

ESTUDO DA REGENERAÇÃO DE NERVOS TIBIAIS DE RATOS WISTAR EM SUTURA PRIMÁRIA COM “GAP” E SEM “GAP”, COBERTOS POR SEGMENTOS DE VEIA

STUDY OF TIBIAL NERVE REGENERATION IN WISTAR RATS IN PRIMARY NEURORRHAPHY WITH AND WITHOUT GAP, WRAPPED IN VEIN SEGMENTS

Ewerton Bastos dos Santos, Marcela Fernandes, João Baptista Gomes dos Santos, Vilnei Mattioli Leite, Sandra Gomes Valente, Flávio Faloppa

RESUMO

Objetivo: O presente estudo comparou, em ratos da raça Wistar, a regeneração nervosa nas suturas epineurais com espaçamento de 1,0mm (com “gap”) e sem espaçamento (sem “gap”), ambos cobertos com tubo de veia jugular externa, através da contagem de motoneurônios no nível da medula espinhal entre L3 e S1, marcados por meio de exposição do nervo tibial ao Fluoro – Gold (FG). **Método:** Os nervos tibias de ambos os lados foram seccionados e foram realizadas suturas epineurais com “gap” e, no lado contralateral, sem “gap” sendo que as suturas foram cobertas com tubo de veia. Após quatro meses do procedimento cirúrgico, os nervos tibias foram expostos ao FG, perfundidos e realizada a contagem dos motoneurônios na medula espinhal. **Resultados:** Para a análise estatística foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado, onde obtivemos um resultado estatisticamente significativo entre o número de motoneurônios do grupo com “gap” em relação ao sem “gap” ($p=0,013$). **Conclusão:** Obtivemos melhores resultados na contagem de motoneurônios daqueles nervos onde haviam sido realizadas as suturas primárias sem “gap”, quando comparados com as suturas com “gap”. **Nível de Evidência: Estudo Experimental.**

Descritores: Corantes fluorescentes. Regeneração nervosa. Nervo tibial. Ratos Wistar. Técnicas de sutura.

ABSTRACT

Objective: This study compared nerve regeneration in Wistar rats, using epineural neurorrhaphy with a gap of 1.0 mm and without a gap, both wrapped with jugular vein tubes. Motor neurons in the spinal cord between L3 and S1 were used for the count, marked by exposure of the tibial nerve to Fluoro-Gold (FG). **METHOD:** The tibial nerves on both sides were cut and sutured, with a gap on one side and no gap in the other. The sutures were wrapped with a jugular vein. Four months after surgery the tibial nerves were exposed to Fluoro-Gold and the motor neuron count performed in the spinal cord. **RESULTS:** The results were statistically analyzed by the paired Wilcoxon test. There was a statistical difference between the groups with and without gap in relation to the motor neuron count ($p=0.013$). **CONCLUSION:** The epineural neurorrhaphy without gap wrapped with jugular vein showed better results for nerve regeneration than the same procedure with gap. **Level of Evidence: Experimental Study.**

Keywords: Fluorescent dyes. Nerve regeneration. Tibial nerve. Wistar rats. Suture techniques.

Citação: Santos EB, Fernandes M, Santos JBG, Leite VM, Valente SG, Faloppa F. Estudo da regeneração de nervos tibiais de ratos wistar em sutura primária com “GAP” e sem “GAP”, cobertos por segmentos de veia. Acta Ortop Bras. [online]. 2012;20(3): 165-9. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>

Citation: Santos EB, Fernandes M, Santos JBG, Leite VM, Valente SG, Faloppa F. Study of tibial nerve regeneration in Wistar rats in primary neurorrhaphy with and without gap, wrapped in vein segments. Acta Ortop Bras. [online]. 2012;20(3): 165-9. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

O tratamento da lesão de nervos periféricos exige um conhecimento detalhado da anatomia e fisiologia dos mesmos e é obtido através de experiências clínicas e trabalhos experimentais. O objetivo do reparo de lesões nervosas é restaurar a sensibilidade e função muscular normais. A restauração da função, após a lesão de um nervo, requer o crescimento dos axônios acometidos através da distância entre a lesão e o órgão alvo. Nesta situação, quando realizamos trabalhos experimentais com animais (ratos),

encontraremos diferença no tempo do estudo já que a regeneração exige distâncias relativamente pequenas.

Há relatos do uso de enxertos arterial e venoso em experimentos animais, com a vantagem de serem autógenos.¹ Foi demonstrado, experimentalmente, que a luz da veia tem capacidade de regenerar nervo, servindo como conduto para o crescimento axonal. Este estudo foi realizado através da observação clínica e eletrofisiológica da regeneração de nervos ciáticos de rato usando diferentes modelos de enxerto de veia autógenos,² concordando com outros

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São Paulo, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP.
Correspondência: Marcela Fernandes. Rua Borges Lagoa, 786. Vila Clementino - 04038-001 - São Paulo - SP Brasil.
e-mail: fernandesmarcela@hotmail.com

Artigo recebido em 12/08/2011, aprovado em 19/01/2012

Acta Ortop Bras. 2012;20(3): 165-9

autores que afirmaram que as veias oferecem substratos biológicos para regeneração axonal.³ Em trabalhos nacionais houve demonstração da melhora da contagem de motoneurônios utilizando tubos de veia.^{4,5}

Vários pesquisadores têm defendido as suturas com “gaps curtos” que variaram, na literatura, entre 0,5 a 5,0mm,⁶⁻⁹ sendo que em um dos estudos, utilizando lesão e reparo em nervo femoral de ratos com “gap” de 0,5mm entre os cotos foi observada desorientação nos axônios dos motoneurônios nas primeiras duas semanas, havendo melhora nas semanas seguintes devido a interação de fatores tróficos entre os axônios.⁶ Valero-Cabré et al.¹⁰, quando compararam técnicas de sutura, utilizando tubos de silicone, observaram que quando aplicada às suturas com “gap”, não há melhora do processo de reinervação. Visto que na literatura foram encontrados bons resultados com técnicas utilizando coberturas com veias,^{3,4,8} objetivamos neste estudo comparar as suturas com “gap” e sem “gap” cobertas com veia, através análise quantitativa da regeneração nervosa, pela contagem de motoneurônios na medula.

OBJETIVOS

Comparar, utilizando contagem de neurônios marcados com Fluoro-Gold®, os resultados da regeneração nervosa dos nervos tibiais de ratos Wistar, através da neurografia término-terminal, com “gap” e sem “gap” cobertos com enxerto de veia.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM. Todos

os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento do animal, de acordo com a International Ethical Guidelines.¹¹

Foram utilizados 20 ratos da raça Wistar, machos, com peso médio de 250 g e idade média de oito semanas, mantidos em condições controladas com ciclo claro/escuro (12/12 h), temperatura 21± 2°C, com livre acesso à água e ração.

Supondo diferença de pelo menos 10 motoneurônios, em média, entre a sutura com “gap” e a sutura sem “gap”, com confiança de 95% e poder de amostra de 80%, a amostra necessária neste estudo seria de 16 animais ao todo. Esperando uma perda de animais no decorrer do estudo, foram operados, então, 20 animais. Ao final dos experimentos, chegamos a um total de 11 animais, devido às perdas ao longo das etapas do trabalho.

Cada animal recebeu anestesia intraperitoneal com solução anestésica composta por hidrato de cloral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,25 g), propilenoglicol (4,28 ml), álcool etílico absoluto (11,5 ml), água destilada (45,7 ml) e thionembatal 3%.^{4,5} Com o animal posicionado em decúbito dorsal, utilizando microscópio e instrumental microcirúrgico, fizemos uma incisão cervical anterolateral para a retirada de um segmento de 12 mm de comprimento de veia jugular externa. (Figura 1A) O animal foi então posicionado em decúbito ventral e realizamos uma incisão pósterolateral em ambas as coxas, para dissecar o nervo ciático e suas ramificações: sural, peroneiro e o tibial. Seccionamos ambos os nervos tibiais e realizamos a sutura epineural com “gap” na pata direita e sem “gap” no contralateral, sendo que o segmento de veia cobriu as suturas.² (Figura 1B, C, D) Após quatro meses, os animais foram submetidos à nova cirurgia para exposição dos nervos tibiais ao marcador neuronal FG.¹²

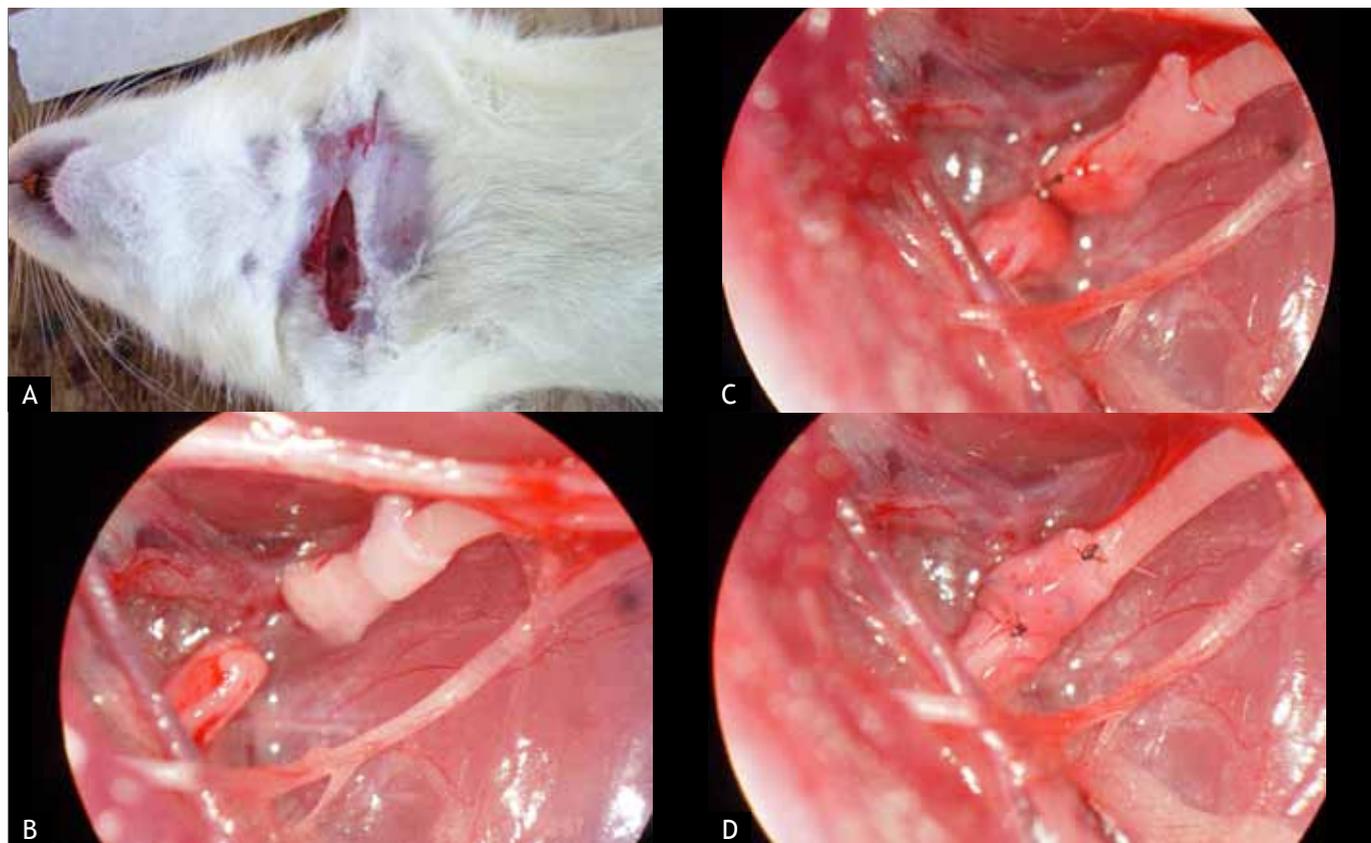


Figura 1. Via de acesso para retirada da veia jugular externa (A). Nervo tibial seccionado com tubo de veia recolhido no coto proximal (B). Neurografia com “gap” de 1,0 mm entre os cotos (C). Aspecto final da neurografia com cobertura de veia reparada por dois pontos (D).

(Figura 2A) Após 48 horas, os animais foram anestesiados com thionembutal (50 mg/Kg, i.p) e sacrificados por perfusão transcardíaca¹³ com 50 ml de solução salina isotônica intracardíaca para limpeza do sistema vascular, 200 ml de paraformaldeído 4%, rapidamente em 10 minutos, 300 ml lentamente, em 20 minutos, 200 ml de tampão sacarose 10% rapidamente em 10 minutos, 300 ml lentamente, em 20 minutos.^{4,5} (Figura 2B) Ao término deste procedimento, com o animal em decúbito ventral, realizou-se a laminectomia dorsal e lombar.^{4,5} (Figura 3) Após a exposição da medula espinal, ressecamos o segmento correspondente de L3 a S1.^{4,5} Marcamos, então, um sulco na região dorsal deste segmento para indicar o lado direito.

As medulas foram seccionadas em cortes de 40 μ m e montadas em lâminas de vidro. As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Axiolab para evidenciar o FG. (Figura 4) Os cortes foram examinados em aumentos de 25 a 100 vezes e os neurônios motores marcados foram contados.¹² O número de motoneurônios obtidos foram corrigidos pelo critério de Abercrombie e Johnson¹⁴ para aumento de 40X, visando eliminar a contagem de um mesmo motoneurônio em seções diferentes, pois é possível, com esta espessura, que o corpo celular apareça em mais de um corte seriado.



Figura 2. Marcação neuronal com FG do nervo tibial seccionado distal à neurorafia (A), Perfusão intracardíaca do rato com cateter na aorta após 48 horas da marcação neuronal (B).



Figura 3. Laminectomia com exposição da medula espinal de L3 até S1 e identificação das raízes espinais e segmento medular a ser removido para análise

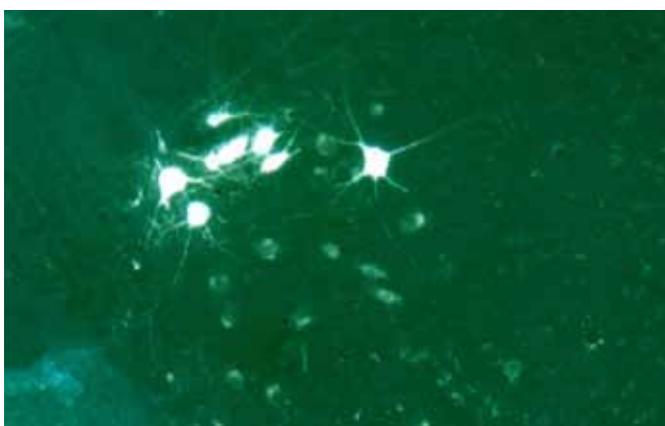


Figura 4. Visualização dos motoneurônios corados com Fluoro-Gold® em microscópio de fluorescência em aumento de 40X.

RESULTADOS

Após a contagem dos motoneurônios na medula dos 11 ratos, apresentamos seus resultados em valor corrigido pelo critério de Abercrombie e Johnson.¹⁴ (Tabela 1, Figura 5)

Tabela 1. Número de motoneurônios, corados com Fluoro-Gold® na medula espinal de ratos Wistar, corrigido pelo critério de Abercrombie para secção de 40 μ m

Ratos	Sutura com "GAP"	Sutura sem "GAP"
1	233	293
2	228	289
3	223	263
4	489	546
5	226	256
6	359	324
7	178	153
8	310	393
9	510	653
10	169	222
11	259	285
MÉDIA	289,4	334,3*

As suturas sem "gap" apresentam melhores resultados, quando comparadas com as suturas com "gap" (*p= 0,013).

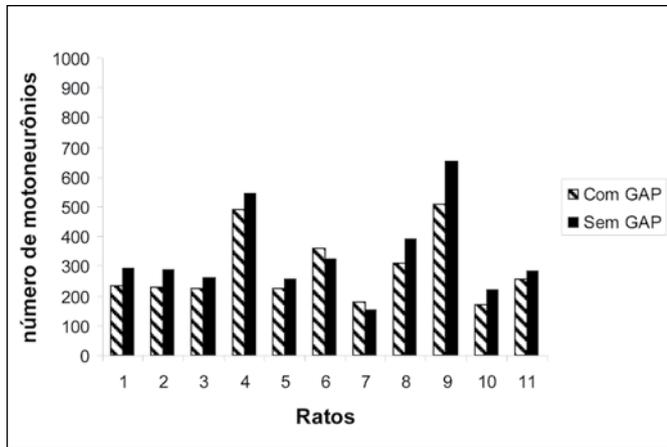


Figura 5. Representação dos números de motoneurônios na medula dos animais que foram operados com “gap” e sem “gap” para os 11 ratos.

Foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado para comparar o número de motoneurônios entre os grupos sutura com “gap” e sutura sem “gap” dos lados direito e esquerdo, respectivamente, no mesmo rato. O teste mostrou que o número de motoneurônios com “gap” é estatisticamente menor do que o sem “gap” ($p = 0,013$).

DISCUSSÃO

Vários métodos para reparação de nervos periféricos lesados vêm sendo propostos nas últimas décadas.

A tubulização, que consiste na introdução das extremidades distal e proximal de um nervo dentro de uma estrutura tubular contendo ou não substâncias que promovam a regeneração axonal, foi primeiramente testada com osso descalcificado, entre as duas extremidades do nervo periférico.¹⁵

O material ideal para a tubulização seria: de baixo custo, inerte (biocompatível), fino, flexível, bioabsorvível, inibidor dos processos inflamatórios (fibrose, glioma, neuroma, edema, isquemia e aderência) e beneficiadores dos processos que contribuem para a regeneração (acumuladores dos fatores que promovem o crescimento do nervo).^{16,17} O tubo de veia autógena é uma opção de material que preenche muito destes critérios.

Estudos concluíram que os nervos regeneram através da luz da veia² e foram demonstrados na microscopia eletrônica.¹⁸ Observações comparando veias demonstraram que a veia jugular como neurotubo, apresenta qualidade superior na regeneração de nervos quando comparada com a veia femoral.¹⁹ Vários pesquisadores têm obtido melhores resultados quando utilizaram tubos de veia.^{3,5,19} Iniciamos nosso trabalho com 20 ratos operados, sendo que perdemos 09 durante etapas diversas: anestesia, perfusão ou má qualidade dos cortes histológicos observados na microscopia.

Determinamos quatro meses de intervalo entre a primeira e a segunda cirurgia, pois este tempo é o suficiente para a regeneração do nervo.²⁰ Sendo assim após esse período, o estudo da regeneração neuronal torna-se mais confiável por se saber que o nervo não sofrerá maiores alterações biológicas, aproximando-se de sua estrutura original.¹⁹

Para analisar a regeneração nervosa utilizamos a marcação neuronal retrógrada com FG[®], na concentração 3%. O FG[®] foi escolhido para avaliação do resultado das suturas devido a sua baixa toxicidade em curto prazo, facilidade de uso e por se tratar de um método não subjetivo, rápido e reprodutível.²¹ Este marcador é

fluorescente e permite sua observação direta ao microscópio sob o uso de filtros, sem reação química com cromógeno, permitindo mais fácil reprodução em outras experiências.^{1,22} Além disso, é um método de estudo quantitativo tão importante quanto os outros métodos também quantitativos, como no caso da eletrofisiologia, em que seus resultados são objetivos e bem definidos², baseia-se na observação direta da presença de marcadores transportados retrogradamente até o corpo celular,^{1,21} permitindo a representação do nervo no nível da medula. Sendo o interesse do trabalho demonstrar a reconexão da periferia com o SNC, utilizamos o transporte axonal retrógrado com FG para visualizar os motoneurônios no corno anterior da medula. Em um trabalho anterior⁵ utilizamos a análise histomorfométrica e tentamos correlacionar com os achados da marcação axonal retrógrada com FG e concluímos que o motoneurônio apresenta um axônio e este, quando lesionado, pode gerar diversos brotamentos axonais na tentativa de atingir o órgão alvo. Apesar da densidade de fibras estarem aumentada, mostrando brotamento axonal, este brotamento nem sempre atinge o órgão alvo com efetividade. Sendo assim, nem todos os motoneurônios da medula apresentam marcação com FG, apesar do número de fibras estarem aumentada. O número de fibras contadas não tem relação com o número de motoneurônios na medula. Como o objetivo principal era avaliar a reconexão da periferia com o SNC, utilizamos apenas a metodologia do FG.

Durante a dissecação para marcação neuronal com FG[®], observamos em 09 ratos a presença de uma fibrose mais intensa no lado com “gap” quando comparado ao lado sem “gap”. Na literatura encontramos que o tubo de veia forma uma fibrose mais intensa, quando utilizado.⁷

Considerando-se a possibilidade de uma mesma célula ser contada mais de uma vez em diferentes cortes histológicos, usamos o fator de correção estabelecido por Abercrombie e Johnson¹⁴ para cortes de 40 μm , em que se multiplica o resultado por 0,65, na tentativa de eliminar o erro de contagem do mesmo corpo celular em seções diferentes.

Estudos sugerem que axônios são atraídos por influências químicas e que isso pode ser melhorado deixando-se um “gap” entre os cotos do nervo ao invés da sutura sem “gap”.^{8,23} Não encontramos durante nossa revisão bibliográfica trabalho que mostrasse evidências negativas contra as suturas com “gap”, sendo que nossa dúvida foi em escolher o “gap” ideal. Os “curtos gap” citados na literatura variam de 0,5 a 5,0mm⁶⁻⁹ sendo que achamos 0,5mm uma distância muito pequena já que quando seccionamos o nervo e o reparamos, com o próprio edema dos cotos, perderíamos esta distância. Optamos pelo “gap” de 1,0mm, mas não encontramos na literatura trabalhos realizados com este espaçamento.

Trabalhos comparando sutura com “gap” e sem “gap”, ambos tubulizados, em coelhos e macacos, concluíram que a utilização de pequeno “gap” melhorava a especificidade da regeneração nervosa.^{8,24} Os defensores da sutura com “gap” tubulizado acreditam que elas possuem as seguintes vantagens: menor trauma cirúrgico ao nervo porque seus cotos localizados dentro de um guia diminuiriam a quantidade de pontos na sutura.⁹ A presença do coto proximal em um guia levaria a migração distal axonal sem interposição de outros tecidos e sem desvio no alinhamento, melhorando a regeneração pelo acúmulo de fatores neurotróficos na luz do tubo.^{2,23,25} Ao final do estudo, a perda de animais foi maior do que a prevista, restando um total de 11 animais. Supondo a mesma diferença proposta de pelo menos 10 motoneurônios, em média, entre sutura com “gap” e sem “gap” e com a mesma confiança, o poder do

estudo ficou em 66%. Após o estudo estatístico encontramos, neste trabalho experimental, que o melhor método de sutura primária é aquele realizado sem "gap", pois este apresenta melhores resultados quando comparados com as suturas com "gap".

CONCLUSÃO

A sutura primária coberta por segmento de veia, em nervos tibiais de ratos Wistar, apresentam melhores resultados nas suturas sem "gap", quando comparados com as suturas com "gap".

REFERÊNCIAS

1. Weiss P, Taylor C. Further evidence against 'neurotropism' in nerve regeneration. *J Exp Zool.* 1944;95(2): 233-57.
2. Chiu DTW, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein grafts as a conduit for nerve regeneration. *Surgery.* 1982;91(2):226-33.
3. Ferrari F, De Castro Rodrigues A, Malvezzi CK, Dal Pai Silva M, Padovani CR. Inside-out vs. standard vein graft to repair a sensory nerve in rats. *Anat Rec.* 1999;256(3):227-32.
4. Fernandes M, Valente SG, Amado D, Fernandes MJS, Naffah-Mazzacoratti MG, 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.* 2007;15(2):97-100.
5. Fernandes M, Valente SG, Fernandes MJ, Félix EP, Mazzacoratti Mda G, Scerni DA et al. Bone marrow cells are able to increase vessels number during repair of sciatic nerve lesion. *J Neurosci Methods.* 2008;170(1):16-24.
6. Brushart TM. Preferential motor reinnervation: a sequential double-labeling study. *Restor Neurol Neurosci.* 1990;1(3):281-7.
7. Heijke GC, Klopffer PJ, Dutrieux RP. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. *Microsurgery.* 1993;14(9):584-8.
8. Hasegawa J, Shibata M, Takahashi H. Nerve coaptation studies with and without a gap in rabbits. *J Hand Surg Am.* 1996;21(2):259-65.
9. Scherman P, Lundborg G, Kanje M, Dahlin LB. Sutures alone are sufficient to support regeneration across a gap in the continuity of the sciatic nerve in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2000;34(1):1-8.
10. Valero-Cabré A, Tsonis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *J Neurotrauma.* 2004;21(1):95-108.
11. 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.
12. Leite VM. Estudo do comportamento das lesões altas do nervo ciático através da utilização de Fluoro-Gold e Horseradish Peroxidase como marcadores neuronais [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.
13. Valente SG, Marques RH, Baracat EC, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Amado D. Effect of hormonal replacement therapy in the hippocampus of ovariectomized epileptic female rats using the pilocarpine experimental model. *Epilepsy Res.* 2008;82(1):46-56.
14. Abercrombie M, Johnson MI. Collagencontent of rabbit sciatic nerve during Wallerian degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1946;9(4):113-8.
15. Glück T. Ueber Neroplastik auf dem wege der transplation. *Archs Klin Chir.* 1880;25:606-16.
16. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989;33(2):87-134.
17. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein, silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg.* 1995;35(3):266-71.
18. Colonna M, Anastasi GP, Cavallaro G, Signorini M, Tomasello F. Nerve regeneration through autogenous vein grafts: an SEM evaluation. *J Reconstr Microsurg.* 1996;12(4):205-10.
19. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Jones DS, Seckel BR. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1993;14(9):608-18.
20. Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982;253(1-2):1-12.
21. Taylor DC, Pierau FK, Schmid H. The use of fluorescent tracers in the peripheral sensory nervous system. *J Neurosci Methods.* 1983;8(3):211-24.
22. Moscalcoff MCS. Estudo comparativo de neurorrafia término-terminal com neurorrafia término-lateral utilizando o Fluoro-Gold® como marcador neuronal [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.
23. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. Case report. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1991;25(1):79-82.
24. Mackinnon SE, Dellon AL, Lundborg G, Hudson AR, Hunter DA. A study of neurotrophism in a primate model. *J Hand Surg Am.* 1986;11(6):888-94.
25. Seckel BR, Chiu TH, Nylas E, Sidman RL. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. *Plast Reconstr Surg.* 1984;74(2):173-81.