

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ENXERTO AUTÓGENO E ENXERTO MUSCULAR COBERTO COM TUBO DE VEIA AUTÓGENO EM NERVOS TIBIAIS DE RATOS WISTAR, UTILIZANDO O FLUORO-GOLD® COMO MARCADOR NEURONAL

COMPARATIVE STUDY BETWEEN AUTOGENOUS GRAFT AND MUSCULAR GRAFT COVERED WITH AUTOGENOUS VEIN TUBE IN WISTAR RATS' TIBIAL NERVES USING THE FLUORO-GOLD® AS A NEURONAL MARKER

Marcela Fernandes¹, Sandra Gomes Valente², Débora Amado³, Maria José da Silva Fernandes³, Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti⁴, João Baptista Gomes dos Santos⁵, Flávio Faloppa⁶, Vilnei Mattioli Leite⁷.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da regeneração nervosa através da contagem de neurônios comparando duas técnicas cirúrgicas no tratamento da perda de substância nervosa nos membros inferiores em 15 ratos. Inicialmente obteve-se tubo de veia de 12mm de comprimento retirado da jugular externa esquerda. A seguir, opera-se os dois membros inferiores, expondo o nervo tibial de cada lado e ressecando um segmento de 8 mm do nervo, simulando, ao mesmo tempo, a perda de substância e a obtenção do enxerto nervoso autógeno. A reparação da perda de substância do lado esquerdo consistiu numa enxertia convencional simples para a reparação de lesão nervosa por meio de sutura microcirúrgica. A do membro inferior direito foi pela tubulização com 8 mm de enxerto de músculo quadríceps denaturado com nitrogênio líquido coberto com veia jugular. Após quatro meses, os animais foram submetidos à nova cirurgia para exposição dos nervos tibiais ao marcador neuronal Fluoro Gold®. Após 48 horas, foram perfundidos e o segmento medular entre L3 e S1 foi removido e posteriormente cortado em secções de 40 µm. Houve contagem neuronal de todos os cortes e não foram verificadas diferenças estatísticas entre as duas técnicas cirúrgicas.

Descritores: Transplante autólogo, Nervos periféricos, Contagem de células, Ratos Wistar.

SUMMARY

The purpose of this work was to study nervous regeneration through neurons counts by comparing two surgical techniques for addressing nervous gaps on 15 rats' lower limbs. Initially, a 12-mm long vein tube from the left outer jugular was obtained, and then both lower limbs are operated, exposing the tibial nerve at each side and performing a resection of an 8-mm nerve segment, at the same time simulating a gap and an autogenous nerve graft. Left gap repair consisted of a usual conventional graft for nervous injury repair by means of microsurgical suture. The gap repair on right lower limbs was made through quadriceps muscle, treated with liquid nitrogen, covered with an 8-mm tube of jugular vein. After four months, the animals were submitted to a new surgery for exposing tibial nerves to the Fluoro-Gold® neuronal marker. After 48 hours, the rats were perfused and medullar segment between L3 and S1 was removed and subsequently cut into 40µm sections. Neurons on all sections were counted, and no statistical differences were found between both surgical techniques.

Keywords: Transplantation autologous; Peripheral nerves; Cell count; Wistar rats.

Citação: Fernandes M, Valente SG, Amado D, Fernandes MJS, Mazzacoratti MGN, Santos JBG et al. Estudo comparativo entre enxerto autógeno e enxerto muscular coberto com tubo de veia autógeno em nervos tibiais de ratos Wistar, utilizando o Fluoro-Gold® como marcador neuronal. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2007; 15(2):97-100. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Fernandes M, Valente SG, Amado D, Fernandes MJS, Mazzacoratti MGN, Santos JBG et al. Comparative study between autogenous graft and muscular graft covered with autogenous vein tube in Wistar rats' tibial nerves using the Fluoro-Gold® as a neuronal marker. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2007; 15(2): 97-100. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Na lesão do nervo periférico, as fibras nervosas originam-se e crescem a partir do coto proximal⁽¹⁾. Em lesões de nervos digitais, os melhores resultados após a reparação foram encontrados em crianças, demonstrando a necessidade de estudos de regeneração nervosa em adultos⁽²⁾.

O uso de tubo, para recompor o nervo lesado não é recente⁽³⁾. Os tubos parecem importantes na regeneração por confinarem substância neurotróficas que ajudam na orientação dos axônios em direção ao seu alvo distal⁽⁴⁾. O grande impulso às pesquisas

da tubulização com veia foi dado após experimentos em ratos que demonstraram que a luz da veia permite a regeneração do nervo⁽⁵⁾.

Nas grandes perdas de substância nervosa, quando é utilizada veia para preenchimento do espaço, pode haver colabamento. No entanto, quando a veia é preenchida por músculo, este colabamento é prevenido, além de não haver dispersão das fibras dos cotos proximais e distais, podendo também evitar a fibrose e melhorar o aporte sanguíneo⁽⁶⁾.

Com base nestes dados, o presente trabalho teve como objetivo,

Trabalho realizado no Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP.

Endereço para correspondência: Rua Borges Lagoa, 786 - Vila Clementino - 04038-001 - São Paulo - São Paulo - E-mail: fernandesmarcela@click21.com.br

1- Mestre em Medicina, Médica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP.

2- Doutora em Ciências, Bióloga do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP.

3- Professor Adjunto do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da UNIFESP.

4- Professor Adjunto Livre-Docente do Departamento de Bioquímica da UNIFESP.

5- Professor Afiliado e Chefe de Clínica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP.

6- Professor Titular e Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP.

7- Professor Adjunto Livre-Docente e Chefe da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP.

Recebido em 09/05/06 e Aprovado em 07/12/06

comparar a eficácia do enxerto de músculo denaturado coberto com veia, em nervos tibiais de ratos Wistar, quando comparados ao enxerto autólogo tradicional, utilizando-se a contagem de neurônios marcados com Fluoro-Gold®.

MATERIAL E MÉTODO

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Médica em Pesquisa do Hospital São Paulo / Universidade Federal de São Paulo, de acordo com a International Ethical Guidelines⁽⁷⁾.

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, pesando em média 155g, mantidos em condições controladas com ciclo claro/escuro (12/12h), temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com livre acesso à água e ração, por todo período do experimento.

No total foram operados 29 ratos, no entanto apenas 15 puderam fazer parte do grupo de estudo, pois os demais apresentaram problemas durante a execução dos diversos procedimentos experimentais que dificultavam a quantificação dos dados.

Os animais foram anestesiados com solução composta por hidrato de cloral, sulfato de magnésio, thionembatal, propilenoglicol, álcool etílico e água destilada na dose de 4ml/Kg.

A cirurgia consistiu na retirada da veia jugular externa (Figura 1) com a ligadura das tributárias e isolamento de um segmento de 12 mm de comprimento (Figura 2). O enxerto venoso foi mantido em soro fisiológico 0,9% até a sua utilização.

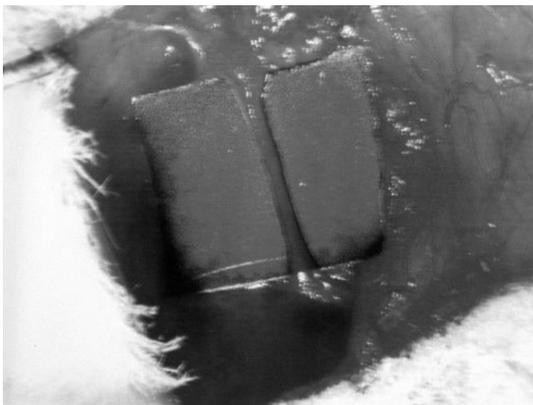


Figura 1 – Identificação da veia jugular externa.



Figura 2 – Medida do segmento de 12 mm a ser retirado da veia jugular externa.

O nervo ciático e suas ramificações (nervo sural, peroneiro e tibial) foram expostos. O nervo tibial direito foi dissecado e manipulado o mínimo possível (Figura 3). Um segmento de 8mm foi seccionado, deixando um coto proximal de aproximadamente 3mm (Figura 4). O segmento do nervo foi reservado em solução fisiológica 0,9%.



Figura 3 – Exposição do nervo ciático e suas ramificações.

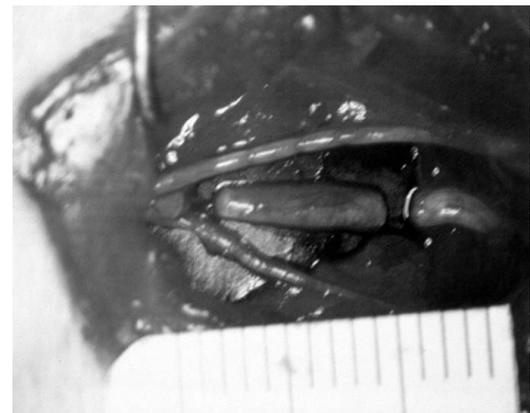


Figura 4 – Secção de 8 mm do nervo tibial direito.

A lesão provocada no nervo tibial esquerdo foi corrigida pela interposição do enxerto de nervo retirado do membro contralateral e suturado com dois pontos epineurais com monofilamento de náilon 10,0.

Do lado direito foi retirado 1 cm de músculo do quadríceps e colocado em nitrogênio líquido para realizar sua denaturação⁽⁸⁾. O músculo denaturado foi suturado ao coto proximal e em seguida coberto com tubo de veia (Figura 5). Feita a acomodação da veia sobre todo o segmento muscular, foi realizada sutura com o epineuro proximal e distal para que a veia não se deslocasse do enxerto muscular. Os planos musculares e cutâneos foram suturados com monofilamentos de náilon 4,0.



Figura 5 – Acomodação da veia jugular sobre o enxerto de músculo.

Após 120 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram reapareados para exposição dos nervos tibiais direito e esquerdo (Figura 6) para a marcação neuronal com Fluoro-Gold® 3% (Fluorochrome Inc.) para posterior contagem dos neurônios no corno anterior da medula espinhal.

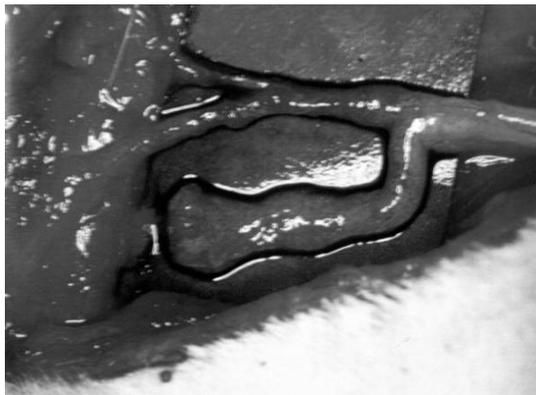


Figura 6 – Secção do nervo tibial distal ao enxerto muscular.

O nervo ficou exposto ao corante por 90 minutos. Após este tempo, o plano muscular e a pele foram suturados.

O animal, 48h após a exposição com o corante, foi novamente anestesiado e então submetido à perfusão transcárdica através de abertura na caixa torácica e exposição do coração. O ventrículo esquerdo foi puncionado com uma agulha e as soluções infundidas foram drenadas através de uma secção do átrio direito.

Durante a perfusão, foram utilizadas as soluções tampões, fosfato 0,2M e sacarose 10%, em pH fisiológico.

Terminada a perfusão, a medula foi extraída com o auxílio de microscópio. A laminectomia foi iniciada a partir do nível S2. Foi feita identificação das raízes dorsais de L3, L4, L5, L6 e S1 e o trajeto das raízes de L3 e de S1 foi acompanhado até a sua entrada na medula, que foi seccionada transversalmente a fim de preservar o segmento de L4, L5 e L6.

O segmento de medula passou por processo de crioproteção em sacarose 20% e posterior corte em micrótomo de congelação, em secções de 40µm.

As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de fluorescência. Foi analisado o corno anterior da medula espinhal e identificados os neurônios motores (Figura 7). Foram avaliadas apenas as células tipicamente marcadas com Fluoro-Gold, para evitar erro de interpretação. Do total de células, foi feito o critério de correção de Abercrombie⁽⁹⁾ para cortes seriados ao micrótomo.



Figura 7 – Células coradas com Fluoro-Gold®. Aumento de 20X.

Como métodos estatísticos de avaliação, foram utilizados os seguintes testes: teste “t” pareado, Wilcoxon sinalizado e Mann-Whitney.

RESULTADOS

Após a contagem dos neurônios, os resultados em valor absoluto foram corrigidos pelo critério de Abercrombie⁽⁹⁾ (Tabela 1).

Contagem de motoneurônios no corno anterior da medula Foi utilizado para análise estatística o teste “t” pareado, onde é feito subtraindo-se os lados de cada um dos ratos e retirando-se o seu efeito individual. Em seguida testou-se a média das diferenças chegando a zero, demonstrando não haver diferença entre os grupos.

Utilizamos ainda o teste de Wilcoxon que se utiliza as diferenças entre os postos de cada rato e o teste de Mann-Whitney que trabalha com as médias dos postos de cada um grupos, sem retirar o efeito individual dos ratos. Nesses dois testes também não houve diferença estatística.

RATOS	LADO DIREITO Enxerto de músculo denaturado coberto com veia	LADO ESQUERDO Enxerto convencional
1	257	250
2	705	657
3	1054	916
4	1331	1358
5	438	465
6	268	239
7	594	697
8	540	564
9	523	466
10	437	393
11	385	442
12	840	767
13	690	677
14	1258	1301
15	811	744

Tabela 1 - Número de células contadas nos lados direito e esquerdo da medula, corrigidas pelo critério de Abercrombie, para secção de 40 µm.

DISCUSSÃO

Foram utilizados ratos jovens (60 dias) da raça Wistar por serem bem conhecidos biologicamente e amplamente utilizados em ensaios experimentais. A idade foi escolhida a fim de evitar a perda dos mesmos por doenças relacionadas ao envelhecimento⁽¹⁰⁾.

Dos 15/29 ratos operados foram utilizados no final do trabalho, pois durante o experimento, alguns problemas técnicos como perda do animal por insuficiência cardio-respiratória durante a anestesia, complicação pós-cirúrgica, má fixação ou crioproteção do tecido, entre outros, nos impossibilitaram de utilizar o restante dos animais. No entanto, como foram analisadas uma grande quantidade de células coradas em cada lâmina, este número de animais foi suficiente para que encontrássemos dados similares à literatura^(11,12).

A opção pela utilização da veia jugular externa se deve às vantagens que esta apresenta em comparação à veia femoral. Estas vantagens são: a) maior diâmetro – que permite melhor qualidade na sutura e cobre as extremidades dos cotos, evitando a formação de neuromas na sutura, b) não apresenta válvulas – evitando barreiras para o crescimento axonal⁽¹³⁾, c) o comprimento do vaso é suficiente para a tubulização e d) evita grande agressão tissular à pata do rato – por uma dupla incisão ao abordar o nervo lateralmente e o enxerto venoso medialmente.

O nervo tibial foi utilizado por dois motivos: diminui a morte celular e mimetiza as lesões periféricas comumente encontradas na clínica. Se fosse utilizado o nervo ciático para este trabalho, estaríamos correndo o risco de aparecer alguns problemas para os ratos, típicos de lesão dos membros inferiores, como: autofagia das partes insensíveis⁽¹⁰⁾, úlceras na pele⁽¹¹⁾ e dificuldade do animal em manter-se em pé para alimentar-se.

A utilização dos dois membros do mesmo animal foi feita devido às variações orgânicas particulares de cada rato, podendo comprometer a confiabilidade dos resultados na comparação dos métodos cirúrgicos propostos^(10,12).

A escolha do tamanho de 8mm para a perda de substância foi feita respeitando os limites descritos na literatura, de que esta medida não pode ultrapassar os 10 mm⁽¹⁴⁾.

No interior do enxerto de veia foi utilizado músculo denaturado em nitrogênio líquido⁽¹⁵⁾, por este apresentar menor taxa de redução do seu tamanho, que é de 42%, enquanto que a denaturação por microondas é de aproximadamente 89%⁽¹⁶⁾. A taxa de denaturação nos músculos utilizados neste trabalho foi de aproximadamente 20%. Este dado foi obtido através da medida anterior e posterior ao processo de denaturação.

O tempo estabelecido de 4 meses de intervalo entre a primeira e segunda cirurgia se deu pelo fato de que este tempo é suficiente para a regeneração do nervo⁽⁴⁾, tornando o estudo mais confiável, pois desta forma o nervo não sofrerá alterações biológicas decorrentes do envelhecimento, mantendo a sua estrutura original. Alguns autores, no entanto, consideram que o tempo ideal entre os procedimentos é de 5 meses⁽¹⁷⁾.

Após a secção do nervo tibial, na primeira cirurgia, os ratos claudicavam ambas as patas traseiras, ao passo que, na segunda abordagem, mostravam-se clinicamente bem e sem atrofias. A dissecação do plano cirúrgico foi mais fácil na pata que recebeu enxerto de músculo coberto com veia, concordando com os achados da literatura⁽¹⁸⁾. Vale ressaltar que este dado é interessante e possibilita aplicação clínica nos casos em que a diminuição da reação cicatricial é importante, como no tratamento de recidivas das síndromes compressivas⁽¹⁹⁾.

Para a análise da regeneração nervosa, utilizamos o Fluoro-Gold® como marcador neuronal retrógrado na concentração de 3%, mas a concentração pode variar de 2-4%. Este marcador fluorescente permite a observação direta ao microscópio, sem a necessidade da utilização de cromógenos, o que torna mais fácil a reprodução do experimento⁽¹²⁾. Esta observação direta baseia-se na presença do marcador, transportado retrogradamente até o corpo celular⁽²⁰⁾ permitindo, assim, a representação do nervo na medula.

O aspecto negativo na utilização do Fluoro-Gold® como marcador neuronal, reside no fato de que ao ser iluminado durante a análise, a fluorescência perde a intensidade progressivamente, impossibilitando a reavaliação da mesma lâmina.

Durante a perfusão transcardíaca, foi utilizada a solução de sacarose que protege o tecido das agressões do congelamento, permitindo melhor visualização e análise do tecido a ser avaliado.

Este importante passo foi observado por outros autores^(10,12).

Para evitar a contagem da mesma célula mais de uma vez em diferentes cortes, foi utilizado o fator de correção estabelecido por Abercrombie⁽⁹⁾ para cortes de 40µm. Os resultados foram apresentados na forma de valor absoluto e valor corrigido (Tabela 1), mas a análise estatística foi feita com base nos valores corrigidos.

Foram utilizados três testes estatísticos para definir se havia diferença significativa entre as técnicas empregadas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos, portanto o enxerto de músculo denaturado coberto com veia apresenta um número semelhante de células marcadas quando comparadas com o método de enxerto simples.

Não foi possível comparar os resultados deste trabalho com os dados da literatura, pois não foi encontrada nenhuma relação entre o enxerto de músculo e veia nos trabalhos revisados.

Oliveira⁽¹⁴⁾, utilizando enxerto de músculo desnaturado comparado com enxerto nervoso convencional, também não apresentou diferença estatística entre os dois métodos.

Dois dos animais utilizados apresentaram menor número de células contadas, porém as diferenças entre os dois lados mantiveram certa proporcionalidade, que não alterou a análise estatística.

Foi utilizada a associação do enxerto de músculo com veia, baseado no princípio de que o nervo lesado produz grande quantidade de substâncias regeneradoras de axônios⁽¹¹⁾ e a veia, sendo um sistema tubular com permeabilidade seletiva, evitaria a dispersão destas substâncias, facilitando a regeneração nervosa. O músculo denaturado manteria a membrana basal, funcionando como um sistema de apoio para os neurônios em regeneração.

CONCLUSÃO

Não detectamos diferença estatística entre os grupos tratados com enxerto nervoso convencional e enxerto de músculo denaturado com nitrogênio líquido coberto com veia autógena.

AGRADECIMENTO

Agradecemos às Dras. Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti, Débora Amado Scerni, Maria José da Silva Fernandes e D. Hilda pelo apoio técnico e experimental para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramon y Canal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford University Press, 1928.
2. Altissimi M, Mancini GB, Azarrà A. Results of primary repair of digital nerves. *J. Hand. Surg.*, 1991, 16B: 546-547.
3. Glück T. Ueber neuroplastic auf dem wege der transplation. *Archs Klin Chir*, 1880, 25: 606-616.
4. Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derives from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982, 253: 1-12.
5. Chiu DTW, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery* 1982, 91(2): 226-233.
6. Weiss P. The technology of nerve regeneration a review. *Sjutureless tabulation and related methods of nerve repair. J Neurosurg* 1944, 1: 400-449.
7. CIOMS/OMS. Council for International Organizations of Medical Services. WHO Distribution and sales service, 1211 Geneva 27, Switzerland. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals.
8. Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery* 1994; 15: 176-8.
9. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 1946, 94: 239-247.
10. Leite VM. Estudo do comportamento das lesões altas do nervo ciático através da utilização de Fluoro-Gold® e horseradish peroxidase como marcador neuronais (tese). São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1994.
11. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of peripheral nerve regeneration by the isolation nerve segment. *Annals of Plastic Surgery* 1986, 16(6): 494-500.
12. Moscalcoff MCS. Estudo comparativo de neurografia término-terminal com neurografia termo-lateral utilizando o Fluoro-Gold® como marcador neuronal (tese). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 1997.
13. Wang KK, Costas PD, Jones DS. Sleeve insertion and collagen coating improve nerve regeneration through vein conduits. *J Reconstructive Microsurgery* 1993(b), 9(1): 39-48.
14. Oliveira EF. Enxerto de músculo-esquelético nas lesões de nervo ciático de ratos (tese). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
15. Whitworth H, Doré C, Hall S, Green CJ, Erengghi, GT. Different muscle graft denaturing methods and their use for nerve repair. *Br J Plast Surg* 1995, 48(7): 492-9.
16. Leniham DV, Carter AJ, Glasby MA. An electrophysiological and morphological comparison of the microwave muscle graft and the freeze-thawed muscle graft. *Br J Plast Surg* 1998, 51(4): 300-6.
17. Aldskogius H, Thomander L. Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles after facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain Res.* 1986, 375: 126-134.
18. Lundborg G, Rosén B, Danielsen N. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm. Early results from a prospective, randomized and clinical study. *J Hand Surgery* 1997, 22A: 99-106.
19. Varitimidis SE, Riano F, Vardakas DG. Recurrent compressive neuropathy of the median nerve at the wrist: treatment with autogenous saphenous vein wrapping. *J Hand Surgery* 2000, 25B(3): 271-5.
20. Taylor DCM, Pierav, K, Schmid H. The use of fluorescent tracers in the peripheral sensory nervous system. *J Neurosci Meth* 1983, 8: 211-224.