

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TERAPIA CELULAR NA REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DO
DEFEITO AGUDO DO NERVO FEMORAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA
(*Oryctolagus cuniculus*)

Anelise Bonilla Trindade

PORTO ALEGRE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TERAPIA CELULAR NA REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DO
DEFEITO AGUDO DO NERVO FEMORAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA
(*Oryctolagus cuniculus*)

Autora: Anelise Bonilla Trindade

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e
Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Obino Cirne-
Lima

PORTO ALEGRE

2009

T833t Trindade, Anelise Bonilla

Terapia celular na degeneração e recuperação funcional do defeito agudo do nervo femoral em coelhos Nova Zelândia. / Anelise Bonilla Trindade. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

104 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Emerson Antonio Contesini, Orient.

1. Cirurgia veterinária 2. Regeneração nervosa: cirurgia: coelhos I. Contesini, Emerson Antonio, Orient. II. Cirne-Lima, Elizabeth Obino, Co-orient. III. Título.

CDD 619.7

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Anelise Bonilla Trindade

TERAPIA CELULAR NA REGENERAÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DO
DEFEITO AGUDO DO NERVO FEMORAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA
(*Oryctolagus cuniculus*)

APROVADO POR

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Orientador e Presidente da Comissão

Profª. Dra. DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA
Membro da Banca

Prof. Dr. MAURÍCIO VELOSO BRUN
Membro da Banca

Prof. Dr. CARLOS AFONSO DE CASTRO BECK
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida mãe Maria Elisa, que soube orientar-me para os melhores caminhos, apoiando-me em todo este percurso, iluminando minha trajetória, com amor, carinho e a compreensão que só seu coração é capaz. É com certeza alicerce na construção de minha vida, ensinando-me sempre que com educação, coragem, dedicação e muito trabalho consegue-se chegar às grandes realizações. Amo-a e a admiro tanto quanto ela a mim.

Dedico também, à minha tia Maria Eneida (*in memoriam*), minha segunda mãe, que sempre será um exemplo de ser humano, de profissional e de mestre. Me apoiou, me incentivou, vibrou e chorou comigo diante dos mais incríveis desafios. Acabou me abandonando no segundo ano de mestrado e tornando minha trajetória um tanto triste. Porém, a garra e a tenacidade foram mais fortes, fazendo-nos seguir a caminhada, apesar da sinuosidade do caminho. Onde quer que esteja, estará sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, pai, irmãos, tios, sobrinho e primos, os quais me dão muito apoio emocional para enfrentar os desafios que têm surgido ao longo de minha vida. Por estarem sempre ao meu lado, me incentivando a lutar, ousar e nunca desistir. São os meus fãs incondicionais de toda a vida, assim como eu sou deles.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Contesini pela amizade, confiança e oportunidade de todo o aprendizado adquirido durante minha vida profissional e principalmente durante o mestrado.

À minha coorientadora, profa Dra Elizabeth Obino Cirne-Lima por toda a ajuda prestada durante o mestrado, me recebendo sempre com muito carinho no laboratório de embriologia e diferenciação celular. Através dela, pude conhecer um mundo diferente, o da terapia celular.

À querida profa. Dra Dominguita Lühers Graça, a qual admiro desde o tempo de faculdade. Agradeço o profissionalismo, a amizade, a boa disposição e todo o carinho com que abriu as portas de sua casa para ler as lâminas histológicas comigo. É o exemplo de profissional o qual almejo um dia ser.

Ao Cristiano Gomes, colega, amigo e parceiro de cirurgia. Esteve sempre presente durante todas as etapas do experimento, me auxiliando e aconselhando mesmo quando seus problemas pareciam maiores que os meus. Foi realmente o primeiro presente que a UFRGS me deu na galeria de amigos.

Ao Lucas Colomé, amigo desde a época da faculdade que permitiu a continuidade e aprimoramento do projeto. Mesmo à distância, me deu muito apoio, incentivo além de valiosas dicas.

À minha querida equipe de estagiárias, Andréa Velasque, Karina Magano, Lisiane Pinho, Mariane Elizeire e Paula Gerhardt, que não mediram esforços em colaborar para a realização deste trabalho. Saibam o quão orgulhosa sou de ter trabalhado com vocês.

Aos médicos neurologistas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Dr. Pedro Schestatsky e Vítor Félix Torres que realizaram as eletroneuromiografias dos animais e me ajudaram a compreender os intricados mecanismos eletrofisiológicos do sistema nervoso.

Agradeço ao médico neurologista Dr. Marco Stefani que oportunizou a realização do exame eletrofisiológico.

À minha “irmã” de mestrado Janete Volpato Marques que foi um anjo amigo nas horas complicadas do experimento, achando sempre uma solução um tanto alternativa para as dificuldades.

Ao colega Giordano Gianotti que anestesiou cuidadosamente todos os animais do experimento.

Aos amigos que fiz na Unidade de Experimentação Animal, Enfermeira Marta, Méd. Veterinária Fabíola Meyer e os funcionários Tânia e Eduardo, que sempre cuidaram com muito carinho dos animais do experimento, proporcionando à eles conforto e bem estar. Contribuíram de forma indelével para a realização de todo o processo experimental.

Aos colegas e amigos que adquiri nestes dois anos de UFRGS, Nádía Crosignani, Simone Scherer, Ana Carolina Rodarte, Aline Gouvêa, Liziane Ferraresi, Fabiana Quartiero, Juliana Voll, Rafael Stédile e Àlan Pophl, onde o carinho, respeito e amizade tornaram o mestrado mais agradável.

À Paula Cristina Basso e Carlos Eduardo Bortolini, meus ex-colegas de residência, mas eternos amigos e companheiros de mestrado, que mesmo à distância incentivamo-nos uns aos outros a enfrentar os desafios da pós-graduação. Um dia trabalharemos juntos novamente.

Às amigas Camila Both e Carla de Pelegrin, que dividiram a morada comigo e foram ombros amigos durante estes anos de mestrado. Me ajudaram muito tanto emocionalmente quanto no trabalho das imagens da dissertação.

À direção do Hospital Veterinário da UFRGS, Dr. Carlos Afonso Beck e Dr. Marcelo Alievi, bem como funcionários, residentes e alunos, que me auxiliaram sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Maurício Veloso Brun, meu primeiro orientador na vida profissional, o qual me ensinou e me incentivou a dar os primeiros passos na pesquisa.

À equipe do laboratório de embriologia e diferenciação celular, Paula Terraciano, Ana Helena Paz e Eduardo, agradeço a atenção e o profissionalismo na separação das células.

Enfim, não poderia deixar de agradecer à todos os animais que participaram do experimento, que doaram seu corpo, mudaram seu habitat, simplesmente para o bem da ciência. Foi um desafio trabalhar com uma espécie tão peculiar, tão independente, mas prazerosamente recompensadora. À eles o meu respeito e eterna gratidão.

*“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas, os
fracassos se transformam em golpes fatais.*

*Mas se você tiver sonhos...
seus erros produzirão crescimento, seus desafios
produzirão oportunidades e seus medos produzirão
coragem”.*

(Augusto Cury)

RESUMO

A aceleração da regeneração nervosa aliada à sua qualidade através da inoculação de células no sítio da lesão tem sido objeto de diversos estudos experimentais. Assim, o presente trabalho objetiva avaliar a regeneração nervosa associando a técnica de tubulização com a fração mononuclear autóloga de medula óssea em coelhos. Foram utilizados 28 coelhos da raça Nova Zelândia, hípidos, distribuídos em dois grupos: terapia (GT) e controle (GC), de igual número, subdivididos de acordo com o tempo de avaliação em 50 e 75 dias. Todos os animais foram anestesiados e submetidos a secção do nervo femoral direito com imediata neurorafia utilizando tubo de silicone, deixando um intervalo de 5 mm entre os cotos nervosos, porém apenas o GT recebeu a terapia celular. A avaliação da regeneração foi realizada funcionalmente e histologicamente, sendo os dados de função obtidos por exame clínico neurológico realizado a cada dez dias de pós-operatório e eletrofisiologia nervosa realizada previamente a eutanásia aos 50 e 75 de pós-operatório. Na análise histológica constataram-se presença de ponte nervosa e boa regeneração das fibras em todos os animais. A eletrofisiologia nervosa demonstrou queda nos valores de amplitude e aumento da latência, independentemente dos grupos. Entretanto, na avaliação funcional da marcha, o GT apresentou melhor desempenho significativo nas três primeiras semanas de avaliação. Estes dados sugerem que a terapia celular associada à técnica de tubulização influencia beneficemente no início da regeneração nervosa, proporcionando retorno funcional do nervo mais precoce quando comparado a animais controle.

Palavras-chave: Regeneração nervosa, células mononucleares, cirurgia, coelhos

ABSTRACT

The acceleration of nerve regeneration combined with its quality by the inoculation of cells is the site of the injury has been the object of several experimental studies. This paper aims to evaluate the nerve regeneration using the tubulization technique associated with the transplantation of autologous mononuclear cell from bone marrow in rabbits. The study has used twenty-eight animals New Zealand, healthy, allocated in two groups with equal number: therapy group (TG) and control group (CG), divided according to the evaluation duration time at 50 and 75 days. All animals were anaesthetized and then had their right femoral nerve sectioned, followed by immediate neurorrhaphy with a silicon tube, leaving a 5mm gap between the nervous stumps, but only the GT received cell therapy. The evaluation of the regeneration was made histologically and functionally through clinical examination carried out each ten days postsurgery and through electrophysiology prior to euthanasia at 50 and 75 postsurgery in both groups. The histological analysis, showed the presence of nerve repair and good regeneration of fibers in both groups. The electrophysiology showed a reduction of the amplitude values and increased latency, irrespective of the group. However, the lameness analysis showed that the GT had significantly better performance on the first three weeks postoperatively. The results suggest that cell therapy associated with the silicon channels can be a good influence on the beginning of nerve regeneration, providing functional return of the nerve earlier when compared to control animals.

Key-words: *Nerve regeneration, femoral nerve, autologous mononuclear cell, microsurgery, rabbit*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Desenho esquemático da face medial do membro pélvico direito de coelho, demonstrando as principais estruturas adjacentes ao nervo femoral. A cor amarela indica os nervos; a azul indica as veias e o vermelho indica as artérias. **(5)** Porção medial do músculo ilíaco. **(10)** Nervo femoral; veia ilíaca externa direita. **(16)** Artéria e veia femoral profunda. **(17)** Artéria e veia circunflexa lateral. **(20)** Músculo reto femoral. **(21)** Músculo vasto medial. **(22)** Artéria e veia femoral; nervo safeno. **(24)** Músculo pectíneo. (Fonte: POPESKO, 1990)..... 24
- Figura 02 – Potenciais de ação de um nervo. **(A)** Neurônio não estimulado ou em repouso tem carga negativa (-) em seu interior. Este é o estado de polarização. **(B)** Quando estimulado, o interior do neurônio torna-se positivo (+) por um curto período. **(C)** A célula, muito rapidamente retorna ao seu estado de repouso com uma carga interna negativa (-). O retorno ao estado de repouso é chamado de repolarização. (Fonte: www.bioaula.com)..... 29
- Figura 03 – Desenho esquemático do surgimento da célula- tronco a partir do zigoto e capacidade de gerar todos os tipos celulares. Fonte: <http://academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>..... 38
- Figura 04 – Desenho ilustrativo demonstrando a propriedade fundamental das células-tronco de se dividirem assimetricamente (Fonte: Zago, 2006)..... 38
- Figura 05 – Reparo do SNP. **(1)** Neurônio normal, mielinizado, conectado a um músculo. **(2)** Quando o axônio é seccionado, o coto distal e a mielina degeneram, mas o coto proximal sobrevive, embora ocorra cromatólise do corpo celular **(c)**. Inicia a degeneração Walleriana no coto distal **(a)**. **(3)** Regeneração do axônio lesionado. **(n)** Os neuritos crescem dentro das Bandas de Büngner **(b)**. **(4)** Neurônio mielinizado, regenerado com restauração completa da condução nervosa. (Fonte: PELLEGRINO et al., 2003)..... 51
- Figura 06 – Sutura epineural de nervo periférico (Fonte: MATTAR Jr; AZZE, 2008)..... 54
- Figura 07 – Desenho esquemático da sutura perineural (Fonte: Mattar Jr; Azze, 2008)..... 56

Figura 08 - Sequência do procedimento cirúrgico em coelhos submetidos à secção completa do nervo femoral direito e adaptação de tubo de silicone para a união dos cotos. (A) Após incisão na região inguinal, o nervo femoral foi localizado e liberado de seu leito. (B) Secção do nervo femoral com tesoura microcirúrgica antes de emitir o nervo safeno. (C) Nervo femoral seccionado. (D) Neurorrafia femoral do coto proximal no tubo de silicone em padrão isolado simples. (E) Neurorrafia femoral de ambos os cotos Nervosos deixando-os afastados em aproximadamente 5 mm. (F) Inoculação da fração mononuclear autóloga de medula óssea no interior da câmara.....	63
Figura 09 – Avaliação da espessura de ambos os membros pélvicos do coelho por meio de fita métrica.....	65
Figura 10 - Posicionamento dos pacientes e eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica do nervo femoral direito (operado), através da inserção de agulhas intradérmicas lateralmente à artéria femoral para avaliação eletrofisiológica do nervo.....	68
Figura 11 - Avaliação da marcha de coelhos, submetidos a neurotomia e imediata neurorrafia com prótese de silicone, através do tingimento da região plantar dos membros pélvicos. (A) Animal do GT com grau 0 de claudicação na segunda semana de pós-operatório. (B) Animal do GC com grau IV de claudicação na segunda semana de pós-operatório. Constata-se o apoio desproporcional do membro pélvico direito operado (seta preta) com relação ao membro contralateral.....	74
Figura 12 - Demonstração gráfica do grau de claudicação dos animais pertencentes ao grupo terapia e ao grupo controle eutanasiados aos 75 dias.....	80
Figura 13- Médias dos escores das claudicações dos animais deste experimento, avaliados a cada 10 dias.....	80
Figura 14 - Análise gráfica da eletrofisiologia de ambos os membros pélvicos dos coelhos controle e terapia submetidos a neurotomia com imediata neurorrafia do nervo femoral direito, através de prótese de silicone e avaliados aos 50 e 75 dias de pós-operatório.(A) Membro sadio com amplitude de 12,3mV e latência de 1,32ms. Membro operado com amplitude de 2,92mV e latência de 1,52ms. (B) Membro sadio com amplitude de 10,1mV e latência de 1,24ms. Membro operado com amplitude de 0,92mV e latência de 1,62ms. (C) Membro sadio com amplitude de 5,5mV e latência de 1,28ms. Membro operado com amplitude de 0,83mV e latência de 1,88ms. (D) Membro sadio com amplitude de 6,2 mV e latência de 1,22ms. Membro operado com amplitude de 2,24mV e latência de 1,36ms.....	83

Figura 15– Avaliação macroscópica do sítio da tubulização do nervo femoral direito de coelhos após aposição das extremidades seccionadas com um tubo de silicone. Observação da formação de ponte entre os cotos nervosos seccionados e aposicionados por meio da técnica de tubulização. **(A)** Nervo femoral tubulizado e coletado aos 50 dias. **(B)** Nervo femoral tubulizado e coletado aos 75 dias. **(C)** Aspecto da regeneração do nervo femoral após remoção da prótese de silicone. Nervo coletado aos 75 dias pós-operatória. **(D)** Sítio da tubulização do nervo femoral. A região proximal foi tingida com tinta preta para sua identificação no momento da leitura das lâminas..... 84

Figura 16 - Tecidos neuronais de coelhos submetidos a neurotomia com imediata neurorafia do nervo femoral direito, corados pela técnica de Hematoxilina-eosina. **(A)** Visão geral da lâmina, fibras regenerando bem. **(B)** Reação inflamatória. A seta preta indica a presença de eosinófilos e a seta branca indica a presença de um plasmócito. **(C)** Grânulos de hemossiderina indicados pela seta preta. **(D)** Leve reação granulomatosa ao redor do orifício por onde passou o fio de sutura. Barra 100µm..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Classificação das lesões de nervos periféricos, segundo Seddone Sunderland (Fonte: Mattar Jr; Azze, 2008).....	27
Tabela 02 -	Escores de avaliação da claudicação dos coelhos descrita por ANDERSON et al. (2003).....	66
Tabela 03 –	Metodologia de avaliação das alterações encontradas nas lâminas histológicas coradas com HE, seguindo-se a classificação de COLOMÉ et al. (2008).....	69
Tabela 04 –	Média e Desvio Padrão das variáveis monitoradas no trans-operatório de coelhos submetidos a secção do nervo femoral direito com imediata neurorrafia através de prótese de silicone.....	71
Tabela 05 -	Média e Desvio Padrão da duração do procedimento cirúrgico de secção do nervo femoral direito de coelhos com imediata neurorrafia através de prótese de silicone.....	73
Tabela 06 -	Avaliação em três momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) da propriocepção consciente direita dos coelhos controle e terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurorrafia por meio de prótese de silicone.....	75
Tabela 07-	Avaliação em três momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) do reflexo patelar direito dos coelhos controle e terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurorrafia por meio de prótese de silicone.....	76
Tabela 08 –	Avaliação em três momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) da sensibilidade da região do quadríceps direito dos coelhos controle e terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurorrafia por meio de prótese de silicone.....	77
Tabela 09 -	Média e respectivos desvio padrão da avaliação em quatro momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) da circunferência da coxa dos coelhos controle, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurorrafia por meio de prótese de silicone.....	78

Tabela 10 -	Média e respectivo desvio padrão da avaliação de quatro momentos (Grupo 50 dias) e de sete momentos (Grupo 75 dias) da circunferência da coxa dos coelhos do grupo terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurorrafia por meio de prótese de silicone.....	78
Tabela 11 -	Escores da marcha dos coelhos submetidos a neurotomia do nervo femoral com imediata neurorrafia através de prótese de silicone, avaliados em sete e três momentos com intervalos de 10 dias, e pertencentes ao Grupo Controle	79
Tabela 12 -	Escores da marcha dos coelhos submetidos a neurotomia do nervo femoral com imediata neurorrafia através de prótese de silicone, avaliados em sete e três momentos com intervalos de 10 dias, e pertencentes ao Grupo Terapia.....	79
Tabela 13 -	Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo saudável em comparação com o nervo operado dos animais do Grupo Controle 40 dias de pós-operatório.....	81
Tabela 14 -	Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo saudável em comparação com o nervo operado dos animais do Grupo Terapia 40 dias de pós-operatório.....	81
Tabela 15 -	Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo saudável em comparação com o nervo operado dos animais do Grupo Controle 75 dias de pós-operatório.....	82
Tabela 16 -	Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo saudável em comparação com o nervo operado dos animais do Grupo Terapia 75 dias de pós-operatório.....	82
Tabela 17 -	Avaliação das diferentes variáveis (degeneração Walleriana, e presença de granuloma, hemossiderina e de eosinófilos), observados nos animais submetidos a neurotomia com imediata neurorrafia do nervo femoral direito eutanasiados aos 50 dias de pós-operatório.....	86
Tabela 18 -	Avaliação das diferentes variáveis (degeneração Walleriana, e presença de granuloma, hemossiderina e de eosinófilos), observados nos animais submetidos a neurotomia com imediata neurorrafia do nervo femoral direito eutanasiados aos 75 dias de pós-operatório.....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Sistema Nervoso	19
3.1.1	Anátomo-fisiologia do tecido nervoso.....	19
3.1.1.1	Anatomia e fisiologia do nervo femoral.....	22
3.1.1.2	Lesões que afetam o nervo femoral.....	23
3.1.1.3	Características clínicas das lesões do nervo femoral em animais.....	23
3.2	Classificação das lesões nervosas periféricas	25
3.3	Potencial de ação neural	27
3.4	Eletroneuromiografia	30
3.4.1	Técnicas eletrodiagnósticas e seus princípios básicos.....	31
3.4.1.1	Eletromiografia.....	31
3.4.1.2	Estudo da condução nervosa (Eletroneurografia).....	33
3.5	Terapia Celular	35
3.5.1	Célula-Tronco.....	36
3.5.1.1	Plasticidade das células-tronco.....	39
3.5.1.1.1	Células-Tronco Totipotentes.....	39
3.5.1.1.2	Células-Tronco Pluripotentes.....	40
3.5.1.1.3	Células-Tronco Multipotentes.....	40
3.5.1.1.4	Células-Tronco Progenitoras ou precursoras	41
3.5.2	Células-Tronco Adultas.....	41
3.5.2.1	Células-Tronco Hematopoiéticas.....	42
3.5.2.2	Células-Tronco Mesenquimais.....	44
3.5.3	Utilização da terapia celular na neurologia.....	46
3.6	Regeneração Nervosa	49
3.7	Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa	52
3.7.1	Neurólise.....	54
3.7.2	Sutura Epineural.....	54
3.7.3	Sutura Fascicular ou Perineural.....	55

3.7.4	Técnica de Tubulização Neural.....	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1	Animais.....	59
4.2	Coleta e Processamento das células mononucleares autólogas de medula óssea.....	59
4.3	Procedimento anestésico.....	61
4.4	Procedimento cirúrgico e transplante das células mononucleares autólogas de medula óssea.....	62
4.5	Procedimento pós-operatório.....	64
4.6	Avaliação clínica.....	64
4.6.1	Avaliação da marcha	65
4.7	Avaliação eletrofisiológica do nervo femoral.....	66
4.8	Eutanásia.....	67
4.9	Avaliação Macroscópica.....	68
4.10	Avaliação Microscópica.....	68
4.11	Análise Estatística.....	70
5	RESULTADOS.....	71
5.1	Animais	71
5.2	Procedimento Anestésico.....	71
5.3	Coleta do Aspirado Medular	72
5.4	Processamento do aspirado Medular.....	72
5.5	Procedimento cirúrgico do nervo femoral.....	72
5.6	Avaliação clínica.....	73
5.6.1	Avaliação da marcha.....	74
5.7	Avaliação Eletrofisiológica.....	81
5.8	Avaliação Macroscópica.....	83
5.9	Avaliação Microscópica.....	85
6	DISCUSSÃO.....	88
7	CONCLUSÕES.....	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são extensões do sistema nervoso central e responsáveis pela integração das atividades das extremidades locomotoras, em suas funções sensitiva e motora. São susceptíveis aos mesmos tipos de traumas que afetam outros tecidos, tais como contusão, compressão, esmagamento, estiramento, avulsão e laceração (MATTAR Jr; AZZE, 2008). A interrupção da continuidade da estrutura do nervo, resulta na parada de transmissão dos impulsos nervosos e na desorganização de suas atividades funcionais (MATTAR Jr; AZZE, 2008), levando a considerável inabilidade e/ou permanente incapacidade física nos indivíduos (IGNATIADIS et al., 2007).

Por esse motivo, há anos cientistas do mundo inteiro realizam pesquisas em busca de um maior entendimento sobre o processo de regeneração nervosa, tentando encontrar por meio de diversos recursos terapêuticos, a forma ideal para que um nervo lesionado possa voltar a apresentar sua total funcionalidade (SANTOS; ANDRÉ, 2007).

Relatos de sucesso na reparação cirúrgica de nervos periféricos são encontrados na literatura desde o século XIX (IGNATIADIS et al., 2007), quando Laugier (1864) e Hueter (1873), sugeriram a reparação direta do nervo por aproximação do epineuro, sendo que essa técnica permanece como prática ainda convencional nos dias de hoje (SILVA-NETO, 2007). No entanto, nem todas as lesões nervosas são propícias para anastomose direta, uma vez que perdas significativas de tecido nervoso requerem a utilização de enxerto ou conduto que comunique as duas extremidades (MIMURA et al., 2004; IGNATIADIS et al., 2007). Desta maneira surgiram os enxertos autólogos (HU et al., 2007) os quais tornaram-se uma das alternativas no tratamento de lesões de nervo periférico. Esta técnica apresenta algumas limitações tais como o ajuste adequado da extensão e do diâmetro do nervo, a necessidade de subsequente cirurgia no mesmo paciente com perda da função do nervo doador, além da formação de neuromas e de maior dor pós-operatória (WANG et al., 2007).

Por estas razões, muitas pesquisas têm sido feitas com o interesse de induzir a regeneração do nervo seccionado através de “guias de condução regenerativa”, feitos com materiais biológicos e não biológicos tais como o tubo de silicone (MURAKAMI et al., 2003; WANG et al., 2007).

Estes guias são considerados alternativas viáveis para as técnicas de enxertia, com a função de ajudar a direcionar o crescimento axonal de um nervo seccionado, permitindo a difusão de fatores neurotróficos e neuroprotetores produzidos pelos cotos nervosos com função regenerativa (ZHANG et al., 2008). Ainda assim, a regeneração continua sendo lenta e nem sempre completa, uma vez que o silicone permanecerá no organismo, podendo promover reação de corpo estranho, compressão do nervo com perda de sua função e formação de neuroma (WANG et al., 2007). Recentemente tem sido testada a combinação de terapia celular e fatores tróficos com técnicas já consagradas de tubulização nervosa (BRAGA-SILVA et al., 2006; COLOMÉ et al., 2008), objetivando primeiramente recuperar a continuidade do nervo, permitindo o crescimento da porção distal do coto proximal (CHEN et al., 2007), além da recuperação funcional do mesmo.

A resposta neuronal e a regeneração axonal implicam em interações complexas entre diversos tipos celulares e mudanças na expressão de diferentes tipos de moléculas. Para isso, muitos modelos experimentais têm sido usados para conjugar conhecimentos sobre regeneração nervosa e o desenvolvimento de estratégias que promovam a recuperação funcional (SANTOS; ANDRÉ, 2007).

Neste intuito, vários estudos têm demonstrado que a implantação de células-tronco neurais, células mesenquimais de medula óssea ou fibroblastos promovem efeito benéfico na regeneração de nervos periféricos (SHEN et al., 1999; DEZAWA et al., 2001; MURAKAMI et al., 2003; CUEVAS et al., 2004; HEINE et al., 2004; MIMURA et al., 2004). Porém, ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual se diferenciam em tecido nervoso.

Apesar dos resultados serem animadores em termos de regeneração, a utilização da terapia celular na rotina, bem como suas aplicações clínicas ainda são consideradas um grande desafio para a engenharia tecidual que segue buscando através das novas pesquisas, resultados consistentes para sua utilização de uma forma segura (COVAS, 2006). Para isso, o presente trabalho objetiva contribuir para a avaliação da regeneração nervosa associando a técnica de tubulização com células autólogas mononucleares de medula óssea, verificando conjuntamente sua funcionalidade nervosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a capacidade de regeneração nervosa periférica após defeito agudo do nervo femoral de coelhos Nova Zelândia, corrigido mediante a técnica de tubulização com prótese de silicone associada ou não à inoculação de aspirado de células mononucleares autólogas de medula óssea no sítio da lesão nervosa.

2.2 Específicos

- Avaliar a viabilidade da técnica no reparo nervoso por ponte entre os cotos do nervo femoral seccionado.

- Avaliar, clinicamente, o retorno da função nervosa por meio de exame clínico neurológico e observação da marcha dos animais a cada 10 dias.

- Verificar a função do nervo femoral através da eletrofisiologia nervosa aos 50 e 75 dias de pós-operatório.

- Acompanhar, macro e microscopicamente, o processo de regeneração nervosa aos 50 e 75 dias de tubulização do nervo femoral.

- Comparar a regeneração do nervo femoral em animais tratados com células mononucleares autólogas de medula óssea com os animais não tratados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sistema Nervoso

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP).

O SNC é constituído pelo encéfalo e a medula espinhal, já o SNP é constituído pelos nervos e gânglios periféricos. Todas as estruturas exclusivas do SNP têm origem na crista neural. Nos gânglios periféricos, existem neurônios, células de Schwann e células satélites (SHORES, 1996; LENT, 2005a; PIERUCCI et al., 2008).

O SNP se divide em sistema nervoso somático e sistema nervoso autônomo (GUYTON, 1996; LENT, 2005a). O sistema nervoso somático é responsável pela inervação dos músculos esqueléticos. Não contém gânglios periféricos e as sinapses ocorrem no interior da medula espinhal (SNC) de onde partem neurônios mielinizados até a junção neuromuscular (placa motora) (VITAL, 1999). Já o sistema nervoso autônomo, transporta todos os impulsos do SNC e apresenta uma ação integradora sobre a homeostase corporal, regulando a atividade de estruturas fisiológicas que não estão sob controle voluntário, tais como a respiração, a digestão, a circulação, a sudorese, dentre outras (VITAL, 1999).

3.1.1 Anátomo-fisiologia do tecido nervoso

O tecido nervoso é formado por trilhões de células nervosas, células gliais, vasos sanguíneos e uma pequena quantidade de tecido conjuntivo (LENT, 2005a).

O sistema nervoso (SN) é constituído por dois tipos de células: os neurônios e as células da glia ou neurógliá. O neurônio é a unidade funcional do sistema nervoso e as células da glia, constituem elementos de sustentação, nutrição, revestimento, modulação da atividade nervosa e de defesa (www.bioaula.com.br).

Cada neurônio do SN é uma unidade sinalizadora, capaz de gerar e conduzir eletricidade, possuindo morfologia adaptada para recepção, transmissão e processamento de sinais (GUYTON, 1996; LENT, 2005a).

Um neurônio típico apresenta quatro regiões definidas morfológicamente: o corpo celular (soma), os dendritos, o axônio e o terminal pré-sináptico do axônio, sendo a bainha conjuntiva que o envolve, denominada endoneuro (BOUSKELA; SHMIDT, 2005; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

O corpo celular é o centro metabólico do neurônio, tem a função de integrar as informações recebidas e elaborar as respostas. Possui núcleo, retículo endoplasmático, sistema ou complexo de Golgi e dendritos (LOPES et al., 1993; BOUSKELA; SHMIDT, 2005).

Além de dendritos, que são os receptores, o corpo celular possui a substância de Nissl: retículo endoplasmático rugoso e polissomos, responsável pela produção de proteínas de muitos processos vitais, incluindo o desenvolvimento de componentes do citoesqueleto envolvidos no transporte axoplásmico e regeneração de nervos periféricos (STORS, 1998; BOUSKELA; SHMIDT, 2005; MATTAR JR; AZZE, 2008).

A lesão nos corpos celulares é irreversível, por isso, a natureza os situou em locais bem protegidos como no interior do crânio (encéfalo) e no interior da coluna vertebral. São os corpos celulares que constituem a substância cinzenta do SN. (LOPES et al., 1993).

Os axônios são envolvidos por uma bainha lipoprotéica, a bainha de mielina, que faz o isolamento elétrico e permite que os estímulos sejam conduzidos de modo saltatório rápido e eficiente (LENT, 2005a; PURVES, 2005a). Os estímulos chegam ao neurônio através de dendritos, passam para o corpo celular e então para o axônio (MOTTA et al., 2008).

Os axônios do SNP, consistem em axoplasma líquido no interior da membrana celular e podem ser mielinizados ou desmielinizados. Muitos axônios desmielinizados podem estar envolvidos por uma única célula de Schwann, mas a bainha de mielina para cada axônio mielinizado é formada por uma série de células de Schwann (PURVES, 2005a; RODKEY; SHARP, 2007). Normalmente, o axônio possui microtúbulos, neurofilamentos e raras proteínas e lisossomas, não possuindo ribossomos e, portanto, não sintetiza proteínas (BOUSKELA; SHMIDT, 2005).

Nos axônios mielinizados, a área não coberta pela bainha de mielina constitui os denominados nódulos ou nodos de Ranvier, onde ocorrem as trocas iônicas na condução saltatória do estímulo nervoso. Ou seja, nas fibras nervosas mielinizadas, o potencial de ação salta de um nodo de Ranvier a outro resultando na rápida velocidade de condução. Em fibras não mielinizadas, a condução é mais lenta pela continuidade do potencial de ação em toda a extensão da fibra (RODKEY; SHARP, 2007; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

A fibra nervosa é longa, com diâmetro variado e é impossível de ser abordada cirurgicamente. Em seu interior, há um complexo sistema de transporte anterógrado e retrógrado formado por microtúbulos, microfilamentos e neurofilamentos. No órgão de destino, o axônio ramifica-se formando os telodendros ou botões sinápticos (MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Cada fibra nervosa, é completamente envolvida por uma bainha protetora ou envoltório de tecido conjuntivo, constituído de fibrilas colágenas, fibroblastos chamado de endoneuro. Possui elasticidade e resistência, apresenta a função de proteção das fibras, além de nutri-las através de um sistema capilar (RODKEY; SHARP, 2007; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Várias fibras nervosas, de diferentes tamanhos, são agrupadas formando os fascículos nervosos sendo cada fascículo envolvido por tecido conjuntivo denso e forte que os protege de traumas e compressões externas, chamado de perineuro. O perineuro, tem como funções manter a pressão intrafascicular auxiliar na manutenção do fluxo axoplasmático, proteger as fibras nervosas e formar uma barreira entre as fibras nervosas e outros tecidos, impedindo a entrada de substâncias estranhas (MATTAR Jr; AZZE, 2008).

O nervo inteiro encontra-se circundado pelo epineuro. Essa camada externa, compõe-se de tecido conjuntivo areolar e contém fibras colágenas mais espessas (PURVES, 2005a). Tanto o perineuro como o epineuro externo são mais espessos nas articulações, protegendo os nervos periféricos durante os movimentos (RODKEY; SHARP, 2007; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Próximo ao seu final, o axônio se divide em vários ramos muito finos, os terminais pré-sinápticos, elementos transmissores do neurônio. Por intermédio desses terminais, um neurônio se contacta e transmite informações sobre sua atividade a superfícies receptoras de outros neurônios, músculos ou outros tipos de células receptoras (BOUSKELA; SHMIDT, 2005)

A região de contato entre um terminal de uma fibra nervosa e um dendrito ou o corpo (mais raramente um outro axônio) de uma segunda célula chama-se sinapse, formada pelo terminal pré-sináptico de uma célula (célula pré-sináptica), a superfície sináptica de outra célula (célula pós-sináptica) e o espaço entre estas duas estruturas é denominado de fenda sináptica (BOUSKELA; SHMIDT, 2005; LENT, 2005a).

A sinapse constitui uma região especializada fundamental para o processamento da informação pelo SN. Na sinapse, os sinais elétricos que chegam a um neurônio nem sempre passam sem alteração. Muitas vezes são bloqueados parcial ou completamente, ou então amplificados, o que significa que este é um local de decisão do SN, onde a informação não é apenas transferida, mas transformada na passagem (LENT, 2005a).

3.1.1.1 Anatomia e fisiologia do nervo femoral

O nervo femoral é o maior ramo do plexo lombar. Ele se origina das três divisões posteriores do plexo, as quais são derivadas do segundo, terceiro e quarto nervos lombares (Figura 1). Emerge da borda lateral do músculo psoas, entra no triângulo femoral lateral à artéria femoral, onde se divide em ramos terminais (DYCE et al., 1997).

Os ramos motores acima do ligamento inguinal inervam os músculos sartório, pectíneo e quadríceps femoral. Os ramos sensitivos compreendem os ramos cutâneos anteriores da coxa para a superfície ântero-medial da coxa e o nervo safeno para o lado medial da perna e pé e segue um trajeto através dos músculos psoas, alcançando um espaço entre o canto dorsocaudal do flanco e o músculo ílio-psoas (GUSMÃO, 2003).

O nervo femoral é acompanhado pela artéria e veia ilíacas externas e, ao adentrar à coxa, segue numa direção protegida entre os músculos sartório e pectíneo. Em seguida, emite o nervo safeno e, após um trajeto posterior muito curto, mergulha entre os

músculos reto femoral da coxa e vasto medial (Figura 1) para adentrar no quadríceps (<http://www.compuland.com.br/anatomia/plexo.htm>).

3.1.1.2 Lesões que Afetam o Nervo Femoral

As lesões do nervo femoral frequentemente comprometem também o nervo obturatório. Devem ser consideradas lesões da medula espinhal, cauda equina e plexo lombar. As lesões periféricas podem ser resultantes de tumores pélvicos, abscessos do músculo psoas, fraturas da pelve e da porção superior do fêmur. Também podem ser decorrentes de lesões durante cirurgia pélvica, pressão exercida durante intervenções cirúrgicas prolongadas (quando os membros são fortemente abduzidos), de ferimentos, de aneurismas da artéria femoral e neurites (DYCE et al., 1997; <<http://www.compuland.com.br/anatomia/plexo.htm>>).

3.1.1.3 Características clínicas das lesões do nervo femoral em animais

Segundo Dyce et al. (1997), clinicamente, as lesões do nervo femoral dependem do nível de comprometimento do nervo, podendo apresentar-se como:

- a) Sinais clínicos motores. A paralisia do músculo ílio-psoas determina a incapacidade de flexionar a coxa sobre o tronco. Se o íliaco isoladamente estiver paralisado, a flexão da coxa estará enfraquecida. Na paralisia do quadríceps estão ausentes tanto a extensão da perna quanto o reflexo patelar. A marcha torna-se dificultosa.
- b) Lesões atróficas. A atrofia desenvolve-se na superfície cranial da coxa.
- c) Distúrbios sensitivos. A sensibilidade é perdida na distribuição cutânea do nervo femoral. A dor ocorre com as lesões irritativas, sendo frequentemente mais acentuada no joelho.
- d) Lesões parciais. Lesões da coxa podem comprometer somente ramos isolados do nervo femoral, como por exemplo o nervo safeno isoladamente, ou ramos para o músculo quadríceps.

Assim, uma lesão grave no nervo femoral, apresenta consequências sérias, uma vez que a paralisia do quadríceps impede a firmeza da articulação do joelho, tornando o

membro todo incapaz de suportar o peso. Nenhuma compensação é possível para este desvio (DYCE, et al., 1997; <http://www.compuland.com.br/anatomia/plexo.htm>).

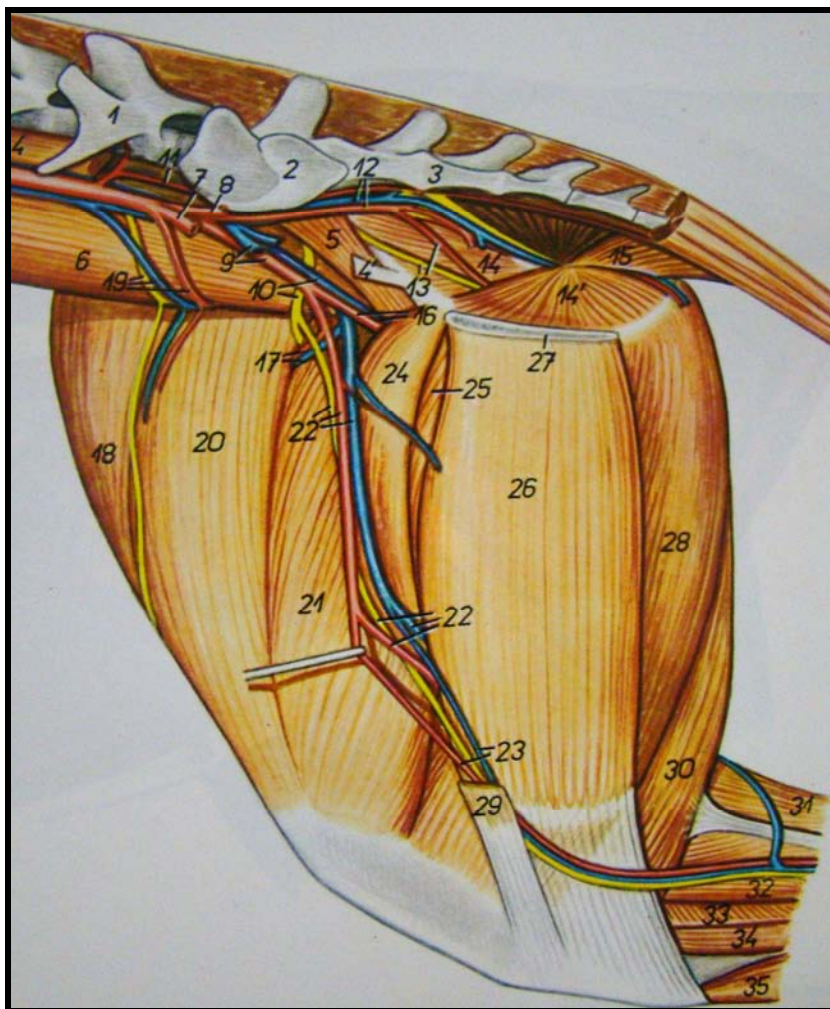


Figura 01 – Desenho esquemático da face medial do membro pélvico direito de coelho, demonstrando as principais estruturas adjacentes ao nervo femoral. A cor amarela indica os nervos; a azul indica as veias e o vermelho indica as artérias. (5) Porção medial do músculo ílíaco. (10) Nervo femoral; veia ilíaca externa direita. (16) Artéria e veia femoral profunda. (17) Artéria e veia circunflexa lateral. (20) Músculo reto femoral. (21) Músculo vasto medial. (22) Artéria e veia femoral; nervo safeno. (24) Músculo pectíneo. (Fonte: POPESKO, 1990).

3.2 Classificação das lesões nervosas periféricas

As consequências de lesões nas fibras nervosas dependem de sua natureza, intensidade e local lesionado (FERREIRA, 1998). O grau de continuidade do endoneuro, perineuro e epineuro são classificados em três níveis e dependem da capacidade regenerativa do nervo (RODKEY; SHARP, 2007).

Seddon, em 1943, classificou as lesões nervosas em neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Já Sunderland, em 1952, as classificou em cinco graus. (DOURADO et al., 2003; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

No primeiro grau de lesão, neuropraxia de Seddon ou grau I de Sunderland, a estrutura do nervo permanece intacta, não existindo perda de continuidade axonal entre o neurônio e o músculo. Ocorre apenas uma interrupção da condução nervosa por uma lesão exclusivamente na bainha de mielina do nervo. O termo bloqueio de condução refere-se á incapacidade de um potencial de ação em propagar-se além de uma região específica do nervo (FERREIRA, 1998; DOURADO et al., 2003 MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Assim, na neuropraxia há uma perda temporária da função motora do nervo com disfunção da propriocepção, estímulo vibratório, tato, dor e sudorese. Pode durar de um a seis meses, embora geralmente resolvam-se em até três meses se não houver degeneração Walleriana (MATTAR Jr; AZZE, 2008). RODKEY; SHARP (2007), ainda acrescentam que o bloqueio de condução geralmente afeta as fibras motoras mais intensamente que as fibras sensitivas e simpáticas, principalmente as fibras maiores.

Na axonotmese de Seddon (Tabela 1), alguns axônios sofrem ruptura e ocorre a interrupção do axônio, mas as bainhas conectivas não estão lesadas (RODKEY; SHARP, 2007; MATTAR Jr; AZZE, 2008). Ocorre bloqueio da condução nervosa devido à perda da continuidade do axônio, porém, a membrana epineural se mantém intacta (DOURADO et al., 2003).

FERREIRA (1998) descreveu a axonotmese, como uma lesão que acomete os axônios do nervo e ocorre uma reação em duas fases. A primeira fase envolve a desintegração do axônio e a quebra de sua bainha de mielina, o que é chamado de degeneração Walleriana (axonal). Embora as alterações mais importantes ocorrem

abaixo do nível da lesão, também ocorrem alterações acima desta que, inclusive, podem levar à degeneração do neurônio e toda via axonal se a lesão ocorrer no SNC e próximo ao corpo neuronal. Já a segunda fase da axonotmese descrita pelo mesmo autor é o processo de regeneração (reinervação) da continuidade entre o axônio e seu órgão terminal. O processo regenerativo é fortemente influenciado pela condição do endoneuro. Quando o endoneuro é preservado, a regeneração processa-se completamente, uma vez que o axônio vai crescendo confinado no tubo originalmente ocupado por ele.

Assim, na axonotmese surge a degeneração Walleriana, causando paralisia motora, sensitiva e autonômica. Porém a recuperação pode ser de bom prognóstico, apresentando tempo variável de acordo com o nível da lesão (MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Sunderland (1952), subdividiu a axonotmese em três grupos: grau II – lesão do axônio ou disjunção axonal completa com degeneração Walleriana sem interrupção da lâmina basal; grau III – lesão da fibra nervosa (axônio e endoneuro), com interrupção da lâmina basal; grau IV – disjunção axonal, endoneural e perineural; grau V – disjunção axonal completa, com lesão no endoneuro, perineuro e epineuro (Tabela 1) (DOURADO et al., 2003; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Na neurotmese de Seddon ou lesão grau V de Sunderland (Tabela 1), todo o nervo e suas estruturas estão lesadas. Ocorre secção e separação completa de todas as estruturas nervosas, produzindo um intervalo entre as extremidades seccionadas. Não há integridade do epineuro e a sua reparação sempre será cirúrgica. A regeneração e reinervação nunca será completa e, geralmente, os pacientes evoluem com alguma deficiência em relação à função motora (FERREIRA, 1998; DOURADO et al., 2003; RODKEY; SHARP, 2007; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Tabela 1 - Classificação das lesões de nervos periféricos, segundo Seddon e Sunderland.

<i>SEDDON</i>	<i>SUNDERLAND</i>	<i>LESÃO</i>
<i>Neuropraxia</i>	<i>Grau I</i>	<i>Disfunção (ausência de lesão)</i>
<i>Axonotmese</i>	<i>Grau II</i>	<i>Axônio</i>
<i>Axonotmese</i>	<i>Grau III</i>	<i>Axônio + Endoneuro</i>
<i>Axonotmese</i>	<i>Grau IV</i>	<i>Axônio + Endoneuro + Perineuro (fascículo)</i>
<i>Neurotmeese</i>	<i>Grau V</i>	<i>Axônio + Endoneuro + Perineuro + Epineuro (nervo)</i>

Fonte: MATTAR Jr; AZZE, 2008.

3.3 Potencial de ação neural

As células nervosas geram sinais elétricos, sendo estes a base da transferência de informações no sistema nervoso (GUYTON, 1996, PURVES et al., 2005b). Porém, um problema fundamental para os neurônios é que seus axônios, que podem ser bastante longos, não são bons condutores elétricos. Para compensar essa deficiência, os neurônios desenvolveram um sistema de propagação “auto-sustentada” que lhes permite conduzir sinais elétricos ao longo de grandes distâncias. Estes sinais elétricos são chamados de potencial de ação, potenciais em “pico” ou ainda impulsos nervosos (PURVES et al., 2005b). Os potenciais de ação existem através das membranas de praticamente todas as células do corpo e algumas células como os neurônios e fibras musculares. As células portanto são “excitáveis”, isto é, capazes de autogerarem impulsos eletroquímicos e, em alguns casos, usarem esses impulsos para a transmissão de sinais (GUYTON, 1996).

Os impulsos eletroquímicos, são propagados ao longo da extensão dos axônios (LENT, 2005b), sendo os sinais fundamentais que carregam a informação de um lugar a outro no sistema nervoso. Isto ocorre porque existem diferenças nas concentrações de íons específicos através das membranas das células nervosas e porque as membranas são seletivamente permeáveis a alguns destes íons (GUYTON, 1996; LENT, 2005b; PURVES et al., 2005b). Estes dois fatos, por sua vez, dependem de dois diferentes tipos

de proteínas presentes na membrana celular: os transportadores ativos, os quais movem íons ativamente para dentro ou para fora da célula contra seus gradientes de concentração; e os canais iônicos, os quais permitem que apenas certos íons cruzem a membrana na direção de seus gradientes de concentração (PURVES, et al., 2005b).

Como em todas as células, o interior do neurônio é negativo em relação ao exterior, uma diferença de potencial mantida constante pelo contínuo fluxo de íons através da membrana é chamada de potencial de repouso, o qual reflete a separação de cargas elétricas entre a face externa e a face interna da membrana celular (Figura 02) (LENT, 2005b).

Junto da membrana celular, existe excesso de íons de sódio (Na^+) na região extracelular ou no exterior do neurônio e íons de potássio (K^+) no interior do neurônio (GUYTON, 1996; LENT, 2005b). Desta maneira, o potencial de ação depende do fluxo de íons Na^+ e K^+ através dos canais específicos. A permeabilidade da membrana durante o repouso é mais alta para o Na^+ do que para o K^+ . O potencial inicia com a despolarização da membrana, causando mudança na permeabilidade, abrindo os canais de Na^+ (que normalmente são mantidos fechados por “portões” sensíveis à variação de voltagem), o que eleva a entrada de Na^+ na célula e produz a fase ascendente do potencial de ação. A fase descendente é causada pelo fechamento desses “portões”, com a redução do influxo de Na^+ e abertura dos canais de K^+ , ocasionando aumento do efluxo desse íon (BOUSKELA; SHMIDT, 2005). Este movimento de íons através da membrana celular e o consequente potencial de ação, deslocam-se ao longo da membrana, o que corresponde à deslocação do impulso nervoso ao longo da célula, sendo depois comunicado a outras células através das sinapses (BOUSKELA; SHMIDT, 2005; PURVES et al., 2005b). Portanto, a membrana celular do neurônio em repouso é impermeável ao movimento de íons através de si, existe um potencial elétrico entre o interior e o exterior da célula, de -70 mV, chamado potencial de repouso da membrana (PURVES et al., 2005b).

Sendo assim, a fase de despolarização do potencial de ação é causada por uma súbita abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem, o que permite o movimento de íons sódio para dentro do axônio durante menos de 1 milissegundo. Os

canais de sódio, tornam-se aos poucos inativos, o que cessa, em alguns milissegundos, a corrente de sódio (LENT, 2005b).

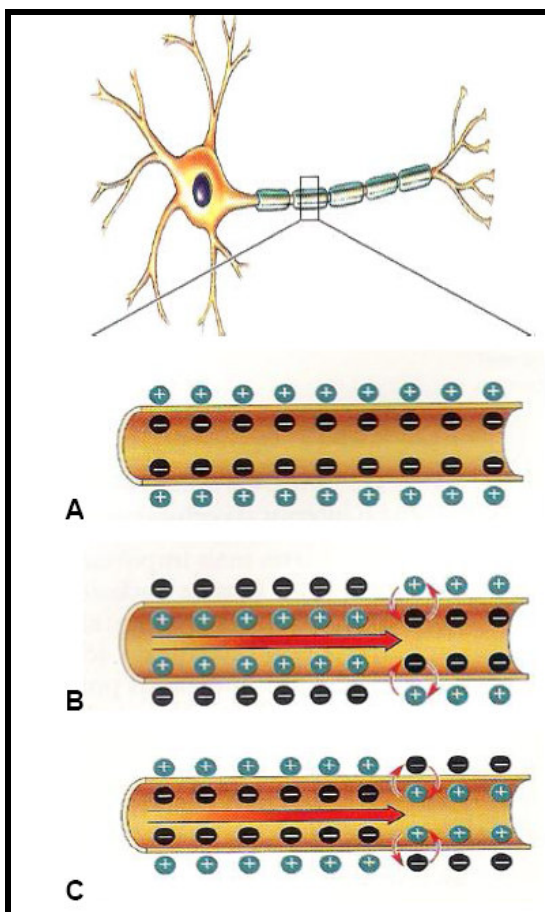


Figura 02 – Potenciais de ação de um nervo. (A) Neurônio não estimulado ou em repouso tem carga negativa (-) em seu interior. Este é o estado de polarização. (B) Quando estimulado, o interior do neurônio torna-se positivo (+) por um curto período. (C) A célula, muito rapidamente retorna ao seu estado de repouso com uma carga interna negativa (-). O retorno ao estado de repouso é chamado de repolarização. (Fonte: www.bioaula.com)

Já a fase de repolarização do potencial de ação é mais rápida que a diminuição do fluxo de sódio. Isso ocorre pela atuação do potássio, cujos canais dependentes de voltagem abrem-se mais lentamente que os de sódio. A saída de potássio restaura a polaridade da membrana nos níveis de repouso, mas durante um certo tempo ela permanece inexcitável, incapaz de gerar outros potenciais de ação. Esta fase, chama-se período refratário, e deve-se ao fato de que após se abrirem, os canais iônicos passam ao estado inativo ou refratário e não ao estado de repouso. Posteriormente, os canais voltam ao estado de repouso, e a membrana do axônio volta ao estado excitável. A bomba de sódio/potássio se encarrega de restaurar o gradiente eletroquímico original (LENT, 2005b).

3.4 Eletroneuromiografia

A avaliação eletrofisiológica, baseia-se na aplicação de estímulos elétricos nos nervos motores, sensoriais ou mistos com registros dos potenciais de ação na tela do osciloscópio (MERLETTI et al., 2008).

A eletroneuromiografia (ENMG) é um teste eletrodiagnóstico que permite avaliar a função de várias estruturas do sistema nervoso central e periférico (MERLETTI et al., 2008), além da avaliação da atividade elétrica do músculo esquelético durante o repouso e contração (FERREIRA, 1998). É um exame complementar considerado como extensão do exame físico neurológico (CHRISMAN, 1985), onde se realiza anamnese e formulação de hipóteses diagnósticas para as diversas doenças que envolvem o SN (FERREIRA, 1998).

A ENMG não só verifica ou exclui uma suspeita clínica, mas também define precisamente o local, tipo e grau de lesão. Também avalia a severidade da lesão e descreve a distribuição dos achados em grupos de músculos diferentes, definindo assim, o músculo mais comprometido em caso de necessidade de biopsia muscular (http://www.suportemed.com/index_arquivos/page0005.htm). Estes dados fornecem uma estimativa da gravidade da doença relacionada ao SN e músculo-esquelético (CUDDON et al., 2007).

Em humanos, este teste eletrodiagnóstico é efetuado em repouso e durante a contração voluntária, no entanto, Cuddon et al. (2007) citaram que esta prática não é clinicamente possível em grande parte dos animais domésticos. Dessa forma, os pacientes veterinários necessitam de anestesia geral para a execução de estudos mais precisos.

A ENMG agrupa uma série de técnicas eletrofisiológicas, sendo a seleção destas feita caso a caso, de acordo com o quadro clínico do paciente (FERREIRA, 1998), o que justifica a necessidade do exame ser realizado por um profissional capacitado.

A avaliação eletrodiagnóstica detalhada consiste nos exames de eletromiografia, nos estudos da neurocondução sensorial e motora, na avaliação da junção neuromuscular por meio de estimulação repetitiva supramáxima ou na eletromiografia de uma fibra isolada (CUDDON et al., 2007).

Embora tenham sido descritas novas técnicas neurofisiológicas empregadas juntamente com a ENMG no diagnóstico das doenças do SNP, como a onda F, o reflexo H, o potencial evocado somatossensitivo e outras, para FERREIRA (1998) nenhuma delas se mostrou superior a própria ENMG em termos de diagnóstico de neuropatias periféricas.

3.4.1 Técnicas eletrodiagnósticas e seus princípios básicos

3.4.1.1 Eletromiografia

Trata-se da avaliação da atividade elétrica neuromuscular (ZHANG et al., 2008), durante o repouso e contração muscular (FERREIRA, 1998), através da inserção de um eletrodo de agulha na área do ponto motor de um determinado músculo (CHRISMAN, 1985; FERREIRA, 1998; MERLETTI et al., 2008).

Há uma variedade de tipos de eletrodos (CUDDON et al., 2007). Os que capturam os potenciais elétricos podem ser eletrodos de superfície e de profundidade (MALTA et al., 2006). Os eletrodos de superfície são pequenos discos metálicos, colocados sobre a pele. Segundo O'Sullivan; Shmitz (1993) e Torriani et al. (2003),

estes eletrodos quando aplicados em humanos, são muito mais convenientes para os clínicos, mais aceitáveis pelos pacientes e produzem menos movimentos, sendo úteis para a avaliação dos músculos superficiais.

Os eletrodos de profundidade são colocados no interior do músculo, utilizando-se dois filamentos de arame de pequeno calibre, revestidos, que são introduzidos através de agulhas hipodérmicas, colocadas na profundidade dos músculos (O'SULLIVAN; SHMITZ, 1993; FERREIRA, 1998). Estes últimos eletrodos, podem ser ainda classificados como monopolares ou bipolares. Os monopolares consistem em dois eletrodos dos quais um deles é colocado sobre o feixe muscular de interesse e o outro colocado num ponto não afetado pela atividade do feixe muscular de interesse. Assim, é possível medir a diferença de potencial entre estes dois pontos. Os bipolares, consistem em três eletrodos, sendo dois deles colocados sobre a região que se deseja estudar e o terceiro (eletrodo terra) posicionado num local não afetado pela atividade da região de interesse. Mede-se a diferença de potencial elétrico entre os dois eletrodos que estão na região de interesse, tomando-se como referência o eletrodo terra (RODRIGUEZ-AÑEZ, 2008).

O'Sullivan; Shmitz (1993), relataram que em seres humanos, os eletrodos de superfície são os mais utilizados por ser um método não invasivo e de fácil execução, enquanto que Cuddon et al. (2007) citaram que em animais, em decorrência de problemas técnicos como a tricotomia e o mau contato entre a pele e os eletrodos de superfície, os concêntricos tipo agulha ou monopolares são preferíveis.

Na musculatura normal não são observadas atividade elétrica no repouso (FERREIRA, 1998; CUDDON et al., 2007), com exceção da atividade insercional (CUDDON et al., 2007), e potenciais de placa motora, caso a agulha esteja situada em um terminal axonal (MERLETTI et al., 2008). A atividade insercional, é uma atividade fisiológica (MERLETTI et al., 2008), que ocorre pelo dano mecânico às miofibras no momento da aplicação da agulha. Esse procedimento promove descargas espontâneas da atividade elétrica, com início e término abrupto conforme a agulha é introduzida (CUDDON et al., 2007).

Quando ocorre uma lesão nervosa periférica, de axonotmese ou neurotmese, há o aparecimento de potenciais de fibrilação e ondas positivas, devido à descarga espontânea das fibras musculares desnervadas em função da instabilidade da membrana celular (FERREIRA, 1998).

Os potenciais de ação da unidade motora, são avaliados durante a contração muscular voluntária (CUDDON et al., 2007), onde são analisados quanto a amplitude, a duração e a incidência dos potenciais polifásicos. A amplitude é determinada pelo número de fibras musculares ativadas próximas ao eletrodo de agulha e pela distância entre o eletrodo e as fibras. A duração do potencial, reflete a atividade de todas as fibras musculares da unidade motora e o grau de assincronismo existente entre a despolarização de cada fibra (FERREIRA, 1998).

Apesar da EMG apresentar vantagens na avaliação de nervos periféricos, CUDDON et al. (2007) citaram como principal desvantagem a correlação deficiente entre a gravidade da doença clínica e o grau da anormalidade eletromiográfica. Portanto, sua utilização isolada não é eficiente. Além disso, sua utilidade clínica na medicina veterinária é restrita, uma vez que nem sempre ocorre obediência por parte dos animais.

3.4.1.2 Estudo da condução nervosa (Eletroneurografia)

As técnicas de neurocondução avaliam apenas as fibras nervosas grossas mielinizadas e complementam a avaliação eletromiográfica. Consistem na avaliação da velocidade de condução nervosa, latência distal e proximal, amplitude, duração, área e morfologia do potencial de ação composto (FERREIRA, 1998).

A velocidade de condução nervosa é definida como a distância que um impulso percorre ao longo do nervo por unidade de tempo (CHRISMAN, 1985; FEITOSA et al., 2000). As velocidades declinantes da condução nervosa motora estão associadas a desmielinização (CUDDON et al., 2007).

A verificação da amplitude é uma estimativa do número de fibras musculares ativadas pela estimulação nervosa e representa a soma das amplitudes das fibras

musculares individuais que estão sob a área de captação do eletrodo ativo (FERREIRA, 1998; CUDDON et al., 2007).

Assim, a amplitude do potencial de ação representa o volume dos axônios de disparo sincrônico. Portanto, quando ocorre declínio da amplitude, este dado denota uma diminuição na quantidade de axônios viáveis e, portanto, uma desnervação, ou então uma redução no número de miofibras estimuladas (CUDDON et al., 2007).

Já a latência consiste no tempo de condução nervosa do ponto de estímulo ao término do nervo, e do tempo de transmissão neuromuscular (do término do axônio para a placa motora, incluindo o tempo necessário para a geração do potencial de ação muscular composto), determinando a condução nas fibras nervosas mais rápidas (FERREIRA, 1998). Em outras palavras, a latência informa sobre a integridade das fibras de condução rápida (CHRISMAN, 1985; CUDDON et al., 2007).

Griffiths; Duncan (1978) e Feitosa et al. (2000), acrescentaram que a duração da onda M é um reflexo da sincronia das fibras musculares que ocorre no momento em que estas mesmas sofrem descargas no tempo. Estes mesmos autores, ainda relataram que retardos de latência podem indicar comprometimento de fibras rápidas e o aumento na duração pode indicar comprometimento de fibras lentas.

Assim, na avaliação dos nervos motores aplica-se um estímulo elétrico supramáximo sobre um nervo periférico (FERREIRA, 1998), o qual provocará uma onda de despolarização dos axônios e geração de impulsos ao longo do trajeto desse nervo (CHRISMAN, 1985; MERLETTI et al., 2008). Os impulsos elétricos serão captados em um eletrodo de registro superficial (CUDDON et al., 2007), localizado no ponto motor de um músculo inervado por este nervo (eletrodo ativo) e outro eletrodo, de referência, localizado sobre o tendão deste músculo (FERREIRA, 1998).

A velocidade de condução motora não é constante ao longo de todo o nervo pois o impulso se alentece à medida que atinge a porção distal, onde existem ramos terminais não mielinizados e a junção neuromuscular (CHRISMAN, 1985; FEITOSA et al., 2000). A velocidade de condução nervosa motora é determinada através do período de tempo entre a transmissão neuromuscular e a geração do potencial deve ser eliminado.

A diferença da latência entre ambas as respostas obtidas pela estimulação em dois pontos distintos (distal e proximal) exclui os dois componentes comuns a ambos os estímulos, representando o tempo necessário para o impulso nervoso percorrer estes dois pontos (FERREIRA, 1998).

O cálculo da velocidade de condução é feito dividindo-se a distância entre os pontos de estímulo, a qual é medida por meio de uma fita métrica, pela diferença da latências, considerando-se a fórmula: Velocidade = distância/ tempo (CHRISMAN, 1985; FERREIRA, 1998; CUDDON et al., 2007)

Os estudos da condução nervosa motora podem ser úteis para a distinção entre os quadros de neuropraxia e de separação axonal e nervosa completa (axonotmese e neurotmese respectivamente) (CUDDON et al., 2007). E por estas características, CHRISMAN (1985), enfatizou que a velocidade de condução nervosa é o maior auxílio no diagnóstico e monitoração de neuropatias periféricas.

Sendo assim, a utilização da velocidade de condução nervosa concomitantemente à eletromiografia, como acompanhamento da regeneração de nervos lesionados experimentalmente em coelhos, vêm sendo cada vez mais utilizado como um dado complementar ao exame clínico neurológico, excluindo assim a subjetividade que este último apresenta (IGNATIADIS et al., 2007; WANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

3.5 Terapia celular

O avanço tecnológico da ciência tem proporcionado benefícios consideráveis para a humanidade através da introdução de novas vacinas e terapias, aumentando a expectativa de vida e promovendo melhorias na saúde das pessoas de todo o mundo (SOUZA et al., 2003).

Dentro deste contexto, encontra-se a terapia celular, definida por ZAGO (2006) como sendo um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências, que visam a utilização de células para tratamento de muitas doenças. Essas novas técnicas estão sendo aplicadas em um amplo espectro de

doenças humanas, incluindo muitos tipos de câncer, doenças neurológicas como a doença de Parkinson, lesões de medula espinhal, diabetes e doenças cardíacas, entre outras .

É um conceito inovador, com uma enorme perspectiva de contribuir para o tratamento de várias enfermidades agudas ou crônicas (DOHMANN, 2004), sendo que pesquisas realizadas acerca da terapia com células-tronco demonstraram resultados animadores. Portanto, a utilização de células-tronco e suas aplicações terapêuticas no reparo tecidual, tanto em humanos como em animais, continuam sendo alvo de incansáveis pesquisas (VIOLINI; MARIANI, 2008), no intuito de trazer perspectiva de tratamento e cura para várias doenças.

No entanto, a aplicação mais imediata da terapia com células-tronco, a qual vêm sendo explorada em termos experimentais no mundo todo, é seu uso na regeneração de órgãos. Essa modalidade de terapia implica na inoculação de células-tronco em meio ao tecido danificado, na expectativa de que estas células proliferem e se diferenciem em células saudáveis típicas daquele tecido (http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf) .

3.5.1 Células-Tronco

As células-tronco são células indiferenciadas por apresentarem-se em estágios embrionários. Elas podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes especializadas ou não (KAJI; LEIDEN, 2001), com capacidade de se auto-regenerarem e gerarem células maduras de um determinado tecido. Portanto, as células-tronco apresentam três propriedades fundamentais: autorrenovação, diferenciação e proliferação (KAJI; LEIDEN, 2001; REYA et al., 2001; NARDI, 2005; ZAGO, 2006).

Estas características as diferenciam das outras células do organismo uma vez que sua autorrenovação é feita por meio de divisão celular. A capacidade de se multiplicar também ocorre por mitose, ocorrendo por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes. Por fim, sob certas condições fisiológicas e experimentais, são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular, permitindo o

surgimento de tipos celulares distintos morfofuncionalmente e, por extensão, de tecidos e órgão especializados (Figura 3). Em essência, as células-tronco são capazes de fazer divisões assimétricas (Figura 4), ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o *pool* de células-tronco, ou alternativamente podem se diferenciar em células especializadas (ZAGO, 2006).

Este processo de diferenciação é regulado pela expressão de genes específicos nas células-tronco, mas ainda não está totalmente elucidado. Certamente, isto depende também do microambiente, ou nicho, no qual a célula-tronco está inserida, devido à seja, pela influência exercida pelas células vizinhas e pela presença, ou ausência, de vários fatores de diferenciação celular (http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf).

As células-tronco presentes no embrião são designadas células-tronco embrionárias e as células-tronco encontradas em tecidos adultos são denominadas células-tronco adultas (VOGEL, 2000). A plasticidade é definida como a capacidade que uma célula-tronco apresenta em originar células diferenciadas de outros tecidos, como por exemplo quando células-tronco hematopoiéticas originam as células musculares cardíacas ou a hepatócitos. Ou seja, a plasticidade é a capacidade de transdiferenciação (ZAGO, 2006).

De acordo com suas diferentes funções, as células-tronco se classificam em embrionárias (pluripotentes e totipotentes) e somáticas ou adultas (multipotentes) (LAKSHMIPATHY et al., 2004), cujas funções e características são diferentes de acordo com a plasticidade que cada uma apresenta.

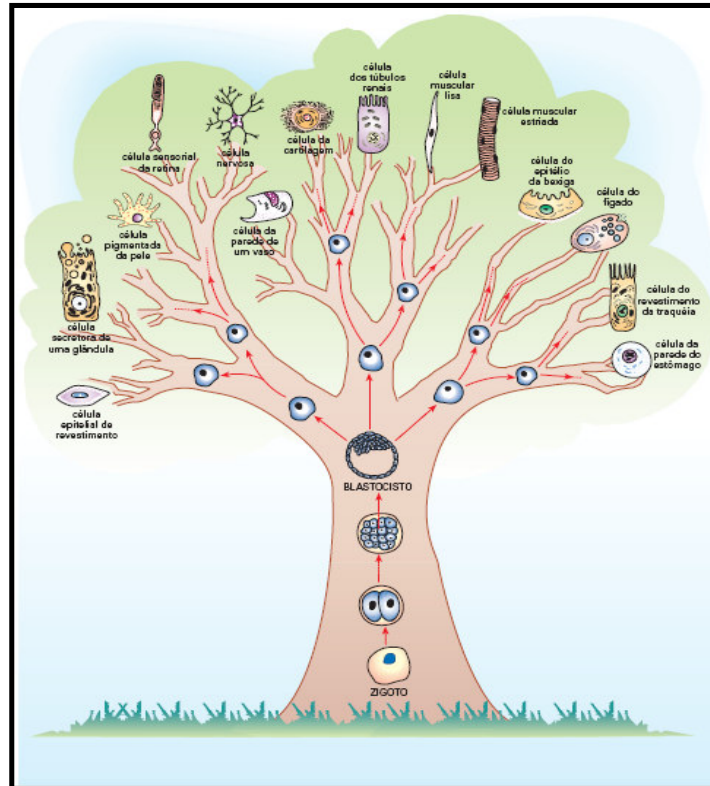


Figura 03 –Desenho esquemático do surgimento da célula- tronco a partir do zigoto e capacidade de gerar todos os tipos celulares. Fonte: <http://academicos.cefetmg.br/admin/downads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>

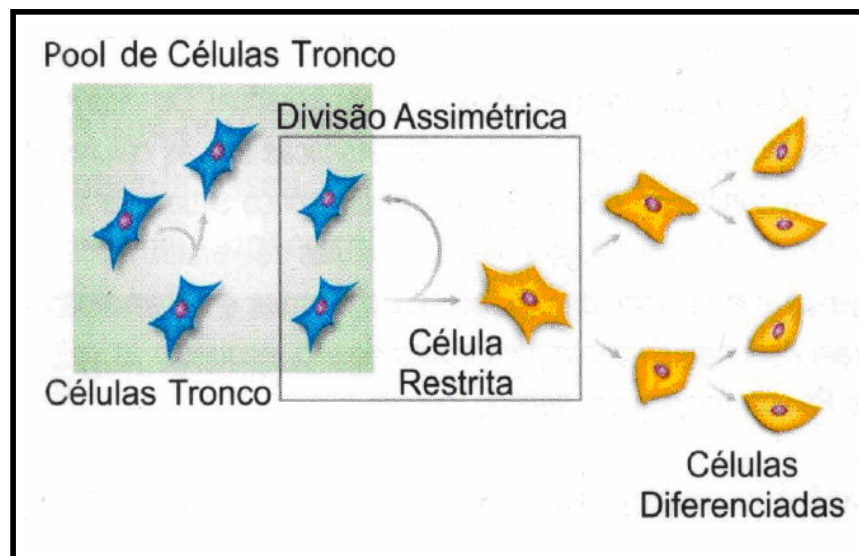


Figura 04 -Desenho ilustrativo demonstrando a propriedade fundamental das células-tronco de se dividirem assimetricamente (Fonte: Zago, 2006).

3.5.1.1 Plasticidade das células-tronco

Levando-se em consideração algumas características, como o nível de plasticidade que estas células apresentam, as diferentes vias de diferenciação e as atividades funcionais desempenhadas, as células-tronco apresentam diferentes potenciais para a diferenciação e classificam-se em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (SOUZA et al., 2003).

3.5.1.1.1 Células-tronco totipotentes

O zigoto é uma célula-tronco totipotente, isto é, capaz de originar células de todos os tecidos (ZAGO, 2006), ou seja, podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico (GAGE, 2000).

As células-tronco totipotentes correspondem às células do embrião em estágios iniciais do desenvolvimento, e têm potencial para originar não só todas as células maduras de um indivíduo adulto, mas todos os anexos embrionários, tais como a placenta, podendo originar um organismo completo. Entretanto estas células são efêmeras, pois avançam na diferenciação e perdem tal capacidade em poucos dias após a fertilização (ROBEY, 2000; SOUZA et al., 2003).

O processo de clivagem do zigoto produz por volta do terceiro ou quarto dias após a fecundação uma estrutura chamada mórula, composta por 16 a 32 células, num arranjo compacto que lembra uma amora. Nesta etapa, as células continuam sendo totipotentes. Por volta do quinto dia após fecundação, o embrião encontra-se na fase de blastocisto, um estágio de 32 a 64 células, com a forma de uma esfera oca. A camada mais externa desta esfera, chamada de trofoblasto, dará origem aos tecidos extra-embrionários, como a placenta. A massa celular interna da esfera dará origem ao embrião propriamente dito. (http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf).

3.5.1.1.2 Células-tronco pluripotentes

As células da massa interna são relativamente mais diferenciadas do que as totipotentes, possuindo plasticidade menor do que estas, mas mantendo ainda as características de células-tronco. São denominadas de células-tronco pluripotentes, uma vez que podem dar origem aos mais de 250 tipos celulares diferentes de tecidos do adulto (ZAGO, 2006). Assim, podem originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo por não terem a capacidade de gerar as membranas embrionárias (ROBEY, 2000; ZAGO, 2006; <http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>).

São obtidas a partir do embrião em estágios iniciais de desenvolvimento, e podem ser cultivadas *in vitro*. São as células derivadas do embrião, do feto ou de um tipo de célula híbrida obtida de um processo chamado de transferência de núcleo somático ou “clonagem” (ZAGO, 2006).

Em indivíduos adultos, também podem ser encontradas; porém, em uma pequena quantidade. São oriundas da medula óssea e podem originar células de sangue, ossos, cartilagem, músculos, pele e tecido conjuntivo (GAGE, 2000). Não são consideradas como células progenitoras, porque apresentam trocas epigenéticas, que reduzem a eficiência de sua resposta aos sinais de diferenciação e proliferação (RIVEROS et al., 2007).

3.5.1.1.3 Células-tronco multipotentes

A medida que o embrião se desenvolve, as células que o compõem mostram um potencial para diferenciação cada vez mais reduzido. Assim, as células pluripotentes passam a ser multipotentes, ou seja, células com capacidade de darem origem a um número menor de células especializadas (http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf).

Portanto, as células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas do que as pluripotentes, presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos celulares. Estas células, são designadas de acordo com o

órgão de que derivam e podem originar apenas células daquele órgão, possibilitando a regeneração tecidual (GAGE, 2000).

3.5.1.1.4 Células progenitoras ou precursoras

Estas células não podem ser consideradas como células-tronco, pois ao se dividir, não produzem células similares à célula mãe, que adquirem morfologia e fisiologia própria, mais diferenciadas, especializando-se no desempenho de uma tarefa específica do organismo (http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf).

3.5.2 Células-tronco adultas

Além de presentes no embrião, as células-tronco também são encontradas em vários órgãos e tecidos no indivíduo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células para renovação fisiológica ou em reposta a uma lesão. Tais populações celulares indiferenciadas, e com habilidade de autorrenovação em múltiplos tipos celulares, são denominadas células-tronco adultas ou somáticas (BJORNSON et al., 1999; CLARKE et al, 2000; FUCHS et al., 2004; MOORE; LEMISCHKA, 2006), sendo classificadas como multipotentes pela sua capacidade limitada de diferenciação (ZAGO, 2006).

Uma vez formado o indivíduo, nem todas as células são plenamente diferenciadas, pois mesmo em um organismo adulto, existem tecidos e órgãos que precisam ser continuamente renovados (ZAGO, 2006; <http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>). Numerosos tecidos possuem células-tronco residentes, que constituem uma reserva da qual o organismo lança mão para repor células maduras desgastadas ou quando ocorre lesão ou remodelação dos tecidos. Assim, são bem conhecidas as células-tronco da pele, da mucosa intestinal, do fígado, da gordura, da córnea, da retina, da polpa dentária, do pulmão e dos músculos esqueléticos (ZAGO, 2006). Dessa forma, as células-tronco são fundamentais na manutenção dessas populações celulares (<http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>) e vários mecanismos celulares regulam o balanço entre autorrenovação e a

diferenciação das células-tronco, o qual recebe grande influência do nicho o qual estão inseridas (FUCHS et al., 2004).

3.5.2.1 Células-tronco hematopoiéticas

Em indivíduos adultos, a primeira e mais conhecida célula-tronco descrita é a hematopoiética (LIANG; BICKENBACH, 2002; NARDI, 2005; ZAGO, 2006). Estas células apresentam como características principais a capacidade de autorrenovação e a pluripotencialidade (SILVEIRA, 2000). Este fato é sabido desde a década de 1940, uma vez que tais células-tronco indiferenciadas são as responsáveis pela reposição de células maduras no sangue, sendo estas últimas, autorrenovadas constantemente (ZAGO, 2006).

Assim, as células hematopoiéticas são as que compõem o sangue e exibem características diferentes das de outros órgãos vitais, tais como tempo de vida relativamente curto, multiplicidade de tipos celulares, e grande dispersão no organismo. Em um indivíduo normal, os níveis das células maduras no sangue são mantidos em limites estreitos e, em resposta a emergências como perda sanguínea ou infecções, os tecidos hematopoiéticos são capazes de responder rapidamente a estímulos aumentando a produção celular. Em adultos, estas condições podem ocorrer por existir um sistema de controle extremamente complexo (NARDI; ALFONSO, 2006).

As células-tronco hematopoiéticas são raras. Estima-se que menos de 1 em 10.000 células da medula seja uma célula-tronco hematocitopoiética multipotente, ou seja, 0,05% a 0,1% e, por isso, sua identificação morfológica sempre foi muito difícil (ZAGO, 2006). Por existirem em pequena quantidade no organismo, é admirável a capacidade de produção deste sistema, pois é muito grande a quantidade de células diferenciadas maduras produzidas: 3 bilhões de hemácias e 850 milhões de granulócitos por quilo por dia na medula óssea humana normal (<http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>). Em outras palavras, em um homem de 70 quilos pode ser estimada a produção de um trilhão de células por dia, incluindo 200 bilhões de eritrócitos e 70 bilhões de neutrófilos (OGAWA, 2008).

Além de se localizarem na medula óssea, estas células-tronco circulam no sangue de adultos e, em especial, no sangue do feto. No momento do nascimento, o

sangue fetal retido na placenta após a secção do cordão umbilical pode ser recuperado, constituindo rica fonte destas células que podem ser usadas para fins terapêuticos (ZAGO, 2006). Desta forma, as células-tronco hematopoiéticas, até o momento, são as mais compreendidas e mais amplamente aplicadas em protocolos clínicos, situação esta compreensível se considerarmos a facilidade de acesso ao tecido hematopoiético como sangue periférico, da medula óssea e do sangue do cordão umbilical. A fácil coleta de células propiciou seu estudo *in vitro* muito precocemente (NARDI; ALFONSO, 2006).

Quando ocorre uma disfunção regulatória da hemocipoiese, por exemplo, pelo aumento ou diminuição da produção de células-tronco, há em consequência uma superprodução ou produção insuficiente de determinadas células sanguíneas. É o que ocorre na leucemia, a qual é uma produção excessiva de glóbulos brancos (<http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>).

A ideia de transplantar a medula óssea começou a ser desenvolvida logo após a exposição de populações civis a doses letais de radiação em 1945, quando pesquisadores demonstraram em animais irradiados a possibilidade de regeneração do sistema hematopoiético. Os transplantes de medula óssea vêm sendo realizados há décadas para o tratamento de vários tipos de doenças hematológicas, tais como leucemias, linfoma e mieloma (NARDI; ALFONSO, 2006). Nos últimos anos, a utilização de células-tronco do sangue periférico no transplante de células hematopoiéticas, em substituição ao transplante de medula óssea, têm sido cada vez mais comum. Pelo fato das células-tronco hematopoiética se apresentarem em número restrito na circulação periférica, são representadas por toda a subpopulação de células CD34, obtidas após administração de fatores estimuladores de colônia (GALLACHER et al., 2000; CUTLER; ANTIN, 2001). No entanto, muitos aspectos ainda precisam ser elucidados para que o processo hematopoiético seja totalmente compreendido, como a plasticidade destas células, a qual representa uma oportunidade para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas de grande potencial, justificando o entusiasmo despertado por esta área de pesquisa (NARDI; ALFONSO, 2006).

3.5.2.2 Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSC= *mesenchymal stem cells*), são um dos mais interessantes tipos de células-tronco adultas (NARDI; MEIRELLES, 2006). São multipotentes, capazes de suportar a hematopoiese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares, porém, constituem uma pequena população celular na medula óssea (COVAS, 2006). Para Horwitz et al. (2005), as MSCs é um termo comumente aplicado para referir-se a células com alta plasticidade, aderentes, isoladas tanto da medula óssea como do tecido adiposo e de outros tecidos, com capacidade de diferenciação multipotente *in vitro*.

Alguns autores ainda definiram as MSCs como células não hematopoiéticas, multipotentes capazes de se diferenciarem em ambas linhagens mesenquimais e não mesenquimais. Apresentam capacidade para diferenciarem-se em condrócitos, osteócitos, adipócitos, tenócitos, cartilagem, mioblastos e tem sido demonstrado que as MSCs apresentam capacidade para diferenciarem-se em neurônios e astrócitos *in vitro* e *in vivo* (COVAS, 2006; GIORDANO et al., 2007).

O tipo de célula específica envolvida neste fenômeno de diferenciação não está claro. Relatos sugeriram que a capacidade de diferenciação das MSCs, podem contribuir para resultados observados, ou seja, elas podem se diferenciar em células específicas e não específicas de um tecido *in vitro* e *in vivo*, e têm a tendência de adquirirem características tecido-específicas quando cultivadas com tipos de células especializadas ou quando expostas a extratos teciduais *in vitro* (NARDI; MEIRELLES, 2006).

Assim, são facilmente isoladas, cultivadas e manipuladas em *ex-vivo*. As MSCs são dotadas de grande plasticidade e apresentam um forte potencial para aplicações terapêuticas, contudo, são ainda pouco conhecidas. Estão presentes na medula óssea e são identificadas através de pobres combinações fisiológicas, fenotípicas e propriedades funcionais (SHORT et al., 2003; BARRY; JAVAZON et al., 2004; KASSEM et al., 2004; MURPHY, 2004; ZIPORI, 2004).

Segundo Covas (2006), as MSCs foram originalmente identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein e cols., em 1966, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas

(CFU-F = *colony forming units – fibroblastic*). Tais autores, demonstraram a distinção entre as células progenitoras hematopoiéticas e osteogênicas com base em vários experimentos. Demonstraram também, que células de medula óssea eram capazes de regenerar novos tecidos ósseos em transplantes seriados em receptores secundários, confirmando a capacidade de autorrenovação das células osteogênicas, e determinando seu *status* de célula-tronco. Posteriormente, desenvolveram um método de isolamento destas células baseado na sua capacidade de aderência ao plástico, que é utilizado até hoje como método padrão de isolamento. Do conjunto destes experimentos, ficou demonstrado que estas células da medula óssea (CFU-F) constituíam uma população celular rara, não entravam na fase S do ciclo celular antes de 60 horas de cultura, possuíam elevada capacidade replicativa, eram clonogênicas, formavam colônias de densidade e formato irregulares, eram capazes de formar tecido ósseo *in vivo* mesmo após terem sido extensivamente cultivadas *in vitro*. No entanto, constituem uma pequena população celular na medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. Contudo, podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas (COVAS, 2006).

A identificação das MSCs depende de sistemas de cultura *in vitro*, o qual tem evidenciado informações heterogêneas, o que torna a caracterização das MSCs mais difícil. Três sistemas *in vitro* são geralmente empregados para examinar estas células: CFU-F, análise estromal da medula óssea e cultivo de linhagens de células mesenquimais. São facilmente isoladas de uma pequena quantidade de aspirados de medula óssea, obtidos a partir da crista ilíaca superior, da tíbia, do fêmur, do úmero e da coluna vertebral lombar e torácica de humanos e grandes mamíferos. Ainda, podem ser isoladas do tecido adiposo, do fígado, dos tendões, da membrana sinovial, do fluído amniótico, da placenta e dos dentes (COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006; GIORDANO et al., 2007).

As MSC da medula óssea expressam um amplo espectro de citocinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente na manutenção do ambiente estromal, que é importante elemento regulador da hematopoiese e de outros sistemas celulares presentes na medula óssea. Também, produzem uma série de

moléculas da matriz extra-celular, incluindo a fibronectina, laminina, colágenos e proteoglicanos (COVAS, 2006).

Duas outras extraordinárias características das MSCs fazem da terapia celular um procedimento promissor no tratamento de várias doenças. Elas têm capacidade de migrar para sítios de tecidos lesados e têm fortes propriedades imunossupressivas, podendo ser exploradas tanto em enxertos autólogos quanto heterólogos (Le BLANC; PITTENGER, 2005).

Com base nas características acima citadas, a terapia com células-tronco mesenquimais é um procedimento promissor para o tratamento de vários tipos de doenças degenerativas. Apesar do número de trabalhos científicos envolvendo células mesenquimais crescer exponencialmente nos últimos anos, muito ainda existe para ser feito neste campo. A terapia com estas células é promissora, mas só poderá estar disponível como opção terapêutica a médio e longo prazos (COVAS, 2006).

3.5.3 Utilização da terapia celular na neurologia

Vários estudos têm comprovado que a terapia celular é um procedimento que auxilia a regeneração nervosa periférica; porém, ainda restam dúvidas, como, por exemplo, a respeito do mecanismo através do qual as células-tronco produzem subtipos específicos (NUNES; ZATZ, 2006).

Dentre estes estudos, podemos citar os realizados por Chen et al. (2007), os quais avaliaram a regeneração do nervo ciático de 40 ratos, após remoção cirúrgica experimental de 15 milímetros deste mesmo nervo, com imediata reconstrução cirúrgica através de uma câmara de silicone interposta entre ambos os cotos nervosos. Neste estudo, 20 animais receberam tratamento adicional com células-tronco mesenquimais e o mesmo número de animais não a receberam. Os autores observaram que a progressão do processo regenerativo, nos animais que receberam terapia celular adicional, apresentavam alta expressão de fatores neurotróficos. Assim, a utilização de MSCs evidenciou forte associação com estes fatores, favorecendo a regeneração neural.

Nesta mesma linha de pesquisa, Shimitzu et al. (2007) compararam a utilização de MSCs de ratos Wistar, diferenciadas e não diferenciadas, *in vitro*, em células de Schwann, como adjuvante à regeneração do nervo ciático. As células não diferenciadas,

expressaram marcadores para as células de Schwann *in vivo* e apoiaram a regeneração axonal. Os autores concluíram que as MSCs não diferenciadas podem ser um substituto das células de Schwann, podendo ser aplicadas para a regeneração nervosa.

Já Braga-Silva et al. (2006) compararam o efeito das células de medula óssea, do plasma rico em plaquetas, e a combinação de ambos na regeneração de nervos periféricos associados a técnicas convencionais em comparação com técnicas cirúrgicas convencionais utilizadas como único tratamento. Como resultados, estes autores observaram melhor performance funcional, avaliada pelo teste da marcha nos ratos tratados com células-tronco de medula óssea quando comparados com os demais grupos. Histologicamente, no grupo células-tronco, verificaram axônios mielínicos e amielínicos em quantidade adequada ao comparar com o grupo o qual só recebeu tratamento cirúrgico e plasma rico em plaquetas. Ainda, estes mesmos autores observaram que o grupo tratado com células-tronco e plasma rico em plaquetas não apresentou melhores resultados quando comparado aos demais animais. A justificativa dada, é que a preparação do plasma rico em plaquetas, de alguma forma, inibe os efeitos das células-tronco parcialmente ou até mesmo completamente.

Em contrapartida, estudo realizado em coelhos Nova Zelândia por Colomé et al. (2008), com intuito de verificar a eficácia da regeneração nervosa utilizando células-tronco autólogas de medula óssea como terapia adicional à tubulização do nervo tibial, demonstrou apenas significância no que diz respeito à presença de degeneração Walleriana. Estes autores concluíram que a terapia celular apresentou vantagens no processo de regeneração do nervo periférico, aos 30 dias de pós-operatório.

A respeito das células-tronco neurais (CTN), estas constituem a fonte de todos os tipos de neurônios que surgem durante a formação da placa neural, e possivelmente constituem a maioria dos tipos de células da neuroectoderme. Com o desenvolvimento, as CTN tornam-se progressivamente menos abundantes. Apesar disto, recentes progressos demonstraram que neurônios adequados para transplantes podem ser originados de cultura de células-tronco, e que a neurogênese ocorre em diferentes regiões do cérebro adulto, tanto em condições fisiológicas como patológicas e estas regiões possuem células-tronco adultas. As células ependimais e os astrócitos, residentes na zona subventricular adjacente, tem sido apontadas como fonte de células-tronco neurais adultas multipotentes. Portanto, o transplante de células-tronco e a

mobilização de células-tronco endógenas são procedimentos que têm sido propostos como terapias potenciais em várias doenças do SNC (GRITTI et al., 2002; MARIE; OBA-SHINJO, 2006).

Assim, muito se têm estudado a respeito das células-tronco neurais adultas. Recentes estudos demonstraram que quando a cultura de CTN é suplementada com ácido hialurônico e colágeno, estas células são capazes de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (BRANNVALL et al., 2007).

Zhang et al. (2008) verificaram a implantação de células-tronco neurais embebidas em ácido hialurônico e colágeno como promotores de regeneração em um modelo experimental de transecção do nervo facial de coelhos. Foram utilizados neste experimento 39 coelhos, separados em seis grupos: controle; transecção bilateral do nervo e imediata reconstrução; transecção unilateral com implantação de células-tronco neurais embebidas em ácido hialurônico e colágeno, transecção unilateral com implantação de neurofina-3 (NT-3), ácido hialurônico e colágeno e por fim, transecção unilateral com implantação de células-tronco neurais, ácido hialurônico e colágeno e neurofina-3. Como resultados, os autores observaram, após 12 semanas de pós-operatório, nos grupos AH-colágeno, CTN e AH-colágeno, NT-3 e AH-colágeno, os seguintes resultados: atrofia muscular do lábio superior, reflexo palpebral reduzido e queda da orelha. Porém, nos animais que receberam CTN embebidas em NT-3 suplementadas com AH-colágeno, demonstraram reflexo palpebral normal, orelhas não eretas porém, com movimentação normal, além de leve atrofia do lábio superior. Como conclusão, estes autores supõem que a utilização de células-tronco neurais embebidas em ácido hialurônico e colágeno e NT-3 facilita a reinervação de lesões do nervo facial de coelhos, podendo ser uma alternativa de tratamento.

Clarke et al. (2000) verificaram que as CTN, quando implantadas em blastocistos de ratos, participavam da formação de diferentes tecidos e órgãos oriundos dos três folhetos embrionários, pois as células derivadas apresentavam marcadores específicos dos tecidos aos quais foram incorporadas, como por exemplo, desmina no tecido cardíaco; citoceratina 20 no epitélio intestinal; e albumina no fígado. Este experimento demonstrou o perfil pluripotente da CTN adulta e sua ampla capacidade de desenvolvimento, podendo potencialmente, ser utilizada para gerar uma variedade de

tipos celulares para transplantes em diferentes doenças humanas, dentre elas o mal de Parkinson, o mal de Alzheimer e a esclerose múltipla.

Assim, pesquisas adicionais ainda são necessárias para a compreensão dos mecanismos de diferenciação ocorridos tanto no interior das próteses utilizadas em cirurgias de nervos periféricos, preenchidas com a preparação de células-tronco, quanto no interior dos cotos nervosos seccionados (BRAGA-SILVA et al., 2006). Também, há a necessidade de buscar o conhecimento a respeito do direcionamento das células-tronco adultas (*homing*) para diferentes microambientes. Isto se faz essencial para que possa ser determinado, com clareza, se estas células são realmente capazes de originar diferentes linhagens neurais, quando injetadas por via venosa ou localmente (NUNES; ZATZ, 2006).

3.6 Regeneração nervosa

Há muito se sabe, que os nervos periféricos lesionados são susceptíveis à regeneração (LENT, 2005b). Pelo menos, até o século XIX, sabia-se que, após a reparação de um nervo periférico, era possível obter a recuperação funcional das estruturas por ele inervadas, mas desconhecia-se o mecanismo pelo qual isto ocorria (MATTAR Jr; AZZE, 2008).

Em 1850, Augustus Waller, apresentou seu clássico trabalho sobre a degeneração nervosa após uma lesão. Seu estudo, nos nervos hipoglosso e glossofaríngeo de sapos, demonstrou não apenas a degeneração do axônio distal, mas também o processo de regeneração nervosa. Ele notou que a progressão da regeneração é mais rápida nos jovens e que a estimulação elétrica galvânica não altera a velocidade de regeneração.

A importância de Augustus Waller, pode ser expressa pela denominação de degeneração Walleriana dada ao conjunto de fenômenos que ocorrem no axônio distal após uma lesão (LOPES et al., 1993; FERREIRA, 1998; ROSSETO et al., 2001; LENT, 2005b; PURVES, 2005a; RODKEY; SHARP, 2007; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

A lesão do nervo periférico geralmente envolve fibras mielinizadas e não mielinizadas. A interrupção do o axônio separa em cotos proximal e distal. Desprovido

de aporte energético por ter sido desconectado do soma, o coto distal do axônio degenera, fragmentando-se gradualmente em pedaços menores. A mielina se desorganiza e também se fragmenta. Os produtos da degeneração do coto distal, tanto dos axônios quanto da mielina, são rapidamente removidos por macrófagos provenientes da corrente sanguínea. Ao mesmo tempo, as células de Schwann começam a proliferar em torno das estruturas em degeneração e a fabricar nova mielina ao longo da porção desnudada do axônio, formando segmentos internodais mais curtos (Figura 5) do que os originais (FERREIRA, 1998; LENT, 2005b; PURVES, 2005a).

Em função disso, existe aumento no número de nódulos de Ranvier nesta porção remielinizada do nervo, e a velocidade de condução é mais lenta que o normal (FERREIRA, 1998). As células de Schwann começam a sintetizar moléculas que irão compor a matriz extracelular, capazes de estimular o crescimento do axônio lesionado. Essas moléculas são a laminina, a fibronectina e outras, que apresentam grande adesividade ao cone de crescimento que se formará no coto proximal. Assim, na região proximal à lesão, os axônios sofrem um processo de degeneração retrógrada, semelhante ao que ocorre no coto distal, mas geralmente, estendendo-se apenas ao nódulo de Ranvier mais proximal. Este processo de degeneração pode atingir o corpo celular levando a morte da célula por apoptose (LENT, 2005b; MARTINS et al., 2005).

As alterações presentes no corpo celular, segundo Martins et al. (2005), representam um incremento do metabolismo celular, que visa a produção de proteínas relacionadas à regeneração do citoesqueleto axônico, em detrimento da produção de neurotransmissores.

A regeneração da extremidade distal do coto proximal do nervo periférico lesionado inicia com a degeneração Walleriana do coto distal. O citoesqueleto e o axoplasma degeneram deixando o tubo endoneural vazio (LENT, 2005b; MARTINS et al, 2005; RODKEY; SHARP, 2007).

A regeneração, que ocorre no sistema nervoso periférico, está diretamente relacionada à possibilidade de manutenção das células de Schwann independentemente da degeneração do axônio. Essa sobrevivência, que pode levar meses no coto distal de animais submetidos a axoniotomia, ocorre pela existência de uma série de sinais

celulares produzidos pelas próprias células de Schwann, independente do contato com os axônios (MARTINS et al., 2005).

No local da lesão, as alterações estão presentes nas primeiras 24 horas. Ao rompimento do nervo, a primeira nítida alteração que se observa é a retração do mesmo (PIERUCCI, 2008). O intervalo formado entre os cotos é preenchido por sangue formando-se um coágulo de fibrina. A este coágulo convergem capilares e fibroblastos de tecidos adjacentes. Na extremidade do coto proximal, os axônios formam protrusões axoplasmáticas denominadas de brotos de crescimento ou neuritos (Figura 5 (3) n) . Por este processo, cada axônio pode originar vários axônios delimitados pelo perineuro. Este brotamento axonal está presente precocemente, podendo ser observado em apenas três horas após a ocorrência da lesão nervosa (MARTINS, et al., 2005).

Em seguida, ocorre absorção destes brotamentos axonais múltiplos, e a formação de um único axônio. Após 24 horas, os terminais axonais continuam avançando e, estendem-se para a área lesada por três a oito dias. Ocorre aumento na presença de mitocôndrias e vesículas juntamente com a expansão distal da extremidade do axônio, esta estrutura é denominada cone de crescimento (FERREIRA, 1998; LENT, 2005b; MARTINS et al., 2005).

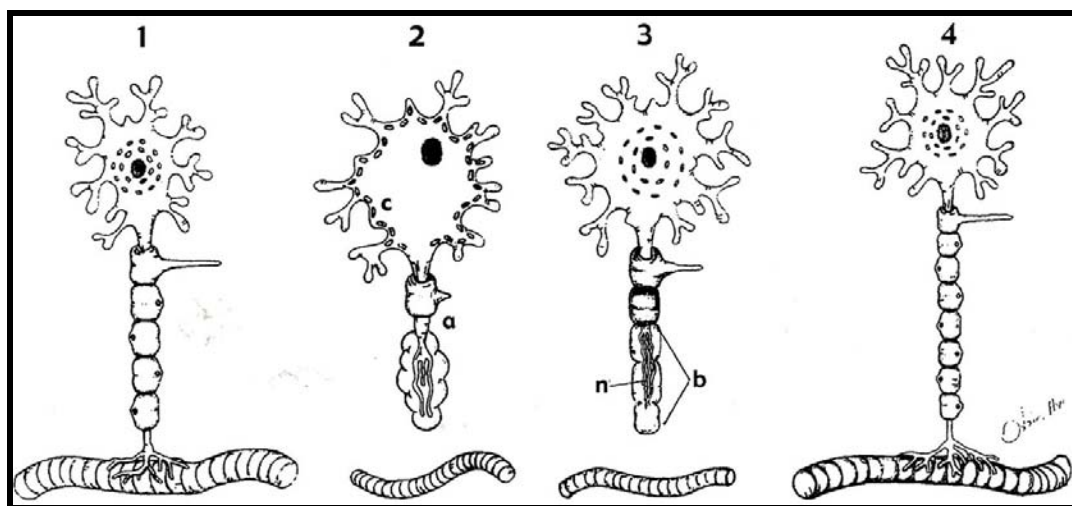


Figura 05– Reparo do SNP.

(1) Neurônio normal, mielinizado, conectado a um músculo.

(2) Quando o axônio é seccionado, o coto distal e a mielina degeneram, mas o coto proximal sobrevive, embora ocorra cromatólise do corpo celular (c). Inicia a degeneração Walleriana no coto distal (a).

(3) Regeneração do axônio lesionado. (n) Os neuritos crescem dentro das Bandas de Büngner (b).

(4) Neurônio mielinizado, regenerado com restauração completa da condução nervosa. (Fonte: PELLEGRINO et al., 2003).

Esta expansão distal da extremidade proximal, ou cone de crescimento, forma duas porções: a região do lamelipódio e os filopódios, ou neuritos. A região do lamelipódio é definida como a área central da extremidade do cone que está em constante remodelamento pela formação e retração dos filopódios. Os filopódios são expansões em forma de espículas que se estendem e se retraem a partir da superfície do lamelipódio, movimentados pela contração dos filamentos de actina e formando uma rede poligonal complexa no seu interior. Por meio desta disposição, o cone de crescimento atua de forma semelhante ao movimento amebiano, explorando o microambiente extracelular até que pela interação de receptores de superfície com estímulos adequados (tais como fatores de crescimento), haja uma reorientação apropriada que possibilite o crescimento axonal em direção ao coto distal (Figura 5) e órgão-alvo (MARTINS et al., 2005).

3.7 Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa

A descontinuidade da estrutura do nervo, por algum tipo de trauma resulta no bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos e na desorganização de suas atividades funcionais. (MATTAR Jr; AZZE, 2008).

O tratamento das lesões de nervos periféricos, de uma forma geral em animais, apresenta problemas singulares. As lesões nervosas isoladas não costumam exibir risco de morte, mas suas sequelas podem levar a deficiência permanente, óbito ou eutanásia. A regeneração inadequada dos nervos periféricos após traumatismo representa um dos maiores problemas no tratamento de pacientes lesionados (RODKEY; SHARP, 2007).

Na maioria das vezes, a intervenção cirúrgica faz-se a única opção terapêutica no tratamento de nervos acometidos traumáticamente (MARTINS et al., 2005). Com base neste dado, Rodkey; Sharp (2007), são favoráveis do procedimento cirúrgico precoce e rigoroso, relatando assim, maiores chances do retorno à função neural.

Mattar Jr; Azze (2008) enfatizaram a importância de classificar as lesões em recentes ou tardias, dependendo do tempo entre o trauma e o atendimento prestado. Até três semanas são consideradas recentes, e após este período, tardias. Assim, existe o reparo primário e o secundário das lesões periféricas. O reparo primário deve ser

efetuado em, no máximo, cinco a sete dias do traumatismo, sendo indicado quando a lesão do nervo periférico é limpa, incisa, sem componentes de esmagamento, não há outras lesões associadas, a cobertura cutânea é adequada, a contaminação é mínima e a equipe e o instrumental cirúrgico são apropriados.

Já o reparo secundário, é realizado num período maior que sete dias após a lesão nervosa. Rojas (1982), considerou a sutura secundária aos 21 dias como a ideal para realizar a neuroanastomose por apresentar um campo praticamente livre de células inflamatórias. Este mesmo autor relatou que na reparação secundária, o epineuro apresenta-se mais resistente, oferecendo maior sustentação de sutura.

Mesmo assim, a reabilitação de funções sensoriais e motoras continuam sendo desafiantes para os pesquisadores (SANDRINI et al., 2007).

Embora na última década não tenham ocorrido grandes modificações nas técnicas utilizadas para a cirurgia de nervos (MARTINS et al., 2005), o uso da microcirurgia para tratamento das lesões de nervos periféricos determinou grandes avanços nos resultados funcionais pós-operatórios, persistindo, no entanto, diversos questionamentos relativos ao manejo ideal destas lesões (MELLO et al., 2001).

Assim, muitos métodos de sutura ou de reparo dos nervos periféricos foram descritos, mas nenhuma técnica isolada se mostrou superior (RODKEY; SHARP, 2007). Os métodos convencionais para reparo de nervos seccionados incluem a neurólise, neurorrafia epineural, a neurorrafia fascicular, a neurorrafia epineural-fascicular combinada com enxertos nervosos (SHORES, 1996), a sutura em padrão axial central (CONTESINI et al., 1992), a aplicação de adesivos de fibrina (DOURADO et al., 2003; SANDRINI et al., 2007) e as técnicas de tubulização com câmaras constituídas a partir de diferentes materiais (CONTESINI et al., 1992; NAKAMURA et al., 2004; BRAGA-SILVA et al., 2006; KIM et al., 2006; WANG et al., 2007; COLOMÉ et al., 2008). A finalidade destes métodos de reparação microcirúrgica, para Dourado et al. (2003), consiste no realinhamento dos cabos nervosos com o mínimo de trauma iatrogênico.

A seguir, serão descritas as técnicas cirúrgicas mais utilizadas nas lesões dos nervos periféricos, com maior ênfase à técnica de tubulização neural, por ser motivo do presente estudo.

3.7.1 Neurólise

A neurólise consiste na ressecção de tecido cicatricial do tronco nervoso. Pode ser externa, quando a ressecção é efetuada em torno do epineuro, liberando-o de aderências, e interna ou fascicular, quando o epineuro é aberto e a ressecção de tecido cicatricial é efetuada entre os fascículos, objetivando descomprimir o tronco e os fascículos nervosos. Está indicada em lesões com continuidade do arcabouço conjuntivo do nervo, como no caso de neuromas (FERREIRA, 1998; MATTAR Jr; AZZE, 2008).

3.7.2 Sutura Epineural

A sutura epineural (Figura 6) é a técnica clássica eleita para a reparação nervosa. Consiste em unir a porção epineural dos cabos proximais e distais com o menor número possível de suturas, diminuindo assim, o tempo de intervenção e causando menores traumatismos ao tecido nervoso (URBANIÁK, 1982; SAWAMURA; ABE, 1997). Além disso, não invade o conteúdo neural, é simples e de fácil execução, não necessitando de grandes ampliações de imagem (SILVA-NETO, 2003).

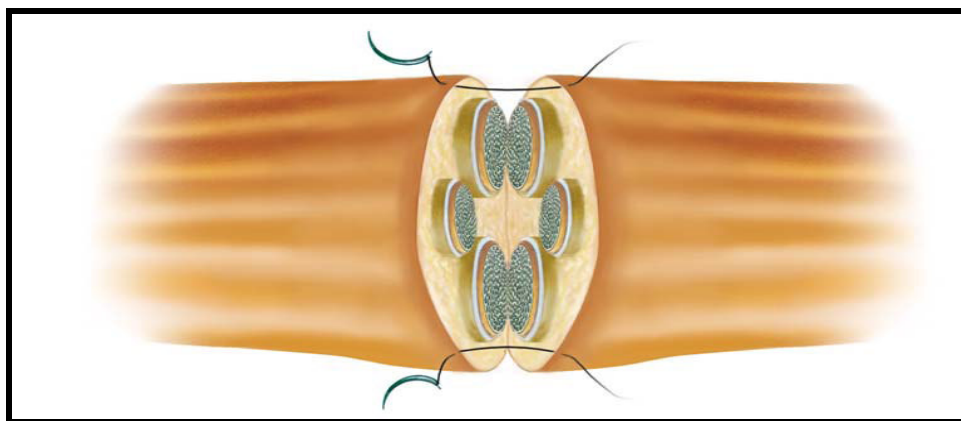


Figura 06 – Sutura epineural de nervo periférico (Fonte: MATTAR Jr; AZZE, 2008).

3.7.3 Sutura Fascicular ou Perineural

Esta técnica consiste na dissecação de cada fascículo ou grupo de fascículos, liberando-os do tecido conjuntivo circundante e aproximando-os individualmente (Figura 7) (URBANIÁK, 1982).

Assim, diferentemente da sutura epineural, necessita de maior ampliação (de 8 a 16 vezes), sendo um procedimento demorado e mais entediante quando comparado às neurorrafias epineurais (RODKEY; SHARP, 2007). A manipulação no sítio da lesão é maior, podendo aumentar o trauma, a inflamação e induzir alterações degenerativas do tecido nervoso (SANDRINI et al., 2007). A grande vantagem da sutura fascicular é a de permitir a regeneração fascicular acurada por introduzir as fibras nervosas apropriadamente nos tubos endoneurais em suas extremidades (RODKEY; SHARP; 2007).

Tanto para a técnica epineural quanto para a fascicular, é fundamental evitar-se a tensão na zona de sutura, prevenindo-se assim a fibrose e a isquemia local (FERREIRA, 1998). Porém, quando não for possível evitar a tensão entre os cotos neurais, o enxerto interfascicular poderá ser uma boa alternativa, uma vez que permite resolver o problema da tensão em caso de perda significativa de tecido nervoso (FERREIRA, 1998; IGNATIADIS et al., 2007; ROKEY; SHARP, 2007;).

Nos enxertos nervosos, empregam-se segmentos livres de nervo, geralmente o sural, pertencentes ao doador autógeno, onde os fascículos pertencentes ao segmento proximal serão conectados aos do segmento distal por meio de um ou mais enxertos. Este enxerto sofrerá um processo de degeneração e funcionará apenas como conduto para os axônios em regeneração (FERREIRA, 1998; RODKEY; SHARP, 2007). O nervo o qual foi retirado seu segmento para enxerto autólogo, receberá a sutura epineural e o enxerto será anastomosado a seu sítio com sutura fascicular.

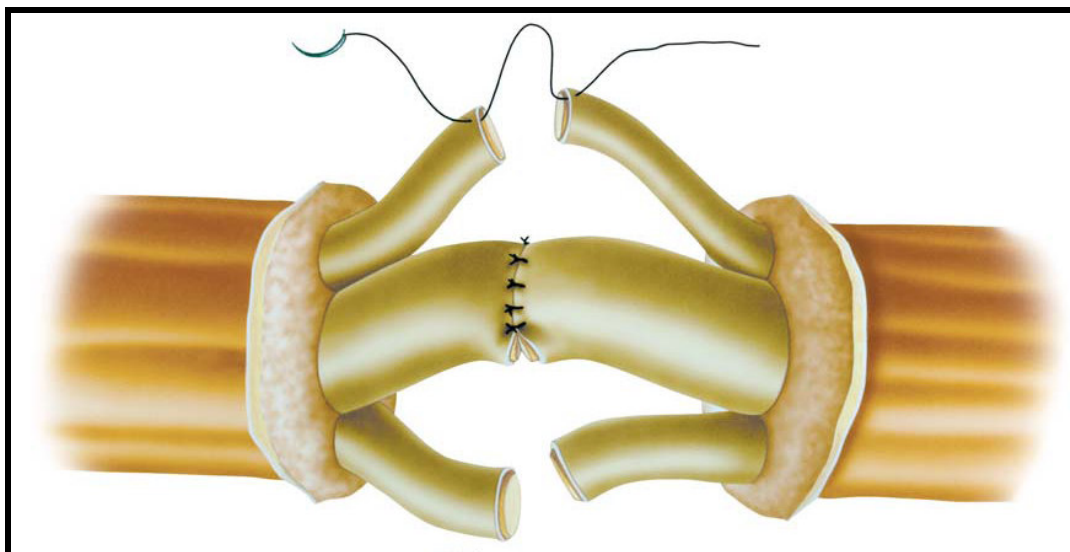


Figura 07 – Desenho esquemático da sutura perineural (Fonte: Mattar Jr; Azze, 2008).

Apesar da técnica que utiliza enxertos autógenos apresentar bons resultados, Wang et al. (2007) citaram como desvantagens a necessidade de uma segunda cirurgia no mesmo paciente. Ainda é citado a necessidade de um ajuste adequado da extensão e do diâmetro do nervo lesionado (PAULA et al., 2005), a diminuição da função do nervo doador (HUANG; HUANG, 2006), a maior dor ao paciente a formação de neuroma e de grandes cicatrizes não aceitáveis esteticamente em pacientes humanos (WANG et al., 2007).

Por estas razões, muitos estudos têm sido realizados no intuito de resolver as desvantagens do enxerto neural e, induzir a regeneração do nervo seccionado através da utilização de materiais biológicos e sintéticos biodegradáveis e não biodegradáveis como uma alternativa aos enxertos autógenos (PAULA et al., 2005; WANG et al., 2007).

3.7.4 Técnica de tubulização neural

A técnica de tubulização é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma prótese tubular, objetivando propiciar um ambiente favorável à regeneração (OLIVEIRA et al., 2004), servindo

ainda, como um guia para o crescimento das extremidades nervosas rompidas (WANG et al., 2007).

Diferentes materiais compõem estes tubos. Dentre os biológicos, estão o colágeno (MATTAR Jr; AZZE, 2008), o quitosano (PINEDO et al., 2001), a gelatina (WANG et al., 2008), veias, artérias, epineuro (IGNATIADIS et al., 2007), entre outros. Os materiais sintéticos mais utilizados como neurotubos são o silicone (CONTESINI et al., 1992; STOPIGLIA et al., 1998; BRAGA-SILVA et al., 2006; WANG et al., 2007; COLOMÉ et al., 2008), a celulose liofilizada (MELLO et al., 2001), o poliuretano (HUANG; HUANG, 2006; WANG et al., 2007), a poliglactina (HUANG; HUANG; 2006); o ácido poliglicólico (OLIVEIRA et al., 2004) e os adesivos de fibrina e cianocrilatos (SANDRINI et al., 2007).

Wang et al. (2007), citaram como principais desvantagens na utilização de materiais sintéticos não biodegradáveis o fato de permanecerem no sítio da lesão mesmo após a regeneração neural, podendo levar a uma possível reação de corpo estranho. Estes mesmos autores ainda citaram que é possível a ocorrência de uma compressão do nervo tardiamente, resultando em dor e comprometimento da função nervosa.

Já os materiais biodegradáveis também apresentam desvantagens, tais como a baixa biocompatibilidade, a liberação de produtos ácidos de degradação e a rápida perda das propriedades mecânicas durante a degradação (HUANG; HUANG, 2006).

Da mesma forma, também são estudados fatores de crescimento de nervo (*NGF – nerve growth factor*) e outras substâncias que favorecem o processo de regeneração nervosa, as quais, podem ser adicionadas isoladas ou concomitantemente às técnicas cirúrgicas. É o caso dos gangliosídeos e neuroquinas, os quais já vêm sendo utilizados com finalidade terapêutica em humanos (MATTAR Jr; AZZE; 2008).

Colomé et al (2008), utilizando um modelo experimental de defeito agudo neural de 12 coelhos Nova Zelândia, com secção bilateral do nervo tibial e posterior reparo mediante a utilização de câmara de silicone, observaram em todos os animais o tecido de regeneração internamente à prótese de silicone em um período de 30 dias de pós-operatório, formando uma “ponte” de interligação dos cotos nervosos seccionados.

Estes resultados, estão de acordo com os encontrados por Da-Silva et al. (2003) e Braga-Silva et al. (2006), os quais utilizaram o mesmo tipo de material para um modelo experimental em nervos ciáticos de ratos Wistar, sendo que todos os animais apresentaram tecido de interligação dos cotos neurais.

No que se refere a utilização de adesivos para o reparo de nervos lesionados, alguns autores relataram ser técnica vantajosa quando comparada ao emprego de sutura, uma vez que o adesivo de fibrina é um concentrado biológico constituído por componentes derivados do plasma, de aplicação tópica, cujo mecanismo de ação se assemelha à última fase da coagulação fisiológica (formação do fibrinogênio). O coágulo formado pelo adesivo é um componente fisiológico encontrado no reparo tecidual, diferenciando-o de outros tipos de colas como, por exemplo, os cianocrilatos. Assim, pequenas quantidades de cola de fibrina podem ser facilmente aplicadas e ao solidificarem-se, formam um coágulo plasmático (SANDRINI et al., 2007).

Mattar Jr; Azze (2008), relataram que ao colar um enxerto ao outro, várias fibras são unidas pelo adesivo, diminuindo a quantidade de pontos necessários para o afrontamento fascicular e, conseqüentemente, diminuindo a agressão da manipulação da sutura e reduzindo o tempo cirúrgico.

Sandrini et al. (2007), avaliaram a anastomose do nervo facial de coelhos com cola de fibrina e observaram aumento crescente na contagem de axônios dos animais avaliados aos 30 e aos 120 dias, o que leva a concluir que a cola de fibrina induz a anastomose dos cotos nervosos nesses animais.

Torres et al. (2003) compararam a utilização de três técnicas microcirúrgicas, a sutura epineural, a aplicação de cola de fibrina e a tubulação com BioFill® na reconstrução do nervo ciático de ratos, e concluíram que tanto a técnica de tubulação quanto a aplicação de cola de fibrina proporcionam bom alinhamento axonal devido à menor quantidade de material de sutura no tecido neural, levando a menor formação de neuromas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 28 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia albinos, hígidos, de ambos os sexos (17 fêmeas e 11 machos), com idade variando entre 3 e 5 meses, com massa corporal de $3,52 \text{ kg} \pm 0,64$, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Os animais passaram por um período de adaptação, de no mínimo cinco dias na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde receberam como alimentação, ração comercial peletizada específica para coelhos e água *ad libitum*, mantidos em gaiolas individuais sob temperatura controlada de $18,9^{\circ}\text{C}$ e umidade de ar média de $68,2\%$.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de igual número: Controle (GC) e Terapia (GT), sendo subdivididos de acordo com o tempo de avaliação em 50 e 75 dias (GC50 e GT50; GC75 e GT75). Assim, cada subgrupo foi composto por sete animais.

Este trabalho foi avaliado pela comissão de ética do HCPA, seguindo princípios e normas para a utilização de animais experimentais, sendo aceito sob o protocolo número 07672.

4.2 Coleta e processamento das células mononucleares autólogas de medula óssea

Para se realizar a separação das células mononucleares autólogas de medula óssea, optou-se pela sua extração a partir do tubérculo maior do úmero, em ambos os membros ou até obter-se um volume de no mínimo 5 ml.

A coleta foi realizada com o animal em decúbito lateral, sob anestesia geral. Como medicação pré-anestésica utilizou-se cloridrato de cetamina (20mg.kg^{-1}),

midazolam (2mg.kg^{-1}) e o cloridrato de petidina (5mg.kg^{-1}), todos administrados por via intramuscular. A indução e manutenção anestésica para a coleta do aspirado medular foi realizada por meio de máscara facial, com vaporização de isoflurano em oxigênio 100% a 2 litros/min.

Por meio da flexão da articulação escápulo-umeral, promoveu-se a exposição procedeu-se a punção percutânea com agulha hipodérmica 40x12, lavada com heparina, penetrando no interior do úmero através de movimentos rotacionais. Em seguida, introduziu-se um mandril de catéter número 20 no interior da agulha para sua desobstrução com posterior punção da medula. Este procedimento ocorreu após tricotomia e antissepsia de toda a região escápulo-umeral direita e esquerda.

As coletas foram realizadas previamente ao procedimento cirúrgico, de forma seriada, sendo que todas as amostras foram manipuladas individualmente.

O aspirado total de medula óssea obtido, foi processado com Ficoll-hypaque, que consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros, hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa afim de separar a fração mononuclear por gradiente. A mistura Ficoll-hypaque foi colocada no fundo de um tubo e o aspirado medular adicionado vagarosamente ao mesmo tubo após ser, prévia homogeneização e lavagem por duas vezes com meio de cultura D-MEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1800 rpm. Após a centrifugação, as fases tornaram-se bem visíveis, sendo a fase superior constituída de plasma e constituintes solúveis, na interfase as células mononucleares (*pellet*), em seguida o Ficoll e após os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo.

O *pellet* de células foi ressuspendido em 3 ml de meio D-MEM completo. Em um novo tubo falcon, adicionaram-se 3 ml de Ficoll-hypaque (proporção 1:1). A suspensão celular foi adicionada ao Ficoll-hypaque pela parede do tubo, evitando assim a mistura. As células foram centrifugadas por 20 minutos a 1.500 rpm a 18 graus Celsius. Após a centrifugação, as células mononucleares da interfase foram retiradas novamente, colocadas em um novo tubo falcon e centrifugadas por mais 5 minutos, a 2.000 rpm. O *pellet* celular foi ressuspendido em 1 ml de PBS. As células foram

quantificadas e sua viabilidade testada através do uso de uma substância chamada azul de trypan¹. Esta substância apresenta uma afinidade maior por proteínas do soro do que proteínas celulares, ou seja, as células não viáveis tornam-se coradas de azul. Um total de 1×10^6 células viáveis em um volume de 0,2 mL foram transplantadas à prótese de silicone fixada ao nervo femoral direito previamente transecionado. O tempo total de processamento celular das frações coletadas foi de aproximadamente 1 hora e 50 minutos.

4.3 Procedimento anestésico

Após o término do processamento das células, os animais foram novamente anestesiados para a realização do procedimento cirúrgico. Os pacientes foram pré-medicados com cloridrato de quetamina (20 mg.kg^{-1}), midazolam ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) e cloridrato de petidina (5 mg.kg^{-1}) por via intramuscular. Foi realizada tricotomia ampla de ambos os membros pélvicos e da região inguinal direita.

O acesso venoso foi realizado pela cateterização percutânea da veia marginal da orelha, e objetivou administração fluidoterápica de 5 ml/kg/h de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, com equipo microgotas.

Na sequência, instilou-se 0,1 ml de lidocaína sem vasoconstritor a 1% na região da glote e por meio de hiperextensão atlanto-occipital para facilitar a abertura da epiglote juntamente com a palpação da cartilagem laríngea, os animais foram intubados com sonda traqueal tipo Murphy número 2,5. Procedeu-se então, a vaporização de isoflurano em oxigênio 100% a 2 litros/min para indução e manutenção do plano anestésico a 2V% em sistema semi-aberto. Todos os animais receberam enrofloxacin (5mg.kg⁻¹), por via intravenosa (IV) no momento da indução anestésica.

Além disso, foram monitoradas a frequência cardíaca, a frequência respiratória, a oximetria, a capnografia e a temperatura corporal interna em todos os animais no trans-operatório, através de um monitor multiparamétrico².

¹ Trypan Blue, Acros Organic, Geel – Bélgica.

² Datex-Ohmeda s/ 5_TM – Finlândia.

³ Medicone – Cachoeirinha, RS.

4.4. Procedimento cirúrgico e transplante das células mononucleares autólogas de medula óssea

Com o animal posicionado em decúbito dorsal, realizou-se anti-sepsia da pele com álcool-povidine-álcool e promoveu-se uma incisão transversal direita iniciando-se em local correspondente ao ponto médio do ligamento inguinal direito e estendendo-se ao longo da borda medial do músculo sartório. Realizou-se a incisão da fáscia lata em forma de T abrangendo a margem falciforme da fossa oval paralela à borda medial do músculo sartório. Posteriormente, realizou-se a retração da fáscia lata expondo assim, a artéria e a veia femorais. Fez-se retração medial da artéria femoral e incisão vertical do folheto profundo da fáscia lata, expondo assim o nervo femoral e sua goteira entre os músculos íliaco e psoas. O nervo femoral foi localizado e liberado de seu leito (Figura 08 A) e em seguida, realizou-se secção completa do nervo com tesoura microcirúrgica, criando-se portanto, o defeito nervoso imediatamente antes da bifurcação nervosa em nervo safeno e femoral, sem remoção de qualquer segmento (Figura 08B e 08C).

Após, uma câmara siliconada³, cilíndrica, oca, medindo 1,5 mm e 2,42 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente, e 75 mm de comprimento foi fixada com fio monofilamentar de náilon 6-0, tranfixando-se o fio primeiramente na região lateral direita da porção proximal da câmara, em seguida tranfixando-se o epineuro e à região lateral esquerda do tubo de silicone, para assim finalizar a sutura proximal. O mesmo procedimento foi realizado no coto distal do mesmo nervo, deixando-se um espaço entre as extremidades nervosas de aproximadamente 5 mm (Figura 08D).

No espaço criado entre as extremidades nervosas, o GT, recebeu a fração mononuclear autóloga (1×10^6 células), obtida através do aspirado medular em um volume de 0,2 ml, injetado com seringa de 1 ml e agulha calibre 13x04 cuidadosamente no interior da abertura distal do tubo de silicone. O GC, recebeu 0,2 ml de solução de NaCl 0,9% (Figura 08E). Durante a sutura dos cotos nervosos, fez-se uso de microscópio cirúrgico⁴, com ampliação da imagem de 16 vezes (Figura 80F).

³ Medcone – Cachoeirinha, RS.

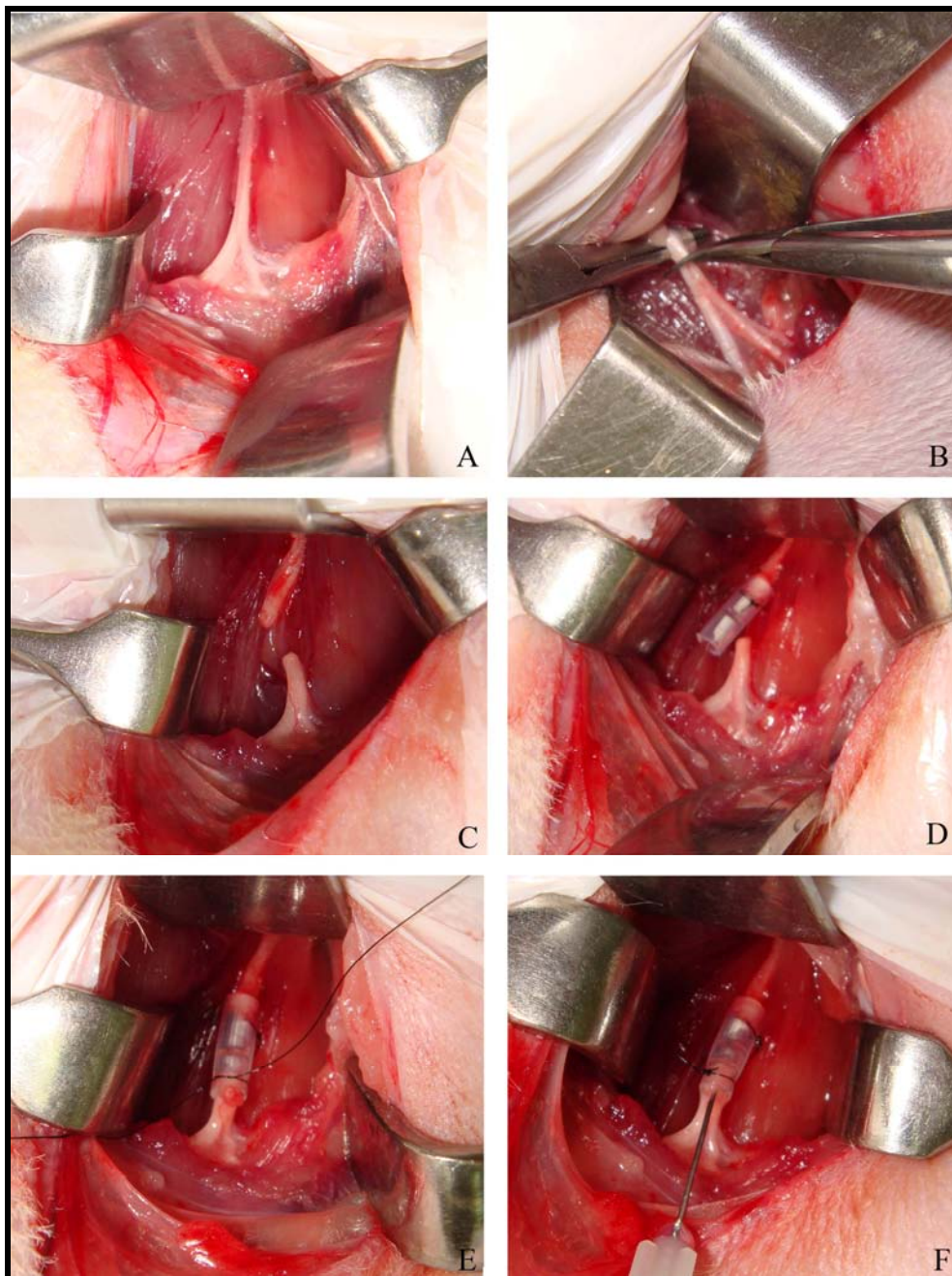


Figura 08- Sequência do procedimento cirúrgico em coelhos submetidos à secção completa do nervo femoral direito e adaptação de tubo de silicone para a união dos cotos. **(A)** Após incisão na região inguinal, o nervo femoral foi localizado e liberado de seu leito. **(B)** Secção do nervo femoral com tesoura microcirúrgica antes de emitir o nervo safeno. **(C)** Nervo femoral seccionado. **(D)** Neurorrafia femoral do coto proximal no tubo de silicone em padrão isolado simples. **(E)** Neurorrafia femoral de ambos os cotos nervosos deixando-os afastados em aproximadamente 5 mm. **(F)** Inoculação da fração mononuclear autóloga de medula óssea no interior da câmara.

4.5 Procedimentos pós-operatórios

Os animais receberam, ao final da cirurgia e nos dois dias subsequentes, cetoprofeno⁴ (1,0 mg.kg⁻¹ IM, SID), além de cloridrato de tramadol⁵ (2,5 mg.kg⁻¹ IM, SID), durante cinco dias. Foi utilizada, como antibioticoterapia sistêmica, a enrofloxacina⁶ na dose de 5mg.kg⁻¹ IM, SID, durante os primeiros cinco dias de pós-operatório.

Para a limpeza da ferida cirúrgica, foi utilizada a solução de NaCl a 0,9%, a cada 24 horas até a cicatrização.

4.6 Avaliação clínica

A partir da data do procedimento cirúrgico (dia zero), os animais foram avaliados a cada 10 dias, pelo teste de agulhamento da porção inervada pelo nervo femoral a fim de estabelecer (ainda que de forma subjetiva), um padrão de evolução do nível sensitivo para os animais de cada grupo e subgrupo de tratamento. Realizou-se ainda avaliação do reflexo patelar e da propriocepção consciente de ambos os membros pélvicos.

A espessura do membro pélvico direito e esquerdo de cada animal operado foi medida com fita métrica a fim de mensurar a presença de atrofia muscular.

Todas as avaliações clínicas foram realizadas ordenadamente, três vezes em cada avaliação, fazendo-se uma média das avaliações, a fim de reduzir a subjetividade do teste, sendo realizadas anteriormente ao procedimento cirúrgico e no pós-operatório com intervalos de 10 dias (Figura 09). Assim, os animais do grupo 75 dias, foram avaliados em 7 momentos e os animais do grupo 50 dias, foram avaliados em 3 momentos.

⁴ Ketofen, Rhodia, Mérieux, Paulínia – SP.

⁵ Tramadol, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

⁶ Flotril, Indústria Química e Farmacêutica Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro - RJ



Figura 09 – Avaliação da espessura de ambos os membros pélvicos do coelho por meio de fita métrica.

4.6.1 Avaliação da marcha

A marcha de cada animal foi avaliada a partir dos dados referidos pelo examinador em um relatório. A marcha anterior e posterior ao procedimento cirúrgico foi observada em cada animal, sendo a primeira avaliação pós-operatória verificada no 10º dia e as avaliações subsequentes verificadas com intervalo de 10 dias. Foram considerados como referência os parâmetros estabelecidos para claudicação em cães por Anderson et al. (2003), adaptando-se para coelhos, graduando-os em graus de zero a cinco (Tabela 2).

Durante este exame, os animais eram soltos no mesmo ambiente em que estavam adaptados, onde em uma parte encontrava-se tapete de borracha com 8 metros de comprimento e a outra parte piso. Os coelhos foram filmados com câmera digital⁷, para

⁷ Sony Cyber Shot® modelo DSC-T70 8.1 megapixels – Tokyo, Japão

posterior reavaliação, caso houvesse necessidade. Além disso, na última avaliação da marcha, tingiu-se a região plantar dos membros pélvicos com tinta têmpera atóxica, sendo este teste realizado sobre papel pardo e piso, no intuito de registrar a impregnação da tinta no papel de acordo com o apoio de peso em cada membro. Essa avaliação foi realizada sempre pelos mesmos avaliadores.

Tabela 2 – Escores de avaliação da claudicação de cães descrita por ANDERSON et al. (2003) e adaptada para coelhos.

<i>Grau de claudicação</i>
Grau 0: Normal
Grau I: Suporte do peso com sutil claudicação intermitente
Grau II: Suporte do peso com consistente claudicação
Grau III: Suporte do peso com claudicação marcante
Grau IV: Não suporta o peso intermitentemente
Grau V: Não suporta o peso consistentemente

4.7 Avaliação eletrofisiológica do nervo femoral

O estudo da condutividade nervosa foi realizado com os animais sob sedação dissociativa a base de cetamina (20mg.kg^{-1}) e midazolam ($0,5\text{ mg.kg}^{-1}$), ambos por via IM. Na sequência, realizou-se o mesmo protocolo anestésico anteriormente citado para o procedimento cirúrgico.

A velocidade de condução nervosa foi avaliada em ambos os membros de 16 coelhos, comparando individualmente o membro operado com o membro contralateral normal. Sete animais do GC e 9 animais do GT foram submetidos a este exame. Os estudos da condução nervosa foram realizados por neurofisiologistas treinados, sem acesso aos dados dos pacientes. A partir do dia zero, os animais foram submetidos a este exame de acordo com as datas das eutanásias, ou seja, aos 50 e 75 dias de pós-operatório.

Com o paciente em decúbito dorsal, o nervo femoral foi estimulado eletricamente por meio da inserção de agulhas intradérmicas na parte medial da espinha ilíaca, lateral à artéria femoral, a qual foi localizada mediante palpação digital (Figura 10).

A intensidade média da corrente elétrica foi de $10 \pm 5,2$ mA. O potencial de ação motor ortodrômico (CMAP) foi gravado utilizando-se eletrodos superficiais de 2 cm, orientados longitudinalmente ao longo do músculo vasto medial, na face medial da coxa (eletrodo ativo), e patela (eletrodo referência). Os estímulos tiveram 0,2 ms de duração, chegando a 1 Hz a partir de uma voltagem constante da fonte de tensão.

Os CMAPs foram registrados por meio de pares de eletrodos com disco de 9 mm de superfície condutora, aplicando-se gel entre o disco e a pele do animal. As respostas foram gravadas em intervalos de tempo de 10 segundos, com um ganho de 0,2 a 1,0 mV e uma frequência de 0,1 Hz a 0,5 kHz. A latência motora, a amplitude, a distância entre os eletrodos e a atividade espontânea muscular foram avaliadas bilateralmente.

4.8 Eutanásia

Ao término dos períodos de avaliação (50 e 75 dias), todos os animais foram eutanasiados. Os pacientes foram primeiramente sedados com cloridrato de cetamina (20 mg.kg^{-1}) associada ao midazolam ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), ambos por via IM, e em seguida, administrou-se sobredose de tiopental sódico⁸, IV, até a parada cardiorrespiratória, seguindo as normas estipuladas para eutanásias em animais pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

⁸ Tiopental Sódico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

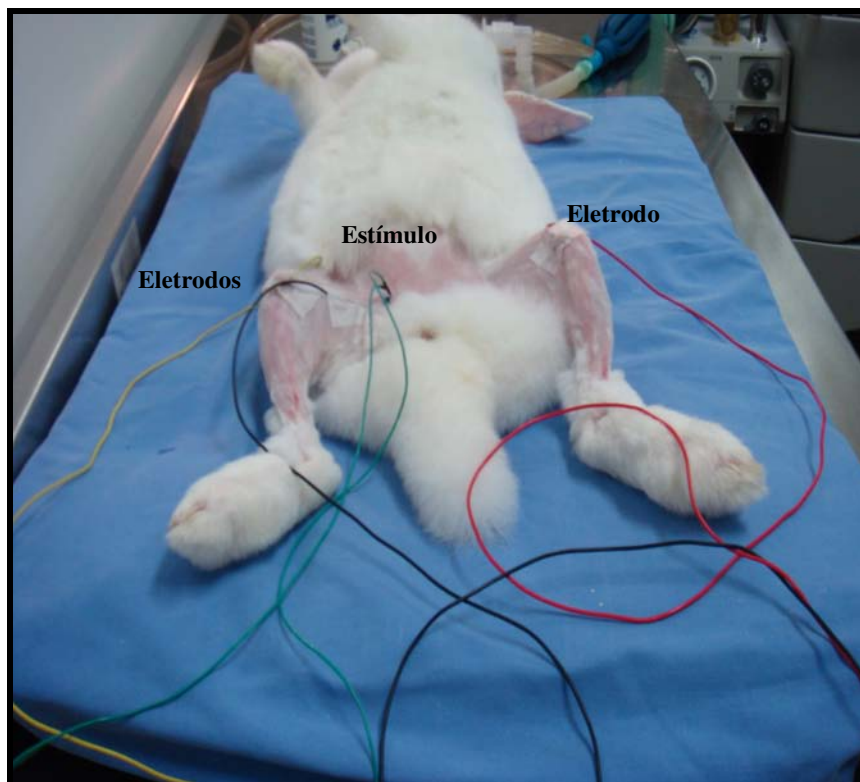


Figura 10 – Posicionamento dos pacientes e eletrodos para a aplicação da estimulação elétrica do nervo femoral direito (operado), através da inserção de agulhas intradérmicas lateralmente à artéria femoral para avaliação eletrofisiológica do nervo.

4.9 Avaliação macroscópica

Após a eutanásia, o sítio de tubulização do nervo femoral operado foi avaliado diretamente quanto à reparação do nervo pela existência de ponte nervosa entre os cotos, pela manutenção envolvendo o tecido nervoso e o tubo nos segmentos neurais proximais e distais, além da ocorrência ou não dos sinais de infecção. Após a remoção do segmento nervoso, este foi imerso em solução de formalina tamponada a 10% (17 amostras) ou gluraldeído 25% (10 amostras) para ser submetida à avaliação histológica, de acordo com a técnica a ser utilizada.

4.10 Avaliação microscópica

As 17 amostras fixadas em formalina tamponada 10% foram incluídas em blocos de parafina e clivadas em 3 μm de espessura. Posteriormente, para a avaliação microscópica foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE).

A captação das imagens foi realizada em microscópio⁹ com câmera fotográfica digital acoplada¹⁰ e programa de captura de imagens Leica IM50.

Na avaliação das amostras coradas com HE levou-se em consideração principalmente a presença de células inflamatórias (eosinófilos), de câmaras de digestão (degeneração Walleriana), grânulos de hemossiderina e de granulomas ou células gigantes nas diferentes porções nervosas, ou seja, no sítio de regeneração e nas porções cranial e caudal a ele.

Para se atribuir pontuações através das variáveis observadas, as lâminas histológicas foram avaliadas de forma seriada, sempre pelo mesmo patologista o qual desconhecia o grupo a que pertencia o animal. A metodologia de avaliação contemplou diferentes formas de observação para as variáveis estudadas, segundo utilizado por Colomé et al. (2008), conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Metodologia de avaliação das alterações encontradas nas lâminas histológicas coradas com HE, seguindo-se a classificação de COLOMÉ et al. (2008).

Variáveis	Escore
	Presença 1
Granuloma	Ausência 0
Eosinófilos	Número absoluto; contagem de eosinófilos pelo escaneamento da lâmina histológica.
Hemossiderina	Número absoluto; contagem dos focos de hemossiderina pelo escaneamento da lâmina histológica.
Degeneração Walleriana	Estimativa em percentagem (%) do processo de degeneração walleriana pela contagem de câmaras de digestão por meio do escaneamento da lâmina histológica

⁹Leica DMR® – Nova York, EUA.

¹⁰Leica® DFC 500 - Nova York, EUA.

4.11 Análise estatística

Após tabulação dos dados, realizou-se a análise estatística (SPSS versão 14.0 para Windows), aplicando-se a análise da variância (ANOVA) para medidas repetidas em relação as variáveis: grau de claudicação, propriocepção consciente, reflexo patelar, sensibilidade local e circunferência da coxa. Para as variáveis de amplitude e latência, aplicou-se o teste Mann-Whitney. Considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para ambos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 Animais

A utilização de coelhos albinos da raça Nova Zelândia, selecionados para a realização deste trabalho, mostrou-se adequada para a avaliação de regeneração do nervo femoral, além de serem modelos animais de fácil manipulação e baixo custo de manutenção.

5.2 Procedimento Anestésico

O protocolo anestésico empregado nos coelhos na coleta do aspirado medular, no procedimento cirúrgico e na avaliação eletrofisiológica mostrou-se adequado em todos os animais em todas as fases do experimento, uma vez que não ocorreram óbitos, tampouco intercorrências em decorrência da administração dos fármacos utilizados. Além disso, todos os animais apresentaram excelente recuperação anestésica.

A média dos valores da frequência cardíaca (FC), da frequência respiratória (FR), da oximetria e da capnografia, avaliados durante a anestesia, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Média e Desvio Padrão das variáveis monitoradas no trans-operatório de coelhos submetidos a secção do nervo femoral direito com imediata neurorrafia através de prótese de silicone.

	FC (batim./min*)	FR (movim./min*)	Oximetria (%)*	Capnografia (mm/Hg)*
Média	228	38	99	41
Desvio Padrão	22,1	9,4	1,21	8,8

*batim./min. = Batimentos cardíacos por minutos.

*movim./min. = Movimentos respiratórios por minuto.

*(%) = Por cento

*(mm/Hg) = milímetros de mercúrio

5.3 Coleta do aspirado medular

Foi possível em todos os casos coletar o aspirado medular do úmero com o uso de agulhas hipodérmicas 40x12 acopladas à seringa de 10 ml, heparinizadas e submetidas a desobstrução de sua extremidade com um mandril de catéter número 20G.

5.4 Processamento do aspirado medular

Após o processo de separação e contagem das células mononucleares presentes na medula óssea, obteve-se a quantidade de 1×10^6 células totais para serem administradas no mesmo paciente. Em quatro animais não foi possível a separação deste número de células. Assim, tais animais não receberam a fração mononuclear e foram transferidos para o GC.

5.5 Procedimento cirúrgico no nervo femoral

O nervo femoral utilizado no modelo experimental mostrou-se adequado para as avaliações pós-operatórias, sendo que todos os animais apresentaram claudicação no pós-operatório imediato. Assim, foi possível a observação de sua evolução clínica da lesão neurológica no decorrer dos tempos estipulados. Porém, houve dificuldade para acessar cirurgicamente o nervo femoral em oito animais. Ainda assim, os procedimentos cirúrgicos foram relativamente rápidos com duração média de $36,28 \pm 13,95$ minutos para o GC e $34,71 \pm 14,63$ para o GT (tabela 5). Em um animal do GC, houve a secção iatrogênica da artéria femoral e apesar de estabilizado o sangramento, este foi retirado do experimento aos 40 dias de pós-operatório por apresentar escoriações cutâneas intermitentes na face médio-distal do membro operado, durante o período de avaliação.

Tabela 5 – Média e Desvio Padrão da duração do procedimento cirúrgico de secção do nervo femoral direito de coelhos com imediata neurografia através de prótese de silicone.

<i>Grupo controle</i>	<i>Tempo (min.)</i>	<i>Grupo Terapia</i>	<i>Tempo (min.)</i>
1C	70	20T	34
2C	42	21T	75
3C	37	22T	40
4C	48	23T	48
5C	30	24T	25
6C	30	25T	21
7C	23	26T	23
8C	40	27T	30
10C	18	30T	25
11C	28	31T	19
12C	25	32T	29
13C	55	33T	40
14C	34	34T	32
15C	28	35T	45
Média	36,28 ± 13,95		34,71 ±14,63

5.6 Avaliação Clínica

As avaliações clínicas foram realizadas bilateralmente, pelos mesmos avaliadores, no mesmo local e na seguinte sequência: propriocepção consciente; reflexo patelar; sensibilidade da face medial da coxa, na região do quadríceps por agulhamento e pinçamento; mensuração da circunferência da coxa, e grau de claudicação.

Nos testes estatísticos de ANOVA não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos GT75 e GC75, GT50 e GC50, nas avaliações que envolveram a propriocepção consciente, o reflexo patelar, a sensibilidade local por agulhamento e pinçamento e a circunferência da coxa.

5.6.1 Avaliação da marcha

Houve diferença estatística com relação ao grau de claudicação dos animais do GT com relação ao GC, independente de seus tempos de avaliação, segundo teste ANOVA, na primeira ($p= 1,15$), segunda ($p= 1,17$) e terceira ($p= 1,28$) avaliações (tabelas 6 e 7), conforme demonstram os gráficos (Figura 12 e 13). Os animais do GT apresentaram menores graus de claudicação nas três primeiras avaliações pós-operatórias (Figura 11).

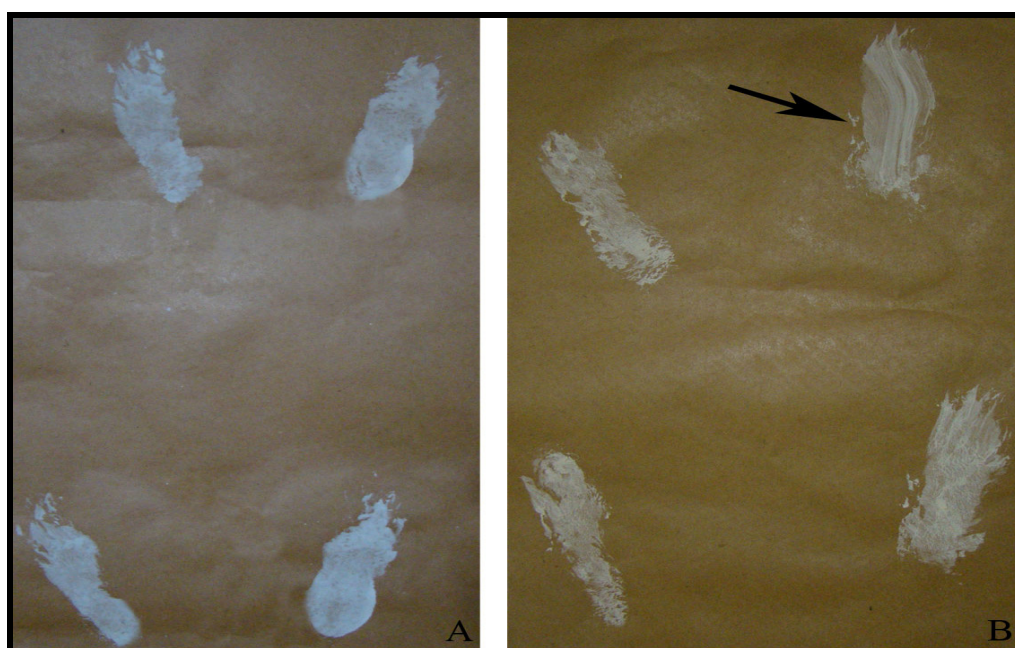


Figura 11 – Avaliação da marcha de coelhos, submetidos a neurotomia e imediata neurorrafia com prótese de silicone, através do tingimento da região plantar dos membros pélvicos. **(A)** Animal do GT com grau 0 de claudicação na segunda semana de pós-operatório. **(B)** Animal do GC com grau IV de claudicação na segunda semana de pós-operatório. Constata-se o apoio desproporcional do membro pélvico direito operado (seta preta) com relação ao membro contralateral.

Tabela 06 – Avaliação em três momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) da propriocepção consciente direita dos coelhos controle e terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neorrafia por meio de prótese de silicone.

<i>Animal</i>	<i>Proprioc1*</i>	<i>Proprioc2*</i>	<i>Proprioc3*</i>	<i>Proprioc4*</i>	<i>Proprioc5*</i>	<i>Proprioc6*</i>	<i>Proprioc7*</i>
1C	0	1	1	1	1	1	1
2C	0	0	0	0	0	0	1
4C	0	0	0	0	0	0	1
5C	0	0	0	0	0	0	1
6C	0	0	1	1	1	1	1
7C	0	1	1	1	1	1	1
8C	0	0	0	0	0	1	1
20T	1	1	1	1	1	1	1
21T	0	0	0	0	0	0	0
22T	0	1	1	1	1	1	1
23T	0	1	1	1	1	1	1
24T	1	1	1	1	1	1	1
25T	0	0	1	1	1	1	1
26T	1	1	1	1	1	1	1
10C	0	0	1	-	-	-	-
11C	0	1	1	-	-	-	-
12C	1	1	1	-	-	-	-
13C	1	1	1	-	-	-	-
14C	0	0	0	-	-	-	-
15C	0	1	1	-	-	-	-
16C	1	1	1	-	-	-	-
27T	1	1	1	-	-	-	-
30T	1	1	1	-	-	-	-
31T	0	1	1	-	-	-	-
32T	0	0	1	-	-	-	-
33T	1	1	1	-	-	-	-
34T	1	1	1	-	-	-	-
35T	1	1	1	-	-	-	-

- Propriocepção consciente no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º e 7º momentos.
- 1 - Presença da propriocepção.
- 0 - Ausência da propriocepção.

Tabela 07 – Avaliação em três momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) do reflexo patelar direito dos coelhos controle e terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurraxia por meio de prótese de silicone.

<i>Animal</i>	<i>Reflexo Patelar 1</i>	<i>Reflexo Patelar 2</i>	<i>Reflexo Patelar 3</i>	<i>Reflexo Patelar 4</i>	<i>Reflexo Patelar 5</i>	<i>Reflexo Patelar 6</i>	<i>Reflexo Patelar 7</i>
1C	0	0	0	0	0	0	0
2C	0	0	0	0	0	0	0
4C	0	0	0	0	0	0	0
5C	0	0	0	0	0	0	0
6C	0	0	0	0	0	0	1
7C	0	0	0	0	0	0	0
8C	0	0	0	0	0	0	0
20T	1	1	1	1	1	1	1
21T	0	0	0	0	0	0	0
22T	0	1	1	1	1	1	1
23T	0	0	0	0	0	0	0
24T	0	0	0	0	0	0	0
25T	0	0	0	0	0	0	0
26T	0	0	0	0	0	0	0
10C	0	0	0	-	-	-	-
11C	0	0	0	-	-	-	-
12C	0	0	0	-	-	-	-
13C	0	0	0	-	-	-	-
14C	0	0	0	-	-	-	-
15C	0	0	0	-	-	-	-
16C	0	0	0	-	-	-	-
27T	0	0	0	-	-	-	-
30T	0	0	0	-	-	-	-
31T	0	0	0	-	-	-	-
32T	0	1	1	-	-	-	-
33T	0	0	0	-	-	-	-
34T	0	0	1	-	-	-	-
35T	0	0	0	-	-	-	-

- 1 – Presença do Reflexo Patelar direito
- 0 – Ausência do Reflexo Patelar direito

Tabela 08 – Avaliação em três momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) da sensibilidade da região do quadríceps direito dos coelhos controle e terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurorrafia por meio de prótese de silicone.

<i>Animal</i>	<i>Sensibil.* Agulha 1</i>	<i>Sensibil.* Agulha 2</i>	<i>Sensibil.* Agulha 3</i>	<i>Sensibil.* Agulha 4</i>	<i>Sensibil.* Agulha 5</i>	<i>Sensibil.* Agulha 6</i>	<i>Sensibil.* Agulha 7</i>
1C*	0	0	0	0	0	0	0
2C	1	1	1	1	1	0	1
4C	0	0	0	0	0	0	0
5C	0	1	1	1	1	0	1
6C	0	0	0	0	1	1	1
7C	1	1	1	1	1	1	1
8C	1	1	1	1	1	1	1
20T*	1	1	1	1	1	1	1
21T	0	1	1	1	1	1	1
22T	0	0	0	1	1	1	1
23T	1	1	1	1	1	1	1
24T	0	0	1	1	1	1	1
25T	0	0	0	1	1	1	1
26T	0	1	1	1	1	1	1
10C	0	1	1	-	-	-	-
11C	0	0	0	-	-	-	-
12C	0	0	1	-	-	-	-
13C	0	0	1	-	-	-	-
14C	0	0	1	-	-	-	-
15C	0	0	0	-	-	-	-
16C	1	1	1	-	-	-	-
27T	1	1	1	-	-	-	-
30T	1	1	1	-	-	-	-
31T	0	0	0	-	-	-	-
32T	1	1	1	-	-	-	-
33T	1	1	1	-	-	-	-
34T	0	0	1	-	-	-	-
35T	1	1	1	-	-	-	-

- Sensibilidade local por Agulhamento
- 1 – Presença de sensibilidade local.
- 0 – Ausência de sensibilidade local.
- C - Controle
- T - Terapia

Tabela 09 – Média e respectivos desvio padrão da avaliação em quatro momentos (Grupo 50 dias) e em sete momentos (Grupo 75 dias) da circunferência da coxa dos coelhos controle, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurrrafia por meio de prótese de silicone.

<i>Animal</i>	<i>Circunf.1*</i> (cm)	<i>Circunf.2</i> (cm)	<i>Circunf.3</i> (cm)	<i>Circunf.4</i> (cm)	<i>Circunf.5</i> (cm)	<i>Circunf.6</i> (cm)	<i>Circunf.7</i> (cm)
1C	14,5	16	16	21	18	19	19
2C	14,5	17	18	19	18	19	20
4C	16	17	18	17,5	16	16	16
5C	15,5	16	15	18	18	18	18
6C	17	18	17	17	17	18	18
7C	18	18	17	17	17	17	17
8C	15	17	15	15	20	20	20
10C	17	16	17	17	-	-	-
11C	15,5	17	16	16	-	-	-
12C	20	22	22	18	-	-	-
13C	17	20	20	19	-	-	-
14C	17	17	17	16	-	-	-
15C	16	16	17	18	-	-	-
16C	17	17	17	17	-	-	-
<i>Média e</i> <i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	16,42 ±1,48	17,43 ±1,69	17,28 ±1,85	17,53 ±1,49	17,71±1,25	18,14 ±1,34	18,28 ±1,49

* Circunferência da coxa avaliada no pré-operatório.

Tabela 10 – Média e respectivo desvio padrão da avaliação de quatro momentos (Grupo 50 dias) e de sete momentos (Grupo 75 dias) da circunferência da coxa dos coelhos do grupo terapia, submetidos a neurotomia do nervo femoral direito com imediata neurrrafia por meio de prótese de silicone.

<i>Animal</i>	<i>Circunf.1*</i> (cm)	<i>Circunf.2</i> (cm)	<i>Circunf.3</i> (cm)	<i>Circunf.4</i> (cm)	<i>Circunf.5</i> (cm)	<i>Circunf.6</i> (cm)	<i>Circunf.7</i> (cm)
20T	17	16	20	20	20	20	20
21T	18	20	20	20	20	20	20
22T	15	18	18	16	16	16	16
23T	17	20	20	20	20	20	20
24T	18	20	19,5	19	20	20	20
25T	20	20	20	18,5	18	18	18
26T	18	20	17	18	18	18	18
27T	20	20	20	18	-	-	-
30T	18	20	20	18	-	-	-
31T	18	18	18	16	-	-	-
32T	20	20,5	21	20	-	-	-
33T	20	20	20	18	-	-	-
34T	18	21	20	19	-	-	-
35T	19	19	20	20,5	-	-	-
<i>Média e</i> <i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	18,28 ±1,44	19,46 ± 1,30	19,53 ±1,08	18,64 ±1,43	18,85 ±1,57	18,85 ±1,57	18,85 ±1,57

* Circunferência da coxa avaliada no pré-operatório.

Tabela 11 – Escores da marcha dos coelhos submetidos a neurotomia do nervo femoral com imediata neurraxia através de prótese de silicone, avaliados em sete e três momentos com intervalos de 10 dias, e pertencentes ao Grupo Controle.

<i>Animal</i>	<i>Marcha 1</i>	<i>Marcha 2</i>	<i>Marcha 3</i>	<i>Marcha 4</i>	<i>Marcha 5</i>	<i>Marcha 6</i>	<i>Marcha 7</i>
1C	3	1	1	1	1	0	0
2C	3	1	1	1	1	1	0
4C	2	1	1	0	0	0	0
5C	4	4	3	2	2	2	2
6C	4	4	3	3	3	2	2
7C	3	2	1	1	1	1	1
8C	3	3	3	3	3	2	2
10C	4	3	3	-	-	-	-
11C	1	1	3	-	-	-	-
12C	2	2	1	-	-	-	-
13C	1	1	1	-	-	-	-
14C	3	4	4	-	-	-	-
15C	3	2	0	-	-	-	-
16C	3	1	1	-	-	-	-
<i>Médias e Desvio Padrão</i>	2,78 ±0,97	2,14 ±1,23	1,86 ±1,23	1,57 ±1,13	1,57 ±1,13	1,14 ±0,89	1 ±1

Tabela 12 – Escores da marcha dos coelhos submetidos a neurotomia do nervo femoral com imediata neurraxia através de prótese de silicone, avaliados em sete e três momentos com intervalos de 10 dias, e pertencentes ao Grupo Terapia.

<i>Animal</i>	<i>Marcha 1</i>	<i>Marcha 2</i>	<i>Marcha 3</i>	<i>Marcha 4</i>	<i>Marcha 5</i>	<i>Marcha 6</i>	<i>Marcha 7</i>
20T	1	1	1	0	0	0	0
21T	5	5	4	3	3	3	3
22T	4	1	1	1	1	1	1
23T	1	1	0	0	0	0	0
24T	1	1	0	0	0	0	0
25T	2	1	0	0	0	0	0
26T	1	1	1	0	0	0	0
27T	2	2	1	-	-	-	-
30T	0	0	1	-	-	-	-
31T	2	2	3	-	-	-	-
32T	4	4	4	-	-	-	-
33T	2	3	0	-	-	-	-
34T	1	1	1	-	-	-	-
35T	1	1	0	-	-	-	-
<i>Médias e Desvio Padrão</i>	1,92 ±1,44	1,71 ±1,38	1,21 ±1,42	0,57±1,33	0,57 ±1,33	0,57±1,33	0,57 ±1,33

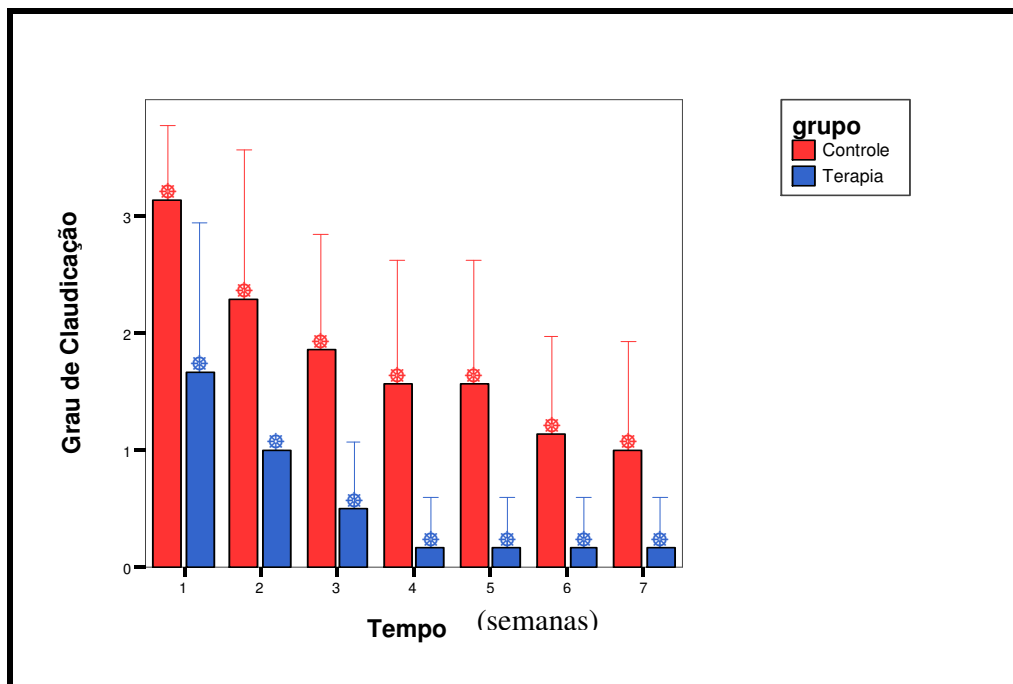


Figura 12 – Demonstração gráfica do grau de claudicação dos animais pertencentes ao grupo terapia e ao grupo controle eutanasiados aos 75 dias.

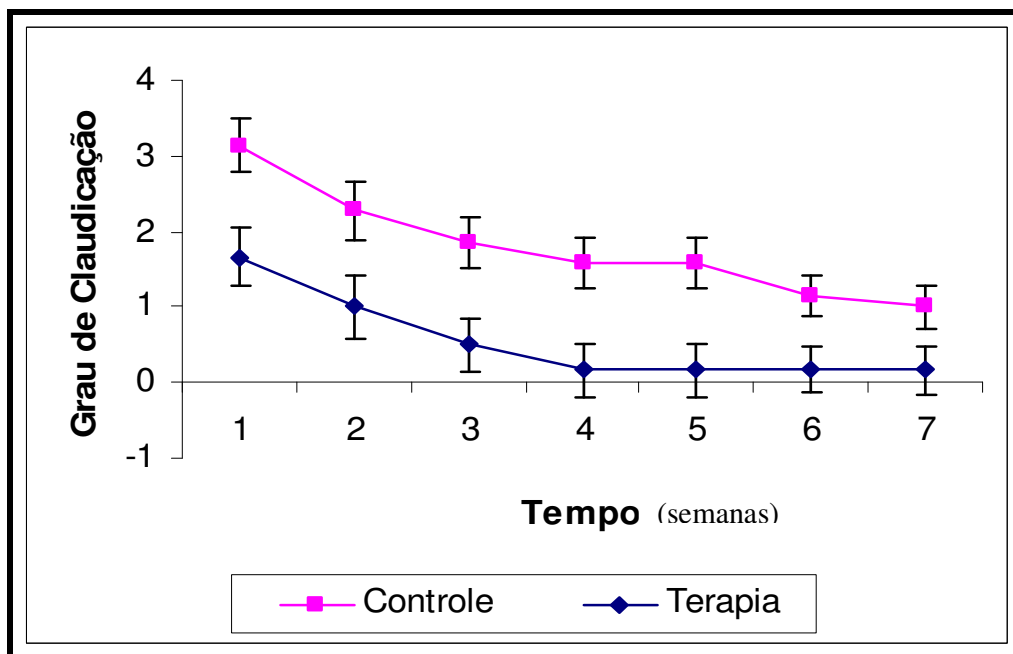


Figura 13 – Médias dos escores das claudicações dos animais deste experimento, avaliados a cada 10 dias.

5.7 Avaliação Eletrofisiológica

A técnica utilizada para a avaliação eletrofisiológica, no presente trabalho, mostrou-se eficaz em todos os pacientes submetidos a este exame. Destes, seis animais pertenciam ao GT75 e quatro animais pertenciam ao GC75, dois do GT50 e três do GC50, totalizando 16 animais avaliados.

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos GT e GC avaliados pelo teste Mann-Whitney (Figura 14).

As médias das amplitudes e latências, do membro saudável e o operado, tanto do GT quanto do GC encontram-se nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo femoral saudável em comparação com o nervo femoral operado dos animais do Grupo Controle 50 dias de pós-operatório.

	Latência (ms)	Amplitude (mV)
Nervo sadio do Grupo Terapia	1,34 ± 0,13	10,96 ± 1,75
Nervo operado do Grupo Terapia	1,52 ± 0,19	6,33 ± 5,60

n = 3 *p* < 0,05

Tabela 14 – Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo femoral saudável em comparação com o nervo femoral operado dos animais do Grupo Terapia 50 dias de pós-operatório.

	Latência (ms)	Amplitude (mV)
Nervo sadio do Grupo Controle	1,55 ± 0,43	11,75 ± 2,33
Nervo operado do Grupo Controle	1,48 ± 0,19	2,58 ± 2,34

n = 2 *p* < 0,05

Tabela 15 – Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo femoral saudável em comparação com o nervo femoral operado dos animais do Grupo Controle 75 dias de pós-operatório

	Latência (ms)	Amplitude (mV)
Nervo sadio do Grupo Controle	1,39 ± 0,14	9,56 ± 4,82
Nervo operado do Grupo Controle	1,90 ± 0,53	1,97 ± 1,36

n = 4 *p* < 0,05

Tabela 16 – Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrões, de latência e amplitude do nervo femoral saudável em comparação com o nervo femoral operado dos animais do Grupo Terapia 75 dias de pós-operatório

	Latência (ms)	Amplitude (mV)
Nervo sadio do Grupo Terapia	1,41 ± 0,53	10,39 ± 3,39
Nervo operado do Grupo Terapia	2,80 ± 1,82	3,85 ± 3,01

n = 7 *p* < 0,05

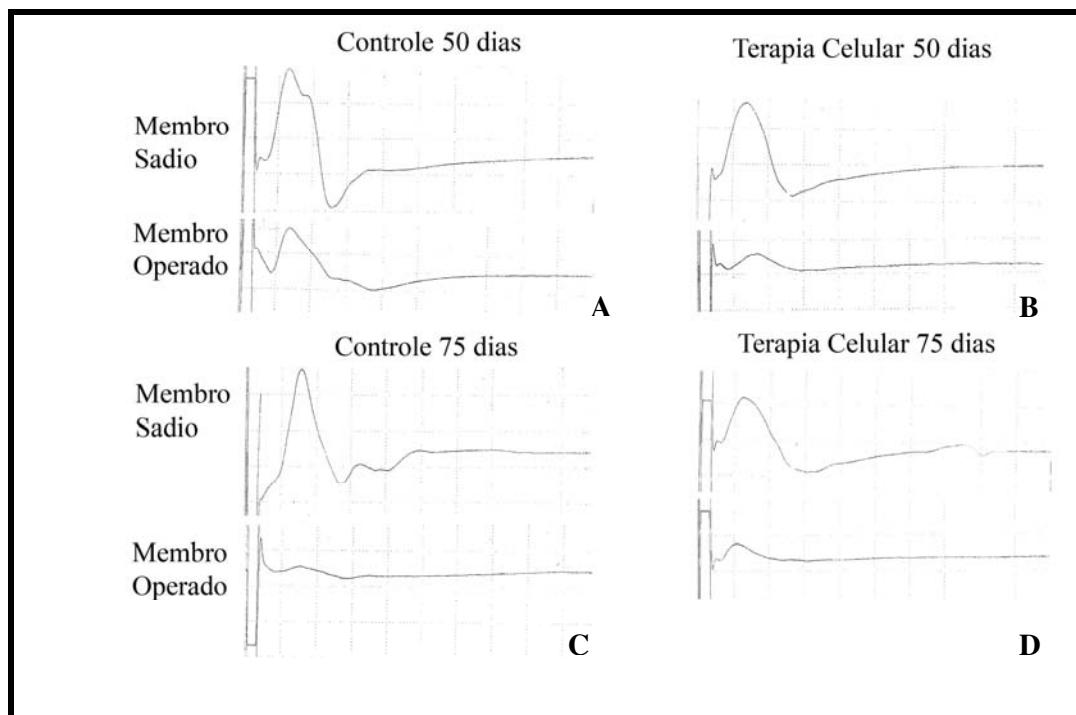


Figura 14 –Análise gráfica da eletrofisiologia de ambos os membros pélvicos dos coelhos controle e terapia submetidos a neurotomia com imediata neurraxia do nervo femoral direito, através de prótese de silicone e avaliados aos 50 e 75 dias de pós-operatório.(A) Membro sadio com amplitude de 12,3mV e latência de 1,32ms. Membro operado com amplitude de 2,92mV e latência de 1,52ms. (B) Membro sadio com amplitude de 10,1mV e latência de 1,24ms. Membro operado com amplitude de 0,92mV e latência de 1,62ms. (C) Membro sadio com amplitude de 5,5mV e latência de 1,28ms. Membro operado com amplitude de 0,83mV e latência de 1,88ms. (D) Membro sadio com amplitude de 6,2 mV e latência de 1,22ms. Membro operado com amplitude de 2,24mV e latência de 1,36ms.

5.8 Avaliação macroscópica

Após a eutanásia, fez-se a avaliação direta do sítio de tubulização do nervo femoral operado. Constatou-se a viabilidade da técnica cirúrgica, uma vez que todos os animais, de ambos os grupos e nos diferentes tempos de avaliação, apresentaram ponte nervosa entre os cotos seccionados. Não foram constatadas deiscências da sutura de fixação da prótese de silicone ao nervo, tampouco a presença de infecção nos animais (Figura 15).

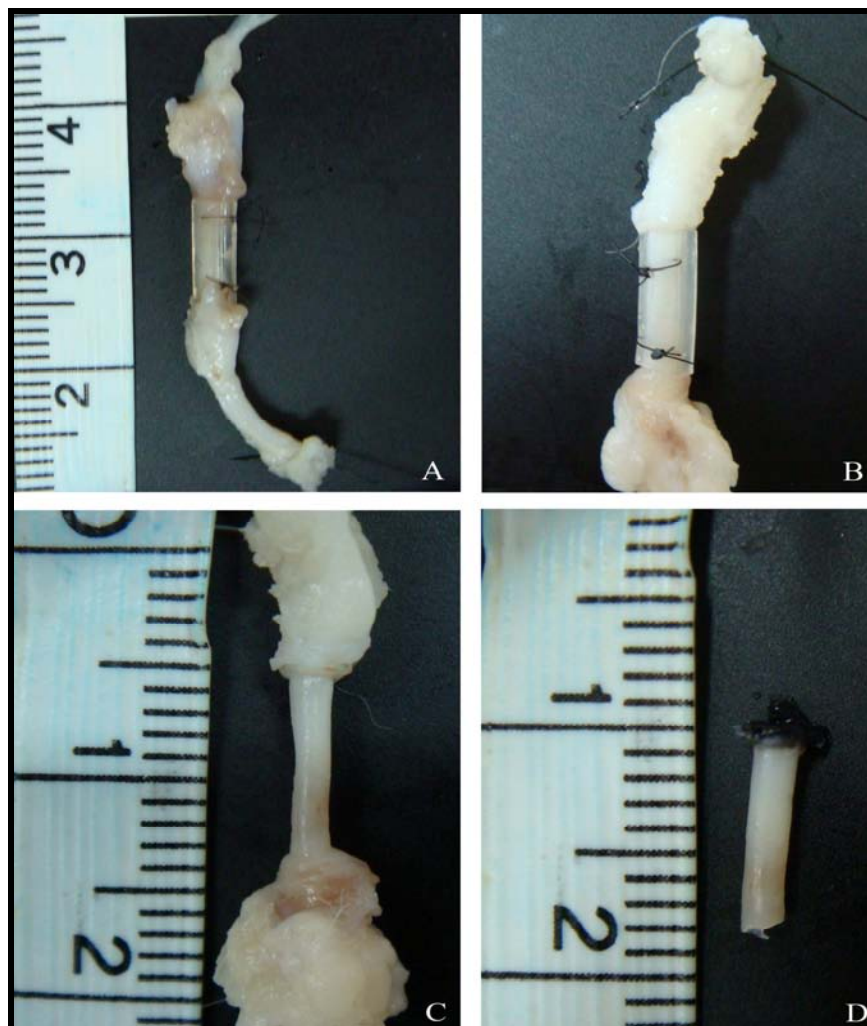


Figura 15 – Avaliação macroscópica do sítio da tubulização do nervo femoral direito de coelhos após aposição das extremidades seccionadas com um tubo de silicone. Observação da formação de ponte entre os cotos nervosos seccionados e aposicionados por meio da técnica de tubulização. (A) Nervo femoral tubulizado e coletado aos 50 dias. (B) Nervo femoral tubulizado e coletado aos 75 dias. (C) Aspecto da regeneração do nervo femoral após remoção da prótese de silicone. Nervo coletado aos 75 dias pós-operatória. (D) Sítio da tubulização do nervo femoral. A região proximal foi tingida com tinta preta para sua identificação no momento da leitura das lâminas.

5.9 Avaliação microscópica

Dos 27 nervos coletados para a avaliação microscópica, 17 deles foram fixados em formol e 10 foram fixados em glutaraldeído para posterior processamento de diferentes técnicas: hematoxilina-eosina (HE) e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente.

Os resultados das análises de microscopia eletrônica serão apresentados com a continuidade deste estudo.

Dos 17 segmentos processados e corados pela técnica de HE, cinco pertenciam ao GC50 e quatro ao GT50; quatro ao GC75 e quatro ao GT75.

Todas as amostras, de uma forma geral, apresentaram excelente organização das fibras nervosas, com pouca ou nenhuma degeneração Walleriana na porção distal do segmento regenerado (Figura 16A), com pouca ou sem reação inflamatória (Figura 16B e 16C) e/ou deposição de hemossiderina (Figura 16D), apresentando rara presença de granuloma.

Em média, o grupo 50 dias, apresentou mais degeneração Walleriana quando comparado ao grupo 75 dias; porém, sem significância estatística entre controle e terapia, tampouco entre os diferentes períodos de avaliação (50 e 75 dias). Dois animais do GT50 e um do GC50 apresentaram hemorragia recente nas análises das secções dos tecidos, observadas através da presença dos grânulos de hemossiderina.

As tabelas 17 e 18 apresentam os resultados das variáveis degeneração Walleriana, presença de granuloma, hemossiderina e de eosinófilos de cada paciente avaliado.

Tabela 17 – Avaliação das diferentes variáveis (degeneração Walleriana, e presença de granuloma, hemossiderina e de eosinófilos), observados nos animais submetidos a neurotomia com imediata neurorrafia do nervo femoral direito eutanasiados aos 50 dias de pós-operatório.

Animais	Degeneração Walleriana	Granuloma	Hemossiderina	Eosinófilos
	Terço proximal	Terço distal		
10C	5%	50%	0	0
11C	0%	20%	1	0
12C	0%	10%	0	0
14C	10%	50%	0	0
15C	0%	5%	1	0
32T	0%	50%	0	0
33T	0%	10%	1	2
34T	0%	0%	0	0
35T	5%	0%	0	0
Média	2%	22%	0,33	0,22
Desvio Padrão	0,03	0,22	0,5	0,66

Tabela 18 – Avaliação das diferentes variáveis (degeneração Walleriana, e presença de granuloma, hemossiderina e de eosinófilos), observados nos animais submetidos a neurotomia com imediata neurorrafia do nervo femoral direito eutanasiados aos 75 dias de pós-operatório.

Animais	Degeneração Walleriana	Granuloma	Hemossiderina	Eosinófilos
	Terço proximal	Terço distal		
1C	0%	0%	0	Eosinófilo (1) Plasmócitos (1)
2C	0%	0%	0	0
4C	0%	0%	0	0
5C	5%	0%	0	0
20T	0%	0%	0	0
21T	0%	20%	0	0
22T	0%	2%	0	0
23T	0%	0%	0	0
Média	1%	3%	0	0,25
Desvio Padrão	0,01	0,07	0	0,70

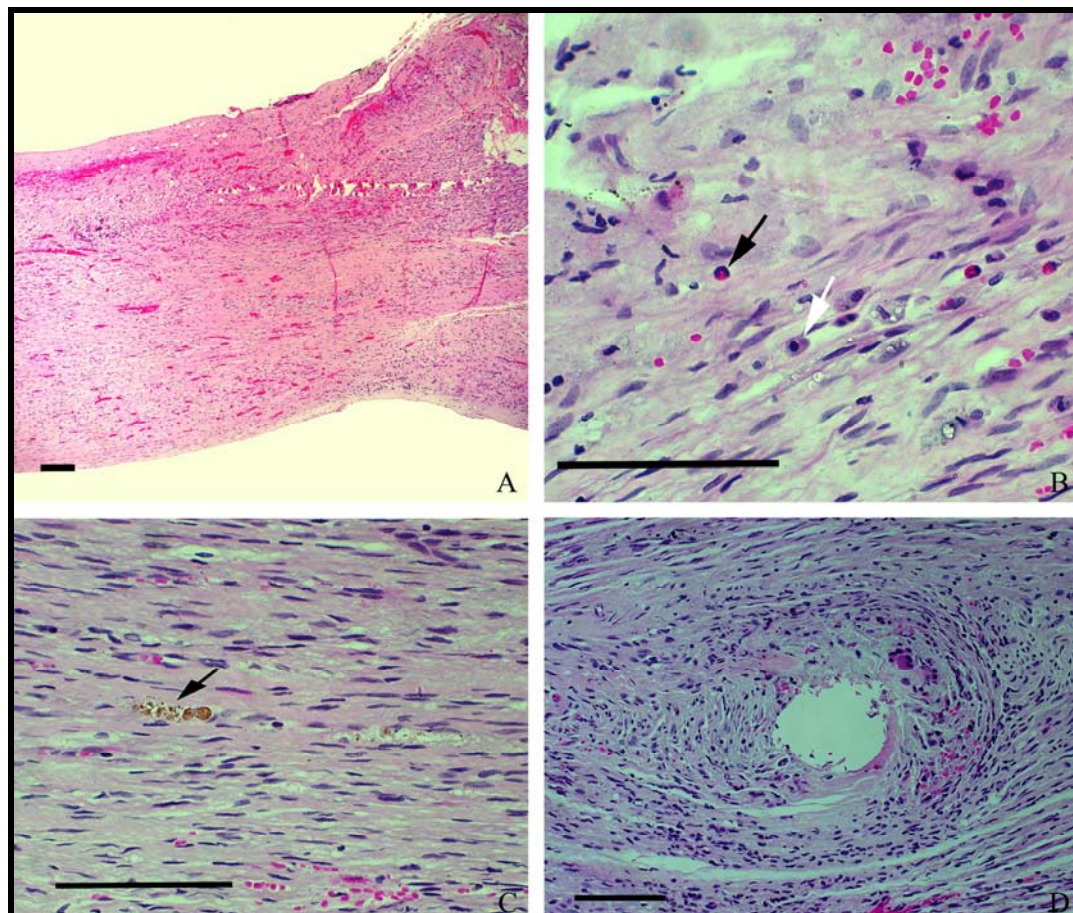


Figura 16 – Tecidos neuronais de coelhos submetidos a neurotomia com imediata neurorrafia do nervo femoral direito, corados pela técnica de Hematoxilina-eosina. **(A)** Visão geral da lâmina, fibras regenerando bem. **(B)** Reação inflamatória. A seta preta indica a presença de eosinófilos e a seta branca indica a presença de um plasmócito. **(C)** Grânulos de hemossiderina indicados pela seta preta. **(D)** Leve reação granulomatosa ao redor do orifício por onde passou o fio de sutura. Barra 100 μ m.

6 DISCUSSÃO

O modelo experimental de defeito agudo no nervo femoral de coelhos com imediata neurorrafia através de tubo de silicone apresentado neste estudo, representou um método adequado para a avaliação da regeneração nervosa periférica através de várias análises clínicas, eletrofisiológicas e histológicas.

De acordo com Ignatiadis et al. (2007) a escolha apropriada do modelo animal é crucial em pesquisas experimentais de lesões nervosas. No presente estudo, a utilização de coelhos representou uma redução de custos com a manutenção e fácil manipulação quando comparados a outros animais de laboratório, uma vez que o uso de ratos ou camundongos necessitaria fio de sutura e tubo de silicone com calibres menores, os quais apresentam valores significativamente maiores. Estes dados, estão de acordo com Colomé et al. (2008) e Gomes (2008), os quais relatam baixo custo com a manutenção de coelhos experimentais.

A proposta inicial seria de utilizar o nervo tibial direito de coelhos pelo seu fácil acesso cirúrgico. Porém, em um estudo piloto realizado pelos mesmos pesquisadores do presente estudo, não foram observadas claudicações consistentes no pós-operatório, o que impossibilitaria a avaliação e o acompanhamento da evolução clínica dos animais. Estes dados vão ao encontro dos referidos por Colomé et al (2008), os quais não puderam observar a claudicação pós-operatória em lesões experimentais do nervo tibial de coelhos. Além disso, no nervo tibial houve maior dificuldade de registrar os estímulos realizados na avaliação eletrofisiológica. Isto é justificado pelo fato do nervo tibial inervar os músculos flexores os quais promovem pobre cobertura muscular na região da tíbia (GUSMÃO, 2003). Pelo fato dos eletrodos utilizados serem de uso humano, conseqüentemente de maior diâmetro, não foi possível registrar os estímulos elétricos do nervo em questão.

A utilização de coelhos permitiu a coleta de células autólogas de medula óssea, evitando-se assim o risco de reações imunológicas e, conseqüentemente, rejeição destas pelo organismo, o que ocorre ao utilizar células heterólogas (HU et al., 2007; GOMES, 2008). Por todas estas razões, optou-se pela utilização de coelhos Nova Zelândia albinos (*Oryctolagus cuniculus*) à semelhança de vários outros pesquisadores nesta área

(IGNATIADIS et al., 2007; SANDRINI et al., 2007; WANG et al., 2007; COLOMÉ et al., 2008; ZHANG et al., 2008).

A escolha de dois tempos de avaliação, 50 e 75 dias objetivou o acompanhamento da regeneração do nervo em questão, extrapolando os referidos por Colomé et al. (2008) os quais avaliaram os animais 30 dias após o procedimento cirúrgico, porém estão de acordo com Ignatiadis et al. (2007), os quais realizaram avaliações seriadas aos 21, 42 e 91 dias com o mesmo intuito do presente experimento.

No que diz respeito à anestesia de coelhos, Fonseca et al. (1996) afirmaram que dentre os animais de laboratório, esta espécie é considerada como a mais difícil de anestésiar, devido à sua instabilidade dose-efeito aos agentes anestésicos comumente utilizados, bem como estreita margem de segurança entre o plano anestésico e a morte. Neste estudo, esta dificuldade foi superada pela experiência pessoal dos anestesistas com esta espécie. Além disso, foi utilizada a anestesia inalatória com isoflurano para a manutenção do plano cirúrgico dos animais, sendo esta técnica considerada como método de escolha para coelhos, por permitir controle preciso do plano anestésico e boa recuperação.

A cetamina foi adicionada ao protocolo devido ao seu efeito anestésico, anti-hiperalgésico e anti-alodínico comprovados em modelos de dor neuropática (RODRIGUEZ, 2003). A combinação desta com midazolam e cloridrato de petidina promoveu ainda relaxamento muscular e potencialização da analgesia durante o trans-operatório (TRINDADE et al., 2008).

Os princípios gerais de monitorização e controle das funções vitais durante a anestesia no coelho se assemelham com as do homem, sendo de especial importância o controle de diversos parâmetros, tais como frequência respiratória e cardíaca, oximetria e capnografia, constituindo assim índices importantes que determinam o plano cirúrgico-anestésico. Por este motivo, estas variáveis foram monitoradas constantemente durante o trans-operatório dos animais estudados. A frequência cardíaca média e respiratória manteve-se dentro dos limites fisiológicos para a espécie. Segundo Fonseca et al. (1996), a frequência cardíaca normal no coelho apresenta-se em 220 a 230 batimentos por minutos e a respiratória em torno de 32 a 60 movimentos respiratórios por minuto.

A oximetria permite monitorização contínua e não invasiva da saturação parcial de oxigênio (p_{sO_2}) que expressa a relação entre oxiemoglobina (cO_2Hb) e desoxiemoglobina (cHb). Já a capnografia, avalia a ventilação alveolar, através da determinação da pressão parcial CO_2 sanguíneo ($PaCO_2$), tendo grande importância para a assistência ventilatória e na direção de complicações relacionadas com a mesma (NUNES; TERZI, 1999). Assim, o que foi buscado avaliando estas variáveis nos pacientes do presente experimento, foi garantir níveis adequados de oxigênio no sangue arterial através de uma ventilação adequada, com intuito de evitar hipóxia tecidual e consequentemente morte dos animais.

A coleta do aspirado medular realizada a partir do tubérculo maior do úmero está de acordo com Grindem et al. (2002), Zago (2006) e Colomé et al. (2008) os quais citaram essa região como local passível de coleta de amostras medulares. Além disso, este local foi importante para evitar interferência do traumatismo da coleta na avaliação da claudicação.

O volume de 5 ml para a separação de 1×10^6 células foi alcançado em todos os animais e facilitado pela desobstrução da agulha 40x12 mm com um mandril de catéter 20G. Diferentemente dos dados referidos por Colomé et al. (2008) e Gomes et al. (2008), que utilizaram 2 ml para a obtenção do mesmo número de células. No presente estudo, optou-se por coletar um volume maior pelo fato dos animais apresentarem teores aumentados de gordura no aspirado medular, verificada após o processo de centrifugação, o que dificultava a separação de 1×10^6 células. Isto justifica a não obtenção do número de células almejado em quatro animais.

Apesar do nervo femoral apresentar características clínicas inerentes quando lesionado, a avaliação neurológica dos animais estudados apresentou um grau elevado de dificuldade para a sua realização, uma vez que alguns animais não apresentavam respostas aos estímulos realizados. Isto pode ser justificado pelo fato destes animais serem presas na natureza, tornando-se estressados com facilidade, mantendo-se muitas vezes inquietos ou estáticos durante a realização do exame clínico, conforme os dados referidos por Verneau et al. (2007).

O acesso cirúrgico também apresentou algumas dificuldades devido à topografia do nervo femoral, associado à estruturas delicadas e importantes próximas a ele como

artéria e veia femorais, e artéria e veia ilíacas externas (GUSMÃO, 2003). Estas estruturas tornam a região femoral um local passível de lesões iatrogênicas (SMEAK, 2007). As lesões cutâneas intermitentes na face médio-distal do membro operado de um coelho do presente estudo, são justificadas pelo fato de que a obstrução, mesmo que parcial da artéria femoral deste animal, prejudicou a irrigação da região distal do membro pélvico, incluindo a pele do animal. De acordo com Gusmão (2003), a artéria femoral fornece o principal suprimento arterial para o membro pélvico. É a responsável por suprir o trígono femoral através das artérias circunflexas femorais a musculatura ântero-medial da coxa e que nutrem a musculatura do jarrete.

A análise da marcha é importante para descrever as avaliações de formas de locomoção como o andar e o correr (ARAÚJO et al., 2009). O modo de andar dos animais é examinado neurologicamente pela resistência e coordenação (CHRISMAN, 1985). Portanto, esta análise nos animais do presente estudo, apesar de subjetiva, apresentou grande importância, pois permitiu observar e comparar a evolução clínica do grupo terapia com o grupo controle. Além disso, foi realizada sempre pelo mesmo avaliador com intuito de diminuir a subjetividade deste teste. Para a obtenção destes dados, alguns animais também permaneciam estáticos durante o exame, justificado pela condição etológica do coelho, de serem presas na natureza e a maneira estática significa um sinal de defesa para que passem despercebidos pelos seus predadores (VERNEAU et al., 2007). Ainda, o coelho apresenta características inerentes da espécie durante a marcha, o que o diferencia grandemente das outras espécies. Fato observado com clareza nos animais do presente estudo. Os coelhos, apresentam movimentos flexores da região plantar e dorsal sem movimentar, conjuntamente, a articulação tíbio-talar, o que permite um grande número de movimentos. No entanto, a região subtalar não permite a eversão e inversão do pé. Isto se justifica no fato do coelho necessitar a flexão da região plantar e dorsal do pé para saltar, caso contrário, lesionaria o membro ao movimentar-se. Portanto, o coelho não pronata nem supina o pé de modo que não há movimentos no calcâneo.

Estes animais, são considerados plantígrados e apresentam menores metatarsos e pernas mais curtas. Os membros ficam afastados com sua postura plantígrada porque usam o salto para movimentarem-se. Pelo fato do coelho não ter dígitos fusionados para aumentar o tamanho do membro e duração de movimentos, ele aumenta o seu passo em

comprimento, aumentando a força com que pode empurrar o chão e o grau que flexiona e estende a coluna vertebral. O coelho pode usar uma força extra para empurrar o chão, já que durante o salto, o sistema muscular de ambos os membros pélvicos estendem-se simultaneamente (WEIL, 2002). Estas características justificam a utilização da impregnação de tinta da região plantar dos membros pélvicos para avaliar a claudicação dos animais estudados uma vez que, por empurrarem o chão com bastante força para realizar o salto, ambos os membros tingidos deveriam deixar marcas bem definidas no solo. Apesar de representar um dado complementar para a avaliação da marcha dos coelhos, não foram encontrados relatos na literatura que utilizem esta técnica.

A utilização de câmeras de vídeo, eletroneuromiografia e a avaliação subjetiva do grau de claudicação pós-operatório foi realizada para a avaliação da recuperação funcional do nervo femoral operado de diversas maneiras, estando de acordo com Araújo et al. (2009), os quais relataram que a constante evolução nos métodos e técnicas de medição da marcha disponibilizadas pelo avanço tecnológico, permite o acesso à diferentes comportamentos do sistema locomotor, de forma mais precisa e com maior rapidez. A utilização conjunta de câmeras de vídeo, plataformas de forças e eletromiógrafos com o intuito de caracterizar a locomoção quantitativamente vem se tornando cada vez mais frequente, constituindo-se em um sistema para avaliações de alterações na marcha e evolução de vários tipos de tratamento. Portanto, apenas a dinamometria não foi incluída na avaliação da claudicação dos animais estudados. Esta, que envolve todas as medidas de força e pressão, sendo que as mensuráveis são as forças externas, dentre as quais destaca-se a força de reação ao solo. Esta força, é calculada através de plataformas ou placas de força que fornecem a força de reação ao solo na superfície de contato durante a fase de apoio do movimento sendo representada sob a forma de vetores em função do tempo (FILIPPIN; BONAMIGO, 2003). Devido a estas características, seria fundamental a utilização de placas de força para uma avaliação mais precisa da marcha dos animais operados; porém, a falta deste equipamento impossibilitou a inclusão desta análise no presente estudo.

A técnica utilizada para a eletroneuromiografia nos 15 animais avaliados mostrou-se eficaz, uma vez que foi possível obter uma padronização dos valores basais nos membros pélvicos não operados dos coelhos, além de permitir uma comparação individual entre membro operado e não operado. Apesar disso, não foram obtidas

diferenças estatísticas entre os animais do GT e GC devido ao pequeno intervalo de tempo entre os animais avaliados aos 50 e 75 dias de pós-operatório.

Todos os animais que receberam terapia celular, independente do tempo de avaliação (GT50 e GT75), apresentaram significativamente melhor qualidade da deambulação com graus menores de claudicação na primeira, segunda e terceira semanas de pós-operatório quando comparados aos animais controles. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Braga-Silva et al. (2006), os quais em um estudo com ratos demonstraram que a performance funcional avaliada pelo teste da marcha nos animais tratados com células-tronco de medula óssea foi significativamente melhor do que nos demais grupos.

Vários estudos, demonstram que a terapia celular apresenta vantagens na regeneração neural, quando comparados aos indivíduos que não a receberam (DEZAWA et al., 2001; CHEN et al., 2007; HU et al., 2007), sugerindo que as células-tronco atraem fatores neurotróficos, promovendo microambiente adequado precocemente, contribuindo para a aceleração da regeneração nervosa (CHEN et al., 2007).

Adicionalmente, a análise morfométrica individual do diâmetro da fibra nervosa usando a secção das fibras é normalmente utilizado para verificar mielinização. Além disso, a verificação do aumento no número de axônios na porção central da regeneração nervosa se constitui numa importante forma de qualificar a regeneração nervosa (CHEN et al., 2007). Estes dados poderão ser avaliados detalhadamente através da microscopia eletrônica de transmissão a qual será realizada posteriormente nas dez amostras de nervos fixadas em glutaraldeído.

No presente estudo, foi possível realizar como técnica histológica, apenas a coloração de hematoxina-eosina em 17 amostras devido a indisponibilidade de outras técnicas, porém permanece a expectativa para que sejam executadas outras técnicas posteriormente. Destas amostras, nove eram de animais do GC e oito pertencentes ao GT. Todos os animais apresentaram fibras nervosas orientadas e bem organizadas com pouca ou nenhuma degeneração Walleriana, com pouca reação inflamatória e sem a presença de granulomas. Não havendo diferenças significativas nas variáveis estudadas histologicamente.

Estes resultados podem ser justificados pelo fato de que o procedimento cirúrgico foi realizado cuidadosamente, com magnificação de imagem, evitando-se manipulação dos cotos seccionados, estando de acordo com Gibson; Daniloff (1989), os quais relataram que a técnica de tubulação reduz a manipulação do nervo e quantidade de material de sutura introduzido no local de anastomose, o que favorece a orientação dos axônios em direção ao coto distal do nervo. Além disso, as bainhas também têm a vantagem de permitir a concentração dos fatores neurotróficos, os quais favorecem o brotamento axonal e, conseqüentemente, a regeneração do nervo (FLANAGAN, 1999).

A presença de hemossiderina observada na análise histopatológica de alguns animais significam hemorragia recente, justificada devido à lesão iatrogênica de vasos próximos ao nervo no momento da coleta do material, pois a hemossiderina é um pigmento resultante da degradação da hemoglobina, que contém o elemento ferro em sua constituição e, assim como a ferritina podem se depositar excessivamente nos tecidos de forma localizada ou sistêmica. A forma localizada é encontrada nas hemorragias onde se observa a hemossiderina dentro dos macrófagos adjacentes algumas horas após o início do sangramento (COSTA-VAL et al., 2006).

A presença de eosinófilos e plamócitos apenas em dois animais do grupo controle, está de acordo com dados encontrados por Colomé et al. (2008), os quais relataram maior quantidade no grupo controle. Estes autores justificam este achado devido ao fato de que animais que receberam terapia celular apresentam uma velocidade de resolução da resposta imune a qual facilita a remoção de fragmentos mielínicos e axonais, favorecendo a produção de fatores neurotróficos, os quais beneficiam a regeneração axonal. Portanto, a produção da resposta imune no grupo tratado estaria em declínio ou cessada no momento da avaliação.

Macroscopicamente, todos os animais apresentaram tecido de regeneração interligando ambos os cotos nervosos, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos, justificados pelo fato das cirurgias terem sido realizadas respeitando os princípios das técnicas micro e neurocirúrgicas. Estes resultados, se assemelham aos encontrados por Colomé et al (2008), Chen et al (2007) e Braga-Silva et al. (2006). Os dados histológicos conferem com o grau de claudicação avaliados em todos os animais, uma vez que na última avaliação todos os pacientes apresentaram baixos índices de claudicação. Porém, contrariam os achados eletrofisiológicos.

Na avaliação eletrofisiológica, o potencial de ação é verificado quanto à uma série de parâmetros, incluindo amplitude, duração, área, morfologia e latência, sendo esta última, importante para determinar a velocidade de condução nervosa (FERREIRA, 1998). Dados estes, avaliados neste trabalho. A amplitude é uma estimativa do número de fibras musculares ativadas pela estimulação nervosa, ou seja, representa o número de axônios de disparo sincrônico. Já a latência no estudo de um nervo motor consiste do tempo de condução nervosa do ponto do estímulo ao término do nervo, ou seja representa alterações ou não na bainha de mielina (FERREIRA, 1998; CUDDON et al., 2007). Os resultados sugerem que no presente experimento, a redução da amplitude e aumento da latência, representaram lesão axonal e lesão na bainha de mielina em todos os animais avaliados.

Estes dados, contrariam os encontrados por Braga-Silva et al. (2006) e Hu et al. (2007), os quais encontraram resultados eletrofisiológicos compatíveis com a regeneração axonal e mielínica. Porém, estão de acordo com os encontrados por Chen et al (2007) e Sandrini et al. (2007), os quais não encontraram correlação significativa entre a velocidade de condução nervosa pós-operatória e o número de axônios regenerados. Neste sentido, os dados da microscopia eletrônica de transmissão, que serão realizados posteriormente, poderão direcionar e justificar melhor os resultados encontrados.

Pelo fato de desconhecerem-se mecanismos de diferenciação das células mononucleares, acredita-se que a terapia celular influenciou beneficemente os estágios iniciais da regeneração neural, uma vez que os animais tratados apresentaram melhores escores iniciais no que diz respeito ao grau de claudicação.

Também, é citado na literatura que a velocidade de regeneração nervosa em animais pode atingir até 4 mm por dia (SEIM III, 2005), diferentemente da velocidade de regeneração neural em humanos o qual atinge em média 1 mm por dia (MATTAR Jr; AZZE, 2008). Por esses motivos, são importantes avaliações histológicas mais precoces, ou seja, com menos dias de pós-operatório, afim de avaliar a influência da terapia celular na organização inicial da regeneração.

Ainda, por tratar-se de uma terapia em parte inovadora, muitos estudos necessitam ser realizados e, conseqüentemente, novas técnicas de avaliação também devem ser empregadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a técnica de tubulização em coelhos, tratados ou não com células autólogas de medula óssea promove regeneração neural, com aproximação dos cotos nervosos num período igual ou inferior a 50 dias de pós-operatório.

Os animais que receberam a terapia celular, apresentam melhores escores funcionais nos que diz respeito à marcha, com baixos graus de claudicação estatisticamente significativos nas três primeiras avaliações.

Na eletrofisiologia nervosa, observaram-se lesão axonal e na bainha de mielina constatadas através da diminuição da amplitude e aumento na latência, sem diferenças estatísticas entre GT e GC, não havendo correlação entre resultados clínicos e eletrofisiológicos.

8 REFERÊNCIAS

ANDERSON, G.M. et al. Circular external skeletal fixation stabilization of antebrachial and crural fractures in 25 dogs. **Journal of American Hospital Association**, v. 39, 2003.

ARAÚJO, C.C., et al. Sistemas de Avaliação da marcha humana. Disponível em: <<http://telemedicina.unifesp.br/pub/SBIS/CBIS2004/trabalhos/arquivos/296.pdf>>. Capturado em: 17 jan: 2009.

BARRY, F.P; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 568-584, 2004.

BJORNSON, C.R.R et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science**, v. 283, p. 534-537, 1999.

BOUSKELA, E.; SHMIDT, S.L. O papel das neurociências na compreensão do funcionamento cerebral e do comportamento. **Arquivos Brasileiro de Psiquiatria, Neurologia e Medicina Legal**, v.99, n. 4, p. 37-41, 2005.

BRAGA-SILVA, J. et al. Efeito das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.5, p. 273-275, 2006.

BRANNVALL, K. et al. Enhanced neuronal differentiation in a three-dimensional collagen-hyaluronan matrix. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, p. 2138-2146, 2007.

CHEN, J. H. et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. **Experimental Neurology**, v. 204, p443-453, 2007.

CHRISMAN, C. Investigações auxiliares iniciais e abordagem da solução do problema. In: _____. **Neurologia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1985. Cap. 4. p. 55-61.

CLARKE, D.L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, v. 288, p. 1660-1663, 2000.

COLOMÉ, L. M. et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p. 2529-2534, 2008.

CONTESINI, E.A. et al. Avaliação clínico-morfológica da regeneração nervosa periférica mediante alinhamento por tubo de silicone em caninos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 1, p. 65-71, 1992.

COSTA-VAL, R. et al. Efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos submetidos à ligadura das veias hepáticas: avaliação da mortalidade e da histologia do fígado e baço. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 1 , p. 51-56, 2006.

- COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 35-48.
- CUDDON, P.A. et al. Eletrodiagnóstico. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 75. p. 1108-1118.
- CUEVAS, P. et al. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. **Neurology Research**, v. 26, p.230-232, 2004.
- CUTLER, C.; ANTIN, J.H. Peripheral blood stem cells for allogenic transplantation: a review. **Stem Cells**, v. 19, p. 108-117, 2001.
- DA-SILVA, C.F. et al. Influence of highly purified preparations of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration *in vivo*. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 20, n. 2, p. 121-124, 2003.
- DEZAWA, M. et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **European Journal of Neuroscience**, v.14, p. 1771-1776, 2001.
- DOHMANN, H.F.R. Pesquisa básica na terapia celular – Luxo ou Necessidade? **Arquivos Brasileiros de cardiologia**, v. 83, n.4, 2004.
- DOURADO, E. et al. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: Procedimentos convencionais e alternativos. **Revista de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial**, v.3, n.2, 2003.
- DYCE, K.M., et al. O sistema nervoso. In: _____. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.8. p. 206-257.
- FEITOSA, M.M. et al. Determinação da velocidade de condução nervosa motora dos nervos radial e ulnar de cães clinicamente sadios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.3, 2000.
- FERREIRA, A.S. **Lesões nervosas periféricas: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Santos, 1998. p.01-250.
- FILIPPIN, N.T; BONAMIGO, E.C.B. Implicações terapêuticas da análise dinâmica da marcha na paralisia cerebral dipléica – um estudo de caso. **Praxisterapia**, v.8, n.8, p. 25-35, 2003.
- FLANAGAN, J.G. As nerve axons migrate during wiring of the nervous system, molecular signposts at intermediate targets show them the way. Such a target has now been found to keep axons alive – provided they're on the right track. **Nature**, v. 401, p. 747-748, 1999.
- FONSECA, N.M. et al. Anestesia em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.2, n.11, p. 82-104, 1996.
- FUCHS, E. et al. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, p. 769-778, 2004.

- GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.
- GALLACHER, L. et al. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1740-1747, 2000.
- GIBSON, K.L.; DANILOFF, J.K. Peripheral nerve repair. **The Compendium on Continuing Education for the Practician Veterinarian.**, v.11, p.938-944, 1989.
- GIORDANO, A. et al. From de laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cell – Article review. **Cellular Physiology**, v. 211, p. 27-35, 2007.
- GOMES, C. et al. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular utilizando auto-enxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental.** 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- GRIFFITHS, I.R; DUNCAN, I.D. The use of electromyography and nerve conduction studies in the evaluation of lower motor neurone disease or injury. **Small Animal Practice**, v. 19, p. 329-340, 1978.
- GRINDEM, C.B. et al. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: small Animal Practice**, v. 32, p. 1313-1374, 2002.
- GRITTI, A. et al. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. **The Journal of Physiology**, v.96, n.1/2, p.81-89, 2002.
- GUSMÃO, L.C.B. Anatomia arterial e venosa aplicada. In: PITTA, G.B.B; CASTRO, A.A., BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado.** Livro em CD Maceió: UNCISAL/ECMAL. 2003.
- GUYTON, A.C. Potenciais de membrana e potenciais de ação. In:____. **Tratado de fisiologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 10, p. 83-97, 1996.
- HEINE, W. et al. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically degenerated peripheral nerves. **Experimental Neurology**, v.189, p.231-240, 2004.
- HORWITZ, E.M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society of cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, p. 393-395, 2005.
- HU, J., et al. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologus mesenchymal stem cells. **Experimental Neurology**, v. 204, p.658-666, 2007.
- HUANG; Y.C.; HUANG, Y.Y. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. **Artificial organs**, v. 30, n. 7, p. 514-522, 2006.
- IGNATIADIS, I.A., et al. Diverse types of epineural conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit. **Microsurgery**, v.27, p. 98-104, 2007.

- JAVAZON, E.H. et al. Mesenchymal stem cell: paradoxes of passaging. **Experimental hematology**, v. 32, p. 414-425, 2004.
- KAJI; E.H; LEIDEN, J.M. Gene and stem cell therapies. *Journal of the American Medical Association*, v. 285, p.545-5550, 2001.
- KASSEM, M. et al. Mesenchymal stem cell: cell biology and potential use in therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 95, p. 209-214, 2004.
- KIM, S.W. et al. Peripheral nerve regeneration through nerve conduit composed of alginate-collagen-chitosan. **Macro Research**, v. 14, n. 1, p. 94-100, 2006.
- LAKSHMIPATHY, U. et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 531-543, 2004.
- Le BLANC, K; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cell: progress toward promise. **Cytotherapy**, v.7, p. 36-45, 2005.
- LENT, R. As unidades do sistema nervoso. In:____. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Atheneu, 2005a. cap.3. p. 65-96.
- LENT, R. Os neurônios se transformam. In:____. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Atheneu, 2005b. cap.5. p. 133-165.
- LIANG, L.; BICKENBACH, J.R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. **Stem Cells**, v.20, p. 21-31, 2002.
- LOPES, V.J.X.; SILVEIRA, M.J.M. et al. Sistema Nervoso. In: _____. **Biologia num contexto social**. Santa Maria: Imprensa Universitária, 1993, cap. 17, p. 141-162.
- MALTA, J., et al. Eletromiografia aplicada aos músculos da mastigação. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.2, p. 106-107, 2006.
- MARIE, S.K.N.; OBA-SHINJO, S.M. Células-tronco no sistema nervoso central: potencial terapêutico. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. Cap. 11, São Paulo: Atheneu, 2006. p. 145-158.
- MARTINS, R.S. et al. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005.
- MATTAR Jr, R.; AZZE, R.J. **Lesões dos nervos periféricos**. Atualização em traumatologia do aparelho locomotor. São Paulo: Departamento de ortopedia e traumatologia, Faculdade de Medicina, USP, 2008. p.03-27. Capturado em 20 set. 2008. Online. Disponível na internet <http://www.ronaldoazze.com.br/fasciculo/fasciculo3.PDF>
- MELLO, L.R. et al. Uso da cellulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, n. 2b, p. 372-379, 2001.
- MERLETTI, R. et al. Analysis of motor units with high-density surface electromyography. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 18, p. 879-890, 2008.

MIMURA, T. et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. **Journal of Neurosurgery**, v. 101, p. 806-812, 2004.

MOORE, K.; LEMISCHKA, I. R. Stem cells and their niches. **Science**, v. 311, n. 5769, p. 1880-1885, 2006.

MOTTA, C. et al. Sistema Nervoso. In: ____. **Corpo Humano: Anatomia e Fisiologia**. Livro em CD. P. 118-122. 2008. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=S3mBsgO4rosC&pg=PA118&lpg=PA118&ots=XVwmKf74VT&dq=corpo+celular#PPA122,M1>.

MURAKAMI, T. et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. **Brain Research**, v. 974, p.17-24, 2003.

NAKAMURA, T. et al. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. **Brain Research**, v. 1027, p. 18-29, 2004.

NARDI, N.B. All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. **Medical Hypothesis**, v.64, p. 811-817, 2005.

NARDI, N. B.; ALFONSO, Z. C. Células-tronco hematopoiéticas. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 49-66.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacologist Journal**, v. 282, p. 174-249, 2006.

NUNES, V.A.; ZATZ, M. Doenças genéticas: como tratá-las? In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. Cap. 14. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 197-220.

NUNES, W.A.; TERZI, R.G.G. Oximetria de pulso na avaliação do transporte de oxigênio em pacientes críticos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.7, n.2, p. 79-85, 1999.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cell. **Blood Journal**, v.81, p. 2844-2853, 2008.

OLIVEIRA, A.L.R. et al. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 225-231, 2004.

O'SULLIVAN, SB; SCHMITZ, T.J. Eletromiografia e testes de velocidade de condução nervosa. In: ____. **Fisioterapia – Avaliação e tratamento**. 2ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 183-218.

PAULA, S. et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 14, n. 4, 2005.

PELLEGRINO, F. et al. **El libro de Neurología para la práctica clínica**. Buenos Aires: INTER-Médica, 2003, 708 p.

PIERUCCI, A. et al. Expression of basal lamina components by Schwann cells cultured on poly(lactic acid) (PLLA) and poly(caprolactone) (PCL) membranes. **Journal of Material Science: Material in Medicine**, v.6, 2008.

PINEDO, U.G. et al. Utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. **Archivos de neurociencias mexicanas**, v. 6, n. 4, p. 184-193, 2001.

POPESKO, P. Atlas **de anatomia topográfica dos animais domésticos**. São Paulo: Manole, 1990. p. 203.

PURVES, D. et al. A organização do sistema nervoso. In:____. **Neurociências**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005a. cap1. p. 01-40.

PURVES, D. et al. Sinalização neural. In:____. **Neurociências**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. cap2. p. 41-56.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n.1, p.105-111, 2001.

RIVEROS, D.M. et al. Células madres y células troncoembrionarias: Diferencias Biológicas. **Veterinária México**, v. 38, n. 4, p. 477-501, 2007.

ROBEY, P.G. Series Introduction: Stem cells near the century mark. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 11, p. 1489-1491, 2000.

RODKEY, W.G.; SHARP, N.J.H. Cirurgia do Sistema Nervoso Periférico. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 81. p. 1218-1226.

RODRIGUEZ, R.F. Estudo farmacológico de um novo modelo de dor neuropática: avulsão do tronco inferior do plexo braquial de rato. 2003, tese. Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

RODRIGUEZ-AÑEZ, C.R. **Eletromiografia na análise da postura**. Capturado em 10 dez. 2008. Online. Disponível na internet http://winston.alhosting.com.br/emg_e_postura.htm

ROJAS, R.A.G. **Estudo da regeneração do sistema nervoso periférico em cães por secção do nervo radial**. 1982. 76f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1982.

ROSSETO, M. et al. Regeneração de nervo periférico após anastomose término-lateral, com manutenção do epineuro, em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 3, 2001.

SANDRINI, F.A.L. et al. Anastomose do nervo facial de coelhos com cola de fibrina: estudo da velocidade de condução nervosa. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 2, p. 196-201, 2007.

SANTOS, T.S; ANDRÉ, E.S. Avaliação funcional da marcha do rato após estimulação elétrica do músculo gastrocnêmio desnervado. **Revista Neurociências**, v.15, n.2, p.120-124, 2007.

SAWAMURA, Y.; ABE, H. Hypoglossal – facial nerve side-to-end anastomosis for preservation of hypoglossal function: results of delayed treatment with a new technique. **Journal of Neurosurgery**, v. 86, p. 203-206, 1997.

SEIM III, Cirurgia dos nervos periféricos. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 43, p. 1336-1350.

SHEN, Z.L.. Viability of cultured nerve grafts: an assessment of proliferation of Schwann cells and fibroblasts. **Microsurgery**, v.19, p. 356-363, 1999.

SHIMITSU, S. et al. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.359, p. 915-920, 2007.

SHORES, A. Lesão e reparo do nervo periférico. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3ed. São Paulo: Roca, 1996, cap. 6, p. 49-56.

SHORT, B. et al. Mesenchymal stem cell. **Archives of Medical Research**, v. 34, p. 565-571, 2003.

SILVA-NETO, J.C. et al. Clinical and Histopathologic Study of the use of gangliosides for nerve regeneration in rats after axonotmesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New York, v. 65, n. 5, p. 870-874, 2007.

SILVEIRA, P.A. Hematopoiese: alguns aspectos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, p.5-6, 2000.

SMEAK, D.D. Hérnias abdominais. IN: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2007. v.1, cap. 32, p. 449-470.

SOUZA, V.F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n.2, p. 251-256, 2003.

STOPIGLIA, A.J. et al. Avaliação morfométrica de fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 80-83, 1998.

STORS, R.W. Sistema Nervoso Central. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia Especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. Cap. 8, p. 353-416.

TORRES, M.F.P. et al. Reparação microcirúrgica do nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de BioFill® em ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.5, 2003.

TORRIANI, C. et al. Biofeedback: conceitos básicos e aplicabilidade clínica. **Revista de Fisioterapia UNIFMU**, v. 1, p. 11-18, 2003.

TRINDADE, A.B. et al. Fármacos injetáveis para a anestesia total intravenosa em cães – revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v.5, n.2, p. 154-172, 2008.

URBANIAK, J.R. Fascicular nerve suture. **Clinical Orthopaedics and related research**, n. 163, p. 57-64, 1982.

VERNEAU, K. et al. The neurological examination and lesion localization in the companion rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 10, p. 731-758, 2007.

VIOLINI, S.; MARIANI, P. Stem cells and regenerative medicine in veterinary field. **Large Animal Review**, v. 14, p. 203-209, 2008.

VITAL, M.A.B.F. Introdução ao sistema nervosa autônomo. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 5, p. 43-58.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? **Science**, v. 287, p. 1418-1419, 2000.

WANG, D.Y.X. et al. Preliminary studies on peripheral nerve regeneration using a new polyurethane conduit. **Journal of bioactive and compatible polymers**, v. 22, p. 143-159, 2007.

WEIL, A. Compararive Mammalian anatomy. Shank and foot of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). In: **Biological Antropology & Anatomy**, 2002. Disponível em: <http://www.baa.duke.edu/companat/BAA_289L_2004/Shank_and_Foot/Rabbit/rabbitshank.htm>.

ZAGO, M. A. Células-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 3-20.

ZHANG, H. et al. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. 67, p. 1-11, 2008.

ZIPORI, D. Mesenchymal stem cell: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. **Blood Cell Molecules and Diseases**, v. 33, p. 211-215, 2004.

Células-Tronco: Esperança para o futura da medicina. Anglo vestibulares. Disponível em: <http://academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2008.

Condução nervosa. Disponível em: <<http://www.englab.com.br/html/conducaonervosa>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

Eletroneuromiografia. Disponível em: <http://www.suportemed.com/index_arquivos/page0005.htm>. Acesso em: 10 dez. 2008.

Plexo lombossacral. Disponível em: <<http://www.compuland.com.br/anatomia/plexo.htm>> Acesso em: 08 jan. 2009.

