrofia agravado pela desnervação definitiva do animal, sendo a diminuição da fibra, desorganização estrutural e invasão de tecido conjuntivo nas fibras musculares, são encontrados.

Os grupos experimentais, GVI e GVN, em ambos os músculos no período de 6 semanas, observa-se uma moderada invasão de tecido conjuntivo interposto, principalmente em áreas próximas a fusos musculares, vasos e fibras atroficas e menor invasão de tecido conjuntivo em áreas próximas as fibras que a interação mioneural foi reestabelecida, este quadro regride parcialmente nos dois grupos experimentais no período de 12 semanas, onde apresenta-se uma melhor organização histológica, como evidenciado na análise em HE, assim seguida de uma menor invasão de tecido conjuntivo entre as fibras, mas ainda com um padrão inferior ao GC, mas superior ao grupo GD.

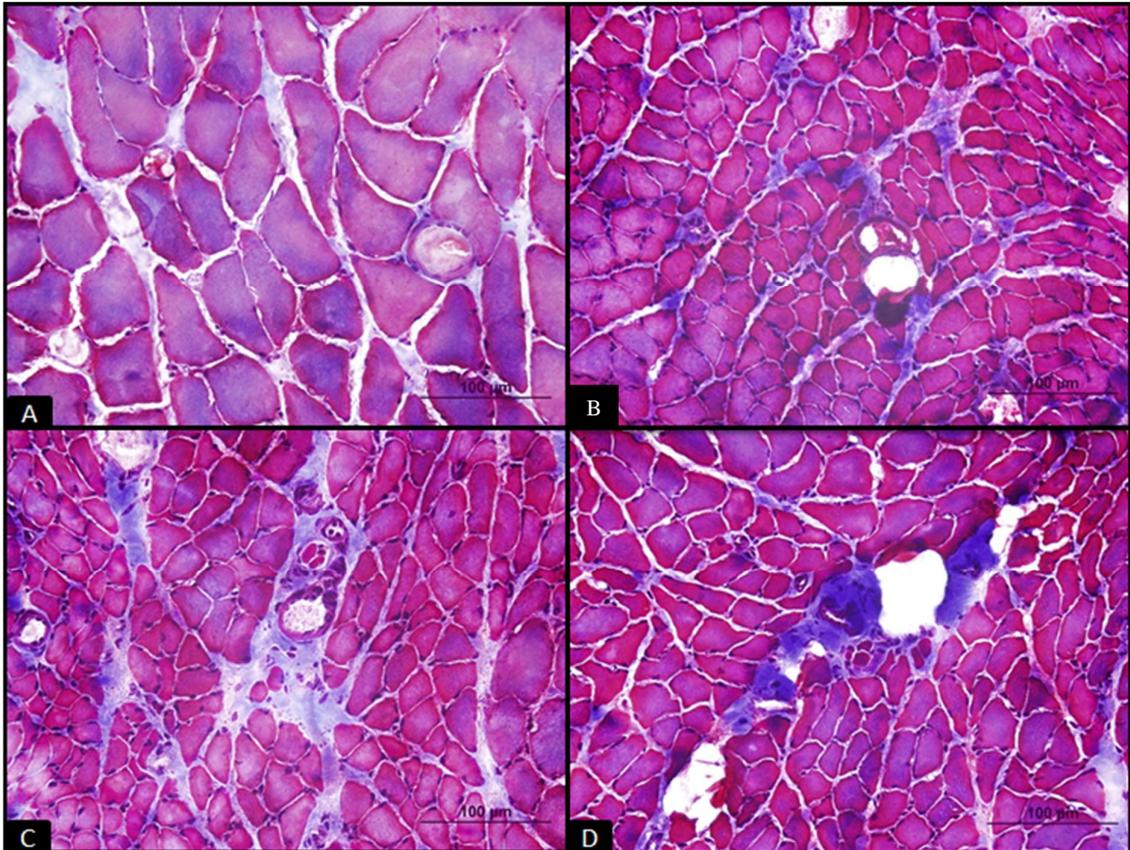


Figura 12 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVN6.

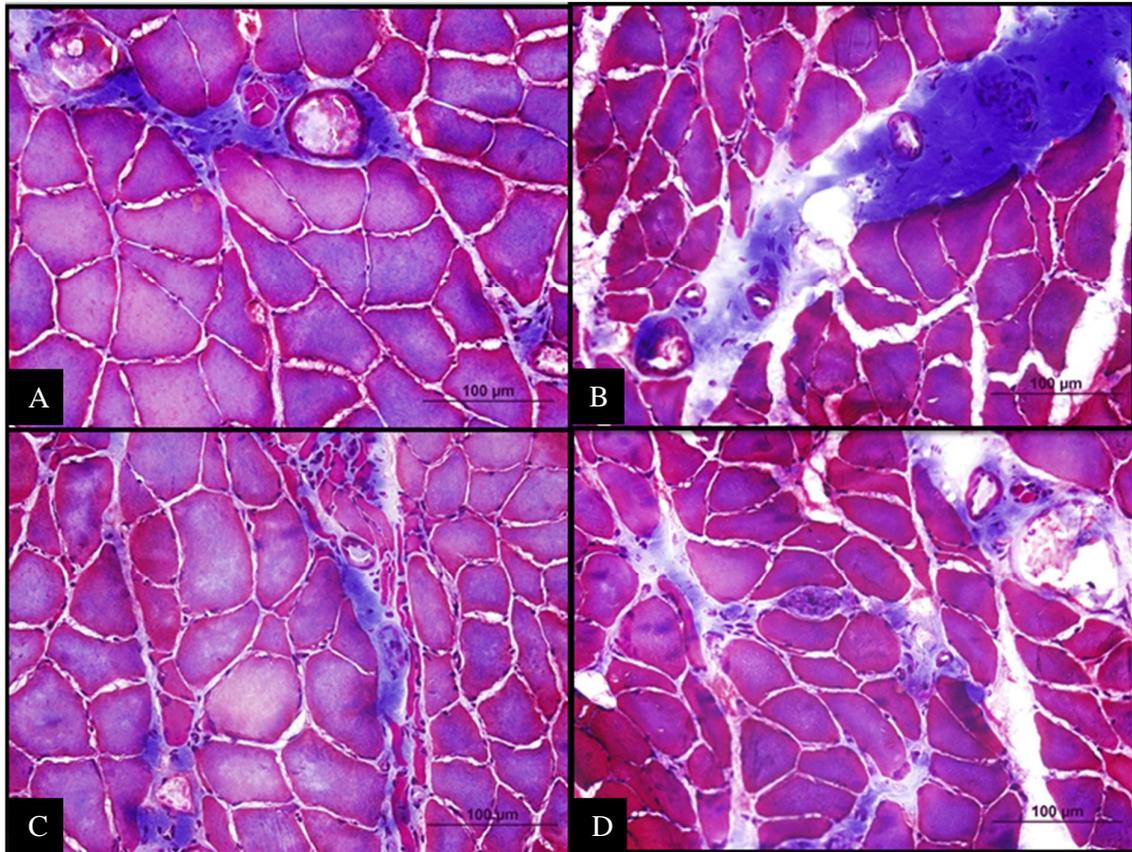


Figura 12 - Fotomicrografia dos músculos Sóleo de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVN12.

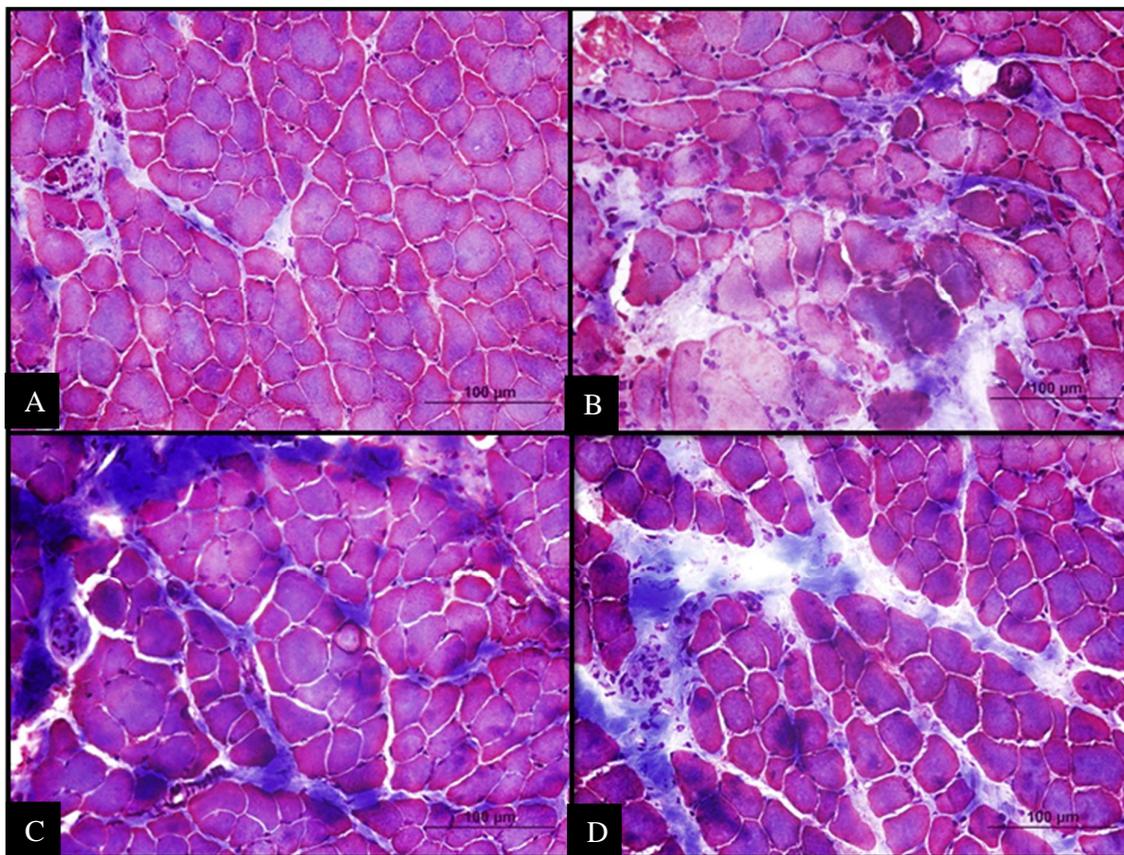


Figura 13 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 6 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC6; B: GD6; C: GVN6; D: GVI6.

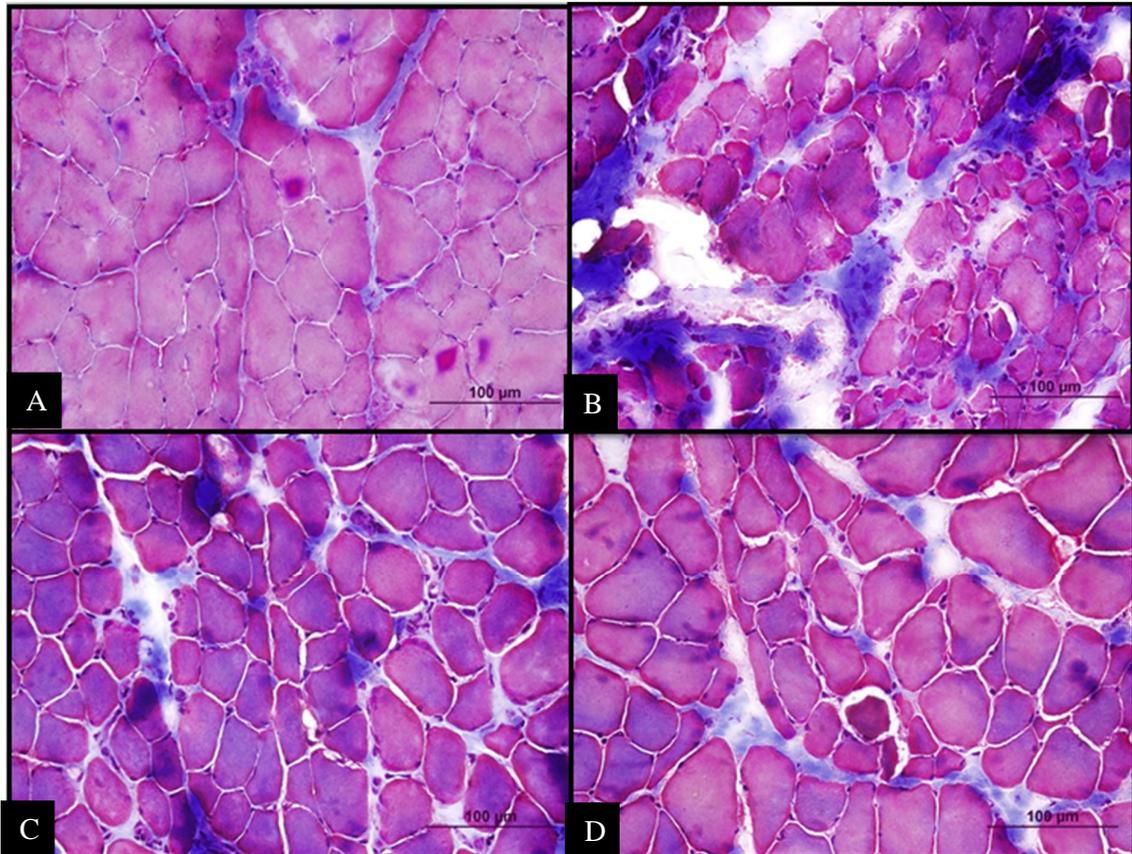


Figura 14 - Fotomicrografia dos músculos EDL de ratos de 12 semanas submetidos a coloração de Tricômico de Masson. Sendo, A: GC12; B: GD12; C: GVN12; D: GVI12.

## 4.6 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO DIÂMETRO MÍNIMO DAS FIBRAS MUSCULARES SUBMETIDAS À COLORAÇÃO EM HE.

### 4.6.1 - MÚSCULO SÓLEO

Tabela 4 - Diâmetro mínimo do músculo Sóleo dos animais em 6 e 12 semanas.

<b>DIÂMETRO MÍNIMO DO MÚSCULO SÓLEO EM 6 E 12 SEMANAS (µm)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	14,96 <sup>c</sup>	13,28	10,29 <sup>b</sup>	7,56
<b>GVI</b>	25,75 <sup>bc</sup>	5,24	37,19 <sup>c</sup>	8,08
<b>GVN</b>	26,56 <sup>b</sup>	5,98	35,06 <sup>c</sup>	7,66
<b>GC</b>	49,63 <sup>a</sup>	7,65	46,94 <sup>a</sup>	7,07

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 4, podemos observar que:

- O diâmetro mínimo das fibras musculares do grupo GC se manteve estável no período de 6 para 12 semanas;
- O diâmetro mínimo das fibras musculares do grupo GD decaiu do período de 6 para 12 semanas;
- Obteve-se um avanço do diâmetro mínimo dos grupos experimentais GVI e GVN, se observando do período de 6 para 12 semanas;
- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se uma ambiguidade entre os grupos, com resultados muito próximos um do outro e;
- Os grupos GVI e GVN foram os que apresentam diâmetro mínimo das fibras musculares mais próximos do grupo GC nos dois períodos de tempo estudados.

#### 4.6.2 - MÚSCULO EDL

Tabela 5 - Diâmetro mínimo do músculo EDL dos animais em 6 e 12 semanas

<b>DIÂMETRO MÍNIMO DO MÚSCULO EDL EM 6 E 12 SEMANAS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	15,68 <sup>a</sup>	11,03	10,47 <sup>a</sup>	6,19
<b>GVI</b>	25,89 <sup>c</sup>	5,00	34,77 <sup>c</sup>	7,39
<b>GVN</b>	27,58 <sup>c</sup>	5,24	35,48 <sup>c</sup>	6,38
<b>GC</b>	49,63 <sup>b</sup>	6,91	43,58 <sup>b</sup>	8,51

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 5, podemos observar que:

- O diâmetro mínimo das fibras musculares do grupo GC se manteve estável no período de 6 para 12 semanas, com um pequeno crescimento;
- O diâmetro mínimo das fibras musculares do grupo GD decaiu do período de 6 para 12 semanas;
- Obteve-se um avanço do diâmetro mínimo dos grupos experimentais GVI e GVN, observando-se do período de 6 para 12 semanas;
- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se uma ambiguidade entre os grupos, com resultados muito próximos um do outro e;
- Os grupos GVI e GVN foram os que apresentam diâmetro mínimo das fibras musculares mais próximos do grupo GC nos dois períodos de tempo estudados.

## 4.7 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL DAS FIBRAS MUSCULARES SUBMETIDAS À COLORAÇÃO EM HE.

### 4.7.1 - MÚSCULO SÓLEO

Tabela 6 - Área da secção transversal do músculo Sóleo dos animais em 6 e 12 semanas

<b>ÁREA DO MÚSCULO SÓLEO EM 6 E 12 SEMANAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	503,96 <sup>b</sup>	371,56	294,38 <sup>b</sup>	159,37
<b>GVI</b>	905,89 <sup>b</sup>	282,39	1919,64 <sup>c</sup>	608,04
<b>GVN</b>	957,47 <sup>b</sup>	341,55	1771,48 <sup>c</sup>	563,01
<b>GC</b>	3326,98 <sup>a</sup>	726,09	2934,52 <sup>a</sup>	644,24

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 6, podemos observar que:

-A área de secção transversal das fibras musculares do grupo GC obteve a maior média nos dois períodos estudados;

- A área das fibras musculares do grupo GD decaiu do período de 6 para 12 semanas;

- Obteve-se um aumento da área dos grupos experimentais GVI e GVN de forma, observando-se do período de 6 para 12 semanas;

- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se uma ambiguidade entre os grupos, com resultados muito próximos um do outro, principalmente no período de 6 semanas;

-Os grupos GVI e GVN apresentam área das fibras musculares no período de 6 semanas com valores mais próximos do grupo GD e;

-No período de 12 semanas valores mais próximos aos valores do GC, sendo que:

- No período de 6 semanas, o GVN6 foi o que obteve uma leve vantagem de área, já no período de 12 semanas, o GVI12 foi o que mais se aproximou do GC12.

#### 4.7.2 - MÚSCULO EDL

Tabela 7 - Área da secção transversal do músculo EDL dos animais em 6 e 12 semanas

<b>ÁREA DO MÚSCULO EDL EM 6 E 12 SEMANAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	519,48 <sup>b</sup>	482,33	389,45 <sup>b</sup>	90,86
<b>GVI</b>	879,90 <sup>b</sup>	277,77	1646,92 <sup>c</sup>	593,39
<b>GVN</b>	1039,96 <sup>b</sup>	318,22	1645,03 <sup>c</sup>	497,89
<b>GC</b>	2001,64 <sup>a</sup>	629,32	2317,88 <sup>a</sup>	780,97

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 7, podemos observar que:

- A área de secção transversal das fibras musculares do grupo GC obteve um desenvolvimento no período de 6 para 12 semanas;
- A área das fibras musculares do grupo GD decaiu do período de 6 para 12 semanas;
- Obteve-se um aumento da área dos grupos experimentais GVI e GVN de forma significativa, observando-se do período de 6 para 12 semanas;
- Os grupos GVI e GVN apresentam área das fibras musculares no período de 6 semanas com valores mais próximos do grupo GD e;
- No período de 12 semanas valores mais próximos aos valores do GC, sendo que:
  - No período de 6 semanas, o GVN6 foi o que obteve vantagem não relevante de área, já no período de 12 semanas, o GVI12 e o GVN12 apresentaram valores muito próximos um do outro.

## 4.8 - TRICOMICO DE MASSON

### 4.8.1 - MÚSCULO SÓLEO

Tabela 8 - Percentagem de tecido conjuntivo em corte transversal do músculo Sóleo dos animais em 6 e 12 semanas

<b>ÁREA DE TECIDO CONJUNTIVO DO MÚSCULO SOLEO EM 6 e 12 SEMANAS (%)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	24,82 <sup>c</sup>	5,89	33,94 <sup>a</sup>	4,86
<b>GVI</b>	16,54 <sup>bc</sup>	3,31	16,12 <sup>c</sup>	4,33
<b>GVN</b>	11,24 <sup>ab</sup>	4,53	12,58 <sup>b</sup>	2,51
<b>GC</b>	5,17 <sup>a</sup>	4,71	7,09 <sup>b</sup>	1,16

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 8, podemos observar que:

-A percentagem de tecido conjuntivo do grupo GC em ambos os períodos estudados foram os menores e se mantiveram estáveis de 6 para 12 semanas;

- A percentagem de tecido conjuntivo do grupo GD foi a maior dentre os grupos nos períodos estudados e aumentou sua taxa do período de 6 para 12 semanas;

- OS grupos experimentais GVI e GVN obtiveram uma percentagem de tecido conjuntivo acima do GC e abaixo do GD em ambos os períodos estudados e;

-Não houve aumento nem decréscimo significativo nos grupos experimentais no período de 6 para 12 semanas;

- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se maior percentagem de tecido conjuntivo no grupo GVI;

-O grupo GVN foi o que apresentou percentagem de tecido conjuntivo mais próximo ao GC tanto em 6 semanas e principalmente em 12semanas obtive semelhança significativa ao GC.

#### 4.8.2 - MÚSCULO EDL

Tabela 9 - Percentagem de tecido conjuntivo em corte transversal do músculo EDL dos animais em 6 e 12 semanas

<b>ÁREA DE TECIDO CONJUNTIVO DO MÚSCULO EDL EM 6 e 12 SEMANAS (%)</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	19,57 <sup>c</sup>	4,32	27,94 <sup>c</sup>	5,11
<b>GVI</b>	11,20 <sup>ab</sup>	3,22	12,23 <sup>b</sup>	2,66
<b>GVN</b>	14,25 <sup>bc</sup>	2,71	8,44 <sup>ab</sup>	3,20
<b>GC</b>	7,58 <sup>a</sup>	2,08	4,74 <sup>a</sup>	1,95

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.

Interpretando os dados obtidos da Tabela 9, podemos observar que:

- A percentagem de tecido conjuntivo do grupo GC em ambos os períodos foram os menores e obteve uma pequena queda de 6 para 12 semanas;
- A percentagem de tecido conjuntivo do grupo GD foi a maior dentre os grupos nos períodos estudados e aumentou sua taxa do período de 6 para 12 semanas;
- OS grupos experimentais GVI e GVN obtiveram uma percentagem de tecido conjuntivo acima do GC e abaixo do GD em ambos os períodos estudados e;
- Não houve aumento nem decréscimo significativo no período de 6 para 12 semanas no GVI;
- Houve um decréscimo significativo na percentagem de tecido conjuntivo no período de 6 para 12 semanas no GVN;
- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, no período de 6 semanas o GVN e o GVI apresentaram grande ambiguidade, já no período de 12 semanas, observa-se maior percentagem de tecido conjuntivo no GVI;
- O grupo GVN foi o que apresentou percentagem de tecido conjuntivo mais próximo ao GC no período de 12 semanas.

#### 4.9 - ÍNDICE FUNCIONAL DO ISQUIÁTICO (IFC)

Tabela 10 - Índice funcional do ciático dos animais em um período de 6 semanas pós-cirúrgico.

<b>ÍNDICE FUNCIONAL DO NERVO ISQUIÁTICO EM 6 E 12 SEMANAS</b>				
<b>6 semanas</b>			<b>12 semanas</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>GD</b>	00 <sup>c</sup>	00	00 <sup>c</sup>	00
<b>GVI</b>	-89,64 <sup>b</sup>	6,5	-74,39 <sup>b</sup>	12,43
<b>GVN</b>	-74,91 <sup>b</sup>	13,77	-80,81 <sup>b</sup>	21,76
<b>GC</b>	-4,89 <sup>a</sup>	16,35	-2,32 <sup>a</sup>	11,93

Comparação entre os grupos. Letras iguais não identificam diferença significativa entre si.  
\*o valor foi apenas atribuído para análise estatística

Interpretando os dados obtidos da Tabela 10, podemos observar que:

- O IFC do grupo GC em ambos os períodos foram os que apresentaram índice mais próximo à zero em ambos os períodos estudados e não apresentaram mudança significativa de 6 para 12 semanas;
- OS grupos experimentais GVI e GVN mostraram IFC com diferença significativa ao GC;
- Não houve aumento nem decréscimo significativo do IFC nos grupos experimentais, GVI e GVN, no período de 6 para 12 semanas;
- Na comparação entre os grupos experimentais, GVI e GVN, tanto em 6 quanto em 12 semanas, observa-se uma ambiguidade entre os grupos, com resultados muito próximos um do outro;

## **5 - DISCUSSÃO**

### **5.1 - MODELO ANIMAL**

O modelo animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* foi escolhido nesta pesquisa por vários motivos: são dóceis, permitem fácil manuseio, apresentam resistência imunológica e sua manutenção requer baixo custo financeiro.

Além dessas características já citadas, podemos destacar especialmente o padrão isogênico semelhante ao ser humano. O animal apresenta uma taxa de regeneração e degeneração nervosa e muscular parecida e bem relatada em vários estudos, fazendo que a relação cobaia e ser humano, mesmo apresentando um metabolismo mais acelerado, sejam interpretados com tranquilidade.

Essas características fazem com que o rato *wistar* seja um modelo consagrado na reparação de nervos periféricos (CLOUTIER et al., 2013; GEORGIU et al., 2013; HUNDESHAGEN et al., 2013; SU et al., 2013).

A escolha do gênero masculino deve-se ao fato de uma escolha metodológica da qual se diminua uma variável no estudo, pois animais do gênero feminino poderiam apresentar alterações dos ritmos hormonais, o que causaria variações nos resultados. Como relatado por Kovacic et al., (2009) os hormônios femininos promovem efeitos neurotróficos na regeneração de nervos periféricos, em contrapartida, alguns autores relatam prejuízos com a realização de experimentos com animais do gênero feminino (KANE et al. 2002).

Além disso é importante a escolha de animais jovens, porque além de serem os mais utilizados, e por isso, apresentarem uma maior margem para comparação, sabe-se que quanto mais idoso o animal, mais lento são os fenômenos envolvidos na reparação dos nervos periféricos (ZOU et al., 2013; SAYGILI et al., 2012.).

### **5.2 - AUTOFAGIA**

Em alguns animais do estudo, foi observada a autofagia de dedos. Nos grupos experimentais, nos quais a inervação foi reestabelecida pela intervenção cirúrgica, elas se apresentaram mais brandas; já no grupo desnervado, no qual a inervação não foi reestabelecida, a autofagia foi maior. Uma das explicações para este acontecido, é que com o seccionamento do nervo isquiático, responsável pela inervação total da pata do animal, outras estruturas foram indiretamente afetadas,

como é o caso do nervo sural, o qual é responsável pela inervação sensitiva da região dorso lateral da pata do animal, como observamos na Figura 6, é justamente a porção da pata em que foi observada a autofagia. Outros autores como Rosa-Junior (2010) e Dias (2011) que trabalham com o nervo isquiático também observaram este acontecido. Entretanto, outros autores que estudam a regeneração através de ramos do nervo isquiático, como o fibular, o qual é responsável somente pela inervação do músculo tibial cranial, não observaram autofagia nos animais.

## **5.2 - ANESTÉSICO E VIA DE ADMINISTRAÇÃO**

O anestésico utilizado foi à associação do Cloridato de Ketamina com o Cloridato de Xilazina, porque é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte. Apresenta na sua associação além do sedativo o relaxante muscular, que atua na vasoconstrição, evitando sangramentos extensos, que são preocupantes em animais como o rato, o qual apresenta baixo peso, pequena área corporal e alto metabolismo. Por essas razões essa associação é vastamente utilizada por outros pesquisadores.

A via de administração escolhida foi a intramuscular, por proporcionar sedação gradativa por maior tempo utilizando uma concentração de anestésico baixa (0,10ml/100g), já que a cirurgia experimental empregada desprende um tempo grande de trabalho (DUPLAS et al., 2001). Outros autores utilizam vias de administração diferentes, como por exemplo, a intraperitoneal, a qual apresenta uma sedação mais rápida e maior absorção, empregada em estudos que é necessário um tempo menor de sedação da cobaia.

## **5.3 - NERVO E MÚSCULO ESTUDADOS**

O nervo isquiático foi utilizado para a realização da pesquisa, o qual é considerado por muitos autores o principal nervo periférico para investigação em modelo experimental, justificado pelo seu longo trajeto, facilidade de acesso e grande calibre.

Este nervo é classificado como misto por apresentar fibras tanto motoras quanto sensitivas, portanto é um nervo que quando acometido por uma lesão apresenta um prognóstico difícil e pouco favorável. Nervos somente sensitivos ou motores parecem apresentar regeneração mais favorável, explicada pela sua função

única, pois apresentam um arranjo monofasciculado (BARGHASH et al., 2013) mais simples.

Diferente do nervo isquiático que apresenta diferentes tipos de fibras e arranjo polifasciculado, mais complexo. Essa arquitetura que no momento da reinervação faz com que o nervo isquiático tenha maior dificuldade na orientação do neurito em crescimento até o órgão alvo.

Os músculos sóleo e o EDL foram utilizados nesta pesquisa. O músculo sóleo é um músculo postural, de contração lenta e pouco fatigável, contendo predomínio em sua constituição fibras do tipo SO (slow oxidative), conhecido como músculo vermelho; já o músculo EDL, é um músculo de contração rápida, oposto do músculo sóleo, e se contrai somente quando é exigido por algum movimento, apresenta predomínio em sua composição fibras do tipo FG (fast glycolity), portanto é fatigável facilmente e é conhecido como músculo branco. Ambos os músculos são relatados na literatura na investigação da resposta após reinervação de nervos periféricos (MINATOMO, 2007; RADTKE et al., 2009).

Dias (2011) também utilizou esse dois músculos em seu estudo, relatando a importância de se conhecer a resposta da reinervação em músculos de características opostas e conhecer qual é mais sensível aos fenômenos da atrofia.

#### **5.4 - LESÃO NERVOSA E “GAP”**

A lesão classificada como neurotmeose por Seddon (1943), mais especificamente a grau V classificada por Sunderland (1978) é a injúria de nervo periférico mais grave e com a menor perspectiva de melhora, sendo o reparo cirúrgico obrigatório nesses casos.

Quando não há perda de tecido neural o reparo cirúrgico é feito através da neurorrafia termino-terminal, a qual quando realizada por um cirurgião experiente e no período de até seis horas após a lesão, a evolução do quadro tem bom prognóstico (BATISTA et al., 2010, TOBY et al., 1996).

Quando a lesão apresenta perda de seguimento axonal maior que 3 centímetros, considerando os seres humanos, a neurorrafia não pode ser feita. Um intervalo, chamado de “gap” é formado entre os cotos do nervo, sendo documentado na literatura que a tração gerada pela sutura dos cotos do nervo causa microlesões

em toda a extensão do axônio, o qual gera fibrose prejudicando os cones de crescimento e a orientação do axônio ao órgão alvo (FÉLIX et al., 2013; WONG; SCOTT, 1991).

Na literatura, encontra-se grande variação de “gaps” utilizados na pesquisa experimental, variando em média de 5 a 20mm em ratos. Em outras cobaias, como o macaco encontram-se “gaps” de 40mm, em cães de 20, 30, 40mm, chegando até 80mm (GU et al., 2011).

Nesta pesquisa foi utilizada um intervalo de 10 mm em ratos wistar, o qual é utilizado e consolidado por diversos autores (RAHIM MOHAMMADI et al., 2013, PAPALIA et al., 2013), demonstrando-se a indução de uma lesão grave.

Saito et al., (2003), ainda relatam que em lesões com “gaps” a partir de 10 mm os mecanismos de neurofismo entre o coto proximal e distal são comprometidos, diminuindo o poder de orientação do neurito em crescimento.

## **5.5 - TÉCNICA CIRÚRGICA**

O padrão ouro na atualidade para tratamento da neurotmese V é o enxerto autólogo, o qual utiliza um seguimento de tecido nervoso do próprio paciente para realizar a comunicação entre os cotos nervosos (MILLES, 1986).

Segundo Lin et al., (2013), Isaacs (2013) essa técnica cirúrgica apresenta algumas desvantagens como: perda da inervação no sitio do nervo doador, formação de neuroma, resultados funcionais ruins, escassez e limitações de fontes doadoras, como em casos que o calibre do nervo lesado é maior que o doador, sendo necessário à realização de várias pontes de enxerto, diminuindo muito a taxa de recuperação.

Entretanto, na tentativa de minimizar essas perdas motoras e sensitivas, técnicas microcirúrgicas estão sendo estudadas, como a neurorrafia termino-lateral com ou sem janela epineural (VITERBO, 1992) que demonstram resultados promissores e a técnica de tubulização, que foi a cirurgia empregada neste estudo. Diversas vantagens podem ser atribuídas a esta técnica que utiliza um tubo de origem biológica ou sintética para a substituição do “gap” nervoso.

Uma das vantagens desta técnica começa pelo próprio tubo, o qual pode direcionar o axônio e a mielina do coto proximal até o coto distal, conter e alojar

fatores neurotróficos, diminuir a invasão de tecido conjuntivo, auxiliar no direcionamento e regeneração vascular, criando assim, um microambiente mais favorável à regeneração com qualidade do nervo e ainda dificultando a formação de neuromas (KONOFAOS; VER HALEN, 2013).

## 5.6 ENXERTO VENOSO

No início do século, foi comprovada com sucesso a utilização dos enxertos de vasos sanguíneos como uma alternativa para a reparação nervosa (WREDE, 1909; WANG et al., 1995).

Primeiramente Lundborg (1981) demonstrou as vantagens da tubulização onde os axônios regeneraram espontaneamente em direção ao seu alvo (quimiotropismo) através tubos endoteliais artificiais (LUNDBORG et al., 1981). Quimiotropismo específicos, de fibras motoras e sensoriais, respectivamente, foi demonstrado por Brunelli et al. (1987), com uso do enxerto venoso em ratos (RATH; GREEN, 1991).

Além disso, a veia apresenta ao paciente uma mínima perda por sua retirada, compatibilidade imunológica e apresenta grande variedade de calibres, diferente da técnica de enxerto nervoso autógeno (TANG et al., 2008).

Enxertos venosos têm sido usados com sucesso por vários pesquisadores (DE CASTRO RODRIGUES; DAL PAI SILVA, 2001; FERRARI et al., 1999, ROSA-JUNIOR, 2010, MARCOCCIO; VIGASIO, 2010; ZHANG et al., 2002) para preencher as lacunas nos nervos periféricos. Várias pesquisas também foram realizadas utilizando tubos artificiais (MACKINNON; DELLON, 1990; LUNDBORG et al., 1982; MACKINNON; DELLON, 1990; ICHIHARA; NAKAMURA, 2008), tubos contendo fatores de crescimento (RICH et al., 1989; AEBISCHER et al., 1989) e células de Schwann (ANSSELIN et al., 1997). Entretanto, todos estes enxertos e tubos se limitam a lesões de pequena extensão nos nervos periféricos (BRUNELLI et al., 1993).

Pogrel et al. (2001) em um estudo clínico, analisando a regeneração dos nervos lingual e alveolar inferior, verificou que a veia pode formar um canal fisiológico para a regeneração do nervo. Mas, pontua que os melhores resultados são em intervalos mais curtos. E ainda, que existe maior taxa de sucesso no nervo alveolar inferior devido ao seu trajeto ósseo e maior taxa de insucesso no nervo

lingual em “gaps” longos devido aos movimentos da língua que poderiam ocasionar o colapso e/ou a dobradura da veia.

WALTON et al, (1989) concordam que a utilização de enxertos venosos pode ser útil apenas em secções nervosas de reduzido tamanho e em nervos monofasciculados, entretanto, WANG et al, 1993 observou em nervos mistos e principalmente motores, como o nervo isquiático, ocorre melhora na capacidade regenerativa de suas fibras.

Esta melhora na capacidade regenerativa associou-se à laminina e ao colágeno, que são componentes da túnica média e externa das veias (FERRARI et al., 1999; TOS et al., 2012).

Em adição e considerando que ao longo da vida o indivíduo está sujeito a traumas que se recuperam bem na ausência de perda tecidual nervosa, num feixe vâsculo-nervoso, o nervo encontra-se em contato direto com a adventícia de artérias e veias e a laminina, o colágeno e a fibronectina atuam como fatores tróficos na regeneração axonal, e então essa comparação poderemos obter resultados da regeneração nervosa utilizando-se enxerto venoso ao avesso e enxerto venoso normal e poderemos estabelecer como também verificar se a inversão da veia proporciona um melhor micromeio para o processo de regeneração muscular, ou seja, do órgão alvo, tanto no âmbito morfológico quanto funcional.

## **5.6 - RESULTADOS FUNCIONAIS**

Os resultados funcionais são imprescindíveis em um estudo da regeneração nervosa periférica, já que a volta da função é o objetivo máximo desta linha pesquisa. Entretanto esta avaliação ainda hoje é muito discutida, e para alguns autores, sua reprodução é subjetiva.

Para Monte-Raso et al., (2006) o índice funcional do isquiático em ratos é plenamente confiável e reprodutível após a segunda semana de uma lesão por esmagamento, para tal conclusão, os autores fizeram um exame de produtividade entre diferentes examinadores. Este achado concorda com nossos resultados, pois nos animais desnervados não foi possível realizar o índice, como observado na Figura 5, observa-se o arrastar total da pata lesada.

Estudos pioneiros de De Medinaceli, et al., (1984) tornaram a avaliação em um método quantitativo, não invasivo e confiável *in vivo* do nervo isquiático, chamado de “Walking track”.

Bain et al., (1989) discutiram o índice imposto por De Medinaceli, e baseado em seus estudos pioneiros, aperfeiçoaram alguns fatores, como por exemplo, a exclusão da distância entre as pegadas, pois a velocidade da pegada que não é aferida na análise, poderia alterar este fator. Ainda neste trabalho, os autores padronizaram o índice para cada ramo do nervo isquiático: o fibular comum e o tibial posterior, refinando ainda mais as análises. Neste estudo foi utilizada essa metodologia para a interpretação da pegada.

Para a captura da pegada dos animais, a metodologia foi baseada em estudo de De Medinaceli et al., (1984), mais com algumas alterações. Pois no método do autor a transferência da pegada dos animais era aferida pintando-se as patas traseiras do animal, o qual passava por uma caneleta impregnando suas pegadas em um papel localizado no assoalho da caneleta, problemas com borramento e dúvidas em algumas aferições eram frequentes, principalmente em análises em animais reinervados. Mas autores pioneiros como Varejão et al., (2003) criaram um método cinematográfico usando uma câmera acoplada a uma canaleta transparente para a captura das imagens enquanto os animais caminham, fazendo assim, que as variáveis citadas acima fossem excluídas. A partir dessa ideia muitos outros autores passaram a utilizar esse meio para captura das pegadas, como na presente pesquisa.

Os resultados das análises não mostraram diferença significativa na comparação do grupo com a veia normal com o grupo com a veia invertida nos dois períodos de tempo estudados, demonstrando funcionalmente que a inversão da veia não demonstra ganho funcional.

Papalia et al., (2013) encontrou resultados funcionais ruins utilizando veia normal preenchida por tecido gorduroso autólogo com um “gap” de 10mm. Também Mohammadi et al., (2011) utilizou veia invertida em um “gap” de 10mm e observou uma pequena melhora a partir da oitava semana, mais ainda ao final de 12 semanas não apresentava índice significativamente bom, os autores ainda concluem que o índice funcional é mais eficiente e confiável que os métodos histológicos para se investir a regeneração dos nervos periféricos.

Estes trabalhos corroboram com os achados deste trabalho, mostrando que na décima segunda semana pós-cirúrgica ainda não é encontrada uma boa função do nervo isquiático, por meio da análise do índice funcional.

## 5.7 - RESULTADOS HISTOLÓGICOS

O estudo morfológico quantitativo é a forma de investigação mais tradicional na reparação de nervos periféricos. Muitos autores defendem, principalmente a morfometria da fibra nervosa como um método confiável para a avaliação do nervo em regeneração. Já quando avaliado a regeneração através do músculo reinervado comumente a área de secção transversal das fibras é avaliada. Observa-se maior número de trabalhos tendo como objeto de estudo o nervo, mas se faz lembrar, que a importância do estudo da recuperação do órgão alvo, pois está diretamente relacionada à recuperação funcional. Nesta pesquisa o músculo estriado esquelético (GUDA et al. 1993; HENTZ et al., 1991).

Além da área da secção transversal, importante parâmetro que está diretamente relacionado com o poder de contração da fibra, outras aferições são feitas, dentre elas: o diâmetro mínimo.

Essa aferição trata-se mais de uma forma de avaliação do padrão do corte, pois quando se avalia a área, as fibras podem não estar totalmente em plano transversal, principalmente os músculos que sofreram desnervação, o qual se encontram fibras atroficas, que podem gerar desconformações no arcabouço muscular e causar alterações no estudo. Com o diâmetro mínimo esta variável é controlada, pois através desta aferição se faz a correlação com área, porque mesmo existindo alteração no plano transversal da fibra o diâmetro mínimo dificilmente vai alterar-se.

O diâmetro mínimo e a área estudada nesta pesquisa, em ambos os músculos e períodos mostraram correlação entre os dois parâmetros, mostrando que o corte não sofreu alterações significativas, tornando a interpretação dos resultados confiáveis.

Por meio da área da fibra observa-se atrofia mais abrupta do músculo sóleo (GVI6 = 73% e GVN6= 71%) comparado com o EDL (GVI6=57% e GVN6= 49%) em 6 semanas, mostrando que as fibras vermelhas sofrem de forma mais severa o processo de desnervação, quando comparado com as fibras brancas. Um fator que

pode explicar este fato pode ser a própria função do músculo sóleo, um músculo postural que se contrai a todo o momento, portanto apresenta predomínio de fibras lentas, diferente do músculo EDL, o qual se contrai em alguns momentos, e apresenta predominantemente fibras de contração rápida.

Assim, com a perda do poder de contração, a perda de área é mais severa, por apresentar na sua constituição um maior número de fibras que se contraíam a todo momento. Outra explicação seria que o músculo EDL sofre um alongamento passivo feito pela própria posição das patas dos animais quando ficam em posição plantar, ajudando na prevenção dos efeitos deletérios da atrofia (WASHABAUGH et al., 2001).

Foi observado em mais uma análise que não houve diferença na utilização da veia normal ou invertida, tanto na análise do diâmetro mínimo quanto da área nos dois músculos e períodos estudados.

Kelleher et al. (2001) também fizeram a comparação entre o uso da veia normal e invertida, tendo como objeto de estudo a análise do nervo, e observaram também semelhança entre os grupos experimentais, através da análise histológica quantitativa do nervo e através da complementação da análise eletrofisiológica, concluíram que não há diferença na funcionalidade ao se inverter a veia.

No período de evolução de 6 para 12 semanas houve redução da atrofia muscular, observado por meio da área de secção transversal das fibras, tanto no músculo sóleo (GVI12= 35% e GVN12=40%) quanto no músculo EDL (GVI12 30% e GVN12= 29%) mostrando que a reinervação foi bem reestabelecida. Portanto com a interação mioneural estabelecida, observou-se de 6 para 12 semanas a evolução da área de secção transversal das fibras do músculo sóleo (GVI= 38% e GVN=31%) e EDL (GVI= 19% e GVN= 28

Dias (2011) estudou a regeneração do nervo isquiático utilizando tubo de polietileno poroso com preenchimento de tecido gorduroso e observou resultados semelhantes nos resultados da morfometria dos músculos, mas com um tempo de análise maior, de 21 semanas.

## **5.8 - RESULTADOS DA DENSIDADE DE TECIDO CONJUNTIVO**

O tecido conjuntivo mantém contato íntimo com as fibras musculares, organizando e formando um arcabouço para o músculo, tornando assim possível a

contração muscular. Sua distribuição no músculo é didaticamente dividida em 3 envoltórios. O epimísio, a camada mais externa de tecido conjuntivo, constituída principalmente de colágeno tipo I, assegura rigidez e força mecânica nas contrações. O perimísio, a camada que agrupa grupos de fibras musculares, formando os fascículos, é constituído predominantemente de colágeno tipo I e III. E o endomísio, a camada mais interna, a qual envolve as fibras musculares, portanto é a bainha mais íntima a fibra muscular, sendo constituída principalmente de colágeno tipo I, III e V.

Esses envoltórios comunicam-se entre si, e quando o músculo perde sua principal característica, ou seja, o poder de contrair, esse tecido também sofre alterações.

A invasão de tecido conjuntivo principalmente no perimísio e no endomísio das fibras musculares é a alteração mais característica. A composição do tipo de colágeno também é observada, teores maiores de colágeno tipo I no perimísio e endomísio são encontrados, os quais fazem com que a contração muscular torne-se prejudicada, explicada pela rigidez deste tipo de colágeno. Autores afirmam que essas alterações interferem na microcirculação sanguínea das fibras musculares, na recuperação funcional e na interação neuromuscular após a reinervação do músculo. (MINATOMO, 2007).

A percentagem de tecido conjuntivo em músculos sadios gira em torno de 1 a 10% (MURPHY et al., 2013; NACU et al., 2013). Nos GC deste estudo, nos músculos sóleo e EDL nos dois períodos estudados corroboram com os achados da literatura.

Tanto o GVI quanto o GVN no período de 6 semanas após a reinervação apresentam valores de densidade de tecido conjuntivo superiores ao padrão (valores > 10%), sendo que o músculo sóleo foi o mais afetado.

No período de 12 semanas observa-se no músculo sóleo a manutenção da densidade encontrada no período de 6 semanas tanto no GVI quanto no GVN, sendo que o GVI com maior densidade de tecido conjuntivo. No entanto, no músculo EDL, no período de 12 semanas o GVN apresenta valores dentro do padrão (< 10%) e apresentando valores semelhantes ao GC12. Também é observada uma redução de densidade no GVI neste período, mas com valores superiores ao padrão.

Murphy et al. (2013) acreditam que o tecido conjuntivo em excesso no músculo em regeneração pode acarretar resultados funcionais ruins. Em nosso

trabalho a densidade do tecido conjuntivo na grande maioria dos grupos reinervados, apresentou percentagem de tecido conjuntivo acima do normal e na avaliação funcional, resultados ruins também foram vistos.

Portanto, a densidade de tecido conjuntivo nos músculos é um fator determinante na recuperação funcional e a sua comparação deve ser feita. Métodos mais sofisticados, os quais mostram qual tipo de tecido conjuntivo esta sendo substituído no músculo reinervado deve ser mais investigada.

Pois como observado no GVN12 no músculo EDL, que conseguiu obter densidade de tecido conjuntivo entre 1 e 10%, mais sem um resultado funcional bom. Uma explicação para este fato, é que como não sabemos que tipo de tecido conjuntivo esta presente neste músculo reinervado, a sua percentagem pode estar padrão, mais com uma constituição do tipo de tecido conjuntivo, principalmente no perimísio e no endomísio, desorganizada para sua função, explicando os resultados funcionais ruins.

## **5.9 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

As associações feitas entre os diferentes tipos de análise com o objetivo de correlacionar resultados sempre são objetos de discussão em trabalhos desta linha de pesquisa, a histológica com a análise funcional, a histológica com o peso dos músculos estudados, são exemplos dessa tentativa. Oliveira et al. (2001), Mendonça et al. (2003), Monte Raso et al. (2005) defendem que existe a correlação entre o índice funcional com a análise histológica quantitativa.

Dias (2011), Mohammadi et al., (2011), Rosa-Junior (2010), em contrapartida, não concordam que essa correlação é correta. Nos resultados obtidos nesta pesquisa, parece que não existiu correlação entre o índice funcional e a histologia quantitativa.

Mohammadj et al., (2011) diferente da grande maioria dos autores que estudam a morfometria como a análise principal, conclui que o índice funcional é a análise mais confiável para a reparação de nervos periféricos.

Rosa-Junior (2010) e Dias (2011), concluem que a regeneração funcional é mais demorada e, portanto, precisa de um tempo maior de análise para sua comparação, vale lembrar, que em ambas as pesquisas citadas foram feitas análise 150 dias pós-cirúrgico.

Nicks et al. (1989), concordam que há correlação com a área de secção transversal da fibra com os valores de peso do músculo, mas ressalva que quando se analisa o peso muscular deve-se entender que é uma análise mais subjetiva, pois edemas, principalmente em músculos que sofreram desnervação e o tecido conjuntivo são também contabilizados, mas lembra que a análise da secção não é 100% segura, pois sofre alterações pela angulação, no caso deste estudo, minimizada pela relação com o diâmetro mínimo relatado acima, e os métodos histológicos que de alguma forma podem alterar o tecido.

Em nossos achados observamos que parece haver uma relação em perda de massa muscular com perda de área de secção transversal, comparando os grupos experimentais com os controles. Como visto no músculo sóleo, nos grupos GVI e GVN, quando se obteve a perda de 73% e 71% da área a perda de peso foi de 69% e 69%, respectivamente; já no EDL, observamos no GVI e GVN, quando se obteve a perda de 57% e 49% da área a perda de peso foi de 67% e 62%, respectivamente. Estudos estatísticos devem ser realizados para podermos afirmar algo, considerando as limitações das análises.

## **5.10 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As buscas por melhores resultados funcionais na regeneração de nervos periféricos são constantes. Nos achados deste trabalho, parecem mostrar de que a regeneração funcional não depende somente da melhora histológica da fibra muscular. Outros fatores devem ser investigados. A densidade de tecido conjuntivo no músculo, bem como sua constituição e os tipos colágenos encontrados, mostra-se ser crucial para bons resultados funcionais.

Outro fator de investigação que parece ser muito importante nesta linha de pesquisa, que não foi abordado no estudo, é a qualidade da interação mioneural, ou seja, estudar e de alguma forma intensificar a qualidade que o axônio motor se enterra com a placa motora, pois, parece que somente um resultado histológico promissor não garante um resultado funcional bom.

## 6 – CONCLUSÃO

1. O enxerto de veia invertida e o enxerto de veia normal atuaram favoravelmente na regeneração muscular;
2. Nos parâmetros de área de secção transversal e diâmetro mínimo os grupos veia normal (GVN) e veia invertida (GVI) apresentam resultados semelhantes em ambos os músculos estudados;
3. Na quantificação de tecido conjuntivo o grupo veia normal (GVN) apresentou resultados superiores ao grupo veia invertida (GVI);
4. O músculo vermelho (sóleo) sofre uma resposta mais severa a lesão estabelecida no estudo, comparado com o músculo branco (EDL);
5. Os resultados funcionais indicam semelhança entre o grupo veia normal (GVN) e grupo veia invertida (GVI).

## 7 – REFERÊNCIAS

AEBISCHER, P.; SALESIOTIS, A. N.; WINN, S. R. Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. **Journal Neuroscience Research**, v. 23, p. 282-289, Jul. 1989.

ANSSELIN, A. D.; Fink, T.; DAWEY, D.F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, Australia, v. 23, n. 5, p. 387-398, Out.1997.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plastic Reconstructive, Surgical**, Ontario, v.83, p. 129, Jan. 1989.

BRUNELLI, G., FONTANA, G.; JAGER, C.; BARTOLAMINELLI, P.; FRANCHINI, A. Chemotactic arrangement of axons inside and distal to a venous graft. **J Reconstructive Microsurgery**, Brescia, v. 3, n. 2, p. 87-89, Jan. 1987.

BRUNELLI, G.; BATTISTON, B.; VIGASIO, A.; BRUNELLI, G.; MAROCOLO, D. Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. **Microsurgery**, Brescia, v. 14, p. 247-251, Mar. 1993.

CLOUTIER, F. C.; ROULEAU, D. M.; HÉBERT-DAVIES, J.; BEAUMONT, P. H.; BEAUMONT, E. Atorvastatin is beneficial for muscle reinnervation after complete sciatic nerve section in rats. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 47, n. 6, Dez. 2013.

DAHLIN, L. B.; BRANDT, J. Basic Science of Peripheral Nerve Repair: Wallerian Degeneration/Growth Cones. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 14, n. 3, p.138-145, Nov. 2004.

DE MEDINACELI, L.; DERENZO, E.; WYATT, R. J. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. **Computers and Biomedical Research**, Washington, v. 17, n.2, p. 185-92, Abr. 1984.

DEUMENS, R.; BOZKURT, A.; MEEK, M. F.; MARCUS, M. A. E.; JOOSTEN, E. A. J.; WEIS, J.; BROOK, G. A. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. **Progress in Neurobiology**, USA, v. 92, n. 3, p. 245-276, Nov. 2010.

DIAS, D. V. **Tecido adiposo e enxerto com tubo de polietileno poroso usados na técnica de tubulização influenciaria na reinervação de músculos de contração lenta e rápida de ratos?**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

DUPLAS, J.; VACHON, P.; CUVELLIEZ, S.; BLAIS, D. Anesthésie du lapin de Nouvelle-Zélande utilisant les combinaisons tiletamine-zolazepam et ketamine-midazolam avec ou sans xylazine. **Canadian Veterinary Journal**, Quebec, v. 42, n. 6, p. 455-460, Jun. 2001.

FÉLIX, S. P.; PEREIRA LOPES, F. R.; MARQUES, S. A.; MARTINEZ, A. M. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. **Microsurgery**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p. 468-477, Set .2013.

FERRARI, F.; RODRIGUES, A. C.; MALVEZZI, C.K.; DAL PAI, M. S.; PADOVANI, C.R. Inside-out vs. standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. **The Anatomical Record**. Brasil, v. 256, p. 227-232, Nov.1999.,

GEORGIU, M.; BUNTING, S.C.; DAVIES H.A.; LOUGHLIN A.J.; GOLDING, J.P.; PHILLIPS, J.B. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. **Biomaterials**. Milton Keynes, v. 34, n. 30, p. 7335–7343, Out. 2013.

GU, X.; DING, F.; YANG, Y.; LIU L. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. **Progress in Neurobiology**, China, v.93, n.2, p. 204-230, Dez. 2011.

HENTZ, V.R.; ROSEN, J.M.; XIAO, S.J.; MCGILL, K.C.; ABRAHAM, G. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. **The Journal of Hand Surgery**, California, v.16, n. 2, p.251-261, Mar. 1991.

HUNDESHAGEN, G.; SZAMEIT, K.; THIEME, H.; FINKENSIEPER, M.; ANGELOV, D. N.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; IRINTCHEV, A. Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. **Neuroscience**, Jena, v. 248, p. 307-318, Set. 2013.

HUPP, J.R. **Neuropatologia Facial. In Cirurgia Maxilofacial Contemporânea**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, P. 678-691, 2000.

ICHIHARA, S.; INADA, Y.; NAKAMURA, T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts, **Injury**. Kyoto, v. 39, n. 4, p. 29-39, Out. 2008.

ISAACS, J. Major Peripheral Nerve Injuries. **Hand Clinics**, Virginia, v. 29, n. 3, p. 371-382, Ago. 2013.

KANE, D. D.; SHOTT, S.; HUGHES, W. F.; KERNS, J. M. Motor Pudendal Nerve Characterization in the Female Rat. **Anatomical Record**, v. 266, n. 1, p. 21-29. Jan. 2002.

KELLEHER, P.; AL-BRI,K.; ELEUTÉRIO, L. M.; MYLES, L. M. The use of convencional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 54, n. 1, p. 56-57. 2001.

KONOFAOS, P.; VER HALEN, J. P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. **Journal Reconstructive Microsurgery**, Germantown, v. 29, n.3, p. 149-164, Jan. 2013.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle Nerve**, São José do Rio Preto, v. 34, n. 6, p. 785–788, Dez. 2006.

LAMPERT, R. C.; NESBITT, T. R.; CHUANG, S. K.; ZICCARDI, V. B. Management of endodontic injuries to the inferior alveolar nerve. **Quintessence**, v. 47, n. 7, p. 581-587, 2016.

LEE, C. H.; LEE, B. S.; CHOI, B. J.; LEE, J. W.; OHE, J. Y.; YOO, H. Y. Recovery of inferior alveolar nerve injury after bilateral sagittal split ramus osteotomy (BSSRO): a retrospective study. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 38, n. 1, p. 1-4, Jul. 2016.

LIN, M. Y.; MANZANO, G.; GUPTA, R. Nerve Allografts and Conduits in Peripheral Nerve Repair. **Hand Clinics**, Irvine, v.29, n. 3, p. 331-348, Ago. 2013.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R.H.; LONGO, F.M.; POWELL, H.C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone chambers. Influence of gap length and distal stump contents. **Experimental Neurology**, Suíça, v. 76, n. 2, p. 361-375, Maio. 1982.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.P.; HANSSON, H.A; LARSSON K. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium, and epineurium in preformed mesothelial tubes - an experimental study on the sciatic nerve of rats. **Journal of Neuroscience Research**, Suíça, v. 6, n. 3, p. 265-281, 1981.

LUNDBORG, G.; RICHARD, P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair - A challenge to the plastic brain. **Journal of the Peripheral Nerve System**, v. 8, n. 4, p. 209-226. Dez. 2003.

MACKINNON, S.; DELLON, A.L. A study of nerve regeneration across synthetic (maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. **Journal Reconstructive Microsurgery**, Itália, v. 6, n. 2, p. 117-121, Abr. 1990.

MACKINNON, S.E.; DELLON, A.L. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. **Plastic Reconstructive Surgical**, Ontario, v. 85, n.3, p. 419-424, Mar. 1990.

MARCOCCIO, I.; VIGASIO, A. Muscle-in-Vein Nerve Guide for Secondary Reconstruction in Digital Nerve Lesions. **The Journal of Hand Surgery**. Brescia, v. 35, n. 9, p. 1418-1426, Set. 2010.

MARIN, L.; QUEIROZ, M. S. A atualidade dos acidentes de trânsito na era da velocidade: uma visão geral. **Caderno. Saúde Pública [online]**. Brasil, v. 16, n. 1 p. 7-21, 2000.

MELLO JORGE, M. H. P.; LATORRE, M. R. D. O. Acidentes de Trânsito no Brasil: Dados e Tendências. **Caderno de Saúde Publica**, Brasil, v. 10, p. 19-44, 1994.

MENDONÇA, A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal of Neuroscience Methods**. Ribeirão Preto, v. 129, p. 183-190. Out. 2003.

MILLES, H. The nerve gap. Theory and clinical practice. **Hand Clinics**, Austria, v.2, n. 4, p.651-663, Nov. 1986.

MINAMOTO, V. B. Efeitos da desnervação no músculo esquelético: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, v. 20, n. 3, p. 63-69, jul. 2007.

MOHAMMADI, R.; NIKONAMB, N.; MEHRTASHB, M.; AMINI, K. Ketoprofen combined with artery graft entubulization improves functional recovery of transected peripheral nerves. **Journal of cranio-maxillo-facial Surgery**, Iran, v.42, n. 8, p. 2076-2081, 2014.

MONTE RASO, V.V.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N.; FASAN, V.S. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? **Journal of Neuroscience Methods**, Ribeirão Preto/Brasil, v. 142, n. 2, p. 185-92, Mar. 2005.

MURPHY, M. M.; LAWSON, J. A.; MATHEW, S. J.; HUTCHESON, D. A.; KARDON, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development**. USA, v. 138, n. 17, p. 3625-3637, Set. 2011.

NACU, E.; GLAUSCH, M.; QUANG LE, H; DAMANIK, F. F. R.; SCHUEZ, M.; KNAPP, D.; KHATTAK, S.; RICHTER, T.; TANAKA, E. M. Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. **Development**, Alemanha, v.140 n. 3, p. 513-518, Fev. 2013.

NICKS, D. K. BENEKE, M. W.; KEY, R. M.; TIMSON, B. F. Muscle fiber size and following immobilization atrophy. **Journal of Anatomy**, Missouri, v. 163, n. 1, p. 1-5, Set. 1989.

OLIVEIRA, E. F.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; SELLI, M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**. Brasil, v. 17, p. 69-75. Jan. 2001.

POGREL, M. A. P.; MAGHEN, A. The use of autogenous vein grafts for inferior alveolar and lingual nerve reconstruction. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 59, n. 9, p. 985-988, Set. 2001.

RADTKE, C.; VOGT, P.M. Peripheral Nerve Regeneration: A Current Perspective. **Eplasty**. Alemanha, v.12, n. 9, p. 47, Out. 2009.

RATH, S.; GREEN, C. J. Selectivity of distal reinnervation of regenerating mixed motor and sensory nerve fibres across muscle graft in rats. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 44, n. 3, p. 215-218, Abr. 1991.

RICH, K. M.; ALEXANDER, T. D.; PRYOR, J. C.; HOLLOWELL, J. Nerve growth factor enhances regeneration through silicon chambers. **Experimental Neurology**, St Louis, v. 105, p. 162-170, Abr. 1989.

RODRIGUES, A. C.; DAL PAI, M. S. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. **Microsurgery**, v. 21, n.3, p. 102-107, 2001.

ROSA-JUNIOR, GM. **Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervo periférico: Uma nova proposta**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2010.

ROSBERG, H. E.; CARLSSON, K. S.; HOJGARD, S.; LINDGREN, B.; LUNDBORG, G.; DAHLIN, L. B. Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm – analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. **The Journal of Hand Surgery**, Suécia, v. 30, n. 1, p. 35-39, Fev. 2005.

SAITO, I.; OKA, Y.; ODAKA, M. Promoting nerve regeneration through long gaps using a small nerve tissue graft. **Surgical Neurology**, Japão, v. 59, n. 3, p. 148-154, Mar. 2003.

SAYGILI, E.; KLUTTIG, R.; RANA, O. R.; GEMEIN, C.; ZINK, M. D.; RACKAUSKAS, G.; WEIS, J.; SCHWINGER, R. H.; MARX, N.; SCHAUERTE, P. Age-related regional differences in cardiac nerve growth factor expression. **Age**, Alemanha, v. 34, n. 3, p. 659-667, Jun. 2012.

SEDDON, H. J. Three types of nerve injury. **Brain**, USA, v. 66, n. 4, p. 237-288, 1943.

SARIKOV, R.; JUODZBALYS, G. Inferior alveolar nerve injury after mandibular third molar extraction: a literature review. **Journal Oral & Maxillofacial Research**, v. 5, n. 4, e1. Dez. 2014.

SU, H.; YUAN, Q.; QIN, D.; YANG, X.; WONG, W. M.; SO, K. F.; WU, W. Ventral root re-implantation is better than peripheral nerve transplantation for motoneuron survival and regeneration after spinal root avulsion injury. **BMC Surgical**, China, v. 13, n. 1, p. 21, Jun. 2013.

SUNDERLAND, S. Nerves and nerves injuries. **Edinburg, Churchill Livingstone**, p.483-650, 1978.

TANG, J.; WANG, X.M; HU, J.; LUO, E.; QI MC. Autogenous standard versus inside-out vein graft to repair facial nerve in rabbits. **Chinese Journal of Traumatology**. Chengdu, v. 11, n. 2, p. 104-109, Abr. 2008.

TOBY, E.B.; MEYER, B.M.; SCHWAPPACH, J.; ALVINE, G. Changes in the structural properties of peripheral nerves after transection. **The Journal of Hand Surgery**, Kansas City, v. 21, n. 6, p. 1086-90, Nov. 1996.

TOS, P.; BATTISTON, B.; CICLAMINI, D.; GEUNA, S.; ARTIACO, S. Primary repair of crush nerve injuries by means of biological tubulization with muscle-vein-combined grafts. **Microsurgery**, Itália, v. 32, n. 5, p. 358-363, Jun. 2012.

VAREJÃO, A. S. P.; CABRITA A. M.; GEUNA S.; PINTO P. M.; FILIPI V.M.; GRAMSBERGEN A.; MEEK, M. F. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. **Experimentaol Neurology**, Vila Real, v. 183, p. 695-99, Out. 2003.

VITERBO, F. **Neurorrafia terminolateral, estudo experimental no rato**. 1992, 118f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 1992.

WALTON, R. L.; BROWN, R. E.; MATORY, W. E. J. R.; BORAH, G. L.; DOLPH, J. L. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Plastic Reconstructive Surgery**, USA, v. 84, n. 6, p. 944-952, Dez. 1989.

WANG, K. K.; COSTAS, P.D.; BRYAN, D.J.; EBY, P.L.; SECKEL, B.R. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. **Microsurgery**. USA, v. 16, n. 2, p. 65-70, 1995.

WANG, K. K.; COSTAS, P.D.; BRYAN, D.J.; JONES, D.S.; SECKEL, B.R. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, USA, v. 14, n. 9, p. 608-18, 1993.

WASHABAUGH, C. H.; ONTELL, M.P.; KANT, J.A.; DAOOD, M.J.; WATCHKO, J.F.; WATKINS, S.C.; ONTELL, M. Effect of chronic deservation and deservation-reinnervation on cytoplasmic creatine kinase transcript accumulation. **Journal Neurobiology**, USA, v. 47, n. 3, p. 194-206, Jun. 2001.

WONG, A.Y.C.; SCOTT, J.J.A. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. **Experimental Neurology**, USA, v.114, n. 3, p.364-366, Dez. 1991.

WREDE, L. Uberbrueckung eines nervendefektes mittels seidennaht und leben venenstueckes. **Dtsch Med Wochenschr**, Russia, v. 35, p. 1125-1260, 1909.

YILMAZ, Z.; UCER, C.; SCHER, E.; SUZUKI, J.; RENTON, T. A Survey of the Opinion and Experience of UK Dentists: Part 1: The Incidence and Cause of Iatrogenic Trigeminal Nerve Injuries Related to Dental Implant Surgery. **Implant Dentistry**. v. 25, n. 5, p. 638-645, Out. 2016.

ZHANG, F.; BLAIN, B.; BECK, J.; ZHANG, J.; CHEN, Z.; CHEN, Z.W.; LINEAWEAVER, W.C. Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, China, v. 18, n. 4, p. 295-300, Maio. 2002.