
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE
AREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE
DA MARCHA COMO MÉTODO DE
AVALIAÇÃO FUNCIONAL APÓS
LESÕES NERVOSAS SEGMENTARES EM
NERVO CIÁTICO DE RATOS**

JAVIER ANDRES ARTURO ROMAN VEAS

Porto Alegre, 2009

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA COMO MÉTODO DE
AVALIAÇÃO FUNCIONAL APÓS LESÕES NERVOSAS SEGMENTARES EM
NERVO CIÁTICO DE RATOS**

JAVIER ANDRES ARTURO ROMAN VEAS

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina, pelo programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Área de Concentração em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva

Porto Alegre, 2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

R758u Román Veas, Javier Andrés

Utilização do teste de análise da marcha como método de avaliação funcional após lesões segmentares em nervo ciático de ratos / Javier Andrés Román Veas. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

108 f.: il. graf. tab.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. NERVO CIÁTICO/lesões. 2. NERVO CIÁTICO/fisiologia. 3. REGENERAÇÃO NERVOSA. 4. AVALIAÇÃO DE RESULTADO DE INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS. 5. ADESIVO TECIDUAL DE FIBRINA. 6. FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL. 7. MICROCIRURGIA. 8. MARCHA. 9. ANIMAIS. 10. RATOS. 11. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 12. SCIATIC FUNCTION INDEX. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Título.

C.D.D. 616.83

C.D.U. 611.98-018.8:599.323.4(043.3)

N.L.M. WL 400

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia

Bibliotecária CRB 10/196

Dedicatória

*Para a minha esposa, Jovita;
para Catalina e Macarena, nossas filhas;
para a minha mãe, Rina, que me educou com profunda dedicação;
para minha sogra, Jova, que sempre acreditou em nós.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva, pelas oportunidades que me proporcionou para a realização desta tarefa no Brasil e pela orientação nesta dissertação.

À Dr.^a Denise Cantarelli Machado, pela contribuição nesta pesquisa através do Instituto de Pesquisas Biomédicas.

À Prof.^a Dra. Maria Antonieta Lopes e à Bióloga Raquel Mattos, pela valiosa contribuição, ao possibilitar a utilização do Laboratório de Biologia Tecidual da PUCRS.

A Dr.^a Fernanda Masdeu, (Uruguai), cirurgiã plástica, estagiária no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS em 2008, pelo auxílio na realização das cirurgias.

Ao Sr. Thiago Giuliani, do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela orientação e assistência técnica.

Ao Gilmar Pontes Moreira, pela amizade e suporte fundamental ao cuidado dos animais de experimentação no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS;

Aos acadêmicos Denise Ferreira, Rafael Lessa, Rebeca Regert e Vanessa Trotta, pelo auxílio na realização das etapas experimentais e por suas idéias para melhorar a nossa pesquisa.

Ao Prof.^a Ceres de Oliveira, pela orientação na análise estatística dos resultados.

Ao Prof. Dr. Rodolfo Lopez Allendes, por deixar me partir da cidade de Temuco, Chile, para seguir um sonho e pelo apoio constante para completar a minha tarefa.

Ao CAPES, por disponibilizar a oportunidade de realizar este Mestrado.

RESUMO

Introdução: O tratamento de lesões com perda dos nervos periféricos é ainda um problema não resolvido. Na área de pesquisa experimental, modelos animais com perdas nervosas de grande porte têm sido usados com o objetivo de estudar o efeito de substâncias promotoras da regeneração axonal adicionadas dentro de sistemas de tubulização. Como medida de regeneração nervosa, o efeito funcional é considerado como o mais importante – o índice funcional da marcha, ou Sciatic Function Index (SFI), é o método mais utilizado nas lesões de nervo ciático em ratos; seu uso, porém, tem sido questionado em modelos de transecção nervosa (neurotome). O objetivo do presente trabalho experimental é estudar o desempenho do SFI, em um modelo de transecção e perda de grande porte (12 mm) em nervo ciático de ratos, com o fim de verificar se a utilização do SFI é uma ferramenta confiável para diferenciar padrões de recuperação funcional e regeneração nervosa após perdas segmentares de grande porte em ratos.

Métodos: Foram utilizadas 30 fêmeas de ratos Wistar, adultos, isogênicos, divididos em 5 grupos, nos quais se realizou uma perda de 12 mm do nervo ciático direito. Posteriormente, tal perda foi reparada com auto-enxerto ou com tubo de silicone preenchido com uma matriz de fibrina, onde se adicionaram células mononucleares de medula óssea (CMMO), fator de crescimento neural (NGF) ou uma combinação destes. O índice funcional da marcha (SFI) foi medido entre as 5^o e 16^o semanas após a cirurgia.

Resultados: Do total de ratos tratados com tubo, 21 dos 24 animais falharam em reconstituir nervo no tubo (87,5%). Os três animais em que se evidenciou crescimento de nervo dentro do tubo não mostraram diferenças no SFI em relação aos outros em que não cresceu nervo. Todos os animais com tubulização mostraram ausência de recuperação funcional no SFI durante o seguimento. Depois de 16 semanas, a média do SFI \pm DP dos 4 grupos com tubo foi $-77,88 \pm 8,3$, obtendo valores significativamente piores aos obtidos com auto-enxertos, com média SFI \pm DP, $-56,97 \pm 12,71$, com valor $p=0,003$. Ainda que a diferença tenha sido significativa, o grupo com auto-enxerto apresentou uma melhoria limitada: 43% do valor considerado normal, após 16 semanas de observação.

Discussão: As diferenças do SFI encontradas entre os grupos com ausência de efeito (tubo) e o melhor efeito possível (auto-enxerto) foi significativa ($p=0,003$); porém, a baixa precisão da estimativa e a baixa amplitude de valores encontrada entre eles determinam um método com baixo poder.

Conclusões: O índice funcional da marcha (SFI) não é um método adequado para avaliar regeneração nervosa após lesões com perda segmentar de 12 mm em nervo ciático de rato, por ter um baixo poder para detectar verdadeiras diferenças.

Palavras-chave: nervo ciático, regeneração nervosa, experimentação animal, avaliação de resultado de intervenções terapêuticas, adesivo tecidual de fibrina, fator de crescimento neural.

ABSTRACT

Introduction: Treatment of peripheral nerve loss is still a non-resolved problem. In the experimental research area, animal's models have been used, with long nerve defects, in order to study the effect of different substances with capacity of promote nerve regeneration when incorporated inside of nerve conduits. As a measure of nerve regeneration, a functional effect it's considered as the most important effect measurement, being the Sciatic Function Index (SFI) the most employed method after sciatic nerve injury in rats; however, its use has been questioned in models of nerve transection (neurotmeses). The objective of the present study is to study SFI behavior in a transection model, with a long gap of 12 mm, in rat's sciatic nerve with the aim of verify if the SFI is a reliable tool to differentiate recovery patterns of function and nerve regeneration after long sciatic nerve defects.

Methods: Thirty young adult female Wistar rats were divided in 5 groups, in which a nerve gap was created, with a gap of 12 mm in right sciatic nerve, after that, the nerve gap was repaired using autograft, or using a silicone nerve conduit, filled with fibrin glue at which bone derived stromal cells, nerve growth factor or a combination of both was added. As a functional measure the SFI was recorded each week since the fifth until the sixteen.

Results: Of 24 animals operated with tubes 21 failed to reconstitute a nerve inside the conduit (87, 5%). Of the three animals that showed nerve bridging inside the conduit, neither shown any difference in the SFI score compare with animals without nerve growth. All animals repaired with silicone tube showed absence of improvement in SFI score during all time of follow up. After 16 weeks, the average SFI \pm SD of the 4 groups with tube was $-77,88\pm 8,3$, and this average score was statistically lower than the autograft group, that was $-56,97\pm 12,71$, with a p value =0,003. Even when this difference was significant, the autograft group showed a recovery of only 43% of its normal value, after 16 weeks of follow up.

Discussion: The difference after 16 weeks of SFI score founded between groups with null effect (tube) and the best effect actually possible (autograft), was statistically significant, however the low precision of the measure and the low amplitude of possible values founded between them, cause that its method has low power.

Conclusions: The SFI is not a reliable method to measure nerve repair after long nerve gap (12mm) in a sciatic nerve injury model in rats, because its low power to detect true differences.

Key-words: sciatic nerve, nerve regeneration, animal experimentation, evaluation of results of therapeutic intervention, fibrin tissue adhesive, nerve growth factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmulas de índices funcionais específicos para diferentes tipos de lesão ...	29
Figura 2 - Fotografia do nervo ciático do rato (esquerdo).....	38
Figura 3 - Medidas usadas na determinação do índice funcional da marcha.	41
Figura 4 - Corredor clássico de Medinacelli, de 40 cm de comprimento.....	42
Figura 5 - Corredor comprido utilizado pelo autor para obter registro das pegadas (80 cm).....	43
Figura 6 - Diferença entre as marcas de pegadas feitas com tinta Nanquim e cola (esquerda) e as feitas com azul de bromofenol.....	44
Figura 7 - Contenção manual para pintar as patas do rato.....	45
Figura 8 - Seleção de pegadas para serem digitalizadas.....	46
Figura 9 - Mensuração, no programa Image J, da amplitude da pegada.	47
Figura 10 - Fotografia da zona de carga na região plantar do lado normal.	48
Figura 11 - Deformidade dos dedos em garra dos dedos do lado operado, após	53
Figura 12 - Aspecto dos dedos na pata normal (esquerda) e na operada (direita).....	53
Figura 13 - Zona de alopecia na região cirúrgica após 14 semanas	55
Figura 14 - Resultados das médias em cada grupo, conforme as semanas.	56
Figura 15 - Resultados do teste de marcha no grupo de auto-enxerto (grupo 1).....	57
Figura 16 - Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina (grupo 2).	58
Figura 17 - Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina + CMMO +NGF (grupo 3).....	58
Figura 18 - Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina + CMMO (grupo 4).	59
Figura 19 - Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina + NGF (grupo 5).....	59
Figura 20 - Distribuição amostral de duas médias, com interposição de intervalos de confiança.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais	33
Tabela 2 - Distribuição de animais por grupo experimental e por perdas	51
Tabela 3 - Variação das médias \pm DP do índice de escore funcional da marcha segundo grupo por avaliador 1.....	60
Tabela 4 - Variação das médias \pm DP do índice de escore funcional da marcha segundo grupo por avaliador 2.....	61
Tabela 5 - Comparação das médias dos 5 grupos e TEP observadas por 2 avaliadores .	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CGRP	Calcitonine Gene Related Peptide
CMMO	Células Mononucleares de Medula Óssea
DP	Desvio Padrão
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
FDA	Food and Drug Administration
EIT	Experimental Intermediary Toe Spread
EPL	Experimental Print Length
ETS	Experimental Toe Spread
<i>g</i>	Força gravitacional
<i>g</i>	Gramas(s)
IL-α	Interleucina alfa
ITS	Intermediary Toe Spread
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ng	Nanograma
NGF	Neural Growth Factor
NIT	Normal Intermediary Toe Spread
NPL	Normal Print Length
NTS	Normal Toe Spread
PFI	Peroneal Function Index
PGA	Acido poliglicólico
PL	Print Length
PTFE	Polytetrafluoroetileno
PUCRS	Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

rpm	Rotações por minuto
SFI	Sciatic Function Index
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TEP	Tamanho de Efeito Padronizado
TFI	Tibial Function Index
TIFF	Tagged Image File Format
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TOF	To Other Foot
TS	Toe spread
U	Unidade
UI	Unidade Internacional
μg	Micrograma
μL	Microlitro
®	Marca registrada
%	Por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Anatomia nervosa	16
2.2 Fisiopatologia da lesão nervosa.....	17
2.2.1 Resposta do nervo à lesão	18
2.3 Reparação da lesão nervosa	20
2.3.1 Reparação em casos de defeitos do nervo.	20
2.3.2 Conduitos biológicos	21
2.3.3 Conduitos sintéticos.....	22
2.4 Fatores que podem potencializar a resposta de reparação nervosa.....	24
2.4.1 Fator de crescimento Neural.....	24
2.4.2 Células de Schwann.....	26
2.4.3 Células mononucleares de medula óssea.....	25
2.4.4 Matriz de fibrina.....	26
2.5 Medidas de avaliação após lesão nervosa em modelo animal (rato).	26
2.5.1 Membro superior	27
2.5.2 Membro inferior	27
3 OBJETIVOS DO ESTUDO	30
3.1 Gerais	30
3.2 Específicos.....	30
4 HIPÓTESE.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Delineamento	32
5.2 Tamanho da Amostra	32
5.3 Animais	32

5.4 Materiais de preenchimento dos tubos.....	34
5.4.1 Gel de Fibrina.....	34
5.4.2 Células mononucleares de medula óssea.....	35
5.4.3 Fator de Crescimento Neural (Nerve Growth Factor, NGF).....	36
5.5 Anatomia do nervo ciático do rato	37
5.6 Procedimentos Peri-operatórios	38
5.6.1 Procedimento Anestésico	39
5.6.2 Procedimento Cirúrgico	39
5.6.3 Procedimento de Eutanásia	40
5.7 Teste de análise funcional da marcha	40
5.8 Análises Estatísticas	49
5.9 Aspectos Éticos	49
6 RESULTADOS	51
7 DISCUSSÃO	63
8 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	lxxii

APÊNDICE

Artigo submetido para publicação	83
---	-----------

ANEXO

1 INTRODUÇÃO

As lesões dos nervos periféricos são um tipo de problema encontrado com frequência na atividade clínica diária; e pelo geral ocasionam déficits funcionais significativos na população afetada. Estima-se que a prevalência de lesões de nervos periféricos em todos os pacientes com trauma seja de 2,8% (1). Nos Estados Unidos, a cada ano aproximadamente 200.000 pacientes são tratados cirurgicamente por lesões de nervos periféricos. Embora a maior parte dessas lesões não coloque em risco a vida dos pacientes, apresentam um alto impacto sócio-econômico (2, 3).

Existe, hoje em dia, um grande interesse em desenvolver novas ferramentas para poder melhorar os resultados alcançados após reparação de uma lesão nervosa – especialmente quando se trata de uma lesão completa, chegando a incitar a participação de biólogos, de químicos, de engenheiros, de bioquímicos, entre outros. Este interesse não é novo: já em 1881, pesquisadores procuravam unir os segmentos ou cotos dos nervos lesados, colocando entre eles tubos de diversos materiais de origem biológica (4).

Um dos grandes problemas que este tipo de pesquisa apresenta é a dificuldade para se quantificar o processo de regeneração nervosa. Os estudos histológicos, morfométricos, eletrofisiológicos e as medidas funcionais de regeneração têm sido bem estabelecidos no tempo, mas a correlação entre eles é escassa ou nula. Os estudos de recuperação funcional apresentam maior dificuldade em obter medidas quantitativas; são considerados, por outro lado, os mais significativos na hora de interpretar resultados (5, 6). Fibras nervosas podem regenerar sem fazer a adequada conexão com suas correspondentes origens sensitiva ou motora, mesmo que um número maior de axônios possa superestimar o número de conexões realmente funcionais. Por essa razão, a recuperação funcional não se correlaciona necessariamente com evidência de regeneração histológica ou eletrofisiológica. Já em 1942, pesquisadores demonstravam algumas formas de avaliar o grau de recuperação após a lesão de nervo ciático em ratos: media-se o grau de melhoria através da capacidade de separar os

dedos das patas traseiras (7). Um método quantitativo e reprodutível apareceu na década de 80 por meio de um sistema que visava avaliar tanto o nível de lesão como o grau de recuperação mediante as análises das pegadas incorporadas em uma fórmula, o que foi chamado índice de função ciático ou sciatic functional index (SFI). Desde então, esse método tem sido utilizado com muita frequência como medida de avaliação funcional após lesões de tipo compressão ou axonotmese. Ocorre, porém, que sua real contribuição a lesões completas do tipo transecção ou neurotmese tem sido posta em dúvida – inclusive pelo mesmo ideólogo do teste –, pois o método apresenta problemas para se obterem bons registros das pegadas, conforme o tempo passa (8, 9).

O propósito do presente trabalho é estudar o comportamento do teste funcional da marcha como medida de avaliação funcional em um modelo experimental de lesão segmentária de grande porte em nervo ciático de rato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia nervosa

A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio, constituído por um corpo celular que se continua como fibra nervosa. Esta fibra nervosa é formada pelo axônio circundado por células de suporte, as células de Schwann (equivalente aos oligodendrócitos do Sistema Nervoso Central).

Segundo a relação com a célula de Schwann, os axônios podem ser classificados como mielínicos, quando a membrana plasmática da célula de Schwann se enrola em torno do segmento de um único axônio, formando a bainha de mielina; ou podem ser axônios amielínicos, quando uma célula de Schwann envolve vários axônios em um segmento, sem enrolamento de sua membrana plasmática.

Os corpos neuronais dos neurônios sensitivos e motores encontram-se localizados no gânglio da raiz dorsal e na coluna anterior da substância cinzenta da medula, respectivamente. Desses corpos neuronais, estende-se o axônio até a periferia, constituindo uma das mais complexas e maiores células de um organismo. Seu tamanho as faz incapazes de funcionar sem o suporte estrutural e metabólico de um número aproximadamente dez vezes maior de células do tipo glia (10).

O nervo periférico consiste em um feixe de fibras nervosas organizadas, embebidas em uma matriz de conjuntivo, rico em vasos sanguíneos, chamado endoneuro. Várias fibras nervosas, de diferentes tamanhos, são agrupadas, formando os fascículos nervosos; estes, por sua vez, estão rodeados por uma bainha de tecido conjuntivo denso e forte com várias camadas de células planas (o perineuro), o que protege as fibras das compressões externas,

mantém a pressão intra-fascicular, auxilia na manutenção do fluxo axoplásmico (transporte dentro do citoplasma do axônio) e forma uma barreira de difusão entre as fibras nervosas e outros tecidos vizinhos. O perineuro varia em espessura de acordo com a proximidade das articulações – é mais denso em áreas de maior movimento. Os fascículos estão embebidos em um tecido conectivo solto, o epineuro interno, que se espessa na periferia do nervo, formando o epineuro externo, que também apresenta engrossamentos no nível das articulações.

Os vasos sanguíneos dispostos na camada epineural externa, formando um plexo possível de ser visualizado, ajudam a reposicionar o nervo na sua orientação correta na hora da sutura do mesmo, após traumas agudos. Desses vasos epineurais, pequenos ramos emergem, atravessam a barreira do perineuro obliquamente e formam um plexo de capilares no espaço intrafascicular no endoneuro.

2.2 Fisiopatologia da lesão nervosa

Embora existam variadas classificações de lesões nervosas – tais quais as de Seddon e Sunderland – o modelo proposto por Birch parece bem mais simples e prático (11), pois distingue as lesões apenas entre duas categorias: degenerativas e não-degenerativas. As primeiras incluem todas aquelas lesões em que existe algum grau de descontinuidade da estrutura anatômica do axônio, envolvendo tanto a axonotmese como a neurotmese de Seddon. Esses tipos de lesões necessariamente provocam alterações tanto proximais, no corpo neuronal, como distais, através do processo de degeneração Walleriana, que antecede o processo de regeneração neural. As lesões não-degenerativas, no entanto, não comprometem a estrutura anatômica nem a viabilidade do axônio; além disso, resultam em um bloqueio focal da condução nervosa, que se resolve tratando a causa do bloqueio (neuropraxia).

2.2.1 Resposta do nervo à lesão

Nesta seção, vamos nos referir especificamente a lesões degenerativas severas, com interrupção total ou transecção entre os elementos neurais (neurotmesa), uma vez que é o modelo de lesão que será testada na parte experimental.

Depois da secção nervosa, muitos neurônios comprometidos sofrem um processo de apoptose ou morte celular programada, o que pode atingir até 40 % dos neurônios sensitivos de menor diâmetro, que formam o gânglio da raiz dorsal – é preciso considerar que as lesões proximais provocam uma maior perda neuronal que lesões mais distais (12). Aqueles neurônios que sobrevivem à axotomia e à perda do suporte trófico por elementos provenientes do órgão alvo mudam o modo de funcionamento de “transmissão” para o modo de “supervivência” (12, 13); e a expressão dos seus genes é modificada não só para compensar a perda ou a diminuição de fatores neurotróficos derivados dos órgãos alvos, como também para poder ativar a máquina de crescimento do axônio seccionado. Dentro das primeiras horas da transecção, ambos os cotos são selados por um mecanismo provavelmente semelhante ao que acontece com axônios de invertebrados gigantes. Proximal ao sítio de axotomia, o transporte axoplásmico anterógrado continua por alguns poucos dias. O fluxo axoplásmico retrógrado também acontece no segmento distal, resultando em aumento de volume na região dos cotos; como consequência, ocorre uma concentração de organelas e potentes peptídeos vasoativos, como o CGP (calcitonine gene related peptide) o que contribui na hiperemia local ao redor do sítio de lesão. Sinais provenientes do local de lesão informam ao corpo neuronal o sítio e a extensão da lesão, o que acontece por transporte retrógrado (14). Logo depois de produzida a secção, um processo semelhante ao da apoptose provoca a destruição do esqueleto axoplásmico (por uma via caspase independente e cálcio dependente) – esse processo ocorre um ou dois dias após a lesão em roedores, e em uma semana após lesão em humanos. O coto distal, no entanto, começa com o bem caracterizado processo de degeneração Walleriana, em que citocinas inflamatórias – como TNF- α e IL- α – são secretadas pelas células de Schwann e ativam macrófagos, residentes e à distancia, e ativam as células endoteliais a produzir outras citocinas. Os macrófagos residentes, que constituem em torno de 4% da população celular normal dentro do nervo, respondem extremamente rápido após uma lesão; além disso, junto com os outros macrófagos recrutados do sangue que conseguem ultrapassar a barreira sangue-nervo transitoriamente aberta, limpam e degradam os restos de mielina, não só liberando no processo substâncias mitogênicas para células de

Schwann, como também removendo substâncias que inibem o crescimento axonal, como as glico-proteínas associadas à mielina. Assim, após três a quatro dias de lesão, as células de Schwann, no coto proximal e distal, começam a proliferar e a produzir proteínas facilitadoras do crescimento axonal e outras que ajudam a manter as células de Schwann em um estágio capaz de responder ao crescimento do axônio. Na ausência dessa proliferação das células o crescimento do axônio, desde o coto proximal, fica prejudicado (12).

Enquanto os processos degenerativos acontecem e as células de Schwann proliferam, o brotamento do axônio já está ocorrendo no coto proximal, desde as primeiras horas da lesão, tanto na região do coto como nos hemi-nodos de Ranvier. Esse processo de “negociação” do sítio de lesão é demorado, podendo precisar até 4 semanas para que a totalidade dos axônios possa cruzar do coto proximal até o distal depois de uma sutura direta (15). Após entrar no coto distal, o cone de crescimento axonal segue pela superfície interna da lâmina basal das fibras nervosas primitivas, em íntima associação com as células de Schwann alinhadas, formando as chamadas bandas de Büngner. O mecanismo pelo qual o cone de crescimento axonal seleciona qual o tubo de células de Schwann vai seguir é ainda um processo não esclarecido – existe, porém, alguma especificidade. Tem-se estabelecido que axônios motores apresentam melhor regeneração quando conectados com enxertos motores ou mistos do que quando conectados com enxertos sensitivos. (16). Quanto mais cedo o axônio alcançar o órgão distal com sucesso, maior será a chance de o nervo apresentar uma melhoria funcional.

Quando as células de Schwann desnervadas são contatadas pelo axônio em crescimento, mudam seu comportamento: deixam o ciclo de divisão celular, passam a se diferenciar e dão início ao processo de mielinização, induzidas por sinais provenientes do axônio.

Com o tempo, muitas das células de Schwann não re-inervadas sofrem apoptose e desaparecem, seja por perda do suporte trófico ou por efeito do NGF endógeno. As células que permanecem desnervadas por mais de seis meses são morfológica e funcionalmente diferentes daquelas agudamente desnervadas: perdem os receptores c-erbB neuregulina e p75 neurotrofina, que lhes possibilitam manter uma comunicação celular com o axônio, perdendo progressivamente a capacidade de dar suporte a axônios em regeneração. Essa situação é reversível ao menos em ratos (12).

A evidência experimental sugere, então, que exista uma janela de tempo relativamente estreita enquanto os neurônios estão em modo de “supervivência”, e as células de Schwann

estão com a capacidade de responder ao crescimento axonal, o que reforça a idéia de que a reparação nervosa não deve ser demorada quando existe evidência de transecção nervosa (12).

2.3 Reparação da lesão nervosa

Os tipos de reparação de um nervo lesado podem ser classificados conforme o tempo que se passa até a reparação cirúrgica. Na forma de reparação primária, isso acontece nos primeiros 5 dias após lesão, na sutura primária diferida entre 5 dias a 3 semanas, e no caso de reparação secundária após 3 semanas de lesão. Dados os eventos de reparação axonal recém-analisados, parecem ter validade os argumentos a favor de realizar uma reparação precoce.

Embora a sutura direta do nervo (neurorrafia) permaneça como padrão ouro de reparação, a utilização de cola de fibrina mostra resultados semelhantes em alguns modelos, apresentando uma menor resposta inflamatória no sítio de reparação, se comparado ao uso de suturas. Existem relatos de outros métodos, como enlace fotoquímico, que utiliza laser para estabelecer pontes de entrecruzamento entre as fibras colágenas, com resultados funcionais e histológicos semelhantes aos da neurorrafia direta (17).

Em lesões de grande porte, a sutura primária é fisicamente impossível; então reparações diferidas acontecem uma vez estabilizado o paciente e controlados os potenciais fatores de mal prognóstico – presença de tecidos desvitalizados, infecção e compromisso vascular, entre outros –, assim deixando uma perda entre os cotos, que deve ser substituída por algum tipo de conector entre eles.

2.3.1 Reparação em casos de defeitos do nervo.

Quando uma porção do nervo é perdida devido a trauma ou a uma reparação tardia, os cotos do nervo se apresentam mais rígidos, retraídos e envolvidos em cicatriz (18). O aumento do conteúdo de água, secundário ao processo de degeneração Walleriana, reduz a capacidade de alongação do nervo em até 24% (19). É importante lembrar que, se um nervo for esticado

para se tentar fechar o defeito, além de 10% de seu comprimento em repouso, ocorrerá uma grave alteração da microcirculação endoneural, com conseqüente diminuição do fluxo em torno de 50% (20). Por isso é claro que não se deve forçar a realização de uma sutura direta, se as condições dos cotos e a magnitude da perda não permitem.

O padrão ouro em reparações de defeitos neurais é um auto-enxerto; esta técnica precisa, para sua coleta, a realização de outra abordagem cirúrgica, que deixa outra cicatriz e requer o sacrifício de um nervo doador, com a conseqüente perda da função do mesmo. Além disso, sua disponibilidade é limitada em casos em que é preciso reparar lesões de vários nervos. Como conseqüência do anterior, vários potenciais substitutos de enxerto, tanto biológicos como sintéticos, têm sido testados como guias do crescimento axonal entre o coto proximal e o coto distal.

A seqüência de eventos de uma regeneração nervosa foi elucidada em grande parte utilizando experimentos com tubos de silicone que serviam como verdadeiras câmaras de estudo (21). Inúmeros estudos têm estabelecido que, no caso de regeneração nervosa dentro de tubo de silicone em lesão de nervo ciático em ratos, uma acumulação de fluidos provenientes de ambos os cotos de lesão, contendo fatores neurotróficos, preenchem a câmara no primeiro dia. Dentro de uma semana, uma ponte de fibrina é formada entre os cotos proximal e distal; então, fibroblastos e macrófagos começam a popular esta ponte de fibrina, invadindo o interior do tubo desde ambos os cotos. O coto distal apresenta as mudanças de degeneração Walleriana já descritas. Pela segunda semana, é possível perceber a presença de axônios começando a migrar junto com suas células de Schwann, fundamentais para suportar o crescimento do axônio dentro da câmara, para atingir o coto distal e, logo após, procurar seus órgãos alvo. Finalmente, em um período que pode demorar 2 meses, os axônios são mielinizados pelas células de Schwann, embora com uma espessura menor da bainha e com uma periodicidade maior entre os nodos de Ranvier, quando comparados com uma fibra nervosa normal.

2.3.2 Condutos biológicos

Themístocles Gluck, em 1881, foi o primeiro a testar a utilização de um conduto biológico para unir os extremos de um nervo seccionado – para isso, utilizou um segmento de

osso descalcificado, absorvível, idealizado por Gustav Neuber em 1879 para drenar coleções, mas sua tentativa não teve sucesso pela invasão de tecido cicatricial. Em 1882, Constant Vanlair realiza, com êxito, a primeira aplicação do sistema de tubulização: utiliza um tubo de osso descalcificado no modelo de lesão de nervo de 3 cm (em cão) e consegue demonstrar crescimento de nervo dentro do tubo. Em 1891, Büngner foi o primeiro a usar de veias como conduto para regeneração nervosa. As veias são permeáveis e ricas em fatores de crescimento (22); além disso, estão facilmente disponíveis em variedade de tamanhos e não são imunogênicas. Seu uso continua até hoje; porém, evidências demonstram que sua utilização é considerada um procedimento limitado, indicado apenas para defeitos que sejam menores de 3 cm, no caso de lesões nervosas em seres humanos (23).

Como uma tentativa de melhorar esses resultados e de evitar o colapso das paredes das veias – que ocorre quando utilizadas em defeitos maiores –, diferentes substâncias têm sido testadas dentro do lúmen da veia, como solução salina, segmentos de músculos (24), segmentos de nervo (25), células de Schwann ou colágeno (26). Estudos têm demonstrado que, quando utilizado o sistema de veia com colágeno em seu interior, os resultados são melhores do que quando utilizada solução salina – e o mesmo acontece quando é utilizado músculo esquelético fresco dentro da veia, provendo um substrato para o crescimento do axônio e a proliferação de células de Schwann. Em trabalho clínico recente realizado em pacientes com lesão de plexo obstétrico, foram utilizadas veias com remanescentes neurais suspensos em solução de heparina. O resultado demonstrou que esta configuração do conduto constituiu uma adequada câmara biológica, que permitiu o crescimento de uma lesão com uma perda equivalente a 22 cm (27).

Pequenos defeitos em modelos animais têm sido reparados com sucesso utilizando-se outro conduto autólogo, construído a partir de um segmento de epineuro (28).

2.3.3 Condutos sintéticos

As maiores experiências disponíveis com tubos sintéticos provêm da utilização de tubos de silicone (polímero de compostos de alto peso molecular feito de silicone, oxigênio e hidrogênio), material inerte, hidrofóbico, biocompatível e não-absorvível – e foi com tal material que se iniciaram as pesquisas há mais de 26 anos (29). Seu uso demonstra que o grau

de recuperação é semelhante ao do auto- enxerto, quando aplicados em defeitos de pequeno porte. Lundborg reporta que, ao se utilizar tubo de silicone vazio em lesões cortantes de nervo mediano e ulnar com perdas menores de 5 mm, obtêm-se resultados semelhantes aos obtidos com auto-enxerto, com uma média de 5 anos de seguimento pós-operatório (30); outros autores mostram bons resultados quando utilizados em defeitos ainda maiores (31). Porém, em caso de lesões com defeitos maiores de 3 cm no humano, os resultados funcionais obtidos utilizando tubo de silicone vazio são insatisfatórios. O mesmo ocorreu nos modelos animais, ficando estabelecido que, quando a perda é superior a $9,7\pm 1,8$ mm em rato, o percentual de regeneração cai a 50%, e pequenos aumentos provocam uma dramática queda nos níveis esperados de regeneração (3, 32).

Outros materiais sintéticos têm sido testados. Por exemplo, o Polytetrafluoroetileno (PTFE) – conhecido comercialmente como GoreTex[®] – caracteriza-se por sua anti-adesividade; no entanto, ainda apresenta o problema de não ser absorvível, o que pode causar compressão dos axônios na medida em que sua área de seção aumenta, conforme aumenta o processo de mielinização (33, 34).

Com a realização de novas pesquisas e com a experiência adquirida durante anos, ficou claro que um conduto sintético deveria possuir algumas características mecânicas básicas para aperfeiçoar seu desempenho. Em primeiro lugar, o tubo ideal deve permitir crescimento do axônio e lhe dar suporte (*scaffold*), já que é amplamente aceito que uma guia para o crescimento axonal é fundamental para a eficiente regeneração nervosa. Em segundo lugar, o tubo ideal deve ser semipermeável para que permita o intercâmbio de nutrientes, como glicose e oxigênio, para dentro do tubo e a saída de material de descarte para fora do tubo; deve permitir, também, o intercâmbio de proteínas, tais como fatores de crescimento. Em terceiro lugar, o tubo deve degradar-se a uma velocidade nem muito rápida para evitar a invasão de tecido cicatricial, nem muito devagar para impedir a reorganização estrutural do nervo.

Assim, surgiu uma variedade de tubos sintéticos re-absorvíveis – os mais amplamente pesquisados são os derivados de poliésteres alifáticos, como ácido poli-glicólico (PGA), (35-37), ácido poli-láctico (38, 39), e seus copolímeros (40, 41). Outro material muito utilizado é o colágeno – um dos materiais mais comumente usados também para confeccionar implantes utilizados em neurocirurgia, como por exemplo, os substitutos de dura máter. Para sua confecção, é utilizado especialmente o colágeno tipo I, de origem bovina, o qual é quimicamente tratado para modificar suas características de absorção.

Apesar do importante desenvolvimento de materiais sintéticos para construção de tubos, há ainda um número limitado destes condutos aprovados pela FDA (agência de administração americana de drogas e alimentos) (42), e poucos estudos comparativos são feitos entre eles (42-45).

2.4 Fatores que podem potencializar a resposta de reparação nervosa

Com o objetivo de conseguir melhores resultados, que os obtidos com câmaras vazias, os condutos têm sido suplementados com uma série de substâncias potencialmente promotoras do crescimento axonal. Revisaremos sumariamente algumas destas substâncias.

2.4.1 Fator de crescimento Neural

A utilização de fatores de crescimento, como o fator de crescimento neural ou *nerve growth factor* (NGF), tem sido estudada há muito tempo. Muitas pesquisas demonstram o NGF como um fator favorecedor da resposta reparadora no nervo, utilizando diversas formas de entrega do fator para o interior do tubo, desde microbombas até sua incorporação dentro da parede do tubo para sua liberação por difusão (46-63). Tem-se demonstrado que existe uma alta expressão de receptores de NGF no sítio da lesão logo após uma lesão nervosa, portanto sua adição dentro do tubo em etapas iniciais do processo regenerativo parece justificada (64, 65).

A utilização de componentes celulares no interior do tubo tem sido alternativa de suplementação, já que sua presença é fundamental para o processo de regeneração nervosa.

2.4.2 Células de Schwann

Em grandes perdas, um dos mais importantes problemas apresentado é a possível escassez em número de células de Schwann e em condição suficiente para manter a resposta reparadora e para dar suporte ao crescimento de múltiplos axônios durante o prolongado tempo de crescimento axonal. Como já mencionado, sua presença é fundamental para a regeneração nervosa, pois exercem a função de produção de fatores neurotróficos e de organização estrutural em condutos cilíndricos – bandas de Büngner –, que guiam o axônio no seu caminho até o coto distal. Muitas pesquisas têm demonstrado que a presença de células de Schwann dentro dos tubos promove maior mielinização dos axônios – melhores resultados são obtidos quando são utilizadas células de Schwann autólogas (3, 38, 66-70).

A sua utilização pode ser combinada tanto com condutos biológicos como sintéticos; contudo, é preciso considerar que sua obtenção é difícil, e seu processo de extração e purificação é complexo e demorado (71-73). Alo-enxertos e auto-enxertos acelularizados têm sido experimentalmente enriquecidos com células de Schwann autólogas, coletadas do paciente e isoladas e expandidas *in vitro* (74).

2.4.3 Células mononucleares de medula óssea

Pesquisas recentes demonstram que a utilização de células mononucleares de medula óssea (também denominadas células do estroma da medula óssea), tem a capacidade de diferenciar-se em células fenotipicamente semelhantes às células de Schwann (73, 75-79). Estas células contêm uma porção de células mesenquimais indiferenciadas, que são muito mais simples de trabalhar e de obter em quantidade suficiente – mediante aspirado da medula óssea – quando comparado com a obtenção de células de Schwann. Seu uso tem mostrado resultados semelhantes aos obtidos com células de Schwann em enxertos acelulares para reparar um defeito de nervo ulnar de 4 cm em macacos (80). Variantes deste tipo de células com potencial de diferenciação têm sido encontradas também em zonas doadoras de maior acesso e disponibilidade, como o tecido gorduroso, e os resultados são semelhantes aos alcançados com células da medula óssea (81-83).

2.4.4 Matriz de fibrina

A fibrina é um componente protéico fibrilar que, ao formar matrizes, atua como um suporte estrutural ou *scaffold* para o crescimento e regeneração de tecidos, incluindo o tecido neural. (71). Depois de uma secção nervosa, o fluido proveniente dos cotos de lesão, rico em fibrinogênio, acumula-se no sítio da lesão transformando-se em uma matriz de fibrina na presença de trombina e cálcio. Essa matriz natural serve de suporte para o crescimento do axônio e a multiplicação e migração das células de Schwann, e pode ser magneticamente alinhada para melhorar a regeneração axonal (84). Sua incorporação dentro de condutos serve como carregador de fatores de crescimento e de diversas células, como as de Schwann ou da medula óssea (61, 62, 85-89).

2.5 Medidas de avaliação após lesão nervosa em modelo animal (rato).

Um adequado método de avaliação é fundamental para determinar o tipo de reparação nervosa que será conseguida após uma lesão. Será útil, se os efeitos que ocorrem na regeneração nervosa ficarem claramente evidenciados por ele; além disso, deve ser capaz de distinguir diferenças existentes nas propriedades dos nervos regenerados (90). Embora o processo de regeneração de um nervo periférico possa ser avaliado mediante uma grande variedade de formas – como métodos de avaliação eletrofisiológica e histológica –, a avaliação funcional continua sendo a maneira mais precisa de aproximar-se ao desfecho clínico real, considerando o fato da escassa correlação existente entre os desfechos histomorfométricos, eletrofisiológicos e os resultados funcionais (5, 90-92). A análise funcional pode oferecer a melhor e mais inequívoca evidência de que o nervo não apenas se regenera, como também restabelece conexões adequadas com seus órgãos alvos, sejam estes sensitivos ou motores. Essa avaliação funcional é relativamente simples de ser realizada em humanos, pois podem responder perguntas e executar ordens específicas feitas pelos avaliadores, mas isso não acontece com os animais de experimentação (93).

2.5.1 Membro superior

Embora o nervo ciático tenha sido o modelo de lesão mais freqüentemente empregado, vêm sendo cada vez mais utilizados modelos de lesão do membro superior no rato, a fim de se tentar estabelecer uma maior semelhança com as lesões dos membros superiores em humanos. Isso porque o rato tem a habilidade de pegar e manipular sua comida utilizando seus antebraços e mãos; essa observação para a manipulação de objetos de formas e tamanhos diversos pode ser então observada e quantificada. O rato pode ser, além disso, treinado para realizar uma ampla variedade de tarefas de alcance e pegada por meio de mecanismos de reforço condicionado. É preciso considerar que a avaliação funcional do membro superior do rato é complexa, que inúmeros testes são necessários para determinar cada uma das habilidades testadas, e muitas dessas habilidades testadas estão inter-relacionadas.

As complexidades dos movimentos do membro superior são evidenciadas pelo grande número de provas que têm sido desenvolvidas para estudar alguma alteração sutil. Uma delas, por exemplo, é o alcance de pegada de comida ou objetos. Neste teste, gaiolas que dificultam a tarefa de pegada são empregadas, assim como um bracelete que isola o membro do rato a ser utilizado, para que seja possível estudar o movimento por vídeo e o decompor em diferentes componentes.

Outro teste usado com freqüência é a força da pegada, medida por meio de um dinamômetro ou balança, que determina a força utilizada ou o peso levantado pelo animal quando pega um objeto até que ele o solta, habitualmente mantendo preso o animal pela sua cauda.

2.5.2 Membro inferior

O nervo ciático de rato é o modelo de lesão de nervo periférico mais usado e bem estabelecido (3, 93, 94). O rato é um animal que apresenta inúmeras vantagens – é dócil, tem porte pequeno, é fácil manuseá-lo, cuidar dele, pode ser hospedado em dependências de pequeno e médio porte, baixo custo e conta com aceitação social como animal de experimentação. Além disso, é possível contar com animais geneticamente idênticos através

de linhagens já estabelecidas de ratos isogênicos, o que minimiza o impacto da diversidade genética de outros animais. Também apresentam a vantagem de suas fibras nervosas serem semelhantes em forma e em número às fibras nervosas humanas; e seus nervos são de um tamanho suficiente para produzir uma lesão e manipular as formas de reparação mediante técnicas microcirúrgicas convencionais com relativa facilidade (93). Por essa razão, existem inúmeros trabalhos que visam melhorar as formas de avaliação quantitativa da regeneração nervosa utilizando o modelo de nervo ciático de rato. Esta dissertação se limita a discutir uma das modalidades de avaliação funcional, e não serão discutidas outras aproximações ao problema, como estudos eletrofisiológicos ou morfológicos.

Em lesões de nervo ciático, a maior experiência em medidas de avaliação funcional é o índice de função ciática (Sciatic Function Index ou SFI) estabelecido por Luis de Medinacelli et al, em Nancy, França em 1982 (95) – baseado em pesquisas funcionais, que interpretavam as distâncias medidas entre os dedos primeiro e quinto, e segundo e quarto, quando o rato era mantido manualmente em posição de bipedestação (7, 96). De Medinacelli construiu um corredor de 43 cm de comprimento x 8,7 cm de largura, onde conseguia obter as pegadas de um rato com lesão ciática unilateral, em seu trajeto até uma caixa preta localizada no final do corredor, que serve como refúgio para o animal. O piso do corredor, no seu modelo, era coberto com uma peça de papel de raios-X. As patas traseiras eram submersas em revelador – a reação do revelador com o papel deixava marcas das pegadas para posterior mensuração de diversas distâncias, o que chamou de parâmetros. Comparou-se, então, o lado operado (experimental), com o lado não-operado (normal). No relato de Medinacelli, as distâncias medidas foram (1) a amplitude da pegada entre o primeiro e quinto dedo, o que em inglês é chamado de “*toe spread*” (TS); (2) a amplitude da pegada entre o segundo e quarto dedo, o que em inglês é chamado de “*intermediate toe spread*” (ITS); (3) comprimento da pegada, que é a maior distância média entre a ponta do terceiro dedo e a região do calcanhar, o que em inglês é chamado de “*print length*” (PL); e (4) a maior distância medida entre a pegada do lado normal e experimental em um registro consecutivo, o que em inglês é chamado “*distance to other foot*” (TOF). Esse teste sofreu várias modificações posteriores; a modificação de Bain e Mackinnon perdurou no tempo: baseada no modelo matemático de regressões lineares múltiplas - suprime da fórmula do SFI proposta por De Medinacelli a distância que existe entre a pegada experimental e normal (TOF) (97). Esses autores estabeleceram medidas específicas para avaliar lesões do nervo ciático, do nervo tibial e do nervo fibular, através da análise de lesões isoladas e combinadas feitas nesses nervos. As

fórmulas definidas por Bain e Mackinnon são mostradas na figura abaixo. O peso de cada fator foi estabelecido no trabalho de Bain; o autor chama a atenção para o alto valor do coeficiente para as distâncias medidas entre o primeiro e o quinto dedo (TS), que dá conta de mais de 80% do valor total alcançado no SFI.

$$\begin{aligned} \text{SFI} &= -38.3 \left(\frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} \right) + 109.5 \left(\frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} \right) + 13.3 \left(\frac{\text{EIT} - \text{NIT}}{\text{NIT}} \right) - 8.8 \\ \text{TFI} &= -37.2 \left(\frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} \right) + 104.4 \left(\frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} \right) + 45.6 \left(\frac{\text{EIT} - \text{NIT}}{\text{NIT}} \right) - 8.8 \\ \text{PFI} &= 174.9 \left(\frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} \right) + 80.3 \left(\frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} \right) - 13.4 \end{aligned}$$

Figura 1 - Fórmulas de índices funcionais específicos para diferentes tipos de lesão SFI, índice de função ciática, TFI, índice de função tibial, PFI, índice de função peroneal.

A letra E se antepõe para mostrar que a medida pertence ao lado experimental.

A letra N se antepõe para mostrar que a medida pertence ao lado normal.

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Gerais

Estudar os resultados obtidos com o índice funcional de marcha (SFI) quando utilizado como método para avaliar recuperação funcional após lesão nervosa em um modelo de perda segmentar de grande porte em nervo ciático de ratos.

3.2 Específicos

Avaliar o desempenho do índice funcional de marcha (SFI) no modelo mencionado, utilizando auto-enxerto como sistema de reparo.

Avaliar o desempenho do índice funcional de marcha (SFI) no modelo mencionado, utilizando sistema de tubulização enriquecido com substâncias potencialmente favorecedoras da regeneração neural.

Comparar os resultados obtidos com o índice funcional da marcha no grupo tratado com enxerto com os grupos tratados com sistema de tubulização, no modelo mencionado.

4 HIPÓTESE

O método do índice funcional da marcha (SFI) pode ser adequado para avaliar recuperação funcional após lesões de grande porte no nervo ciático de rato.

Hipótese nula: o método não é adequado para avaliar a recuperação funcional após lesão de grande porte no nervo ciático do rato.

Hipótese alternativa: o método é adequado para avaliar a recuperação funcional após lesão de grande porte no nervo ciático do rato.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento

Estudo experimental prospectivo, controlado e randomizado em ratos Wistar, exclusivamente destinados para pesquisa.

5.2 Tamanho da Amostra

Ficou estimado que seriam necessários seis ratos por grupo experimental para se poder encontrar uma diferença entre as médias dos grupos de pelo menos 2,3 desvios padrão no teste funcional da marcha com um poder $(1-\beta)$ de 90% e um nível de significância de um 5 %.

5.3 Animais

Foram utilizados 35 ratos (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar. Cinco ratos eram machos, e 30 eram fêmeas, adultos jovens entre 2 a 4 meses, isogênicos da linhagem Kyoto, com um peso entre 220 ± 30 gramas, provenientes e mantidos no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, em condições ambientes adequadas para a espécie: controle da temperatura, umidade, ventilação, luz (12 horas dia/12 horas noite), ruído, odores e interação social. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo livre acesso

para água e alimento, adequado para a espécie em qualidade e quantidade. Os animais ficaram no biotério do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, aos cuidados de profissionais com competência no manuseio e cuidado de animais.

Foram utilizadas fêmeas randomicamente alocadas em 5 grupos experimentais. Os cinco animais machos foram utilizados como doadores de medula óssea. Os grupos experimentais estão representados na tabela abaixo.

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais

Grupo	Descrição
1	Auto-enxerto (sem tubo)
2	Tubo com fibrina
3	Tubo com fibrina + células mononucleares de medula óssea (CMMO) com fator de crescimento neural
4	Tubo com fibrina + células mononucleares de medula óssea (CMMO) sem fator de crescimento neural
5	Tubo com fibrina e fator de crescimento neural

Fonte: O Autor.

Grupos controles

Grupo 1 (controle positivo): secção de 12 mm de nervo ciático com colocação do mesmo no trajeto seccionado, invertido 180°, como enxerto autólogo, sem tubo (grupo controle de auto-enxerto, atualmente considerado o padrão ouro no reparo nervoso).

Grupo 2 (controle negativo): secção de 7 mm de nervo ciático com colocação de tubo de silicone com gel de fibrina, deixando um defeito de 12 mm de comprimento dentro do tubo, sem fator de crescimento nem células.

Grupos experimentais

Grupo 3: secção de 7 mm de nervo ciático com colocação de tubo de silicone com células mononucleares de medula óssea mais fator de crescimento neural dentro do gel de fibrina, deixando um defeito de 12 mm de comprimento dentro do tubo.

Grupo 4: secção de 7 mm de nervo ciático com colocação de tubo de silicone com células mononucleares de medula óssea sem fator de crescimento neural dentro do gel de fibrina, deixando um defeito de 12 mm de comprimento dentro do tubo.

Grupo 5: secção de 7 mm de nervo ciático com colocação de tubo de silicone com fator de crescimento neural dentro do gel de fibrina, deixando um defeito de 12 mm de comprimento dentro do tubo.

5.4 Materiais de preenchimento dos tubos

5.4.1 Gel de Fibrina

Um gel de fibrina foi produzido a partir de um produto de fibrinogênio de origem humana, livre de plasminogênio, comercialmente disponível, com o nome de Beriplast P[®] (ZLB Behring GmbH, Marburg. - Alemanha), modificado no laboratório e enriquecido com heparina. Foi utilizado como matriz extracelular e como veículo transportador tanto de células mononucleares de medula óssea (CMMO) assim como de fator de crescimento neural. A união da heparina dentro do gel de fibrina permite a fixação do fator de crescimento dentro da

matriz e prolonga a bio-disponibilidade do fator durante um maior período de tempo, prevendo a sua rápida difusão quando colocado livremente dentro do tubo (62, 86, 89, 98). Uma modificação da concentração de aprotinina e da relação fibrinogênio/trombina com a formulação original do preparado permitiu melhor adaptação das características físico-químicas e biológicas desta matriz de fibrina para o modelo testado, especialmente quanto à viscosidade e ao tempo de manipulação antes da polimerização do produto.

Duas soluções - A e B-, foram preparadas a temperatura ambiente a partir dos 4 frascos da caixa do produto. A solução **A** continha fibrinogênio liofilizado, preparado do plasma humano, em uma concentração de aproximadamente 90 mg /mL e fator XIII de coagulação com aproximadamente 60U /mL (frasco 1), além de aprotinina 66 U/mL. À solução **A** foi acrescentada heparina sódica (Parinex, Lab. Hipolabor, Brasil), em concentração final de 2,38 µg/uL e fator de crescimento neural (NGF 7S, Gibco Invitrogen) em uma concentração de 100 ng/mL.

A solução **A** de fibrinogênio-NGF foi convertida em gel pela adição do mesmo volume da solução **B**, constituída por cloreto de cálcio (5,9 mg/mL) e 66 UI /mL de trombina (58, 62).

A polimerização da fibrina aconteceu dentro do tubo em um período de 3 a 5 minutos depois de misturar o mesmo volume da solução **A** com solução **B**, após ocorreu fixação do segmento distal dentro do tubo mediante sutura.

5.4.2 Células mononucleares de medula óssea

Neste estudo, foram utilizados como doadores ratos machos de 2 a 4 meses de idade, pesando entre 250 e 300 g. Para a obtenção das células de medula óssea, os ratos foram anestesiados de acordo com o protocolo (ver seção de procedimentos anestésicos) e imediatamente sacrificados com sobredose de pentobarbital. A seguir, a tíbia, o fêmur e o úmero dos animais foram retirados sob uma capela de fluxo laminar, para coletar as células da medula óssea. Dois cortes na região das epífises possibilitaram a entrada de uma agulha nº 18G na cavidade medular, onde foram injetados 10 mL de DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline - GibcoBRL) com 1% de heparina sódica. O material assim conseguido foi

ressuspenso e centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) sem soro, em um volume de cerca de 4 mL, e após foi transferido para outro tubo de 15 mL, contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL - Amersham Biosciences) (diluição Ficoll: meio de 1:1), o que evitou que as duas fases líquidas se misturassem. Centrifugou-se a 400 *g* durante 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, coletou-se o anel de células na interface Ficoll-células, ressuspendendo-as em DPBS respeitando a diluição 1:5 (células: DPBS). Centrifugou-se novamente a 1500 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento teve de ser repetido mais duas vezes a fim de retirar o excesso de Ficoll, que é tóxico para as células.

Após a última lavagem, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de DMEM, e as células puderam ser contadas, utilizando Trypan Blue (GibcoBRL) para acessar a viabilidade das células extraídas. A câmara de Neubauer tem sua faixa central em posição milimetricamente determinada abaixo das laterais, de modo que a colocação de uma lamínula, bem aderida às bordas da depressão, origina uma câmara com volume precisamente determinado. Após colocar uma amostra da suspensão de células nessa câmara – de modo que ela fosse toda preenchida, mas sem que houvesse extravasamento –, as células viáveis (não coradas) foram contadas no microscópio.

5.4.3 Fator de Crescimento Neural (Nerve Growth Factor, NGF)

Foi utilizada a preparação do fator de crescimento NGF 7S (Gibco, Invitrogen Corp) origem murino. Trata-se de um complexo obtido da glândula submandibular do rato, que contém uma subunidade 2,5 também conhecida como subunidade β (inteiramente responsável pelo efeito biológico), acompanhada de subunidades α e γ , que parecem proteger a subunidade β da clivagem enzimática. A solução com o fator de crescimento é reconstituída a partir de um liofilizado, até uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$; para isso, foi utilizado meio de cultura estéril (DMEM) adicionado com soro bovino fetal ao 1-2 %. Alíquotas de 0.05 mL desta solução foram preparadas em uma mistura de meio de cultura com soro bovino fetal 1-2%, em uma relação 1/10, até alcançar uma concentração de 1000 ng/mL. Assim, tomando

uma alíquota de 100 µL e levando a solução até um volume total de 1 mL do preparado da solução **A**, conseguiu-se uma concentração final de 100 ng /mL na solução **A**.

5.5 Anatomia do nervo ciático do rato

Sendo o nervo ciático o modelo mais freqüentemente utilizado, é importante conhecer a sua anatomia na hora da aproximação cirúrgica. O nervo ciático é formado pela fusão dos nervos lombares quarto e quinto, com ocasional contribuição do terceiro e sexto nervo lombar (99). Passa pela fenda ciática, de onde dá origem ao nervo cutâneo posterior da coxa, que vai fazer um percurso lateral ao músculo caudo-femoral e medial à cabeça acessória do músculo semitendinoso. O nervo ciático entra, então, na parte posterior da coxa, dando neste ponto um ramo chamado músculo-cutâneo, que passa abaixo do músculo caudo-femoral, dando ao menos 4 ramos ao lado medial do músculo bíceps femoris (100); segue um percurso distal até a fossa poplíteia, onde se divide em 2 ramos terminais – um que entra no aspecto profundo do músculo semi-membranoso, e outro que entra no tecido adiposo da fossa poplíteia. Após a emergência deste ramo músculo-cutâneo, o nervo ciático dá origem a ramos para os extensores do quadril e flexores da perna, continuando seu curso abaixo do músculo glúteo médio dentro da coxa. Em sua região médio-distal, o nervo trifurca-se em nervo peroneal ou fibular, nervo tibial e nervo sural. O nervo fibular tem um trajeto anterior e lateral até o compartimento anterior da perna, e inerva os músculos tibial anterior, extensor longo dos dedos e os músculos fibulares. O nervo tibial segue um curso descendente pela região posterior do joelho, profundo ao músculo gastrocnêmio, inervando além deste, aos músculos flexores dos dedos e ao músculo tibial posterior. A lesão do nervo ciático afeta a função normal da marcha, alterando principalmente as fases da marcha, a orientação do pé, a distância entre as pegadas e inclusive a força com a qual o rato empurra a perna contra o chão.

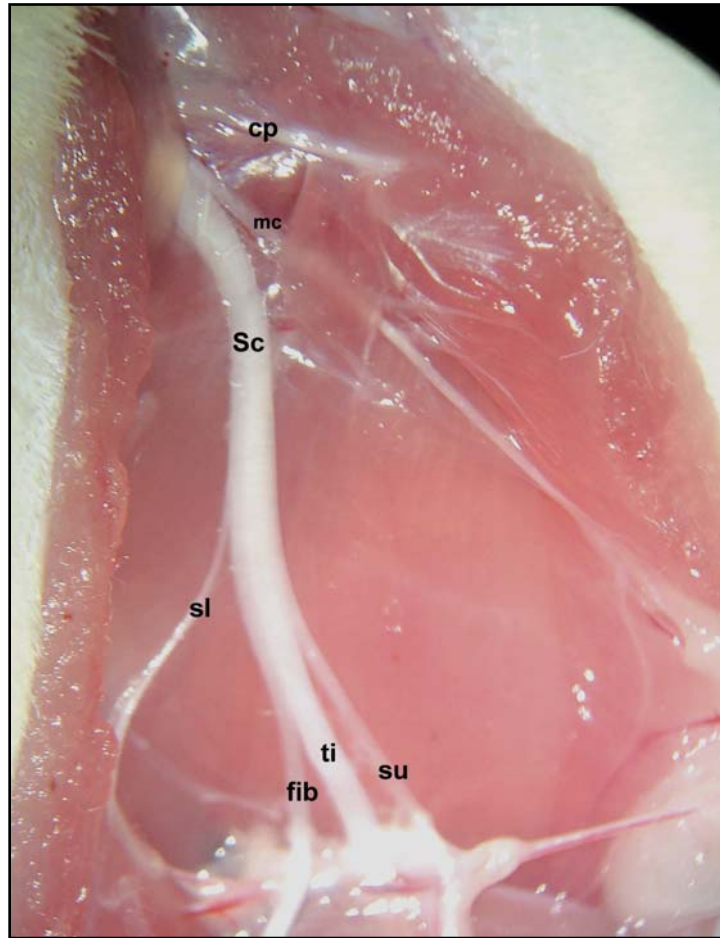


Figura 2 – Fotografia do nervo ciático do rato (esquerdo).
Exposição através da abertura transmuscular.
Sc: nervo ciático; cp: nervo cutâneo posterior da coxa;
mc: nervo músculo-cutâneo;
sl: nervo sural lateral; fib: nervo fibular;
ti: nervo tibial; su: nervo sural.

5.6 Procedimentos Peri-operatórios

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião (o autor). Os animais de experimentação passaram por um período de aclimatação de no mínimo 8 semanas antes da cirurgia, já que são criados dentro do mesmo laboratório.

5.6.1 Procedimento Anestésico

Foi administrada anestesia intraperitoneal com uma solução constituída por 0,2mL de Cloridrato de Clorpromazina (Clorpromaz 5mg /mL) + 0,8mL de Ketamina (Ketamin-S(+), 50 mg /mL, Cristalia, Brasil) na dose de 0,3mL de solução /100 gramas de peso corporal do rato (o que é equivalente a 0,3 mg de Clorpromazina +12 mg de Ketamina /100 g. de peso corporal do rato). Foi realizada a tricotomia na área de acesso cirúrgico sobre o nervo ciático direito. Doses de manutenção anestésica foram contempladas para serem ministradas no transcorrer do ato cirúrgico, conforme necessário (metade da doses inicial).

5.6.2 Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando técnicas assépticas com a ajuda de um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil) para a realização tanto da dissecação como da reparação microcirúrgica.

Foram criadas perdas de substância de grande porte no nervo ciático dos ratos e interposto um tubo de silicone ou enxerto autólogo de nervo, conforme cada grupo do estudo. As células e o gel contendo ou não o fator de crescimento neural foram colocadas no interior do tubo de silicone, em contato com as duas extremidades do nervo lesionado, de forma que se constituísse uma câmara, onde os preparados ficaram contidos.

Sob anestesia geral, cada rato foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, e uma incisão longitudinal foi realizada, 3 mm paralela e posterior ao eixo do fêmur direito, desde o tubérculo maior do fêmur até a região postero-lateral do joelho; a pele foi retraída, e o músculo glúteo e bíceps femoral foram divididos mediante uma dissecação romba paralela às suas fibras com dissecação cuidadosa até que o nervo ciático fosse visualizado em toda a sua extensão. No caso de utilização de modelo de auto-enxerto, foi realizada a secção de um segmento de 12 mm, aproximadamente 5 mm distal à emergência do nervo ciático e 2 mm acima da trifurcação de nervo ciático na região distal da coxa, reparando com o mesmo segmento, invertido 180 graus – este segmento foi utilizado como auto-enxerto, suturado com 2 pontos ao epineuro em cada extremo do enxerto, utilizando fio mono nylon 9-0 (Ethilon[®])

Johnson & Johnson Intl., Belgium). No caso dos modelos com sistemas de tubulização, um segmento de nervo de 7 mm foi retirado da região acima da trifurcação do nervo ciático, e um defeito de 12 mm foi criado dentro do tubo de silicone, o qual foi preenchido segundo o grupo, conforme já mencionado. O tubo de silicone foi fixado mediante dois pontos de sutura ao epineuro em cada extremo, utilizando um fio de mono-filamento 9-0 (Ethilon[®] Johnson & Johnson Intl., Belgium). Foi realizada primeiramente a fixação proximal do tubo ao nervo – o objetivo era deixar a abertura distal disponível para injetar o gel de fibrina com seus componentes; e, logo após a polimerização do mesmo, procedeu-se a sutura do coto distal ao tubo.

A musculatura e a pele foram aproximadas com polipropileno (Prolene[®]) 5-0 e fio mono nylon 4-0 respectivamente (Ethilon[®] Johnson & Johnson, Brasil). Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais após as cirurgias.

Durante o período de observação pós-operatória, foi utilizada uma solução de 1 mL de paracetamol em 20 mL de água, para analgesia.

5.6.3 Procedimento de Eutanásia

No momento do sacrifício dos animais, após 16 semanas pós operatório, foram utilizadas sobre-dosagens de pentobarbital sódico (Tiopental[®]) de 100 mg /kg intra cardíaca com o rato previamente anestesiado, sem provocar dor ou outro sofrimento ao animal, conforme o recomendado na resolução N^o714, de 20 de Junho de 2002, dos métodos de eutanásia segundo espécie.

5.7 Teste de análise funcional da marcha

Provas de avaliação funcional da marcha foram realizadas semanalmente para cada rato, a partir da quinta semana de pós-operatório, mediante o índice funcional de marcha (SFI). Como já foi mencionado, este teste entrega informação quantitativa baseada em uma

fórmula que levam em conta diversas mensurações feitas nas impressões das patas do rato (Figura 3) ao caminhar em um corredor de madeira, em cujo fundo havia uma casinhola escura para abrigo do animal.

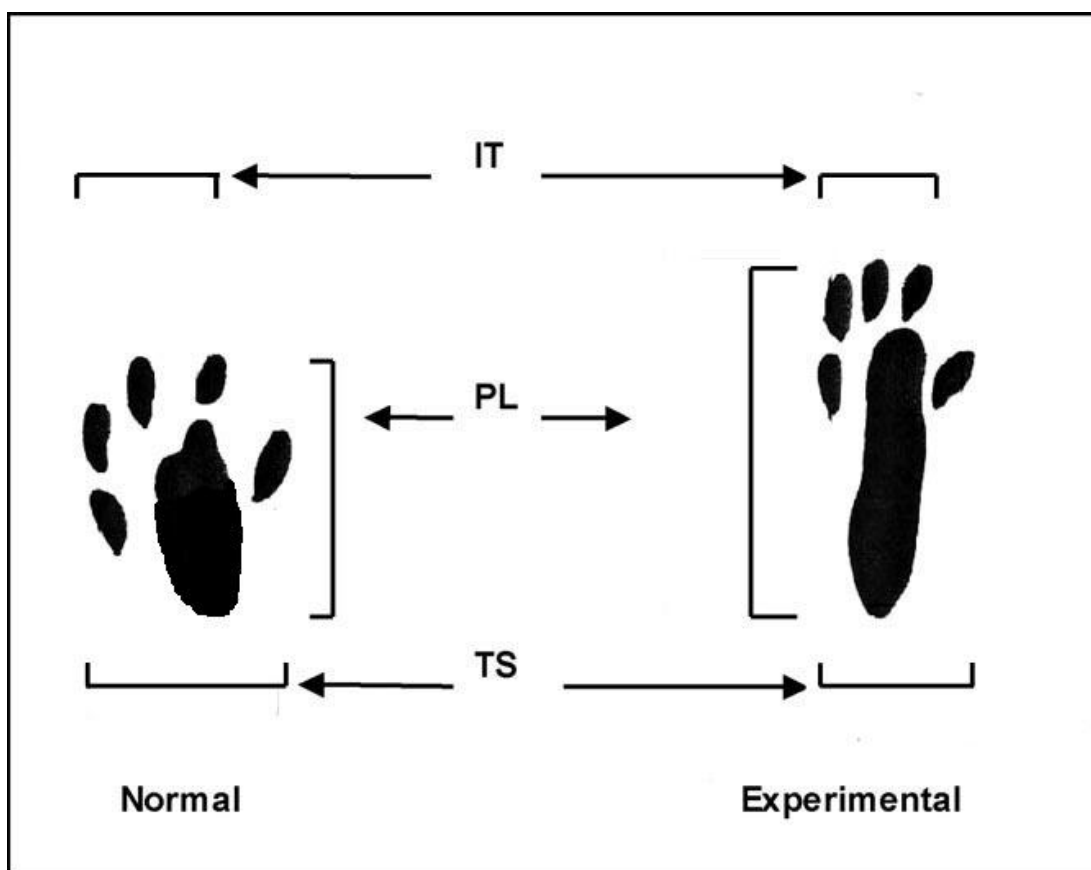


Figura 3 - Medidas usadas na determinação do índice funcional da marcha.
Fonte: Adaptado de Monte-Raso, Barbieri, 2008.

Para a obtenção das pegadas, utilizou-se um corredor mais comprido (80 cm) do utilizado por Medinacelli (43 cm), pois permitiu obter um maior número de pegadas com uma só passagem pelo corredor. Obteve-se um total de 14 pegadas em média, 7 para o lado operado e 7 para o lado normal, no lugar das 8 pegadas no corredor clássico (Fig.4 e 5).



Figura 4 - Corredor clássico de Medinacelli, de 40 cm de comprimento.
Fonte: O Autor.

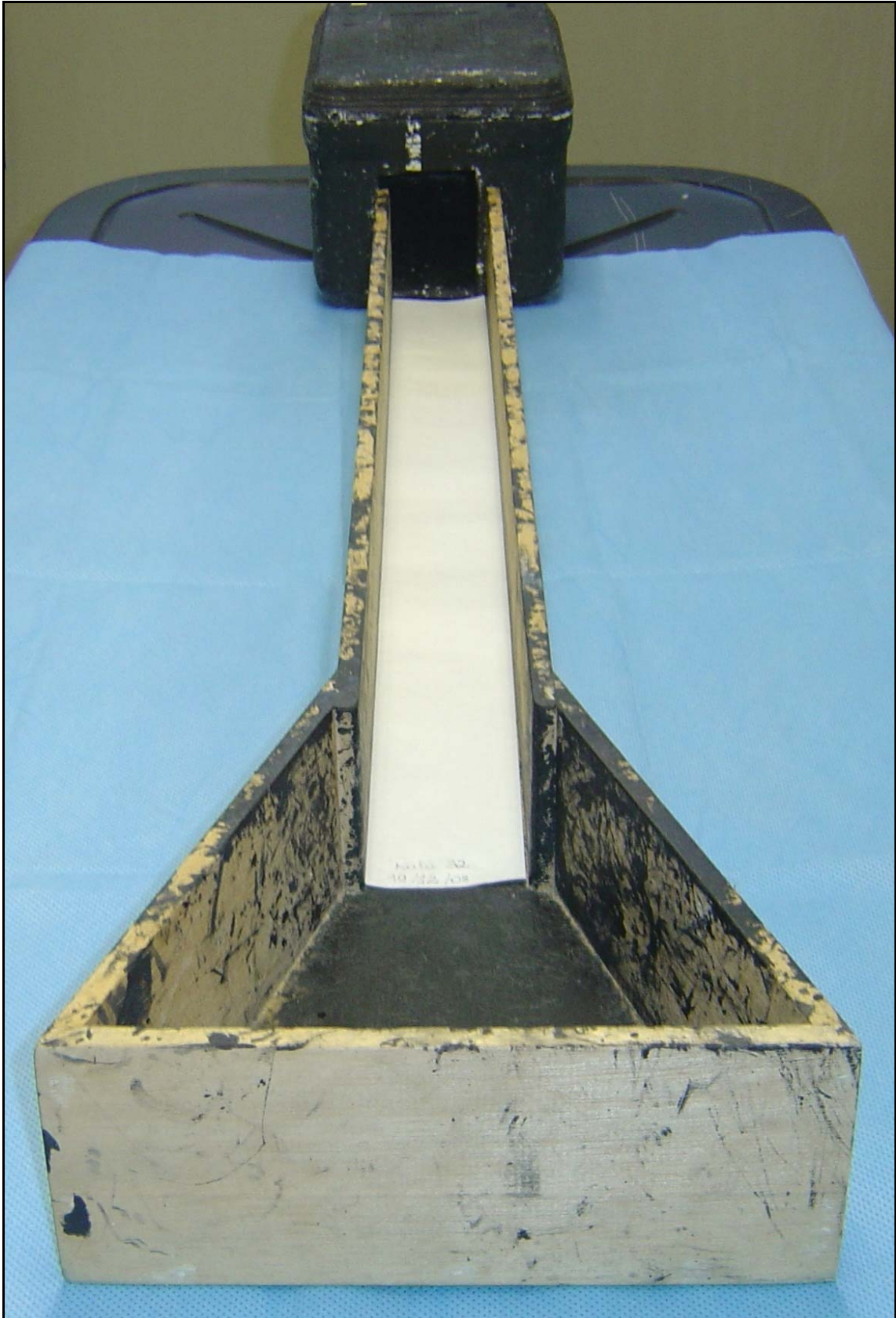


Figura 5-Corredor comprido utilizado pelo autor para obter registro das pegadas (80 cm).
Fonte: O Autor.

Uma fita de papel de igual dimensão à largura do corredor ajudou a manter o papel *in situ* durante o transcurso da marcha do animal, evitando qualquer tipo de dobradura que pudesse alterar a mensuração da pegada.

O animal foi segurado pelo tronco e pela cauda enquanto uma segunda pessoa pintava as patas traseiras com um pincel macio, utilizando uma mistura de uma medida tinta Nanquim de alta qualidade com duas medidas de cola escolar não-tóxica, o que deixa uma tinta densa mais aderente na região plantar do rato. Escolheu-se este método como o mais eficiente depois de usar outros métodos – como tinta de carimbo ou papel impregnado com azul de bromofenol, este último apresentou problemas de difusão da marca deixada pela solução de água e sabonete no papel (Fig.6 e 7).



Figura 6-Diferença entre as marcas de pegadas feitas com tinta Nanquim e cola (esquerda) e as feitas com azul de bromofenol.

Fonte: O Autor.



Figura 7 - Contenção manual para pintar as patas do rato.
Fonte: O Autor.

Foi considerada a fórmula proposta por Bain (97), e medidas foram obtidas uma vez que o registro de cada uma das fitas de papel foi avaliado por 2 observadores treinados. Após, foram determinadas quais impressões apresentavam características bem definidas para serem medidas, resultando no mínimo 2 e no máximo 3 pegadas, selecionadas para cada um dos lados (normal e experimental) de cada animal (Fig.8).



Figura 8-Seleção de pegadas para serem digitalizadas.
Nota-se a variabilidade no registro das pegadas na fita para um mesmo rato.
Fonte: O Autor.

Uma vez definidas quais pegadas seriam medidas, realizou-se a aquisição da imagem digitalizada utilizando um scanner convencional (Genius[®], modelo ColorPage HR7X Slim), com resolução de 300 pixels por polegada para imagem em preto e branco, em formato de imagem de alta qualidade (. TIFF), para uma melhor definição das margens das mesmas, ao se ampliar a imagem. A mensuração das distâncias foi realizada mediante o software de domínio público Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>), na tentativa de diminuir a margem de erro de aferição que se provoca com as mensurações manuais. Os resultados das medidas foram exportados pelo programa diretamente a uma planilha de cálculo de Microsoft Excel, versão 2007, Microsoft[®] Corporation (Fig.9).

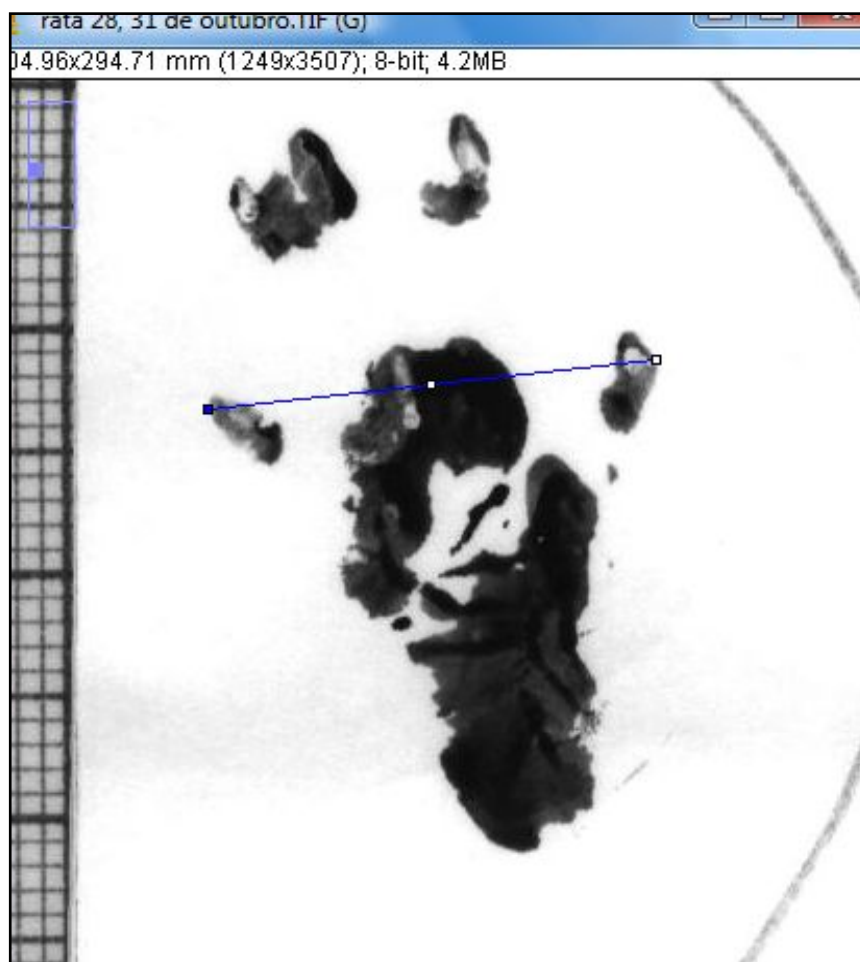


Figura 9-Mensuração, no programa Image J, da amplitude da pegada.
Fonte: O Autor.

Como se pode evidenciar no registro da pegada do rato (Fig. 10), a impressão que a pata normal deixa pode variar por causa da tinta utilizada; portanto, foi necessário estabelecer uma convenção para realizar as mensurações de uma maneira metódica. A pata normal pode

apresentar um artefato de medida com uma prolongação artificial da extensão da pegada (PL), ao ficar com uma camada de tinta mais grossa, que deixa uma impressão parcial de uma zona que, na verdade, não carrega peso. A área que transfere peso é claramente delimitada em uma pegada normal por uma zona curva harmônica na região posterior do calcanhar, como se observa na figura 10.



Figura 10-Fotografia da zona de carga na região plantar do lado normal. No círculo, está a seta com a região a ser desconsiderada na medida. Pode-se ver que na pegada seguinte, a impressão real da zona de carga já não apresenta esta distorção, motivo que determinou ser considerado um artefato da medida. Fonte: O Autor.

5.8 Análises Estatísticas

Foi realizada uma análise descritiva das medidas obtidas nas unidades experimentais e no resultado calculado do SFI para cada semana estudada, em cada grupo, através da média e do desvio padrão. As variáveis quantitativas obtidas das análises funcionais foram submetidas à avaliação da normalidade e homocedasticidade com os testes de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly.

Uma análise de variância para medidas repetidas com dois fatores - grupo e tempo - foi realizada através do critério de Wilk's Lambda para testar interação. A hipótese de que não existe diferença entre os grupos é rejeitada quando o p-valor é inferior ao nível de significância de 0,05. Nos casos em que a hipótese nula foi rejeitada, identificamos quais os grupos são diferentes estatisticamente, utilizando para isto o teste de comparação pós-análise de Tukey.

Com o objetivo de testar a reprodutibilidade do método realizou-se um teste de concordância entre as médias obtidas por dois observadores independentes, mediante o teste t de Student para amostras pareadas. Como medida de efeito foi calculada o tamanho de efeito padronizado (TEP), que é a razão entre a diferença das médias e o desvio padrão comum (que é, por sua vez, a média dos desvios padrão de cada avaliador). O segundo avaliador não tinha experiência com o teste, mas possuía claro entendimento das medidas a utilizar. Não houve sessões de comparação entre os avaliadores se não até completar as medidas de todos os grupos.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS versão 13.0 para Windows.

5.9 Aspectos Éticos

O protocolo com procedimentos em animais de experimentação foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, não recebendo alterações ou modificações nos procedimentos propostos. Em todos os procedimentos, foram cumpridos cabalmente os preceitos das liberdades do bem-estar animal, a fim de mantê-los livres de fome, sede, desconforto; livres de dor e de doenças; livres para

expressar o comportamento natural da espécie; e livres de estresse. Tentou-se reduzir ao mínimo possível o número de animais utilizados, segundo o princípio de redução.

Os procedimentos foram realizados de acordo com os aspectos legais regidos pela Lei Federal do Brasil N° 6638, de 8 de maio de 1979, assim como pela resolução N° 879, de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre o uso de animais na pesquisa.

O método de eutanásia foi escolhido de acordo com as normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais, contempladas na resolução N° 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

6 RESULTADOS

Praticamente a totalidade dos ratos sobreviveu ao procedimento cirúrgico. Contudo, um rato do grupo 3 morreu antes de completar a 3ª semana, de causa desconhecida, mas provavelmente infecciosa, tendo em vista que se tratou de uma morte tardia. Este rato não foi substituído. No decorrer das cirurgias, um rato a mais foi adicionado no grupo 5, na expectativa de enfrentar outra possível perda, situação que não aconteceu. O número de ratos que completaram a experiência foi 30, como se pode observar na tabela abaixo, que mostra a distribuição por grupos.

Tabela 2 - Distribuição de animais por grupo experimental e por perdas

Grupo	nº ratos que iniciaram	nº de perdas	nº ratos que terminaram
1	6	0	6
2	6	0	6
3	6	1	5
4	6	0	6
5	7	0	7

Fonte: O Autor

Após 16 semanas, 21 dos 24 animais com tubo falharam em reconstituir nervo (87,5%). Todos os animais com auto-enxerto demonstraram adequada integração do mesmo

Nos três animais em que uma ponte de nervo cresceu dentro do tubo, o SFI não evidenciou mudanças que demonstraram recuperação funcional.

Realizaram-se 351 testes de marcha de um total de 360 programados (97,5%), com um total de 510 registros em fita de papel. Uma das datas do teste foi omitida por erro, na sexta semana, no grupo 2 (seis ratos); e três registros do rato denominado “rato 31” foram omitidos durante as primeiras três semanas, ao ser confundido como pertencente à outra pesquisa por causa do número conferido a ele. Todos os outros ratos obtiveram registro adequado, nas datas programadas.

O número de registros em papel foi maior do que o dos testes programados, pois em média o teste foi repetido em 45% dos procedimentos, para obter melhor impressão das pegadas no papel, e assim serem medidas adequadamente. A decisão de repetir o registro foi feita no momento da realização do teste pelo pesquisador a cargo.

Em média, um número total de 14 pegadas foi registrado por cada fita de papel, número que variou de acordo com a velocidade com que o rato progrediu no corredor – menor na medida em que o rato avançava mais rápido, e maior na medida em que o rato avançava mais devagar ou apresentava detenções no trajeto. As melhores impressões foram obtidas no momento em que o rato fazia um percurso rápido, e a velocidade era constante, demorando em média menos de 10 segundos para finalizar o percurso. Das 14 pegadas, no mínimo duas pegadas de cada pata (normal e experimental) foram escolhidas para serem digitalizadas e logo medidas. Como já dito, foram necessários mais registros das pegadas, quando a qualidade deixava margem de dúvidas quanto à definição, situação que aconteceu com mais frequência na medida em que os ratos progrediam em semanas de evolução e apresentavam deformidades em garra (não - fixa) dos dedos (Fig. 11), junto com um desvio do polegar para a linha média, colocando-o praticamente alinhado com o dedo indicador (Fig. 12). Não houve diferenças entre os grupos quanto à necessidade de repetir as medidas para obter pegadas – houve no máximo 5 repetições para um só teste.



Figura 11- Deformidade dos dedos em garra dos dedos do lado operado, após 16 semanas.

Fonte: O Autor.



Figura 12-Aspecto dos dedos na pata normal (esquerda) e na operada (direita). Pata com tinta logo após de realizado o teste de marcha.

Observe-se a postura fechada na pata operada (à direita e acima).

Fonte: O Autor.

A secção da fita onde se obtiveram as melhores pegadas corresponde ao terço inicial do corredor, depois de descartadas as primeiras pegadas. Observou-se que, quando o rato era deixado no início do corredor, as pegadas iniciais apresentam variações maiores, se comparadas às pegadas subseqüentes, provavelmente pelo nível de carga que imprime nas suas patas traseiras ao descer da mão do operador, aumentando artificialmente a amplitude da pegada (TS) em até 20%. Como o peso deste fator é significativo na fórmula do SFI, pois dá conta de cerca de 80% do valor total do escore - qualquer variação do valor traria um impacto muito alto no resultado - as pegadas iniciais foram sistematicamente descartadas como medidas válidas. Na parte final do corredor, objetivou-se uma nova variação nas pegadas: os ratos se detinham espontaneamente antes de entrar na caixa, modificando, assim, a amplitude da pegada para uma medida maior. Provavelmente tal reação se dava por efeito do cheiro deixado por outros ratos, porém não foi possível eliminá-lo, mesmo lavando a caixa antes de repetir a experiência com um próximo rato. Assim, a maior parte das pegadas escolhidas se deu nos primeiros 30 cm do corredor.

A avaliação teve de ser permanente no momento em que o teste estava sendo feito, pois só assim se viria a ter pegadas de qualidade, o que foi possível com a clara compreensão, por parte dos operadores, do tipo de padrões de registro necessários para obter medidas factíveis. Esse processo demandou uma importante quantidade de tempo: em média, cada teste demorou 5 minutos por rato na fase de obtenção do registro adequado. Considerando a seleção das pegadas, a realização da digitalização das imagens e sua mensuração com o programa computacional mencionado, o tempo total empregado foi de 20 minutos por cada rato, em cada semana. Foram necessárias em torno de 170 horas de trabalho, apenas para a obtenção das medidas que fazem parte deste reporte.

Na avaliação semanal das patas dos ratos, não foi encontrado em nenhum dos animais sinal indicativo de automutilação. A única observação desta natureza foi que dois animais apresentavam uma pequena área de alopecia parcial na zona da cirurgia, após 14 semanas (Fig. 13).



Figura 13 - Zona de alopecia na região cirúrgica após 14 semanas

A análise estatística revelou que os resultados das médias do índice funcional da marcha apresentavam uma distribuição normal, com provas de igualdade de variância (homocedasticidade); por esse motivo puderam ser utilizados testes estatísticos paramétricos.

O comportamento dos grupos a respeito do SFI foi semelhante ao longo do tempo, visto que não houve interação estatisticamente significativa ($F_{(40; 58,7)} = 0,92$; $p = 0,604$). Isso quer dizer que o comportamento das curvas de progressão do índice funcional ao longo do tempo (eixo horizontal) apresenta oscilações semelhantes entre os grupos, e a diferença existe ao nível de recuperação conseguida (eixo vertical, que representa o valor do SFI alcançado) (Fig. 14, e Tabelas 3 e 4).

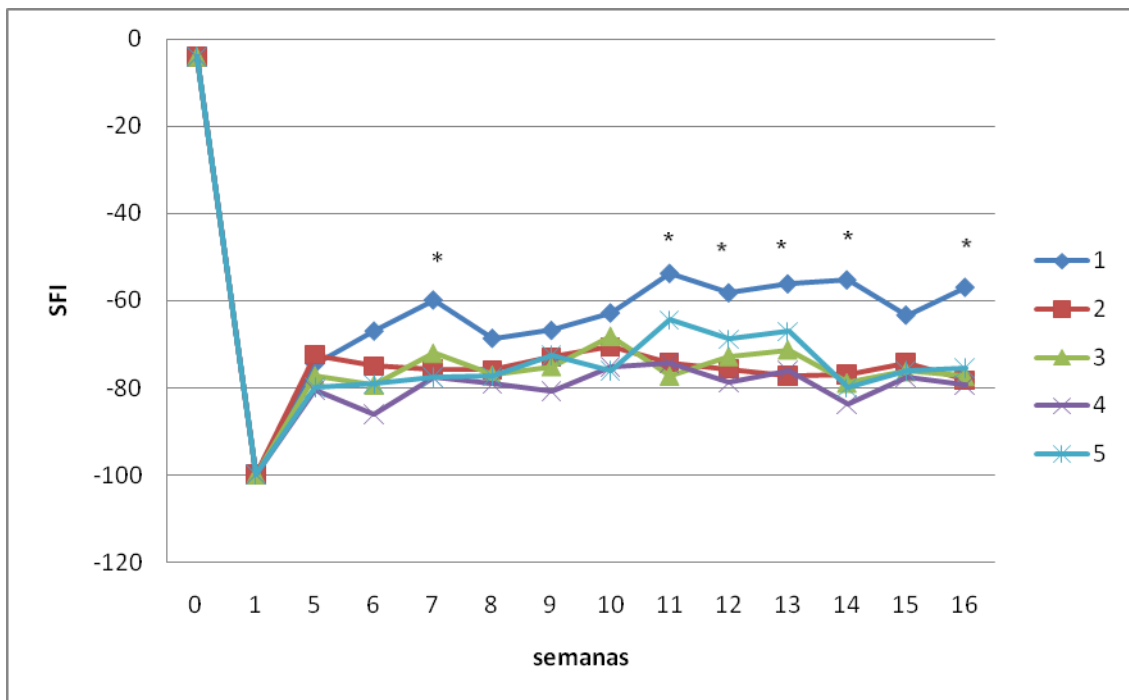


Figura 14-Resultados das médias em cada grupo, conforme as semanas.

* Há diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e os outros ($p \leq 0,05$).

Considerando os resultados obtidos mediante análise de variância, ao final do período de observação de 16 semanas verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo 1 de auto-enxerto e todos os demais grupos, não existindo diferenças entre nenhum dos grupos reparados com tubo ($p=0,003$).

Analisando o momento em que aparecem as diferenças entre o grupo 1 e os demais grupos, pode-se apreciar na figura 14 que a primeira diferença estatística aparece na sétima semana, mas torna-se persistente só após 11 semanas, com a exceção da 15ª semana, em que por escassa margem não se alcançou uma diferença significativa.

Um fato que merece destaque é a magnitude da variabilidade da estimativa das médias, representado por seu desvio padrão, produto de um número escasso de indivíduos utilizados – o que permite que medidas que se afastam da média “verdadeira” possam ter maior peso na média observada, aumentando o desvio padrão. Outra fonte de variação que representa este desvio e a variabilidade das observações, as que de fato se mostram variáveis dependendo de fatores que serão discutidos mais adiante.

Nas páginas seguintes, estão representadas isoladamente as variações obtidas durante as semanas de observação para cada um dos grupos. É preciso notar que, no grupo 1, a 6ª semana representa só uma estimativa da média, já que estes valores não foram coletados. Os valores nos gráficos apresentam uma barra de erro que representa um intervalo de confiança de 95% para o verdadeiro valor da média, calculado a partir do erro padrão (outra estimativa, que divide o desvio padrão pelo número de indivíduos na amostra). Quanto mais estrita for esta margem de erro, mais precisa é a estimativa, e fica mais fácil encontrar uma diferença com outra média, uma vez que suas áreas de rejeição não se superpõem. O grupo 2 apresentou menor margem de erro nas médias; e os grupos 1, 3, 4 e 5 apresentaram uma margem de erro muito grande, se for considerada a amplitude em que oscilam os resultados.

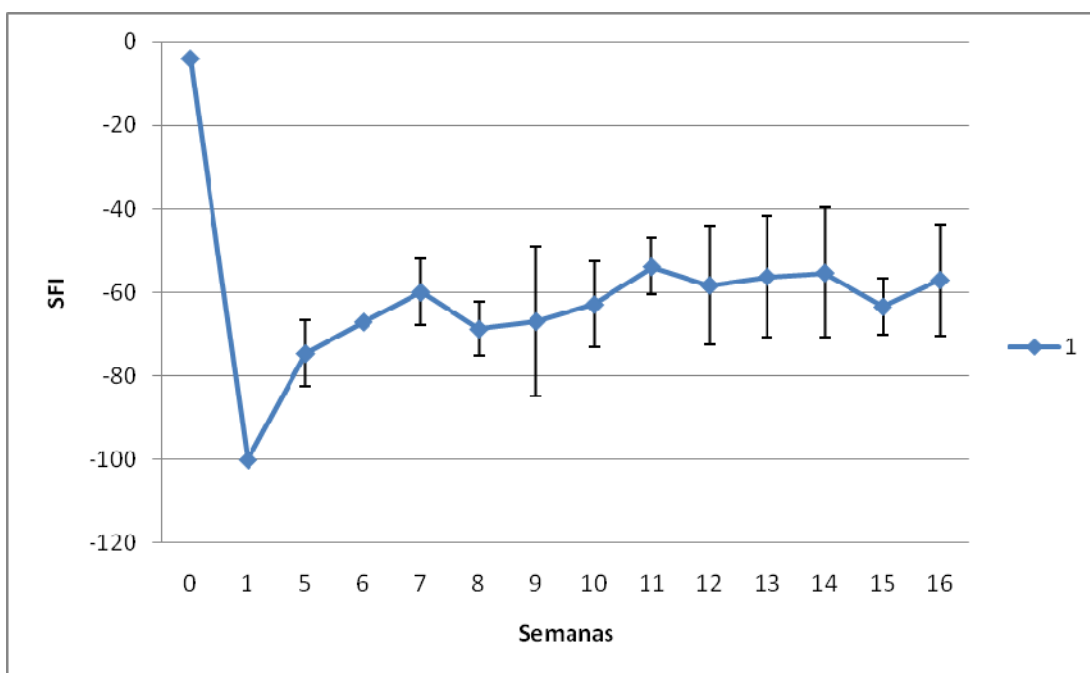


Figura 15-Resultados do teste de marcha no grupo de auto-enxerto (grupo 1). Resultados apresentados como média do grupo com intervalo de confiança de 95%.

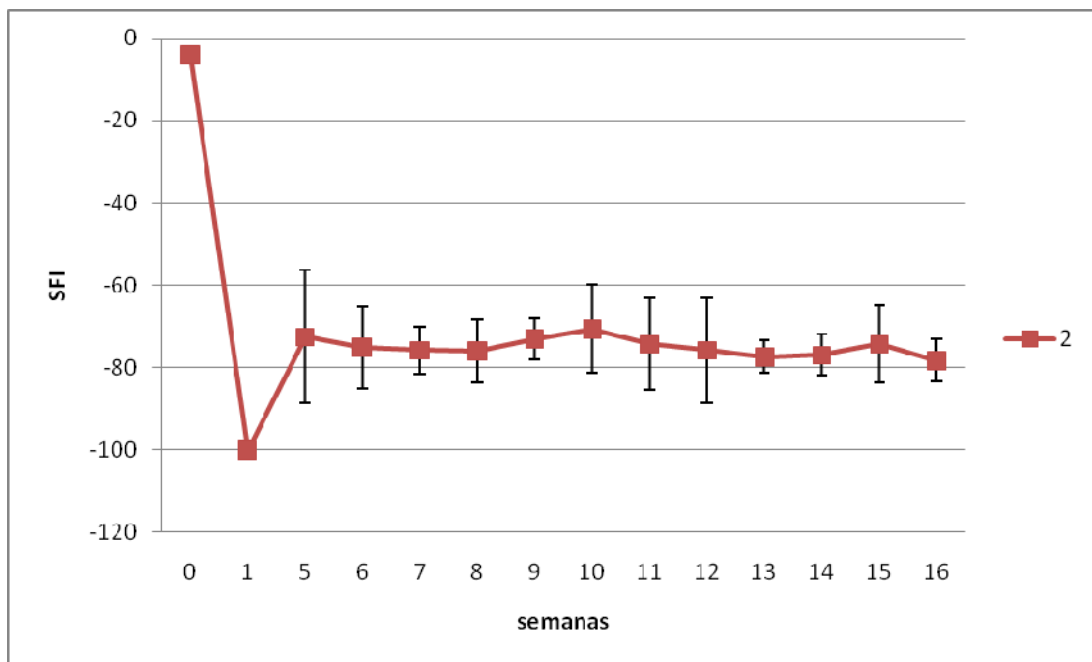


Figura 16-Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina (grupo 2). Resultados apresentados como média do grupo com intervalo de confiança de 95%.

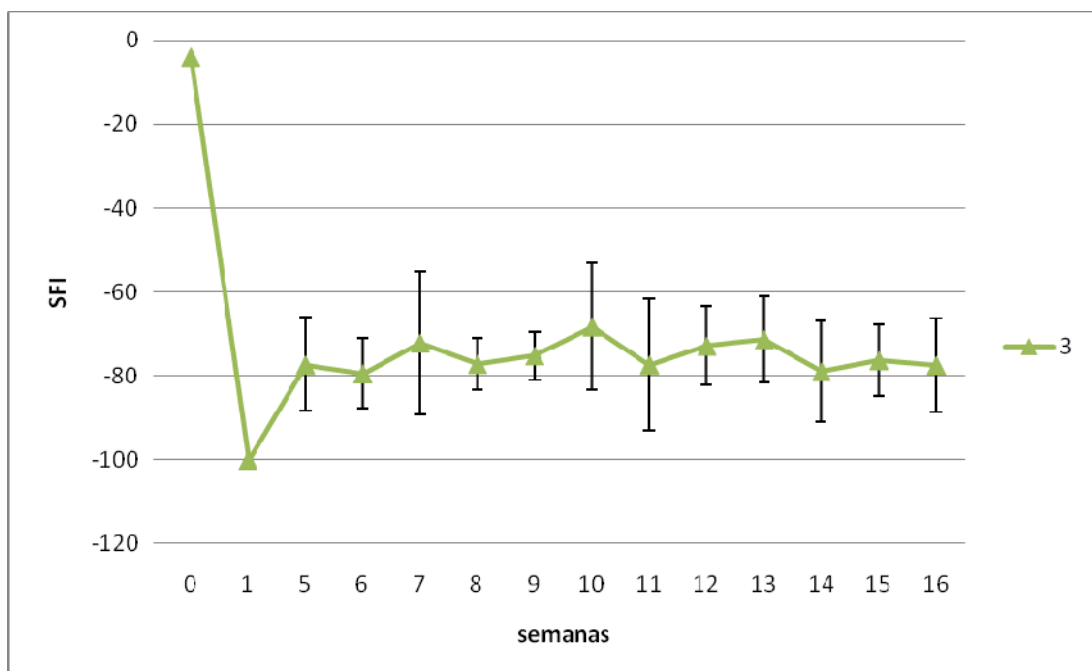


Figura 17-Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina + CMMO + NGF (grupo 3). Resultados apresentados como média do grupo com intervalo de confiança de 95%.

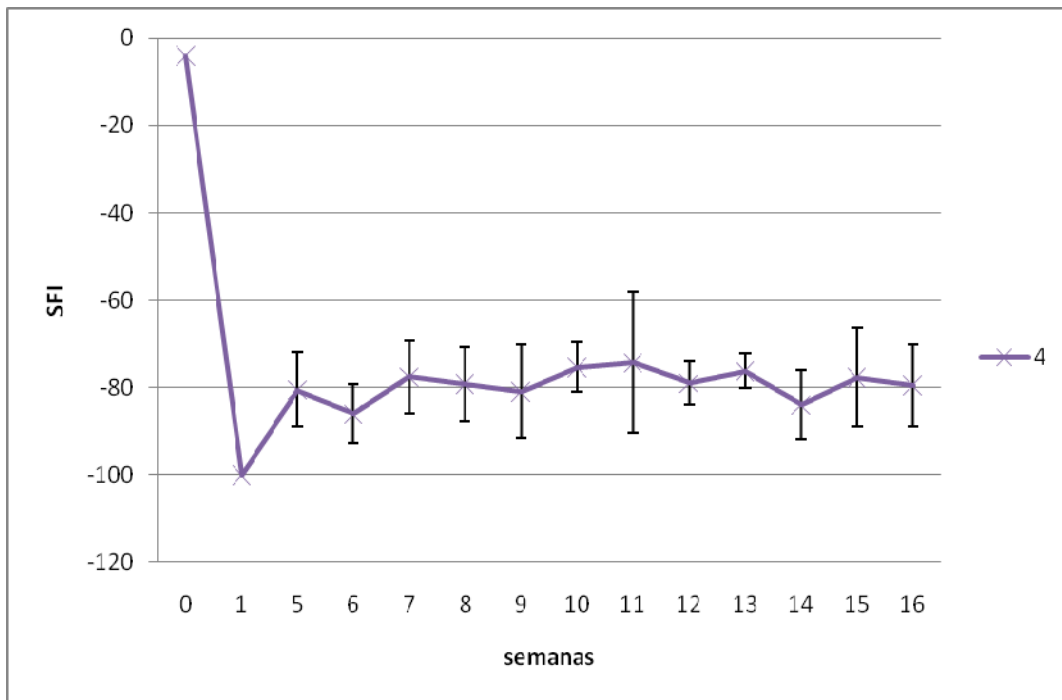


Figura 18-Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina + CMMO (grupo 4). Resultados apresentados como média do grupo com intervalo de confiança de 95%.

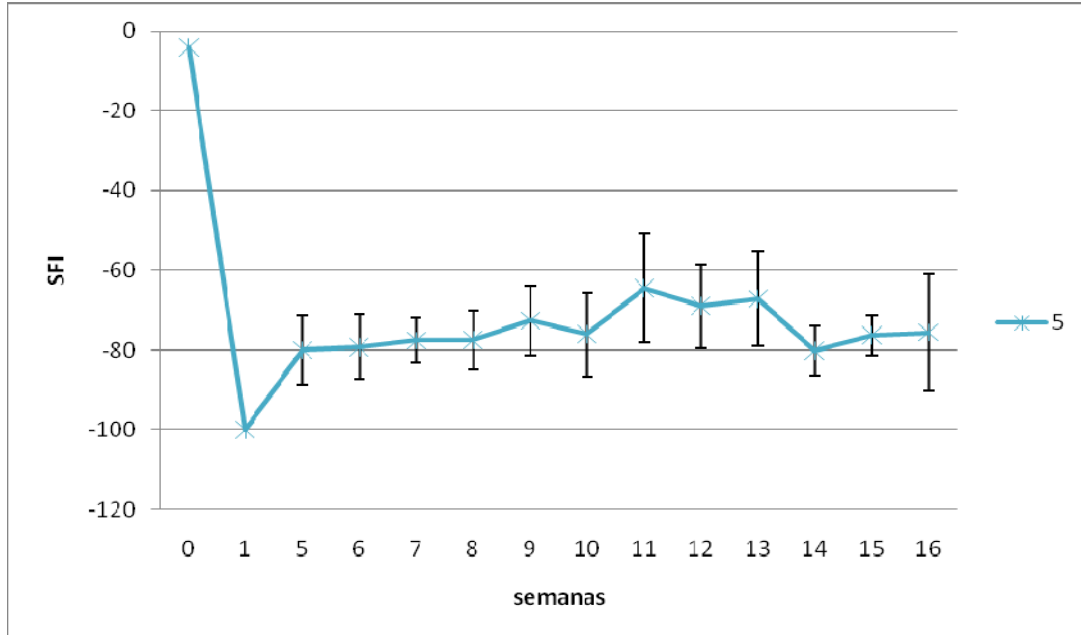


Figura 19-Resultados do teste de marcha no grupo de fibrina + NGF (grupo 5). Resultados apresentados como média do grupo com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3 - Variação das médias \pm DP do índice de escore funcional da marcha segundo grupo por avaliador 1.

Semanas	Grupo				
	1	2	3	4	5
Pré op.	-4	-4	-4	-4	-4
1	-100	-100	-100	-100	-100
5	-74,53 \pm 7,66	-72,48 \pm 15,31	-77,28 \pm 8,99	-80,48 \pm 8,14	-79,94 \pm 8,24
6	*	-75,06 \pm 9,46	79,41 \pm 6,71	-86,05 \pm 6,49	-79,18 \pm 7,77
7	-59,87 \pm 7,66	-75,73 \pm 5,44	-72,11 \pm 13,72	-77,52 \pm 8,00	-77,57 \pm 5,39
8	-68,67 \pm 6,07	-75,93 \pm 7,23	-77,13 \pm 5,04	-79,19 \pm 8,04	-77,38 \pm 8,49
9	-66,85 \pm 17,01	-73,03 \pm 4,67	-75,15 \pm 4,61	-80,83 \pm 10,18	-72,56 \pm 5,12
10	-62,85 \pm 9,77	-70,63 \pm 10,21	68,21 \pm 12,14	-75,32 \pm 5,52	-76,04 \pm 12,40
11	-53,78 \pm 6,47	-74,24 \pm 10,59	-77,29 \pm 12,70	-74,28 \pm 15,45	-64,45 \pm 16,46
12	-58,23 \pm 13,51	-75,72 \pm 12,15	-72,82 \pm 7,50	-78,94 \pm 4,78	-68,92 \pm 9,54
13	-56,18 \pm 13,93	-77,32 \pm 3,87	-71,29 \pm 8,30	-76,17 \pm 3,80	-67,14 \pm 12,92
14	-55,27 \pm 14,80	-76,92 \pm 4,68	-78,90 \pm 9,71	-83,92 \pm 7,46	-80,12 \pm 7,36
15	-63,36 \pm 6,35	-74,24 \pm 8,94	-76,28 \pm 6,97	-77,73 \pm 10,79	-76,20 \pm 5,44
16	-56,97 \pm 12,71	-78,33 \pm 4,89	-77,41 \pm 8,93	-79,46 \pm 8,87	-75,58 \pm 11,27

*Perda no registro.

Tabela 4 - Variação das médias \pm DP do índice de escore funcional da marcha segundo grupo por avaliador 2.

Semanas	Grupo				
	1	2	3	4	5
Pré op.	-4	-4	-4	-4	-4
1	-100	-100	-100	-100	-100
5	-79,57 \pm 11,71	-75,25 \pm 13,81	-77,80 \pm 15,57	-79,83 \pm 9,14	-79,97 \pm 5,35
6	*	-75,75 \pm 6,30	-84,93 \pm 7,21	-86,11 \pm 5,52	-81,13 \pm 9,96
7	-64,61 \pm 13,96	-76,24 \pm 5,73	-78,31 \pm 14,12	-82,45 \pm 7,23	-78,62 \pm 8,29
8	-69,55 \pm 6,64	-78,20 \pm 8,06	-77,07 \pm 8,38	-79,26 \pm 9,53	-76,35 \pm 9,49
9	-69,47 \pm 17,17	-74,02 \pm 4,43	-74,32 \pm 9,45	-83,71 \pm 8,76	-74,05 \pm 8,08
10	-65,10 \pm 10,11	-71,43 \pm 9,79	-66,73 \pm 12,21	-76,37 \pm 4,98	-71,25 \pm 11,34
11	-52,68 \pm 8,79	-75,36 \pm 10,18	-76,68 \pm 12,57	-71,87 \pm 12,65	-65,84 \pm 13,64
12	-63,43 \pm 15,78	-77,76 \pm 13,72	-77,17 \pm 8,94	-79,21 \pm 5,85	-73,64 \pm 8,81
13	-57,29 \pm 15,44	-76,76 \pm 5,27	-71,66 \pm 9,41	-80,30 \pm 4,02	-65,68 \pm 13,31
14	-59,68 \pm 15,29	-79,06 \pm 8,93	-79,77 \pm 10,68	-84,79 \pm 7,55	-79,59 \pm 6,87
15	-66,06 \pm 9,45	-73,43 \pm 9,09	-75,40 \pm 15,70	-75,23 \pm 12,54	-77,72 \pm 6,01
16	-57,20 \pm 17,32	-75,69 \pm 5,32	-78,34 \pm 6,47	-78,41 \pm 9,02	-79,78 \pm 11,88

*Perda no registro.

Tabela 5 - Comparação das médias dos 5 grupos e TEP observadas por 2 avaliadores segundo a variável tempo, em semanas de pós-operatório.

Semanas	Avaliador 1	Avaliador 2	Diferença de Médias (IC 95%)	TEP	p
	Média ± DP	Média ± DP			
5	-76,9±9,9	-78,5±10,8	1,6 (-0,9 a 4,1)	0,15	0,206
6	-79,9±8,3	-81,9±8,1	2,0 (-0,6 a 4,4)	0,24	0,123
7	-72,6±10,3	-76,9±11,4	4,3 (1,5 a 5,3)	0,39	0,001*
8	-75,7±7,5	-76,1±8,6	0,4 (-1,0 a 1,6)	0,05	0,599
9	-74,1±10,3	-75,1±10,8	1,0 (-0,5 a 2,5)	0,10	0,176
10	-70,9±10,6	-70,3±10,1	-0,6(-2,6 a 1,5)	-0,05	0,590
11	-68,3±14,6	-68,1±14,0	-0,2(-2,0a 1,6)	-0,02	0,805
12	-71,2±11,8	-74,1±11,9	2,9(0,4 a 5,5)	0,24	0,025*
13	-69,7±11,7	-70,1±12,9	0,4(-1,2 a 2,2)	0,03	0,560
14	-75,1±13,4	-76,6±12,9	1,5(0,2 a 2,8)	0,11	0,025*
15	-73,6±9,0	-73,6±10,7	0,0(-2,2 a 2,2)	0,00	1,000
16	-74,2±12,9	-73,9±13,4	-0,3(-2,4 a 2,0)	-0,02	0,838

*Apresenta uma diferença estatisticamente significativa.

TEP: tamanho do efeito padronizado, que representa a magnitude da diferença entre médias em unidades de desvio padrão – por exemplo, 0,15 representam 15% do valor do desvio padrão médio (que é a média aritmética entre os desvios padrão dos dois observadores).

7 DISCUSSÃO

A utilização de modelos animais continua sendo uma ferramenta importante para incrementar o conhecimento acerca de condições que precisam ser resolvidas na área médica. Mas é preciso considerar que sua utilização deve visar a minimizar o número de animais utilizados, assim como seu sofrimento; além disso, devem ser utilizados apenas se não existir outra possibilidade de obter informações. Alguns procedimentos, tais como reposição, refinamento e redução, têm norteado a experimentação animal há mais de quatro décadas, estabelecendo as limitações de ordem ética para um adequado uso de animais (101). No caso de lesões do sistema nervoso periférico, a utilização destes modelos continua sendo a base fundamental de aplicação de novas descobertas na área de biotecnologia. Neles, são testados diferentes substitutos ao enxerto autólogo de nervo, que podem ser submetidos a provas de aplicabilidade prática em animais depois de serem testados *in vitro* e antes de serem transferidos para sua utilização clínica em humanos.

Quando se utilizam modelos animais, é fundamental que o experimento tenha uma alta probabilidade de alcançar os objetivos propostos na pesquisa; esses objetivos devem ter, por sua vez, uma razoável chance de contribuir para o bem-estar animal ou humano (situação que não se pode colocar em dúvida, quando se trata de procurar uma resposta para o problema de lesão nervosa). Por isso, é fundamental que, quando utilizados animais como modelo, as provas empregadas para detectar os desfechos sejam as mais precisas e acuradas possíveis. Isso significa que os testes os quais medem o desfecho consigam medir adequadamente aquilo que pretendem medir e que seus dados sirvam para poder estabelecer diferenças entre os grupos estudados.

O índice funcional da marcha tem sido usado por muitos pesquisadores como o padrão ouro para valorizar a recuperação funcional após lesão nervosa; porém, seu uso tem sido associado fundamentalmente a modelos de lesão do tipo esmagamento, os quais apresentam

uma alta probabilidade de recuperação espontânea, alcançando níveis de SFI semelhantes ao valor considerado normal após 8 a 10 semanas de observação.

O índice funcional da marcha, como método de avaliação funcional, tem sido usado em modelos de transecção por alguns pesquisadores e tem alcançado resultados variáveis. No caso de uma transecção nervosa reparada com auto-enxertos ou com substitutos de enxerto, os melhores resultados até agora continuam sendo com a utilização de auto-enxertos, com um potencial de reparação muito limitado, não alcançando os valores prévios à lesão (39, 102, 103).

Segundo referido em alguns estudos de lesão nervosa tratada com enxerto autólogo, o índice funcional da marcha apresenta uma recuperação que se inicia em torno da quinta semana, estabilizando-se em um valor final correspondente a 40% do valor considerado como normal (8, 104). Em nosso experimento, o valor do SFI no grupo com auto-enxerto alcança um valor em torno de 43% do normal, com uma diferença estatisticamente significativa em relação os grupos com tubo – situação alcançada de maneira estável a partir da 11ª semana, mantendo-se até o final do seguimento, na 16ª semana. Em um estudo de seguimento a longo prazo, foi possível observar que, em lesões de transecção de nervo ciático, esta recuperação é alcançada em torno da 12ª semana, e permanece estável, inclusive após um ano de acompanhamento, com um valor de 41% do normal (105), resultado altamente semelhante ao apresentado por esta pesquisa. O melhor grau de recuperação após neurotmesa relatado na literatura foi descrito por Meek (1999) depois de avaliar a recuperação funcional em longo prazo (52 semanas), num defeito de 10 mm no nervo ciático do rato, reparado utilizando um sistema de tubulização absorvível e permeável, com parede fina composto de um copolímero biodegradável. Este autor observou que a recuperação motora avaliada por SFI inicia-se na quinta semana e, logo após 15 semanas, apresenta um índice de recuperação de 70%, no entanto se estabiliza nesse valor, devido à automutilação, que impede posteriores melhorias. Resultados semelhantes a este, quanto ao grau de recuperação funcional, são escassos.

É preciso destacar que nosso grupo de animais não mostrou sinais de automutilação, e mesmo assim não houve mudanças significativas no índice de escore ciático depois da 11ª semana, quando utilizado auto-enxerto. A maior parte dos autores mostra resultados de auto-enxerto em torno de 30 a 40% do valor de SFI considerado normal (39, 102, 103).

Comparados os resultados quando agrupados em dois grandes grupos – grupo de auto-enxerto e grupo com tubo –, percebeu-se a estreita margem de valores no SFI entre a melhor resposta esperada (utilizando-se auto-enxerto) e a pior resposta esperada (ausência completa

de regeneração, encontrada na maior parte dos grupos com tubo). Esses valores oscilam entre um máximo de -57 e um mínimo de -78, com uma amplitude total de 21 pontos na escala do SFI. Essa condição dificulta a probabilidade de serem encontradas diferenças entre os valores intermediários, já que todos os valores possíveis se encontraram muito próximos, necessitando utilizar um maior número de animais para diminuir a margem de erro e detectar uma diferença estatisticamente significativa, mas que muito provavelmente seguirá sendo pouco relevante do ponto de vista clínico, dada a pequena magnitude do efeito final. Dessa maneira, a utilização deste teste, na condição encontrada nesta pesquisa, estará quebrando dois princípios básicos da experimentação animal: a redução (minimizar o número de animais), pois requer um alto número de animais para detectar uma diferença, e o fato de o experimento ter uma razoável chance de contribuir ao bem-estar animal ou humano (já que estaria apontando a detectar uma magnitude do efeito que provavelmente não teria maior relevância clínica).

Para um melhor entendimento, serão considerados aqui alguns conceitos de estatística básica. Quanto mais precisa for uma medida, menos dispersão haverá em torno da média, e maior será a chance de encontrar diferenças em relação à outra média, utilizando um menor número de indivíduos. Se o método utilizado para medir qualquer variável não for suficientemente preciso, as oscilações encontradas em torno da média serão mais amplas – e mais indivíduos serão necessários para reduzir a margem de erro da estimativa. Essa situação ocorre com a nossa estimativa; no entanto tentamos determinar se é um problema das observações muito díspares ou um problema da mensuração destas observações.

Como medida de reprodutibilidade entre observadores, foi calculada a quantia da diferença encontrada nas médias do SFI, analisados os resultados globais do SFI por semana entre dois avaliadores independentes, chamados avaliador 1 e o avaliador 2. Esta diferença foi quantificada em unidades de desvio padrão (Tabela 5). Embora existissem diferenças estatisticamente significativas nas médias nas semanas 7,12 e 14, a magnitude dessa diferença em unidades de desvio padrão foi mínima, com escassa relevância prática. Portanto, pode-se estabelecer que os resultados apresentam uma alta concordância entre as medidas feitas pelos 2 observadores independentes, validando a reprodutibilidade do método de mensuração - um fator a considerar ao se analisar um método que visa ser quantitativo. Nos dados coletados, destaca-se a presença de um desvio padrão muito semelhante entre ambos avaliadores para cada semana comparada, o que representa muito provavelmente uma medida da variação das observações, e não uma variação das mensurações. É provável que a utilização de um sistema

de digitalização e posterior medição das variáveis utilizando um software de análise de imagens digital de fácil acesso, como Image J, ajudem a reduzir a margem de erro nas mensurações, ao fornecer uma medida mais precisa, ao ampliar a imagem, e utilizar uma escala de medida com maior sensibilidade.

Conforme os valores de media e desvio padrão entre dois observadores, apresentados na Tabela 5, o índice de função ciático demonstrou uma medida de dispersão, representada pelo *desvio padrão médio* (a média de todos os desvios padrão), que alcançou um valor em torno de 11 (mínimo 7,5; máximo 14,6). Tal resultado representa entre 14 e 19 % do valor da média do SFI do grupo com auto-enxerto e da média do grupo com tubo, respectivamente. Essa medida, conhecida como coeficiente de variação ((DP/média) x 100%), é considerada alta para um desenho experimental, o qual deveria ter um coeficiente de variação menor de 10%, representando o *grau de imprecisão* da estimativa em torno da média. Assim, dada a baixa amplitude de valores do SFI no modelo e uma alta imprecisão da estimativa, aumenta a possibilidade de se cometer um erro tipo II, que é a probabilidade de não encontrar uma diferença quando esta realmente existe. Ao incrementar a probabilidade de erro tipo II (também chamado nível β), diminui sua probabilidade complementar, representada por $1-\beta$, que é o *poder do teste*. Fica mais fácil entender agora por que, sob a condição de distribuição dos dados encontrados, o teste se apresenta com *baixo poder*, ou seja, oferece baixa probabilidade de encontrar uma diferença entre médias quando esta verdadeiramente existe (106)(Fig. 20).

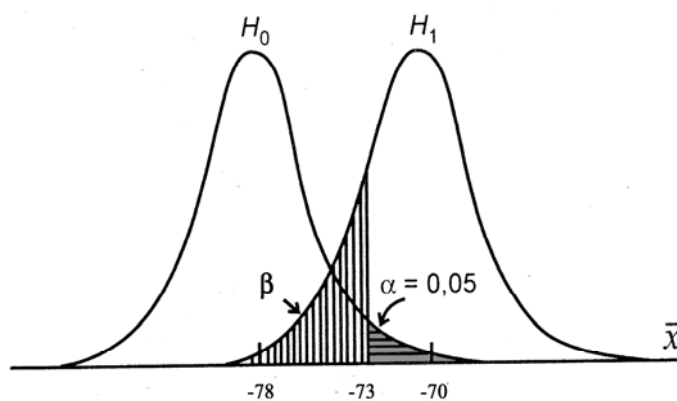


Figura 20 - Distribuição amostral de duas médias, com interposição de intervalos de confiança. As linhas verticais representam a área de erro tipo II ou β , e as linhas horizontais delimitam a área de significância, erro tipo I, com $\alpha = 0,05$.

Fonte: Adaptado de Bioestatística, princípios e aplicações, Callegari-Jacques, 2003, Página 61.

Exemplificando: para detectar uma diferença entre as médias de 11 pontos no SFI, com um desvio padrão igual 11, seriam precisos pelo menos 17 animais em cada um dos grupos, assumindo um poder de 80%, e um nível de significância de 0,05. Se a intenção fosse detectar uma diferença de médias menor – por exemplo, 8 pontos no SFI –, seriam necessários em torno de 31 animais em cada grupo, o que claramente vai contra os princípios de redução.

À mesma conclusão, a respeito da limitação do SFI, chegou Vleggeert-Lankamp (2007) em uma revisão sistemática recente dos métodos de avaliação da regeneração nervosa quando utilizados condutos. Analisados 17 trabalhos de regeneração de lesão de nervo ciático de rato, com defeito mínimo de 5 mm, utilizando condutos sintéticos e SFI como medida de avaliação, demonstrou-se que, quando os diversos resultados apresentados são tratados estatisticamente utilizando o teste de Fisher, não existem diferenças entre os grupos, estabelecendo que ainda a aparentemente capacidade de discriminar entre grupos sem tratamento e enxertados foi estatisticamente não relevante. Este autor cita dois trabalhos semelhantes ao nosso, em que não houve crescimento do nervo dentro do tubo; porém os resultados no SFI foram semelhantes entre os grupos. Conclui que, com base nos dados apresentados na literatura e na revisão estatística dos resultados, a utilização do SFI não é recomendada como uma medida de avaliação funcional no futuro (90).

Embora esses resultados apresentem evidências de deficiência no uso do SFI em modelos de perda nervosa de grande porte, algumas das observações apresentadas podem eventualmente ser consideradas para serem transferidas a um modelo em que o teste de análise funcional da marcha é adequado, como é o caso de uma lesão por esmagamento, em que as amplitudes nos valores entre mínimo e máximo permitem detectar diferenças com menor probabilidade de erro II.

A quantificação do índice funcional da marcha depende fundamentalmente da obtenção das medidas das pegadas das patas traseiras do rato na medida em que ele caminha por um corredor. Por isso, se fez necessário aperfeiçoar a obtenção de boas pegadas, situação que depende de vários fatores, entre os quais se destacam a raça do animal em estudo, os fatores do método utilizado para obter as impressões, a pessoa que realiza o teste, fatores ambientais que podem mudar o comportamento do animal, assim como fatores próprios do tipo de lesão, entre outros. É fundamental lembrar que o processo de escolha das pegadas é subjetivo, já que depende da avaliação acerca da qualidade da pegada e introduz um importante viés (de seleção) em torno dos quais certas medidas podem ser tomadas para tentar diminuir a margem de erro sistemático. O uso da técnica adequada para realizar o teste de

análise funcional da marcha foi evoluindo desde o tempo dos testes pilotos até os testes finais. Algumas considerações a respeito deste aprendizado são apresentadas a seguir.

Não se objetivam registros nos quais tenha sido impossível obter medidas adequadas, mas sim uma maior tendência a repetir os testes na medida em que se avança na evolução das semanas – é mais freqüente após 11 semanas no grupo de auto-enxerto e após 14 semanas no grupo com tubo.

Entre os fatores que têm a ver com a possibilidade de obter bons registros, é sabido que o tipo de rato com o qual se trabalha pode influenciar na obtenção de boas impressões, na medida em que o comportamento de autotomia ou automutilação, provavelmente como conseqüência da dor neuropática, pode levar à mutilação dos dedos das patas traseiras, o que pode vir a interferir com a capacidade de analisar as pegadas, a capacidade da marcha e até com a sobrevivência do animal. Muitos protocolos consideram o sacrifício do animal de acordo com o grau de autotomia apresentado durante o período de acompanhamento pós-operatório (107). Em nossa série, utilizando ratos Wistar, não se apresentaram sinais de autotomia ou automutilação durante as 16 semanas de seguimento, e nenhum tipo de preparo tópico foi utilizado para evitar a automutilação (108), provavelmente determinado pelo fato de terem sido animais fêmeas, que apresentam um menor percentual de autotomia quando comparados com os machos (107). Outro possível fator pode ser a raça. Em um modelo com lesão segmentar reparado com tubo biodegradável, também utilizando ratas Wistar, tampouco se apresentaram sinais de automutilação (41). Essa característica também é reportada por outros autores em ratas Lewis, as que não apresentam sinais de automutilação após cirurgia. No entanto, em ratos Sprague-Dawley, o percentual de autotomia pode alcançar até 50% (109).

Os nossos resultados de ausência de autotomia em todos os ratos, no entanto com desfechos diferentes, nos faz discordar da hipótese apresentada por alguns autores de que a taxa de autotomia pode ser utilizada como um método para comparar diferentes técnicas de reparação (94, 110). Essa discordância é também apoiada por uma revisão sistemática dos métodos de avaliação de regeneração nervosa, quando utilizados modelos de tubulização (90).

Quando analisados os resultados dos dois métodos utilizados para obter as impressões para este trabalho, percebeu-se que, quando utilizado o método de tinta nanquim mais cola, o registro apresentou uma clara definição da pegada, que não se modifica com o decorrer do tempo, situação que não acontece quando utilizado papel impregnado com azul de bromofenol, o qual apresenta distorção das margens das pegadas depois de obtidas, por efeito da difusão da solução aquosa no papel. Não foi observada nenhuma reação adversa do animal,

quando utilizada tinta nanquim com cola , o qual se apresentava livre da tinta após algumas poucas horas.

Quando comparados o método de tinta e papel com outros métodos recentemente reportados na literatura, como a utilização de um registro de postura estático (111) ou registro da marcha em vídeo (94, 112, 113), os resultados alcançados são semelhantes; porém, o registro em vídeo fornece maior gama de variáveis possíveis de registrar, como o posicionamento da pata, a presença de arraste da mesma, rotação do pé, duração das fases da marcha, entre outras, o que permite avaliar de maneira mais completa o movimento do membro inferior, por isso tem sido recomendado como uma melhor alternativa aos métodos tradicionais (90).

Introduziram-se algumas modificações ao modelo proposto por de Medinacelli – alteração do comprimento do corredor de madeira por um maior, com o objetivo de conseguir-se uma área mais extensa para se obterem pegadas, apenas com uma passagem pelo corredor, situação que teve como conseqüência o aumento significativo do número de pegadas registradas por cada passagem no corredor (14 em lugar de 8), o que poderia contribuir para diminuir o número de tentativas realizadas para obter um número adequado de pegadas fáticas de serem medidas.

As deformidades das patas e as alterações da marcha como conseqüência das mesmas, podem impedir uma adequada mensuração das medidas que fazem parte do índice funcional da marcha, segundo descrito por vários autores (114, 115). Entre as características mais comentadas estão a deformidade em inversão ou eversão da pata, deformidade em garra dos dedos e contratura articular em flexão das articulações interfalangeanas, o que determina que uma grande quantidade de registros seja catalogada como não-avaliáveis, e que sejam atribuídos a estes os registros os piores valores possíveis da escala (94). Essas condições são quase impossíveis de serem quantificadas pelo método de tinta e papel, mas é relativamente fácil objetivá-las em vídeo. Algumas das deformidades que foram evidentes em todos os grupos foram a contratura em flexão das interfalangianas e a contratura em adução do polegar, sem serem deformidades fixas ao final das 16 semanas de avaliação, tornando possível uma correção manual da garra sem resistência articular evidente. Essas deformidades, que se apresentaram de maneira mais precoce no grupo com auto-enxerto, são evidentes a partir da semana 11, dado comparado com o dos grupos com tubo que apresentaram esta deformidade próxima da 14ª semana. E, como já se mencionou, sua presença está associada à realização de um maior número de registros para se obter pegadas. Teoricamente, se fosse possível evitar

ou prevenir essas deformidades, o método poderia ter melhor desempenho para detectar diferenças de regeneração, o que se alcançaria com algum dos programas de treinamento que parecem aperfeiçoar a regeneração nervosa(116).

A decisão tomada no início do experimento em não realizar mensurações do índice funcional de marcha durante as primeiras 4 semanas foi baseada na ausência teórica de possibilidade de existir uma regeneração nervosa neste escasso período de tempo, considerando uma lesão de 12 mm de comprimento. Além disso, considerou-se o estabelecido por outros pesquisadores a respeito da interferência do procedimento cirúrgico na marcha do rato e a grande dispersão de resultados apresentados nas primeiras três semanas numa lesão do tipo esmagamento, o que torna difícil interpretar qual seria o verdadeiro resultado (93, 117, 118). Esta situação poderia, teoricamente, estar resolvida após a terceira semana no caso de uma lesão do tipo axonotmese, por isso se considerou pertinente aumentar ao menos uma semana no caso de uma lesão do tipo neurotmese. Embora esta decisão fosse tomada no planejamento do experimento, uma informação valiosa foi perdida em relação ao grau de déficit funcional real que é alcançado após a lesão, o que foi conceituado só num valor teórico de -100 de SFI. No entanto, nos primeiros testes de marcha feitos, constatou-se um SFI em torno de -80. Analisando a situação nos perguntamos: será mesmo que o SFI alcança valores de -100 e o índice melhora espontaneamente a -80 por uma adaptação da marcha ou será que só alcança um patamar negativo em torno de -80 desde o início e se mantém constante no tempo? Considerando este valor de -80 como máxima queda no escore, o percentual de melhoria até um valor de -57 teria sido só de 29% e não de 43%.

A validade destas observações precisa ser testada em futuras pesquisas, sempre pensando em aperfeiçoar as formas de avaliação da recuperação nervosa que permitam aproximar-nos a melhores alternativas de tratamento para esta grave lesão

8 CONCLUSÕES

No modelo de perda segmentar de grande porte (12 mm) no nervo ciático de rato:

Quando utilizado auto-enxerto (padrão ouro) como método de reparação nervosa, o índice funcional da marcha demonstra uma recuperação funcional limitada, em torno de 43% do valor normal (SFI de -57), o que é alcançado a partir da 11^a semana, sem apresentar variações após esta data.

Quando utilizado um sistema de tubulização como método de reparo, o índice funcional da marcha não mostra variações no período de observação: mantém-se estável em um valor de SFI em torno de -78, resultado que representa a ausência de efeito regenerativo.

A utilização do índice funcional da marcha não permite discriminar entre animais que apresentaram crescimento de nervo dentro do tubo e animais que não apresentaram regeneração nervosa, o que evidencia que tal método carece de sensibilidade para este importante desfecho.

Embora exista uma diferença estatisticamente significativa entre a máxima recuperação possível (auto-enxerto) e a falta absoluta de efeito (tubo sem regeneração), a estreita amplitude de valores existente entre eles deixa pouca margem para encontrar diferenças nos resultados intermédios, quando associados a um grau de imprecisão da estimativa importante (representado pelo alto coeficiente de variação), o que determina que este método apresente um baixo poder para detectar diferenças.

Com base na observação descrita, não se pode rejeitar a hipótese nula: o índice funcional da marcha não é um método adequado para diferenciar níveis de recuperação funcional após perdas segmentares em nervo ciático de rato.

Tais constatações indiciam que outras medidas funcionais, mais precisas e com maior poder, deverão ser encontradas para avaliar adequadamente a regeneração nervosa neste tipo de modelo.

REFERÊNCIAS

1. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*. 1998 Jul;45(1):116-22.
 2. Kelsey JL. Upper extremity disorders : frequency, impact, and cost. New York: Churchill Livingstone; 1997.
 3. Yannas IV, Hill BJ. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1593-600.
 4. Ijpm FF, Van De Graaf RC, Meek MF. The early history of tubulation in nerve repair. *J Hand Surg Eur Vol*. 2008 Oct;33(5):581-6.
 5. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 1998 Aug;21(8):1095-7.
 6. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol*. 2001 Mar;168(1):192-5.
 7. Guntmann E, Guntmann L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesions. *J Neurol Psychiatry* 1942 July-October;5((3-4)):117-29.
 8. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995 May;58(1-2):29-37.
 9. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001 Jul 15;108(1):1-9.
-

-
10. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000 Jul-Aug;8(4):243-52.
 11. Birch R. Nerve Repair. In: GREEN DP, editor. *Green's Operative Hand Surgery*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005. p. 1075-112.
 12. Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Oct;87(10):1309-19.
 13. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997 Feb-Apr;14(1-2):67-116.
 14. Abe N, Cavalli V. Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurobiol*. 2008 Aug 7;18:1-8.
 15. Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci*. 2002 Aug 1;22(15):6631-8.
 16. Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR, et al. Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2004 Dec;190(2):347-55.
 17. Johnson TS, O'Neill AC, Motarjem PM, Amann C, Nguyen T, Randolph MA, et al. Photochemical tissue bonding: a promising technique for peripheral nerve repair. *J Surg Res*. 2007 Dec;143(2):224-9.
 18. Toby EB, Meyer BM, Schwappach J, Alvine G. Changes in the structural properties of peripheral nerves after transection. *J Hand Surg [Am]*. 1996 Nov;21(6):1086-90.
 19. Abrams RA, Butler JM, Bodine-Fowler S, Botte MJ. Tensile properties of the neuroorrhaphy site in the rat sciatic nerve. *J Hand Surg [Am]*. 1998 May;23(3):465-70.
 20. McCallister WV, Cober SR, Norman A, Trumble TE. Using intact nerve to bridge peripheral nerve defects: an alternative to the use of nerve grafts. *J Hand Surg [Am]*. 2001 Mar;26(2):315-25.
 21. Heath CA, Rutkowski GE. The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends Biotechnol*. 1998 Apr;16(4):163-8.
-

-
22. Levine MH, Yates KE, Kaban LB. Nerve growth factor is expressed in rat femoral vein. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Jul;60(7):729-33; discussion 34.

 23. Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llana J. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 1996 Nov;12(8):521-7.

 24. Battiston B, Tos P, Conforti LG, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neuroorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl.* 2007;100:43-50.

 25. Calcagnotto GN, Braga Silva J. The treatment of digital nerve defects by the technique of vein conduit with nerve segment. A randomized prospective study. *Chir Main.* 2006 Sep;25(3-4):126-30.

 26. Choi BH, Zhu SJ, Kim SH, Kim BY, Huh JH, Lee SH, et al. Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J Reconstr Microsurg.* 2005 May;21(4):267-72.

 27. Terzis JK, Kostas I. Vein grafts used as nerve conduits for obstetrical brachial plexus palsy reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Dec;120(7):1930-41.

 28. Ayhan S, Yavuzer R, Latifoglu O, Atabay K. Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Reconstr Microsurg.* 2000 Jul;16(5):371-8.

 29. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM, et al. Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. *J Hand Surg [Am].* 1982 Nov;7(6):580-7.

 30. Lundborg G, Rosen B, Dahlin L, Holmberg J, Rosen I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J Hand Surg [Br].* 2004 Apr;29(2):100-7.

 31. Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg [Br].* 1999 Dec;24(6):703-6.

 32. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, et al. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol.* 1982 May;76(2):361-75.
-

-
33. Pitta MC, Wolford LM, Mehra P, Hopkin J. Use of Gore-Tex tubing as a conduit for inferior alveolar and lingual nerve repair: experience with 6 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001 May;59(5):493-6; discussion 7.
34. Stanec S, Stanec Z. Ulnar nerve reconstruction with an expanded polytetrafluoroethylene conduit. *Br J Plast Surg.* 1998 Dec;51(8):637-9.
35. Weber RA, Breidenbach WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast Reconstr Surg.* 2000 Oct;106(5):1036-45; discussion 46-8.
36. Inada Y, Hosoi H, Yamashita A, Morimoto S, Tatsumi H, Notazawa S, et al. Regeneration of peripheral motor nerve gaps with a polyglycolic acid-collagen tube: technical case report. *Neurosurgery.* 2007 Nov;61(5):E1105-7; discussion E7.
37. Dellon AL, Maloney CT, Jr. Salvage of sensation in a hallux-to-thumb transfer by nerve tube reconstruction. *J Hand Surg [Am].* 2006 Nov;31(9):1495-8.
38. Evans GR, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, et al. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 2002 Feb;23(3):841-8.
39. Evans GR, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, et al. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 1999 Jun;20(12):1109-15.
40. Meek MF, Robinson PH, Stokroos I, Blaauw EH, Kors G, den Dunnen WF. Electronmicroscopical evaluation of short-term nerve regeneration through a thin-walled biodegradable poly(DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with modified denatured muscle tissue. *Biomaterials.* 2001 May;22(10):1177-85.
41. Meek MF, den Dunnen WF, Robinson PH, Pennings AJ, Schakenraad JM. Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a new biodegradable poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide. *Int J Artif Organs.* 1997 Aug;20(8):463-8.
42. Meek MF, Coert JH. US Food and Drug Administration /Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann Plast Surg.* 2008 Apr;60(4):466-72.
43. Waitayawinyu T, Parisi DM, Miller B, Luria S, Morton HJ, Chin SH, et al. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. *J Hand Surg [Am].* 2007 Dec;32(10):1521-9.
-

-
44. Clavijo-Alvarez JA, Nguyen VT, Santiago LY, Doctor JS, Lee WP, Marra KG. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plast Reconstr Surg*. 2007 May;119(6):1839-51.
45. Schlosshauer B, Dreesmann L, Schaller HE, Sinis N. Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. *Neurosurgery*. 2006 Oct;59(4):740-7; discussion 7-8.
46. Camarata PJ, Suryanarayanan R, Turner DA, Parker RG, Ebner TJ. Sustained release of nerve growth factor from biodegradable polymer microspheres. *Neurosurgery*. 1992 Mar;30(3):313-9.
47. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neurosci Methods*. 1998 Nov 1;85(1):119-27.
48. Ahmed Z, Brown RA, Ljungberg C, Wiberg M, Terenghi G. Nerve growth factor enhances peripheral nerve regeneration in non-human primates. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1999 Dec;33(4):393-401.
49. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. *Microsurgery*. 1999;19(6):275-80.
50. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J Control Release*. 2000 Oct 3;69(1):149-58.
51. Fine EG, Decosterd I, Papaloizos M, Zurn AD, Aebischer P. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci*. 2002 Feb;15(4):589-601.
52. Lee AC, Yu VM, Lowe JB, 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2003 Nov;184(1):295-303.
53. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg*. 2003 Sep;99(3):555-65.
54. Tsai CC, Lu MC, Chen YS, Wu CH, Lin CC. Locally administered nerve growth factor suppresses ginsenoside Rb1-enhanced peripheral nerve regeneration. *Am J Chin Med*. 2003;31(5):665-73.
-

-
55. Xu X, Yee WC, Hwang PY, Yu H, Wan AC, Gao S, et al. Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2405-12.
56. Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Pietrucha-Dutczak M, Olakowska E, Malinowska I, et al. Influence of nerve growth factor upon the injured peripheral nerve in the absence of its distal part. *Ital J Anat Embryol*. 2004 Oct-Dec;109(4):199-208.
57. Mok SA, Campenot RB. A nerve growth factor-induced retrograde survival signal mediated by mechanisms downstream of TrkA. *Neuropharmacology*. 2007 Feb;52(2):270-8.
58. Bhang SH, Lee TJ, Lim JM, Lim JS, Han AM, Choi CY, et al. The effect of the controlled release of nerve growth factor from collagen gel on the efficiency of neural cell culture. *Biomaterials*. 2008 Oct 4.
59. Chang CJ. Effects of nerve growth factor from genipin-crosslinked gelatin in polycaprolactone conduit on peripheral nerve regeneration-In vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Nov 4.
60. Chang CJ. The Effect of Pulse-Released Nerve Growth Factor from Genipin-Crosslinked Gelatin in Schwann Cell-Seeded Polycaprolactone Conduits on Large-Gap Peripheral Nerve Regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2008 Oct 16.
61. Gao C, Ma S, Ji Y, Wang JE, Li J. Sciatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: an experimental study. *Injury*. 2008 Dec;39(12):1414-20.
62. Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar 15;80(4):998-1002.
63. Derby A, Engleman VW, Friedrich GE, Neises G, Rapp SR, Roufa DG. Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve. *Exp Neurol*. 1993 Feb;119(2):176-91.
64. Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson EM, Jr. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J Neurosci*. 1988 Feb;8(2):664-81.
65. Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM, Jr. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(11):4094-8.
-

66. Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):571-84.
67. Schlosshauer B, Muller E, Schroder B, Planck H, Muller HW. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res*. 2003 Feb 14;963(1-2):321-6.
68. Bozkurt A, Deumens R, Beckmann C, Olde Damink L, Schugner F, Heschel I, et al. In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels. *Biomaterials*. 2009 Jan;30(2):169-79.
69. Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, Terenghi G. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2002 Feb;173(2):213-23.
70. Keilhoff G, Fansa H, Schneider W, Wolf G. In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits. *J Neurosci Methods*. 1999 Jul 1;89(1):17-24.
71. Chen MB, Zhang F, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg*. 2006 Oct;57(4):462-71.
72. Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, Asou H, Vacanti CA, Vacanti MP. A novel technique to isolate adult Schwann cells for an artificial nerve conduit. *J Neurosci Methods*. 2003 Jan 30;122(2):195-200.
73. Hou SY, Zhang HY, Quan DP, Liu XL, Zhu JK. Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. *Neuroscience*. 2006 Jun 19;140(1):101-10.
74. Hess JR, Brenner MJ, Fox IK, Nichols CM, Myckatyn TM, Hunter DA, et al. Use of cold-preserved allografts seeded with autologous Schwann cells in the treatment of a long-gap peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jan;119(1):246-59.
75. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci*. 2001 Dec;14(11):1771-6.
76. Keilhoff G, Goihl A, Langnase K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol*. 2006 Jan;85(1):11-24.
-

-
77. Wang D, Liu XL, Zhu JK, Jiang L, Hu J, Zhang Y, et al. Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain Res.* 2008 Jan 10;1188:44-53.
78. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(4):487-500.
79. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3483-93.
80. Hu J, Zhu QT, Liu XL, Xu YB, Zhu JK. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol.* 2007 Apr;204(2):658-66.
81. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res.* 2005 Aug 15;308(2):283-90.
82. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* 2007 Oct;207(2):267-74.
83. Ryden M, Dicker A, Gotherstrom C, Astrom G, Tammik C, Arner P, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Nov 14;311(2):391-7.
84. Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT. Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechano-structural properties. *Biomaterials.* 2001 May;22(10):1065-75.
85. Kalbermatten DF, Kingham PJ, Mahay D, Mantovani C, Pettersson J, Raffoul W, et al. Fibrin matrix for suspension of regenerative cells in an artificial nerve conduit. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008 Jun;61(6):669-75.
86. Lee AC, Yu VM, Lowe JB, 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2003 Nov;184(1):295-303.
87. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials.* 2003 Jun;24(14):2497-502.
-

-
88. Akassoglou K, Akpinar P, Murray S, Strickland S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. *Neurosci Lett*. 2003 Mar 6;338(3):185-8.
89. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J Control Release*. 2000 Oct 3;69(1):149-58.
90. Vleggeert-Lankamp CL. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2007 Dec;107(6):1168-89.
91. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996 Dec;98(7):1264-71, discussion 72-4.
92. Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006 Sep;64(3B):750-6.
93. Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res*. 2005 Sep 8;163(2):143-58.
94. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*. 2000 Mar 15;96(2):89-96.
95. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982 Sep;77(3):634-43.
96. Hasegawa K. A new method of measuring functional recovery after crushing the peripheral nerves in unanesthetized and unrestrained rats. *Experientia* 1978 Feb 15;34(2):272-3.
97. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989 Jan;83(1):129-38.
98. Sakiyama-Elbert SE, Panitch A, Hubbell JA. Development of growth factor fusion proteins for cell-triggered drug delivery. *FASEB J*. 2001 May;15(7):1300-2.
-

-
99. Asato F, Butler M, Blomberg H, Gordh T. Variation in rat sciatic nerve anatomy: Implications for a rat model of neuropathic pain. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2000;5(1):19-21.
100. Puigdellivol-Sanchez A, Forcada-Calvet P, Prats-Galino A, Molander C. Contribution of femoral and proximal sciatic nerve branches to the sensory innervation of hindlimb digits in the rat. *Anat Rec*. 2000 Oct 1;260(2):180-8.
101. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London,: Methuen; 1959.
102. Ahmed M, Jayakumar R. Peripheral nerve regeneration in RGD peptide incorporated collagen tubes. *Brain Res*. 2003 Dec 12;993(1-2):208-16.
103. Valero-Cabre A, Navarro X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res*. 2001 Nov 23;919(2):302-12.
104. Hall GD, van Way CW, 3rd. A comparison of nerve grafting and tissue expansion techniques in the rat. *Microsurgery*. 1994;15(6):439-42.
105. Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*. 1992 Feb;89(2):251-8.
106. Callegari-Jacques S. *Bioestatística, Princípios e Aplicações*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
107. Weber RA, Proctor WH, Warner MR, Verheyden CN. Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery*. 1993;14(5):323-7.
108. Sporel-Ozokat RE, Edwards PM, Heggul KT, Savas A, Gispén WH. A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. *J Neurosci Methods*. 1991 Feb;36(2-3):263-5.
109. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR, Murrell GA. Denatured muscle as a nerve conduit: a functional, morphologic, and electrophysiologic evaluation. *J Reconstr Microsurg*. 1994 May;10(3):137-44.
110. den Dunnen WF, Meek MF. Sensory nerve function and auto-mutilation after reconstruction of various gap lengths with nerve guides and autologous nerve grafts. *Biomaterials*. 2001 May;22(10):1171-6.
-

111. Bervar M. Video analysis of standing--an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*. 2000 Oct 30;102(2):109-16.
112. de Ruyter GC, Spinner RJ, Alaid AO, Koch AJ, Wang H, Malessy MJ, et al. Two-dimensional digital video ankle motion analysis for assessment of function in the rat sciatic nerve model. *J Peripher Nerv Syst*. 2007 Sep;12(3):216-22.
113. Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P, Siskin BF. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *J Neurosci Methods*. 1994 Apr;52(1):47-52.
114. Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, et al. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve*. 1995 Oct;18(10):1128-38.
115. Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989;10(3):220-5.
116. Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P, Xavier LL, et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2008 Jul-Aug;22(4):355-66.
117. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2006;14:133-6.
118. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods*. 2008 May 30;170(2):255-61.
-

APÊNDICE

Anexo 1 – Artigo submetido para publicação



[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões](#) > [#ANP-25](#) > **Resumo**

#ANP-25 : UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA APÓS LESÕES...

RESUMO	AVALIAÇÃO	EDIÇÃO
Submissão		
Autores	Javier Andres Román, Jefferson Luiz Braga da Silva	
Título	UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA APÓS LESÕES NERVOSAS SEGMENTARES EM NERVO CIÁTICO DE RATOS	
Documento Original	ANP-25-8527-38119-1-SM.DOC 2009-01-28	
Doc. Sup.	ANP-25-8527-38120-1-SP.JPG 2009-01-28 INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR	
	ANP-25-8527-38121-1-SP.JPG 2009-01-28	
Submetido por	javier a román	
Data de submissão	January 28, 2009 - 11:28 AM	
Seção	Artigos / Articles	
Editor	Nenhum(a) designado(a)	
Comentários do Autor	O presente artigo apresenta os resultados de uma pesquisa que visa avaliar a utilidade do índice funcional da marcha ou Sciatic Functional Index (SFI) num modelo de lesão de nervo ciático, do tipo neurotome em ratos	
Status		
Status	Aguardando designação	
Iniciado	2009-01-28	
Última alteração	2009-01-28	
Metadados da Submissão		
EDITAR METADADOS		
Autores		
Nome	Javier Andres Román	
Instituição	Pontificia Universidade Católica do Chile	
Resumo da Biografia	Médico Ortopedista Departamento de Ortopedia y Traumatología Pontificia Universidad Católica de Chile. Mestrando em Ciências da Saúde, Área de Concentração em Clínica Cirúrgica Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Brasil	
Contato Principal para correspondência.		
Nome	Jefferson Luiz Braga da Silva	
Instituição	PUCRS	
Resumo da Biografia	Chefe do Serviço de Mão e Microcirurgia Hospital São Lucas da PUCRS Porto Alegre Brasil	
Título e Resumo		
Título	UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA APÓS LESÕES NERVOSAS SEGMENTARES EM NERVO CIÁTICO DE RATOS	
Resumo	Introdução: O índice funcional da marcha (SFI) é o método de avaliação mais utilizado após lesões do nervo ciático em ratos; porém seu uso em modelos de neurotome tem sido questionado. O objetivo do presente trabalho foi estudar o desempenho do SFI, em um modelo	

de transecção nervosa.

Métodos: Foram utilizados 30 ratos Wistar, divididos em cinco grupos, nos quais se realizou uma lesão com perda de 12 mm. A perda foi reparada com tubo de silicone enriquecido com substâncias potencialmente promotoras da regeneração nervosa ou enxerto. O SFI foi medido entre as 5ª e 16ª semanas após a cirurgia.

Resultados: Após 16 semanas, 21 dos 24 animais com tubo falharam em reconstituir nervo (87,5%). Nos três animais em que um nervo cresceu o SFI não evidenciou mudanças que demonstraram recuperação.

Conclusões: O SFI não é um método adequado para avaliar regeneração nervosa após grandes defeitos ciáticos em ratos.

Indexação

Classificação de Assunto

Neurocirurgia

Palavras-chave

nervo ciático, regeneração nervosa, experimentação animal, avaliação de resultado de intervenções terapêuticas, adesivo tecidual de fibrina, fator de crescimento neural sciatic nerve, nerve regeneration, animal experimentation, evaluation of

Idioma

pt

Agências de Financiamento

Agências

CAPES

Outros dados

Tipo de documento

artigo original



javier roman <romanjavi@gmail.com>

[ANP] Agradecimento pela Submissão

Antonio Spina-França netto <appscielo@bireme.org>

28 de enero de 2009 10:59

Responder a: Antonio Spina-França netto <arq.neuropsiquiatria@terra.com.br>

Para: javier a román <romanjavi@gmail.com>

javier a román,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA APÓS LESÕES NERVOSAS SEGMENTARES EM NERVO CIÁTICO DE RATOS" a Arquivos de Neuro-Psiquiatria. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/anp/author/submission/8527>

Login: javierromanv

Em caso de dúvida, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Antonio Spina-França netto
Arquivos de Neuro-Psiquiatria
Dr. Antonio Spina-França
Editor

Arquivos de Neuro-Psiquiatria
<http://submission.scielo.br/index.php/anp>

Título

**UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA APÓS LESÕES
NERVOSAS SEGMENTARES EM NERVO CIÁTICO DE RATOS**

Título Abreviado:

UTILIZAÇÃO DO SFI APÓS LESÕES SEGMENTARES

Autores:

JAVIER ANDRES ROMAN VEAS MD.* (citar como Román, J.A.)

Medico Ortopedista

Mestrando em Clinica Cirúrgica da PUCRS

JEFFERSON LUIS BRAGA DA SILVA PhD. (citar como Braga-Silva, J)

Chefe do Serviço de Cirurgia da Mão e Microcirurgia

Hospital São Lucas da PUCRS

Trabalho realizado no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica
da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre,RS- Brasil

*Autor: Javier Román ,

Bolsista da CAPES, Curso Mestrado em Ciências da Saúde,

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica. Da PUCRS

Correspondência: Av. Pedro de Valdivia 4131, Ñuñoa, Santiago- CHILE

E-mail : romanjavi@gmail.com

Telefone :56-77251121

Os autores declaram que não existem conflitos de interesses
associados com a presente pesquisa.

UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ANÁLISE DA MARCHA APÓS LESÕES NERVOSAS SEGMENTARES EM NERVO CIÁTICO DE RATOS

RESUMO

Introdução: O índice funcional da marcha (SFI) é o método de avaliação mais utilizado após lesões do nervo ciático em ratos; porém seu uso em modelos de neurotmesa tem sido questionado. O objetivo do presente trabalho foi estudar o desempenho do SFI, em um modelo de transecção nervosa.

Métodos: Foram utilizados 30 ratos Wistar, divididos em cinco grupos, nos quais se realizou uma lesão com perda de 12 mm. A perda foi reparada com tubo de silicone enriquecido com substâncias potencialmente promotoras da regeneração nervosa ou enxerto. O SFI foi medido entre as 5^o e 16^o semanas após a cirurgia.

Resultados: Após 16 semanas, 21 dos 24 animais com tubo falharam em reconstituir nervo (87,5%). Nos três animais em que um nervo cresceu o SFI não evidenciou mudanças que demonstraram recuperação.

Conclusões: O SFI não é um método adequado para avaliar regeneração nervosa após grandes defeitos ciáticos em ratos.

Palavras-chave: nervo ciático, regeneração nervosa, experimentação animal, avaliação de resultado de intervenções terapêuticas, adesivo tecidual de fibrina, fator de crescimento neural

ABSTRACT

Introduction: The Sciatic Function Index (SFI) is the most employed method of evaluation after sciatic nerve injury in rats; however, its use has been questioned in models of neurotmesis. The objective was to study SFI behavior in a transection model.

Methods: Thirty young adult Wistar rats were divided in 5 groups, in which a nerve gap was created, with a gap of 12 mm. The nerve gap was repaired using autograft, or silicone nerve conduits, filled with agents potentially promoters of nerve repair. A SFI was recorded each week since the fifth until the sixteen, after surgery.

Results: After 16 weeks 21 of 24 animals with conduits failed to reconstitute a nerve (87,5%). Of the three animals that showed nerve bridging inside the conduit, the SFI score had not changes that demonstrated improvements

Conclusions: The SFI is not a reliable method to measure nerve repair after large nerve gaps in rats.

Key-words: sciatic nerve, nerve regeneration, animal experimentation, evaluation of results of therapeutic intervention, fibrin tissue adhesive, nerve growth factor.

INTRODUÇÃO

As lesões dos nervos periféricos são um tipo de problema encontrado com frequência na atividade clínica diária; e pelo geral ocasionam déficits funcionais significativos na população afetada. Embora a maior parte dessas lesões não coloque em risco a vida dos pacientes, apresentam um alto impacto sócio-econômico (1, 2).

Um dos grandes problemas é a dificuldade para se quantificar o processo de regeneração nervosa. Os estudos histológicos, morfométricos, eletrofisiológicos e as medidas funcionais de regeneração têm sido bem estabelecidos no tempo, mas a correlação entre eles é escassa ou nula. Os estudos de recuperação funcional apresentam maior dificuldade em obter medidas quantitativas, mas são considerados os mais significativos na hora de interpretar resultados (3, 4). Um método quantitativo e reprodutível apareceu na década de 80 por meio de um sistema que visava avaliar tanto o nível de lesão como o grau de recuperação após lesões de nervo ciático em ratos, mediante as análises das pegadas incorporadas em uma fórmula, o que foi chamado índice de função ciático ou sciatic functional index (SFI). Desde então, esse método tem sido utilizado com muita frequência como medida de avaliação funcional após lesões de tipo compressão ou axonotmese. Ocorre, porém, que sua real contribuição a lesões completas do tipo transecção ou neurotmese tem sido posta em dúvida, pois o método apresenta problemas para se obterem bons registros das pegadas, conforme o tempo passa (5, 6).

O propósito do presente trabalho foi estudar o comportamento do teste funcional da marcha como medida de avaliação funcional em um modelo experimental de lesão de grande porte em nervo ciático de rato.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo, controlado e randomizado em ratos Wistar, exclusivamente destinados para pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Foram utilizados 35 ratos (*Rattus norvegicus*). Cinco ratos eram machos, e 30 eram fêmeas, adultos jovens entre 2 a 4 meses, isogênicos da linhagem Kyoto, com um peso entre 220 ± 30 gramas, provenientes e mantidos no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, em condições ambientes adequadas para a espécie, mantidos em gaiolas individuais, recebendo livre acesso para água e alimento

Foram utilizadas fêmeas randomicamente alocadas em 5 grupos experimentais. Os cinco animais machos foram utilizados como doadores de medula óssea. Os grupos experimentais estão representados na tabela 1.

Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando técnicas assépticas com a ajuda de um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil). Foi administrada anestesia intraperitoneal com uma solução constituída por 0,2mL de Cloridrato de Clorpromazina (Clorpromaz 5mg /mL) + 0,8mL de Ketamina (Ketamin-S(+), 50 mg /mL, Cristalia, Brasil) na dose de 0,3mL de solução /100 gramas de peso corporal do rato. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião (o autor).

Foram criadas perdas de substância de grande porte no nervo ciático dos ratos e interposto um tubo de silicone ou enxerto autólogo de nervo, conforme cada grupo do estudo. As células e o gel contendo ou não o fator de crescimento neural foram colocadas no interior do tubo de silicone, em contato com as duas extremidades do nervo lesionado, de forma que se constituísse uma câmara, onde os preparados ficaram contidos.

No caso de utilização de modelo de auto-enxerto, foi realizada a secção de um segmento de 12 mm, aproximadamente 5 mm distal à emergência do nervo ciático e 2 mm acima da trifurcação de nervo ciático na região distal da coxa, reparando com o mesmo segmento, invertido 180 graus – este segmento foi utilizado como auto-enxerto,

suturado com 2 pontos ao epineuro em cada extremo do enxerto, utilizando fio mono nylon 9-0 (Ethilon[®] Johnson & Johnson Intl., Belgium). No caso dos modelos com sistemas de tubulização, um segmento de nervo de 7 mm foi retirado da região acima da trifurcação do nervo ciático, e um defeito de 12 mm foi criado dentro do tubo de silicone, o qual foi preenchido segundo o grupo,. O tubo de silicone foi fixado mediante dois pontos de sutura ao epineuro em cada extremo, utilizando um fio de monofilamento 9-0 (Ethilon[®] Johnson & Johnson Intl., Belgium). Foi realizada primeiramente a fixação proximal do tubo ao nervo – o objetivo era deixar a abertura distal disponível para injetar o gel de fibrina com seus componentes; e, logo após a polimerização do mesmo, procedeu-se a sutura do coto distal ao tubo.

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais após as cirurgias. sendo utilizada uma solução de paracetamol para analgesia.

Materiais de preenchimento dos tubos

Gel de Fibrina

Um gel de fibrina foi produzido a partir de um produto de fibrinogênio de origem humana, livre de plasminogênio, comercialmente disponível, (Berioplast P[®], ZLB Behring GmbH, Marburg. - Alemanha), modificado e enriquecido com heparina. A união da heparina dentro do gel de fibrina permite a fixação do fator de crescimento dentro da matriz e prolonga a bio-disponibilidade do fator durante um maior período de tempo, prevenindo a sua rápida difusão quando colocado livremente dentro do tubo (7-10).

Células mononucleares de medula óssea

Neste estudo, foram utilizados como doadores ratos machos Para a obtenção das células de medula óssea, os ratos foram anestesiados de acordo com o protocolo (ver seção de procedimentos anestésicos) e imediatamente sacrificados com sobredose de pentobarbital. As células da medula óssea foram isoladas por gradiente de densidade mediante centrifugação com Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL - Amersham Biosciences)

Fator de Crescimento Neural (Nerve Growth Factor, NGF)

Foi utilizada a preparação do fator de crescimento NGF 7S (Gibco, Invitrogen Corp) origem murino. Trata-se de um complexo obtido da glândula submandibular do rato, que contém uma subunidade 2,5 também conhecida como subunidade β . A solução com o fator de crescimento foi reconstituída a partir de um liofilizado, até a uma concentração final de 100 ng /mL.

Procedimento de Eutanásia

Foram utilizadas sobre-dosagens de Pentobarbital sódico (Tiopental[®]) de 100 mg /kg intra cardíaca com o rato previamente anestesiado, sem provocar dor ou outro sofrimento ao animal.

Teste de análise funcional da marcha

Provas de avaliação funcional da marcha foram realizadas semanalmente para cada rato, a partir da quinta semana de pós-operatório, mediante o índice funcional de marcha (SFI). Este teste entrega informação quantitativa baseada em uma fórmula proposta por Bain que levam em conta diversas mensurações feitas nas impressões das patas do rato ao caminhar em um corredor (11).

$$SFI = -38.3 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \times \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

As distâncias medidas foram (1) a amplitude da pegada entre o primeiro e quinto dedo, o que em inglês é chamado de “*toe spread*” (TS); (2) a amplitude da pegada entre o segundo e quarto dedo, o “*intermediate toe spread*” (ITS); (3) comprimento da pegada, que é a maior distância média entre a ponta do terceiro dedo e a região do calcanhar, o “*print length*” (PL). Para a obtenção das pegadas, utilizou-se um corredor mais comprido (80 cm) do utilizado por Medinacelli (43 cm), pois permitiu obter um

maior número de pegadas com uma só passagem pelo corredor. Uma vez definidas quais pegadas seriam medidas, realizou-se a aquisição da imagem digitalizada utilizando um scanner convencional (Genius[®], modelo ColorPage HR7X Slim), com resolução de 300 pixels por polegada para imagem em preto e branco, em formato de imagem de alta qualidade (. TIFF). A mensuração das distâncias foi realizada mediante o software de domínio público Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>), e as medidas exportadas pelo programa diretamente a uma planilha de cálculo de Microsoft Excel, versão 2007, Microsoft[®] Corporation.

Análises Estatísticas

Foi realizada uma análise descritiva das medidas obtidas nas unidades experimentais e as variáveis quantitativas obtidas das análises funcionais foram submetidas à avaliação da normalidade e homocedasticidade com os testes de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly.

Uma análise de variância para medidas repetidas com dois fatores - grupo e tempo - foi realizada através do critério de Wilk's Lambda para testar interação. A hipótese de que não existe diferença entre os grupos foi rejeitada quando o p-valor é inferior ao nível de significância de 0,05, identificando quais os grupos são diferentes estatisticamente, utilizando o teste de comparação pós-análise de Tukey.

Com o objetivo de testar a reprodutibilidade do método realizou se um teste de concordância entre as médias obtidas por dois observadores independentes, mediante o teste t de Student para amostras pareadas. Como medida de efeito foi calculada o tamanho de efeito padronizado (TEP), que é a razão entre a diferença das médias e o desvio padrão comum (que é, por sua vez, a média dos desvios padrão de cada avaliador).

O programa estatístico utilizado foi o SPSS versão 13.0 para Windows

RESULTADOS

Praticamente a totalidade dos ratos sobreviveu ao procedimento cirúrgico. O número de ratos que completaram a experiência foi 30 (Tabela 2).

Após 16 semanas, 21 dos 24 animais com tubo falharam em reconstituir nervo (87,5%). Todos os animais com auto-enxerto demonstraram adequada integração do mesmo

Nos três animais em que uma ponte de nervo cresceu dentro do tubo, o SFI não evidenciou mudanças que demonstraram recuperação funcional.

Quando utilizado auto-enxerto (padrão ouro) como método de reparação nervosa, o índice funcional da marcha demonstra uma recuperação funcional limitada, em torno de 43% do valor normal (SFI de -57), o que é alcançado a partir da 11ª semana, sem apresentar variações após esta data.

Quando utilizado um sistema de tubulização como método de reparo, o índice funcional da marcha não mostra variações no período de observação: mantém-se estável em um valor de SFI em torno de -78, resultado que representa a ausência de efeito regenerativo.

Realizaram-se 351 testes de marcha de um total de 360 programados (97,5%), com um total de 510 registros em fita de papel. Uma das datas do teste foi omitida por erro, na sexta semana, no grupo 2 (seis ratos);. Todos os outros ratos obtiveram registro adequado, nas datas programadas.

O número de registros em papel foi maior do que o dos testes programados, pois em média o teste foi repetido em 45% das vezes.

Em média, um número total de 14 pegadas foi registrado por cada fita de papel e duas pegadas de cada pata (normal e experimental) foram escolhidas para serem digitalizadas. Foram necessários mais registros na medida em que os ratos progrediam em semanas de evolução e apresentavam deformidades em garra dos dedos (Fig.1).

Na avaliação semanal das patas dos ratos, não foi encontrado em nenhum dos animais sinal indicativo de automutilação.

O comportamento dos grupos a respeito do SFI foi semelhante ao longo do tempo, visto que não houve interação estatisticamente significativa ($F_{(40; 58,7)} = 0,92$; $p = 0,604$). Isso quer dizer que o comportamento das curvas de progressão do índice funcional ao longo do tempo (eixo horizontal) apresenta oscilações semelhantes entre os grupos, e a diferença existe ao nível de recuperação conseguida (eixo vertical, que representa o valor do SFI alcançado) (Fig.2 , e Tabelas 3 e 4).

Considerando os resultados obtidos mediante análise de variância, ao final do período de observação de 16 semanas verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo 1 de auto-enxerto e todos os demais grupos, não existindo diferenças entre nenhum dos grupos reparados com tubo ($p=0,003$).

Analisando o momento em que aparecem as diferenças entre o grupo 1 e os demais grupos, pode-se apreciar na figura 2 que a primeira diferença estatística aparece na sétima semana, mas torna-se persistente só após 11 semanas, com a exceção da 15ª semana, em que por escassa margem não se alcançou uma diferença significativa.

Como medida de reprodutibilidade entre observadores, foi calculada a quantia da diferença encontrada nas médias do SFI, analisados os resultados globais do SFI por semana entre dois avaliadores independentes, chamados avaliador 1 e o avaliador 2. Esta diferença foi quantificada em unidades de desvio padrão (Tabela 5).

Conforme os valores de média e desvio padrão entre dois observadores, o índice de função ciático demonstrou uma medida de dispersão, representada pelo desvio padrão médio (a média de todos os desvios padrão), que alcançou um valor em torno de 11 (mínimo 7,5; máximo 14,6).

DISCUSSÃO

A utilização de modelos animais continua sendo uma ferramenta importante para incrementar o conhecimento acerca de condições que precisam ser resolvidas na área médica.

O índice funcional da marcha tem sido usado por muitos pesquisadores como o padrão ouro para valorizar a recuperação funcional após lesão nervosa em nervo ciático de ratos; porém, seu uso tem sido associado fundamentalmente a modelos de lesão do tipo esmagamento, os quais apresentam uma alta probabilidade de recuperação espontânea, após 8 a 10 semanas de observação.

O índice funcional da marcha tem sido usado em modelos de transecção com resultados variáveis. No caso de uma transecção nervosa reparada com auto-enxertos ou com substitutos de enxerto, os melhores resultados até agora continuam sendo com a utilização de auto-enxertos, com um potencial de reparação muito limitado (12-14).

Segundo referido em alguns estudos de lesão nervosa tratada com enxerto autólogo, o índice funcional da marcha apresenta uma recuperação que se inicia em torno da quinta semana, estabilizando-se em um valor final correspondente a 40% do valor considerado como normal (5, 15). Em nosso experimento, o valor do SFI no grupo com auto-enxerto alcança um valor em torno de 43% do normal, com uma diferença estatisticamente significativa em relação os grupos com tubo – situação alcançada de maneira estável a partir da 11^a semana, mantendo-se até o final do seguimento, na 16^a semana. Em um estudo de seguimento a longo prazo, foi possível observar que, em lesões de transecção de nervo ciático, esta recuperação alcançada em torno da 12^a semana, e permanece estável, inclusive após um ano de acompanhamento, com um valor de 41% do normal (16), resultado altamente semelhante ao apresentado por esta pesquisa. O melhor grau de recuperação após neurotinese relatado na literatura foi descrito por Meek (1999) utilizando um sistema de tubulização absorvível e permeável, com parede fina composto de um copolímero biodegradável. Este autor observou que a recuperação motora avaliada por SFI inicia-se na quinta semana e, logo após 15 semanas, apresenta um índice de recuperação de 70%, no entanto se estabiliza nesse valor, devido à automutilação, que impede posteriores melhorias. Resultados semelhantes a este, quanto ao grau de recuperação funcional, são escassos. É preciso destacar que nosso grupo de animais não mostrou sinais de automutilação, e mesmo assim não houve mudanças significativas no índice de escore ciático depois da 11^a

semana no grupo com auto-enxerto. O nosso resultado de ausência de autotomia em todos os ratos nos faz discordar da hipótese apresentada por alguns autores de que a taxa de autotomia pode ser utilizada como um método para comparar diferentes técnicas de reparação (17, 18). Essa discordância é também apoiada por uma revisão sistemática dos métodos de avaliação de regeneração nervosa, quando utilizados modelos de tubulização (19)

Comparados os resultados quando agrupados em dois grandes grupos – grupo de auto-enxerto e grupo com tubo –, percebeu-se a estreita margem de valores no SFI entre a melhor resposta esperada (utilizando-se auto-enxerto) e a pior resposta esperada (ausência completa de regeneração, encontrada na maior parte dos grupos com tubo). Esses valores oscilam entre um máximo de -57 e um mínimo de -78, com uma amplitude total de 21 pontos na escala do SFI. Essa condição dificulta a probabilidade de serem encontradas diferenças entre os valores intermediários, já que todos os valores possíveis se encontraram muito próximos, necessitando utilizar um maior número de animais para diminuir a margem de erro e detectar uma diferença estatisticamente significativa, mas que muito provavelmente seguirá sendo pouco relevante do ponto de vista clínico, dada a pequena magnitude do efeito final.

Como medida de reprodutibilidade entre dois observadores independentes, foi calculada a quantia da diferença encontrada. Embora existissem diferenças estatisticamente significativas nas médias do SFI nas semanas 7,12 e 14, a magnitude dessa diferença em unidades de desvio padrão foi mínima, com escassa relevância prática.

O índice de função ciático demonstrou uma medida de dispersão, representada pelo desvio padrão médio que alcançou um valor em torno de 11. Tal resultado representa entre 14 e 19 % do valor da média do SFI do grupo com auto-enxerto e da média do grupo com tubo, respectivamente. Essa medida, conhecida como coeficiente de variação é considerada alta para um desenho experimental, o qual deveria ter um coeficiente de variação menor de 10%, representando o *grau de imprecisão* da estimativa em torno da média

Assim, dada a baixa amplitude de valores do SFI no modelo e uma alta imprecisão da estimativa, aumenta a possibilidade de se cometer um erro tipo II, que é a probabilidade de não encontrar uma diferença quando esta realmente existe. Ao incrementar a probabilidade de erro tipo II (também chamado nível β), diminui sua probabilidade complementar, representada por $1-\beta$, que é o *poder do teste*. Fica mais

fácil entender agora por que, sob a condição de distribuição dos dados encontrados, o teste se apresenta com *baixo poder*, ou seja, oferece baixa probabilidade de encontrar uma diferença entre médias quando esta verdadeiramente existe (20)

À mesma conclusão, a respeito da limitação do SFI, chegou Vleggeert-Lankamp (2007) em uma revisão sistemática recente dos métodos de avaliação da regeneração nervosa quando utilizados condutos. Analisados 17 trabalhos de regeneração de lesão de nervo ciático de rato, com defeito mínimo de 5 mm, utilizando condutos sintéticos e SFI como medida de avaliação, demonstrou-se que, quando os diversos resultados apresentados são tratados estatisticamente utilizando o teste de Fisher, não existem diferenças entre os grupos, estabelecendo que ainda a aparentemente capacidade de discriminar entre grupos sem tratamento e enxertados foi estatisticamente não relevante. Este autor cita dois trabalhos semelhantes ao nosso, em que não houve crescimento do nervo dentro do tubo; porém os resultados no SFI foram semelhantes entre os grupos. Conclui que, com base nos dados apresentados na literatura e na revisão estatística dos resultados, a utilização do SFI não é recomendada como uma medida de avaliação funcional no futuro (19).

CONCLUSÕES

No modelo de perda segmentar de grande porte (12 mm) no nervo ciático de rato o índice funcional da marcha não é um método adequado para diferenciar níveis de regeneração nervosa. Medidas funcionais, mais precisas e com maior poder, deverão ser encontradas para avaliar adequadamente a regeneração nervosa neste tipo de modelo.

TABELAS**Tabela 6 - Descrição dos grupos experimentais**

Grupo	Descrição
1	Auto-enxerto (sem tubo)
2	Tubo com fibrina
3	Tubo com fibrina + células mononucleares de medula óssea (CMMO) com fator de crescimento neural
4	Tubo com fibrina + células mononucleares de medula óssea (CMMO) sem fator de crescimento neural
5	Tubo com fibrina e fator de crescimento neural

Fonte: O Autor

Tabela 7 - Distribuição de animais por grupo experimental e por perdas

Grupo	n° ratos que iniciaram	n° de perdas	n° ratos que terminaram
1	6	0	6
2	6	0	6
3	6	1	5
4	6	0	6
5	7	0	7

Fonte: O Autor

Tabela 8 - Variação das médias \pm DP do índice de escore funcional da marcha segundo grupo por avaliador 1.

Semanas	Grupo				
	1	2	3	4	5
Pré op.	-4	-4	-4	-4	-4
1	-100	-100	-100	-100	-100
5	-74,53 \pm 7,66	-72,48 \pm 15,31	-77,28 \pm 8,99	-80,48 \pm 8,14	-79,94 \pm 8,24
6	*	-75,06 \pm 9,46	79,41 \pm 6,71	-86,05 \pm 6,49	-79,18 \pm 7,77
7	-59,87 \pm 7,66	-75,73 \pm 5,44	-72,11 \pm 13,72	-77,52 \pm 8,00	-77,57 \pm 5,39
8	-68,67 \pm 6,07	-75,93 \pm 7,23	-77,13 \pm 5,04	-79,19 \pm 8,04	-77,38 \pm 8,49
9	-66,85 \pm 17,01	-73,03 \pm 4,67	-75,15 \pm 4,61	-80,83 \pm 10,18	-72,56 \pm 5,12
10	-62,85 \pm 9,77	-70,63 \pm 10,21	68,21 \pm 12,14	-75,32 \pm 5,52	-76,04 \pm 12,40
11	-53,78 \pm 6,47	-74,24 \pm 10,59	-77,29 \pm 12,70	-74,28 \pm 15,45	-64,45 \pm 16,46
12	-58,23 \pm 13,51	-75,72 \pm 12,15	-72,82 \pm 7,50	-78,94 \pm 4,78	-68,92 \pm 9,54
13	-56,18 \pm 13,93	-77,32 \pm 3,87	-71,29 \pm 8,30	-76,17 \pm 3,80	-67,14 \pm 12,92
14	-55,27 \pm 14,80	-76,92 \pm 4,68	-78,90 \pm 9,71	-83,92 \pm 7,46	-80,12 \pm 7,36
15	-63,36 \pm 6,35	-74,24 \pm 8,94	-76,28 \pm 6,97	-77,73 \pm 10,79	-76,20 \pm 5,44
16	-56,97 \pm 12,71	-78,33 \pm 4,89	-77,41 \pm 8,93	-79,46 \pm 8,87	-75,58 \pm 11,27

*Perda no registro.

Tabela 9 - Variação das médias \pm DP do índice de escore funcional da marcha segundo grupo por avaliador 2.

Semanas	Grupo				
	1	2	3	4	5
Pré op.	-4	-4	-4	-4	-4
1	-100	-100	-100	-100	-100
5	-79,57 \pm 11,71	-75,25 \pm 13,81	-77,80 \pm 15,57	-79,83 \pm 9,14	-79,97 \pm 5,35
6	*	-75,75 \pm 6,30	-84,93 \pm 7,21	-86,11 \pm 5,52	-81,13 \pm 9,96
7	-64,61 \pm 13,96	-76,24 \pm 5,73	-78,31 \pm 14,12	-82,45 \pm 7,23	-78,62 \pm 8,29
8	-69,55 \pm 6,64	-78,20 \pm 8,06	-77,07 \pm 8,38	-79,26 \pm 9,53	-76,35 \pm 9,49
9	-69,47 \pm 17,17	-74,02 \pm 4,43	-74,32 \pm 9,45	-83,71 \pm 8,76	-74,05 \pm 8,08
10	-65,10 \pm 10,11	-71,43 \pm 9,79	-66,73 \pm 12,21	-76,37 \pm 4,98	-71,25 \pm 11,34
11	-52,68 \pm 8,79	-75,36 \pm 10,18	-76,68 \pm 12,57	-71,87 \pm 12,65	-65,84 \pm 13,64
12	-63,43 \pm 15,78	-77,76 \pm 13,72	-77,17 \pm 8,94	-79,21 \pm 5,85	-73,64 \pm 8,81
13	-57,29 \pm 15,44	-76,76 \pm 5,27	-71,66 \pm 9,41	-80,30 \pm 4,02	-65,68 \pm 13,31
14	-59,68 \pm 15,29	-79,06 \pm 8,93	-79,77 \pm 10,68	-84,79 \pm 7,55	-79,59 \pm 6,87
15	-66,06 \pm 9,45	-73,43 \pm 9,09	-75,40 \pm 15,70	-75,23 \pm 12,54	-77,72 \pm 6,01
16	-57,20 \pm 17,32	-75,69 \pm 5,32	-78,34 \pm 6,47	-78,41 \pm 9,02	-79,78 \pm 11,88

*Perda no registro

Tabela 10 - Comparação das médias dos 5 grupos e TEP observadas por 2 avaliadores segundo a variável tempo, em semanas de pós-operatório.

Semanas	Avaliador 1	Avaliador 2	Diferença de	TEP	p
	Média ± DP	Média ± DP	Médias (IC 95%)		
5	-76,9±9,9	-78,5±10,8	1,6 (-0,9 a 4,1)	0,15	0,206
6	-79,9±8,3	-81,9±8,1	2,0 (-0,6 a 4,4)	0,24	0,123
7	-72,6±10,3	-76,9±11,4	4,3 (1,5 a 5,3)	0,39	0,001*
8	-75,7±7,5	-76,1±8,6	0,4 (-1,0 a 1,6)	0,05	0,599
9	-74,1±10,3	-75,1±10,8	1,0 (-0,5 a 2,5)	0,10	0,176
10	-70,9±10,6	-70,3±10,1	-0,6(-2,6 a 1,5)	-0,05	0,590
11	-68,3±14,6	-68,1±14,0	-0,2(-2,0a 1,6)	-0,02	0,805
12	-71,2±11,8	-74,1±11,9	2,9(0,4 a 5,5)	0,24	0,025*
13	-69,7±11,7	-70,1±12,9	0,4(-1,2 a 2,2)	0,03	0,560
14	-75,1±13,4	-76,6±12,9	1,5(0,2 a 2,8)	0,11	0,025*
15	-73,6±9,0	-73,6±10,7	0,0(-2,2 a 2,2)	0,00	1,000
16	-74,2±12,9	-73,9±13,4	-0,3(-2,4 a 2,0)	-0,02	0,838

Legenda da Tabela 5

Apresenta uma diferença estatisticamente significativa.

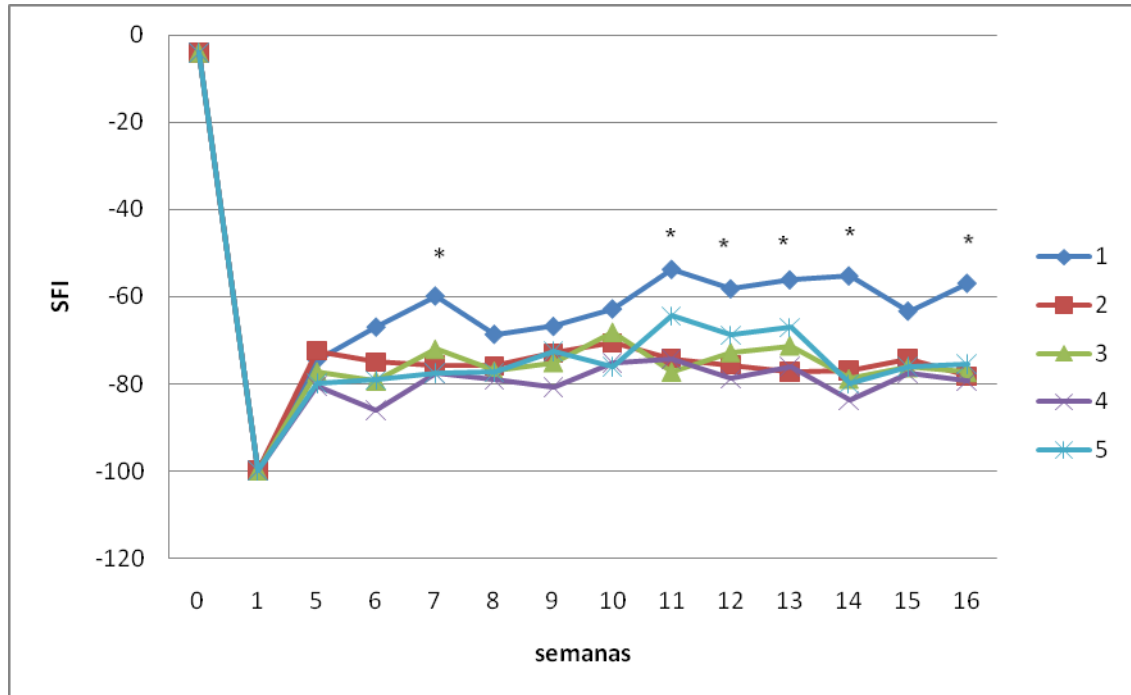
TEP: tamanho do efeito padronizado, que representa a magnitude da diferença entre médias em unidades de desvio padrão – por exemplo, 0,15 representam 15% do valor do desvio padrão médio (que é a média aritmética entre os desvios padrão dos dois observadores).

Ilustrações

Figura 1



Figura 2



Legenda de Figuras

Figura 1

Título de Figura: Deformidade dos dedos em garra dos dedos do lado operado, após 16 semanas.

Legenda :Fonte: O Autor

Figura 2

Título de Figura: Resultados das médias do SFI em cada grupo, conforme as semanas.

Legenda: * Há diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e os outros grupos ($p \leq 0,05$).

Referências

1. Kelsey JL. Upper extremity disorders : frequency, impact, and cost. New York: Churchill Livingstone; 1997.
 2. Yannas IV, Hill BJ. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1593-600.
 3. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 1998 Aug;21(8):1095-7.
 4. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol*. 2001 Mar;168(1):192-5.
 5. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995 May;58(1-2):29-37.
 6. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001 Jul 15;108(1):1-9.
 7. Sakiyama-Elbert SE, Panitch A, Hubbell JA. Development of growth factor fusion proteins for cell-triggered drug delivery. *FASEB J*. 2001 May;15(7):1300-2.
 8. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J Control Release*. 2000 Oct 3;69(1):149-58.
 9. Lee AC, Yu VM, Lowe JB, 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2003 Nov;184(1):295-303.
 10. Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar 15;80(4):998-1002.
 11. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989 Jan;83(1):129-38.
 12. Evans GR, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, et al. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 1999 Jun;20(12):1109-15.
 13. Ahmed M, Jayakumar R. Peripheral nerve regeneration in RGD peptide incorporated collagen tubes. *Brain Res*. 2003 Dec 12;993(1-2):208-16.
 14. Valero-Cabre A, Navarro X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res*. 2001 Nov 23;919(2):302-12.
 15. Hall GD, van Way CW, 3rd. A comparison of nerve grafting and tissue expansion techniques in the rat. *Microsurgery*. 1994;15(6):439-42.
 16. Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*. 1992 Feb;89(2):251-8.
-

17. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*. 2000 Mar 15;96(2):89-96.
 18. den Dunnen WF, Meek MF. Sensory nerve function and auto-mutilation after reconstruction of various gap lengths with nerve guides and autologous nerve grafts. *Biomaterials*. 2001 May;22(10):1171-6.
 19. Vleggeert-Lankamp CL. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2007 Dec;107(6):1168-89.
 20. Callegari-Jacques S. *Bioestatística, Princípios e Aplicações*. 1 Ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
-

ANEXO
