

Luís Carlos Letti Manozzo

ENCAPAMENTO DO COTO NERVOSO COM FÁSCIA  
MUSCULAR NA PREVENÇÃO DO NEUROMA, PÓS-SECÇÃO  
DE NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Cirurgia Plástica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Corrêa Chem

Porto Alegre, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA-CIRURGIA

Luís Carlos Letti Manozzo

ENCAPAMENTO DO COTO NERVOSO COM FÁSCIA  
MUSCULAR NA PREVENÇÃO DO NEUROMA, PÓS-SECÇÃO  
DE NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR

Porto Alegre, 2003.

Luís Carlos Letti Manozzo

ENCAPAMENTO DO COTO NERVOSO COM FÁSCIA  
MUSCULAR NA PREVENÇÃO DO NEUROMA, PÓS-SECÇÃO  
DE NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Curso de Pós-Graduação em Cirurgia, área de concentração Cirurgia Plástica, da Universidade do Rio Grande do Sul.

Aprovada em:

Banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> \_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> \_\_\_\_\_

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS – FIGURAS E GRÁFICOS.....	5
RESUMO.....	7
OBJETIVOS.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
1 TRATAMENTO.....	17
1.1 MÉTODOS TERAPÊUTICOS.....	17
1.1.1 Bloqueios nervosos.....	18
1.1.2 Ligadura do coto proximal.....	19
1.1.3 Implantação em músculo.....	20
1.1.4 Anastomose centro-central.....	21
1.1.5 <i>Laser</i> .....	23
1.1.6 Implantação/encapamento com veia.....	24
1.1.7 Criocirurgia.....	26
1.1.8 Imunoistoquímica.....	26
1.2 PREVENÇÃO DOS NEUROMAS.....	27
1.3 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1 PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	47
2.1.1 Da preparação dos cortes e confecção das lâminas.....	48
2.2 CAPTURA E ANÁLISE DE IMAGEM.....	49
3 RESULTADOS.....	55
3.1 ESPESSURA MÉDIA DA BAINHA DE MIELINA.....	55
3.2 NÚMERO MÉDIO DE FIBRAS MIELINIZADAS POR MILÍMETRO QUADRADO.....	59
4 DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70
ANEXO.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Método de lavagem com concentrações crescentes de acetona.....	47
Tabela 2	Valores (em micras) da média, do desvio padrão, mínimo e máximo, da espessura média da bainha de mielina para os diferentes grupos.....	56
Tabela 3	Valores (em micras) da mediana e intervalos e amplitudes interquartílicos da espessura média da bainha de mielina, para os diferentes grupos.....	56
Tabela 4	Comparação entre os grupos para a espessura média da bainha mielínica pelo teste da soma de postos de <i>Wilcoxon</i> ..	59
Tabela 5	Valores da média, desvio padrão, mínimo e máximo, do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos.....	60
Tabela 6	Valores da mediana e intervalos e amplitudes interquartílicos, do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos.....	60
Tabela 7	Comparação entre os grupos para número médio de fibras mielinizadas pelo teste t.....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Técnica de anestesia intraperitoneal.....	30
Figura 2	Imobilização com fita adesiva e tricotomia.....	31
Figura 3	Microscópio cirúrgico e material de microcirurgia.....	32
Figura 4	Animal anestesiado, posicionado sob o microscópio, fixado na placa de cortiça e material microcirúrgico.....	34
Figura 5	Campo cirúrgico (à esq.) e marcação da incisão (à dir.).....	34
Figura 6	Incisão da pele (à esq.) e posicionamento dos afastadores (à dir.).....	34
Figura 7	Identificação da fáscia muscular (visão sob microscópio).....	35
Figura 8	Coleta do enxerto de fáscia muscular.....	35
Figura 9	Padronização do enxerto com o auxílio de papel milimetrado (5mm por 5mm).....	35
Figura 10	Identificação do nervo ciático.....	36
Figura 11	Preparo para o encapamento (à esq.) e posicionamento do enxerto sob o nervo ciático (à dir.), antes da sutura microcirúrgica.....	36
Figura 12	Encapamento do nervo ciático com enxerto de fáscia muscular, através de 4 ou 5 pontos com fio de náilon 10-0.....	36
Figura 13	Nervo ciático já encapado, sendo preparado para a secção através do uso de instrumento apropriado para esse fim.....	37
Figura 14	Lâmina de bisturi n. 11 sendo introduzida na pinça de secção nervosa. O nervo ciático é seccionado, e o encapamento fica preso ao coto proximal.....	37

Figura 15	Coto proximal encapado com enxerto de fáschia muscular.....	38
Figura 16	O coto distal é identificado (à esquerda, preso por pinça) e ressecado (à direita sobre a pele).....	38
Figura 17	Coto proximal encapado e reposicionado em seu local de origem.....	39
Figura 18	Fechamento.....	39
Figura 19	Sutura epineural no nervo ciático com fio de náilon 10-0.....	41
Figura 20	Nervo ciático já seccionado, coto proximal com pontos microcirúrgicos evidenciados pelo instrumento.....	41
Figura 21	Coto proximal sem encapamento (grupo-controle) devolvido ao seu leito original.....	42
Figura 22	Animais acondicionados em gaiolas, aguardando o prazo de 45 dias para a segunda etapa do procedimento.....	43
Figura 23	Preparo para coleta dos neuromas, 45 dias após o primeiro procedimento. Animal posicionado sob micriscópio e material microcirúrgico.....	44
Figura 24	Coto proximal do nervo ciático e o neuroma.....	45
Figura 25	Coto proximal e neuroma ressecados em uma peça cirúrgica de aproximadamente 2 cm de comprimento.....	45
Figura 26	Neuroma (na ponta à direita da figura) e fragmento do nervo ciático presos com pontos em haste plástica.....	46
Figura 27	Haste plástica com a peça cirúrgica em solução fixadora.....	46
Figura 28	Histologia do neuroma. Pode-se perceber as células de Schwann e o tecido conjuntivo que dá suporte aos nervos. Neurônios seccionados podem ser vistos como pontos vermelhos circundados por uma zona clara de mielina, que, por sua vez, é cercada por fibras de tecido conjuntivo.....	50
Figura 29	Tela de medição da espessura da bainha de mielina.....	51
Figura 30	Tela de contagem do número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado.....	52
Figura 31	Histologia do neuroma não encapado (coloração pelo azul de toluidina).....	53
Figura 32	Imagem histológica de neuroma encapado (coloração pelo azul de toluidina).....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	<i>BOXPLOT</i> para a espessura média da bainha mielínica dos diferentes grupos.....	57
Gráfico 2	Gráfico de probabilidade normal para espessura média da bainha mielínica.....	58
Gráfico 3	<i>BOXPLOT</i> do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos.....	61
Gráfico 4	Gráfico de probabilidade normal do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos.....	62
Gráfico 5	Gráfico das médias do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos.....	64

## RESUMO

**Introdução:** Danos em nervos periféricos não somente resultam em perda da função nervosa, como também em regeneração anormal e formação de neuromas dolorosos. A dor, associada à lesão nervosa, é um importante problema de saúde ainda não completamente resolvido. Pacientes portadores da enfermidade podem ter uma limitação de qualidade na vida, tornando-se até mesmo inaptos a utilizar próteses como em neuromas pós-amputação de extremidades. O encapamento com materiais diversos (silicone, veia, perineuro, etc.) é uma técnica conhecida para o tratamento e a prevenção de neuromas. Entretanto, o uso de fáschia muscular é uma proposta em investigação.

**Objetivo:** Comparar a espessura média da bainha de mielina e o número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado em dois grupos de ratos. Um grupo onde foi realizado encapamento do coto do nervo ciático com fáschia muscular e um grupo-controle.

**Métodos:** Trinta ratos foram submetidos à secção do nervo ciático esquerdo. Em um grupo, o nervo ciático foi seccionado e o coto proximal encapado com enxerto de fáschia muscular através de microssutura. No outro grupo não foi feito o encapamento. Após 45 dias, os ratos foram sacrificados e os neuromas preparados para análise histomorfométrica computadorizada.

**Resultados:** Para a quantificação da formação de neuromas em cada grupo de ratos foram usadas duas variáveis: a mensuração da espessura média da bainha de mielina e o número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado. Esses dados foram obtidos através de análise histomorfométrica computadorizada. Verificou-se diferença significativa entre os grupos a 5% ( $p=0,0232$ ) no que se refere à espessura média da bainha de mielínica, segundo o teste da soma de postos de Wilcoxon. O grupo experimental revelou mediana maior (0,4211) das espessuras médias da bainha mielínica em relação ao controle (0,3919). Pelo teste t, para a variável número médio de fibras mielinizadas, não se verificou diferença significativa entre os grupos a 5% ( $t=1,041$ ;  $GL=27$ ;  $p=0,3073$ ).

**Conclusão:** Houve melhor formação de bainha de mielina no grupo onde foi realizado o encapamento com fáschia muscular. Bainhas de mielina melhor formadas parecem ser indicativas da formação de neuromas menos dolorosos, conforme dados da literatura. Não houve diferença entre os grupos quanto ao número médio

de fibras mielinizadas. O encapamento do coto nervoso com fáscia muscular poderia ser uma alternativa terapêutica no tratamento de neuromas dolorosos.

**Unitermos:** neuroma de amputação; prevenção de neuromas; ratos.



## **OBJETIVOS**

Comparar a espessura média da bainha de mielina e o número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado em dois grupos de ratos. Um grupo onde foi realizado encapamento do coto do nervo ciático com fáscia muscular e um grupo-controle.

## **INTRODUÇÃO**

Danos em nervos periféricos não somente resultam em perda da função nervosa, como também em regeneração anormal e formação de neuromas dolorosos.

Os neuromas são morbidades comuns. São uma das patologias mais freqüentemente encontradas pelos cirurgiões de pé e tornozelo. Podem ser muito dolorosos, levando a importante sofrimento físico e psíquico. A dor, associada à lesão nervosa, é um importante problema de saúde ainda não completamente resolvido. Pacientes portadores da enfermidade podem ter uma limitação na qualidade de vida, tornando-se até mesmo inaptos a utilizar próteses como em neuromas pós-amputação de extremidades.

## **HISTÓRICO**

No passado, houve uma série de dúvidas a respeito das possibilidades de intervenção em nervos periféricos. Tal pensamento deveu-se ao fato de as células nervosas serem classificadas como células permanentes, ou seja, caracterizam-se

por não se reproduzirem após o período embrionário. Ocorre que essas células, apesar de não se reproduzirem, possuem uma capacidade de crescimento e de regeneração que permite esperar reparação em zonas lesadas (21).

Segundo Clarke e O'Malley (1968), as primeiras descrições de sutura de nervos seccionados datam de 1210-1277 e foram realizadas por Saliceto, mas foi em 1873 que Hueter realizou a coaptação de cotos neurais com sutura epineural, e esta se consagrou como método cirúrgico básico de tratamento de lesões neurais (11).

Em 1892, Nissl demonstrou as alterações celulares retrógradas e a cromatólise resultantes de uma secção neural (15). No início do século passado, descobriu-se a eletrofisiologia neural, a função dos neurotransmissores e a conformação ultra-estrutural do sistema nervoso periférico (16 - 17).

Mitchel (1872) foi o primeiro a descrever sistematicamente os vários tipos de dor neuropática, vistos e tratados por ele na Filadélfia, durante a Guerra Civil americana (43).

A adequada restauração de um nervo lesado é crítica para a reabilitação funcional. Mesmo quando músculos e tendões são adequadamente reparados, uma restauração nervosa precária pode resultar em atrofia, alterações de sensibilidade ou na formação de dolorosos neuromas.

As conseqüências da lesão da fibra nervosa dependem da sua natureza, intensidade e do local lesado. Seddon, em 1947, na obra *Lesões cirúrgicas dos nervos periféricos*, estabeleceu os princípios que regem o procedimento de sutura de nervos periféricos (12). Existem predominantemente três tipos de lesão de fibras nervosas: neuropraxia, axonotmese e neurotmese. Na neuropraxia, não existe perda de continuidade axonal entre o neurônio e o músculo, ocorre apenas uma

interrupção da condução nervosa (bloqueio de condução), por uma lesão exclusivamente na bainha de mielina no nervo. Na axonotmese, a lesão acomete os axônios e, na neurotmese, ocorre perda de continuidade de todo o tronco nervoso (9). Nas amputações, onde ocorre uma neurotmese, os neuromas são muito comuns.

Os segmentos distais do nervo sofrem a chamada degeneração walleriana, descrita por Waller em 1850. Esse autor descreveu alterações importantes do processo de regeneração neural, sendo pioneiro em identificar a degeneração que ocorria no coto distal de um nervo seccionado em um sapo. Esta consiste na degeneração de axônios, da mielina e na fagocitose desses pelos macrófagos. Dessa forma, o axônio degenera-se totalmente, desde o ponto de lesão até o extremo distal do nervo (14). As células de Schwann exercem um papel fundamental no processo de migração de células inflamatórias para o nervo lesado, regulando a infiltração dos macrófagos (48). São elas também que produzem fatores de crescimento e servem como base para as unidades regenerativas (38).

Em nosso meio, Chem, em 1983, demonstrou experimentalmente a importância de realizar microneurorrafia com adequada aposição dos fascículos entre os dois cotos seccionados, através de sutura epiperineural superficial, a fim de alcançar melhores resultados (13).

MacKinnon (1985) e Dellon (1988) confirmaram a validade dos estudos de regeneração neural em ratos, salientando que a resposta celular é idêntica à apresentada em primatas. Constataram que apesar da rápida velocidade regenerativa, o processo celular é similar ao dos humanos. Em suas pesquisas, documentaram o processo de regeneração espontânea do nervo ciático em ratos (18 - 19).

Atualmente o rato é um dos modelos experimentais mais empregados para o estudo da regeneração neural, devido à facilidade de obtenção, manuseio ao fator e sobrevivência. Constitui uma fonte de tecido nervoso que apresenta na microscopia eletrônica características celulares indistinguíveis dos nervos periféricos da espécie humana. O modelo experimental mais comumente empregado é o do nervo ciático e seus ramos, nervo fibular e tibial posterior (20).

A morfometria — método de análise diagnóstica quantitativa com técnica semi-automatizada ou automatizada — foi uma grande conquista. Esse sistema consiste de um microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica que estão conectados a um microcomputador cujo programa analisa digitalmente a imagem microscópica. A maior vantagem do emprego do computador é permitir o armazenamento, a mensuração e a análise de dados histológicos numérica e objetivamente (20).

## **ETIOLOGIA DO NEUROMA**

Quando um nervo periférico é seccionado, uma parte do axônio permanece unida ao corpo neural. A essa parte denomina-se porção proximal. Ao fragmento do axônio que fica do outro lado, sem ligação com o corpo neural, denomina-se porção distal. No momento em que acontece uma lesão nervosa, ocorrem alterações tanto numa porção quanto na outra. A porção distal sofre degeneração walleriana. No corpo celular do neurônio danificado, desenvolve-se uma série de modificações na síntese protéica, preparando o axônio para a regeneração. Como consequência, no segmento proximal, cada fibra nervosa lesada tentará regenerar e emitirá uma série

de novas fibras (brotos nervosos). A formação do neuroma ocorre como resultado da regeneração desorganizada, quando os brotos nervosos não encontram um segmento distal adequado para seu crescimento. O crescimento arborescente das fibras nervosas do coto proximal, associado à reação cicatricial, forma o neuroma.

Na microscopia eletrônica de lesões nervosas periféricas, aparecem mudanças ultra-estruturais: a regeneração axonal inicia-se em 7 dias e é estimulada por fatores neurotróficos, que parecem desenvolver um papel importante nesse processo (41).

Há um substancial aumento do fluxo sangüíneo na fase precoce (do 2º ao 14º dias) da formação do neuroma em ratos. Entretanto, na fase crônica, ocorre isquemia, o que pode ser um impedimento à regeneração. Eventos locais que ocorrem no coto proximal são de considerável importância, já que podem determinar o microambiente para a regeneração nervosa. Dessa forma, o microambiente, onde o coto proximal está inserido, teria influência no desenvolvimento da dor neuropática (39).

## **ETIOLOGIA DA DOR NEUROMATOSA**

A dor proveniente do neuroma é produzida quando o tecido nervoso anormal, geralmente cercado por tecidos cicatriciais, é estimulado por pressão, tensão ou hipóxia.

Cravioto (1981) descreveu que neuromas dolorosos contêm um grande número de pequenas fibras não mielinizadas, aparentemente em quantidade muito maior que as mielinizadas. Com esse fato em vista, sugere que um grande número

de fibras não mielinizadas pode estar relacionado com os sintomas dolorosos em alguns pacientes (29). England (1998) detectou a existência de uma distribuição anormal de canais de potássio em neuromas humanos, o que poderia estar relacionado com a hiperexcitabilidade presente nessas lesões nervosas (36).

Existe uma grande variabilidade na intensidade da dor neuropática de paciente para paciente, mesmo quando o tipo de lesão parece ser idêntico. Alguns sofrem de severa e intratável dor de membro fantasma ou do coto de amputação, enquanto outros, com lesões muito semelhantes, não referem sintoma algum. Sugere-se então um padrão hereditário no desenvolvimento da dor neuropática. Esse fato foi comprovado em experiências com animais por Liu (2001). O autor indica que diferenças hereditárias (em ratos), na resposta elétrica em tipos específicos de células aferentes, parecem ser determinantes fundamentais no desenvolvimento da dor neuropática (44).

As hipóteses mais atuais a respeito dos mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática incluem uma distribuição anormal dos canais de sódio no neuroma. Excitabilidade persistente e anormal dos terminais sensitivos em um neuroma é considerado um dos mecanismos da dor do coto de amputação (43). Kretschmer (2002) descreve evidências, sugerindo que o acúmulo de canais de sódio na ponta axonal danificada deve ser responsável pela hiperexcitabilidade axonal ectópica e pelos resultantes fenômenos sensoriais como dor e parestesias. Subtipos de canais de sódio como PN1 e PN3 estão acumulados anormalmente em neuromas humanos (46).

O fator de crescimento nervoso aparentemente tem um papel na patogênese da formação do neuroma e no desenvolvimento da dor neuropática. O uso de

inibidores do fator de crescimento nervoso em um coto nervoso parece reduzir a formação de neuroma e de dor neuropática em ratos (50).



## 1 TRATAMENTO

### 1.1 MÉTODOS TERAPÊUTICOS

A primeira abordagem terapêutica na prevenção de neuromas deve ser focada na reconstrução do “gap” nervoso por reparo primário ou com enxertia, orientando os axônios regenerantes, para restabelecer sua função motora e/ou sensitiva. Quando isso não é possível, como em cotos de amputação onde não existe o coto distal, existem diversos métodos terapêuticos citados para a profilaxia e o tratamento de neuromas dolorosos, incluindo métodos cirúrgicos e não cirúrgicos. Nos métodos não cirúrgicos, pode ser citada a injeção com substâncias diversas dentro do coto nervoso, como álcool, formalina, fenol e outros até a dessensibilização das vias de condução dolorosas. As alternativas não cirúrgicas têm resultados muito controversos na literatura, porque numerosos estudos incluíram pacientes que falharam a outras modalidades terapêuticas. Alguns tratamentos cirúrgicos visam alterar o meio ambiente do nervo amputado, transportando-o para dentro de um músculo ou osso. Outras alternativas cirúrgicas são o uso de retalhos para proteger a terminação nervosa de tecidos cicatriciais e o encapamento do nervo com materiais distintos, como silicone, enxerto nervoso ou de

epineuro, na tentativa de proteger da regeneração. Todos os métodos citados demonstraram eficácia. Entretanto, nenhum deles funciona universalmente (2).

O diagnóstico de neuroma de amputação é feito basicamente pela sintomatologia e história clínica. A Ressonância Nuclear Magnética é um ótimo meio de diagnóstico por imagem em neuromas de amputação de membros inferiores. Ela torna possível demonstrar as características patológicas do neuroma. É aconselhável que esse exame seja realizado na suspeita de neuroma pós-amputação de membros inferiores, pois ajuda a confirmar o diagnóstico e a estabelecer a topografia exata da lesão (68). A radiografia convencional deve ser o primeiro exame de imagem a ser solicitado após o exame clínico, para descartar dores de origem óssea, como osteomielite, ossificação heterotópica e outras. A ultrasonografia pode demonstrar alterações inflamatórias no coto de amputação, bem como coleções líquidas. Entretanto, a Ressonância Nuclear Magnética é o exame de escolha quando o exame clínico e outros exames de imagem são inconclusivos (69).

### 1.1.1 Bloqueios nervosos

O uso de bloqueios neurolíticos há muito vem sendo utilizado no tratamento de neuromas. O uso do álcool absoluto é amplamente difundido. Muitos estudos mostram tentativas terapêuticas com o uso de diversas substâncias químicas com o objetivo de deter o crescimento nervoso. Na maioria dos casos são tentativas empíricas pela falta do entendimento completo da fisiologia nervosa e dos mecanismos de reparação neural (2).

Pataky (1973) sugere o uso de triancinolona (27).

Williams (1984) sugeriu que o uso de bloqueios simpáticos com guanetidina pode ser útil em alguns pacientes não responsivos a outras técnicas de tratamento (26).

Brander (1989) injetou a toxina lectina-ricina no coto proximal de nervos ciáticos de ratos seccionados, para avaliar seus efeitos na formação de neuromas. Todos os animais tratados não mostraram evidências de elementos nervosos viáveis após um mês de tratamento. Todos os controles mostraram a formação de neuromas (28).

Kirvela (1990) utilizou bloqueios neurolíticos com fenol-glicerol em pacientes com dor intratável, decorrente de neuromas pós-amputação ou de outras cirurgias. O autor recomenda que os bloqueios sejam uma alternativa terapêutica quando a cirurgia fracassa (25).

O ultra-som é uma modalidade diagnóstica estabelecida para a avaliação dos neuromas. Pode ser útil na localização dos mesmos para a realização de terapêutica injetável (67).

### 1.1.2 Ligadura do coto proximal

Battista (1981) demonstrou que a formação de neuroma em nervo ciático de ratos é maior se o coto proximal for ligado como um todo, ao invés de simplesmente ser seccionado. O processo de formação neuromatosa parece ser mais intenso quando há ligadura em bloco do coto nervoso. Entretanto, quando a ligadura for fascicular, e o perineuro mantido intacto, o processo de regeneração axonal foi

atenuado, levando a uma menor formação de neuroma (23). O mesmo autor, também em 1981, demonstrou a não-formação de novos neuromas dezesseis meses após a ressecção destes e após a ligadura fascicular em humanos. Parece que manter o perineuro intacto, por meio de ligações seletivamente fasciculares, altera significativamente a regeneração axonal e a formação de neuromas também em humanos (37).

Yuksel (1997) comparou em humanos os efeitos protetores na formação de neuromas que a ligadura epineural, retalho ou enxerto de perineuro exercem sobre o coto nervoso. Encontrou que, quando se utiliza um enxerto de perineuro para cobrir o coto nervoso, ocorre uma significativa melhora na prevenção da dor do que quando comparados com outros grupos (33).

### 1.1.3 Implantação em músculo

A translocação do coto neural de estímulos nocivos, com a implantação desse coto em músculo ou osso, tem sido utilizada. Os primeiros relatos dessa técnica datam de 1918, no trabalho de Moszkowicz (10).

O sepultamento do coto no músculo ou no osso é o tratamento cirúrgico utilizado com maior frequência e apresenta bons resultados em relação à dor (80 a 90%). Mesmo quando há recorrência da formação do neuroma, após esse tipo de procedimento, em geral não há retorno da dor, já que o coto é posicionado distante de um local de fácil estimulação mecânica (70).

Dellon (1986) descreve técnica de tratamento de neuroma através da ressecção e implantação muscular. O trabalho de Dellon foi realizado em sessenta

seres humanos. Os neuromas foram ressecados e implantados dentro do ventre muscular, a uma distância de dois centímetros da superfície do músculo. O coto nervoso foi fixado sem nenhuma tensão com sutura epineural de náilon 6.0. Encontrou-se um alívio satisfatório da dor em 80% dos pacientes tratados (10). Esses dados são conflitantes em relação aos trabalhos de Laborde (1982), que relata resultados de um experimento de dez anos. A simples secção do neuroma e seu posterior implante no ventre muscular resultou em um inaceitável índice de recidiva de 65% (24).

Zhang (1997) identificou que, após a implantação muscular do coto nervoso, as fibras nervosas dispersaram-se entre as fibras musculares e não ocorreu a formação de um neuroma definido (51).

Brooks (2001) descreve uma nova técnica para implantação intramuscular do coto nervoso pós-excisão de neuroma periférico, utilizando a “âncora de tecidos moles de Mitek” (um tipo de agulha modificada). Indica que a técnica é capaz de posicionar o coto nervoso em uma profundidade e tensão precisas no tecido muscular com trauma mínimo (45).

Stahl (2002) descreve um alto índice de alívio da dor e melhoria funcional no tratamento cirúrgico de neuromas dolorosos do nervo cutâneo medial do antebraço, através de implantação do coto nervoso no músculo tríceps (47).

#### 1.1.4 Anastomose centro-central

A expressão *anastomose centro-central* é utilizada para descrever a conexão término-terminal entre grupos fasciculares pareados do coto proximal. Por

exemplo, em um coto de amputação digital, os cotos nervosos de ambos os lados do dedo são confrontados e suturados de maneira término-terminal. Essa conexão é realizada primariamente ou através de um enxerto de nervo interposto entre esses grupos fasciculares.

Em 1984, Gorkisch descreveu essa nova técnica cirúrgica para prevenção de neuromas de amputação na cirurgia de mão, confirmando em seres humanos os bons resultados obtidos previamente em animais (8).

Gonzalez (1985), em modelos de neuromas dolorosos em ratos, encontrou uma redução no tamanho do neuroma com esta técnica (32).

Barbera (1993) constatou que a dor típica de neuroma desapareceu em todos os casos tratados com a técnica. Entretanto, dores esporádicas e difusas permaneceram em alguns. Não houve melhora na sensação de membro-fantasma (31).

Low (1999) utilizou uma técnica término-lateral, suturando o coto nervoso à porção lateral de outro nervo. Conclui que essa técnica é um método terapêutico de sucesso na prevenção de neuromas. Em seu estudo, encontrou uma regeneração mais organizada e menor formação de neuroma quando comparados com o grupo - controle (3).

Um estudo em seres humanos (Belcher, 2000) pesquisou os efeitos da união centro-central na formação de neuromas após amputação digital. Concluiu que o resultado são cotos de amputação mais confortáveis. Entretanto, houve maior perda de sensibilidade nesse grupo, quando comparados ao controle (6).

Wood (1987) descreve o tratamento de cinco pacientes com dor intratável decorrente de neuromas desenvolvidos pós-amputação em nível do punho ou antebraço. O coto de nervo mediano foi ressecado e anastomosado no nervo ulnar

dentro do músculo pronador redondo. Em um paciente foi realizada a anastomose do nervo interósseo anterior ao nervo radial sob os músculos do antebraço. Os pacientes relataram uma melhora sintomática em torno de 80 a 90% de redução de dor. O autor sugere que esse procedimento é uma alternativa terapêutica que deve ser reservada quando todos os outros tratamentos falharem (30).

Smahel (1998), em uma revisão bibliográfica de 1998, indica que o potencial regenerativo dos axônios necessita ser reduzido gradualmente. Uma das técnicas que mais se aproxima desse ponto de vista é a anastomose centro-central e o encapamento dos terminais nervosos com enxerto de nervo ou veia (4).

Al-Quatan, em 2000, estudou a utilização de neurorrafia término-lateral na prevenção e no tratamento de neuromas dolorosos em ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: em um grupo, o nervo tibial foi seccionado e suturado em um padrão término-lateral no nervo peroneal adjacente. No outro grupo, o nervo tibial foi seccionado e implantado no subcutâneo. A análise histológica mostrou a formação clássica de neuroma no segundo grupo e a formação de um neuroma “não-clássico” no primeiro. O nervo tibial cicatrizou dentro do nervo peroneal, havendo continuidade com os perineuros (5).

#### 1.1.5 Laser

Aparatos modernos, como o *laser* Nd:YAG tem sido utilizados na tentativa de inibir a formação de neuromas.

Kuzbari (1996) irradiou cotos proximais de nervos seccionados de ratos com *laser* de CO<sub>2</sub>. Encontrou na análise morfométrica menos tecido conetivo, fibras

maiores em diâmetro e melhor mielinizadas do que no grupo-controle. Os dados o levaram a sugerir que o *laser* de CO<sub>2</sub> é eficaz na prevenção de neuromas (56).

Menovsky (1999) seccionou e coagulou difusamente o nervo ciático de ratos com o Nd-YAG *laser*. No lado contralateral, grupo-controle, o nervo ciático foi seccionado com uma microtesoura. A real formação de um neuroma não pode ser observada no grupo onde foi utilizado o *laser*, apenas em alguns casos foi percebida a formação de um bulbo neuromatoso, com mínima adesão aos tecidos adjacentes. No grupo-controle houve a formação de amplos neuromas de amputação. Os nervos seccionados com o *laser* mostraram alterações degenerativas na bainha de mielina, e não houve proliferação das células de Schwann. Não ocorreu crescimento de axônios além dos limites do coto proximal coagulado. Uma camada epiperineural foi evidenciada cobrindo o coto nervoso. Conclui-se que o uso do *laser* Nd-YAG é capaz de suprimir a formação de neuromas de amputação, pela coagulação térmica, e a supressão da proliferação das células de Schwann (34).

#### 1.1.6 Implantação/encapamento com veia

A implantação do coto neural em uma veia é uma técnica muito utilizada, pois são facilmente acessíveis e, por muitas vezes, estão próximas aos nervos.

Low (2000) implantou ramos do nervo femoral direito de ratos dentro da veia femoral. O epineuro foi suturado à túnica adventícia da veia em um dos lados, e o outro lado serviu como controle (foi feita somente a secção do nervo). A análise histológica dos controles mostrou a formação de neuromas maiores que no grupo do nervo implantado na veia. As fibras nervosas regeneradas foram encontradas



dentro da adventícia e da camada muscular das veias. Não houve penetração do tecido nervoso dentro do lúmen do vaso nem houve trombose (1).

Herbert estudou, em quatorze seres humanos, ao longo de cinco anos, os resultados da implantação do coto nervoso dentro do lúmen de uma veia. Onze pacientes evoluíram com redução sintomática significativa, dois apresentaram leve retorno nos sintomas, mas que não justificariam nova intervenção cirúrgica. Em um caso não houve resposta, indicou-se nova exploração cirúrgica e constatou-se que o coto nervoso havia se soltado da veia. Houve sucesso terapêutico com a realização de novo implante dentro do lúmen venoso (22).

Chiu, em 2000, relata um caso de múltiplos e recorrentes neuromas em um paciente com braço amputado, com uma história clínica de quinze anos, exemplificando assim as dificuldades terapêuticas dessa patologia. Várias modalidades cirúrgicas foram utilizadas, incluindo o sepultamento do coto nervoso em músculo e osso. Uma das técnicas utilizadas com sucesso foi o encapamento do nervo seccionado com um enxerto de veia autólogo. Sugere também que a utilização de enxerto de nervo seja uma alternativa terapêutica dessa patologia desafiadora (7).

Risitano (2002) sugere que, no atendimento de emergência de lesões de nervos sensitivos da mão, seja usado um enxerto de veia como conduto para a reparação nervosa, visando prevenir a formação de neuromas dolorosos (52).

Koch, em 2003, conduziu um estudo em animais para investigar a influência da transposição do coto dentro de uma veia na formação de neuromas. Encontrou diferenças significativas entre o grupo-controle e de tratamento, no que se refere ao tamanho do neuroma, à arquitetura endoneural, à relação tecido nervoso com tecido conjuntivo e à mielinização dos axônios. Seus dados dão a entender que o

procedimento de implantação em veia pode inibir a formação de neuroma clássico (53).

#### 1.1.7 Criocirurgia

A criocirurgia também é empregada para o tratamento de lesões nervosas.

Através de uma sonda criogênica, destrói-se o tecido nervoso, causando desmielinização e conseqüente degeneração walleriana do axônio. Como o perineuro e o epineuro são preservados, a formação de neuromas de amputação é prevenida (55).

Davies, em 2000, descreve o tratamento de seis pacientes com dor crônica, após dano nervoso com uma crio-sonda. Todos os pacientes mostraram melhora sintomática (35).

Caporusso (2002) estudou a eficácia da neuroablação criogênica em neuromas da extremidade inferior. Encontrou um índice de eficácia no alívio da dor, similar ao da cirurgia; entretanto, com um período de recuperação pós-procedimento mais rápido (40).

#### 1.1.8 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica abriu novas perspectivas de tratamento.

Dowsing (2001) demonstrou um aumento na produção de fator inibitório da leucemia em lesões nervosas e que essa produção retorna a níveis normais após a restauração da função do nervo. Quando ocorre a formação de neuromas, os níveis

podem permanecer elevados por anos. A relação entre a formação de neuromas e níveis persistentemente elevados de fator inibitório de leucemia permanece em estudos para ser esclarecida (54).

Harpf (2002), em um estudo imunoistoquímico de neuromas periféricos humanos e nervos digitais normais, revelou uma alta imunorreatividade ao fator de crescimento nervoso dos receptores p75 e trkA ao receptor do fator neurotrófico derivado da linha de células gliais GFRalfa-1. Imagens semi-quantitativas mostraram uma imunorreatividade aumentada ao trkS no grupo do neuroma, o que poderá influenciar futuras terapias através da administração de neurotropinas e outras substâncias (41).

Kretschmer (2002) demonstrou que espécimes de neuroma exibem consideravelmente maior imunofluorescência para canais de sódio e para a proteína anquirina G do que para nervos normais. Os neuromas dolorosos ainda mais. Modelos animais ligam a anquirina G com o acúmulo de canais de sódio nas pontas não mielinizadas dos axônios regenerantes. Talvez uma desregulação desses mecanismos seja o passo inicial da cascata que leva um neuroma a ser doloroso ou não (42).

## 1.2 PREVENÇÃO DOS NEUROMAS

A prevenção de neuromas é um problema cuja solução ainda está em estudo. Este trabalho visa contribuir para um melhor conhecimento das modalidades terapêuticas dos neuromas. Alguns estudos reportam sucesso nas técnicas de encapamento do coto nervoso, tendo resultados comparáveis às técnicas de

implantação no músculo ou osso. Outros, entretanto, não demonstram resultados tão promissores. A maioria das falhas do método de encapsamento, para inibir o crescimento axonal, é atribuída a erros, como o deslocamento da capa ou o crescimento nervoso através das capas. Existem relatos de bons resultados com a utilização de veia, mas a literatura é pobre no que diz respeito ao uso de fásia muscular. Hipoteticamente, esse tecido é mais resistente e de mais fácil obtenção do que veia, fato esse que motivou o presente estudo.

### 1.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de eficazes tubos condutores nervosos, por meio da biotecnologia, é uma interessante perspectiva para o tratamento de neuromas no futuro. A células de Schwann, obtidas por cultura, são provavelmente as células de escolha para introdução nos tubos (49).

Inibidores do fator de crescimento nervoso podem reduzir a formação de neuromas e o aparecimento da dor neuropática, sem danificar o corpo celular de neurônios cujos axônios foram seccionados (50).

Fármacos capazes de bloquear diferentes subtipos e subunidades de canais de sódio, anormalmente acumulados em neuromas, também são uma perspectiva terapêutica (46).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em 30 ratos do sexo feminino da raça Wistar, com peso médio de 212 gramas ( $\pm 30g$  foi admitido). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ficaram sob controle do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O tamanho da amostra foi estabelecido através da análise de diversos trabalhos prévios e semelhantes na literatura.

Realizou-se experimento-piloto em 10 animais, onde foram esclarecidos detalhes de anatomia, treinamento da técnica cirúrgica e anestésica e padronização de procedimentos. A anatomia do sistema nervoso do rato foi estudada a partir das descrições de Greene (57). Os animais foram mantidos por 45 dias. Na etapa seguinte, os cotos nervosos foram ressecados, preparados e estudados, como pretendido pelo trabalho propriamente dito.

Os procedimentos cirúrgicos foram todos realizados pela mesma equipe.

Obedeceram-se a todos os princípios éticos no tratamento dos animais, evitando dor e desconforto durante todas as etapas. No pós-operatório foram mantidos em gaiolas, sendo supridas as necessidades básicas de alimentação e conforto em consonância com os preceitos baseados no *Guide for the care and use*

*of laboratory animals. National Academy Press. Washington: D.C. 1996.* A Lei 9.605/98 de Crimes Ambientais e as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseccção de Animais, contidas na Lei 6.638 foram respeitadas. O trabalho também está de acordo com as Normas de Utilização de Animais em Projetos de Pesquisa da Comissão de Ética em Saúde/ GPPG/HCPA, Resolução Normativa 04/97.

Na anestesia utilizou-se cloridrato de zolazepam (Zoletil®) 50 mg/ml na dosagem de 1m/kg de peso associado a solução aquosa de cloridrato de dihidrodiazina (Rompum®) na dosagem de 0,33ml/kg de peso, por via intraperitoneal. (Figura 1) Na eutanásia, administrado superdosagem de tiopental sódico. Houve perda de três animais durante os procedimentos de anestesia e período pós-operatório.



**Figura 1:** Técnica de anestesia intraperitoneal

Após a anestesia, imobilizaram-se os animais em decúbito ventral em placas de cortiça revestidas por plástico, utilizando-se gentilmente fita adesiva. A seguir, anti-sepsia com álcool e tricotomia no membro inferior direito (Figura 2).



**Figura 2:** Imobilização com fita adesiva e tricotomia

O trabalho foi constituído de dois grupos com quinze animais cada: em um grupo foi feito o encapamento com fáscia muscular, a seguir denominado de grupo-experimento. No outro grupo, o nervo ciático foi simplesmente seccionado e a seguir será denominado simplesmente de grupo-controle.

O nervo ciático esquerdo de 15 ratos Wistar foi seccionado no nível médio da coxa, localização que foi medida em cada caso através de papel milimetrado, tendo como ponto de referência o início da bifurcação do nervo, procurando-se padronizar a altura da secção nervosa a 2 mm acima da bifurcação (3).

Após seccionados, os cotos proximais foram encapados com o enxerto de fáscia muscular, suturados com fio de náilon 10-0, agulha romba BV 130-5 (*Ethicon Inc.* São Paulo - SP-Brasil), numa média de 4 a 5 pontos. A sutura observou os princípios da técnica microcirúrgica atraumática. A hemostasia perineural foi feita apenas com compressão, e o campo cirúrgico foi mantido úmido com solução fisiológica durante todo o procedimento. O coto distal foi removido, para evitar reaproximação espontânea dos cotos, fato este que foi identificado no projeto-piloto.

Após, o nervo foi devolvido ao seu leito, os planos musculares fechados com fio de poligalactina 4-0 e a pele suturada com fio de náilon 6-0. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo autor com o auxílio de lupa cirúrgica e utilização de material específico para microcirurgia.

No grupo-controle foram executados todos os passos do grupo-experimento, exceto o posicionamento do enxerto no coto proximal. Houve coleta do enxerto (que foi desprezado) e sutura perineural com 4 ou 5 pontos e fio de náilon 10-0 da mesma forma que no grupo de intervenção.

A seguir descrever-se-ão detalhadamente todos os procedimentos cirúrgicos.

A cirurgia foi executada sob a visão de microscópio cirúrgico marca D.F. Vasconcellos. O material empregado foi específico para a realização de microcirurgia e constou de pinças, tesouras e porta-agulha de microcirurgia (Figura 3).

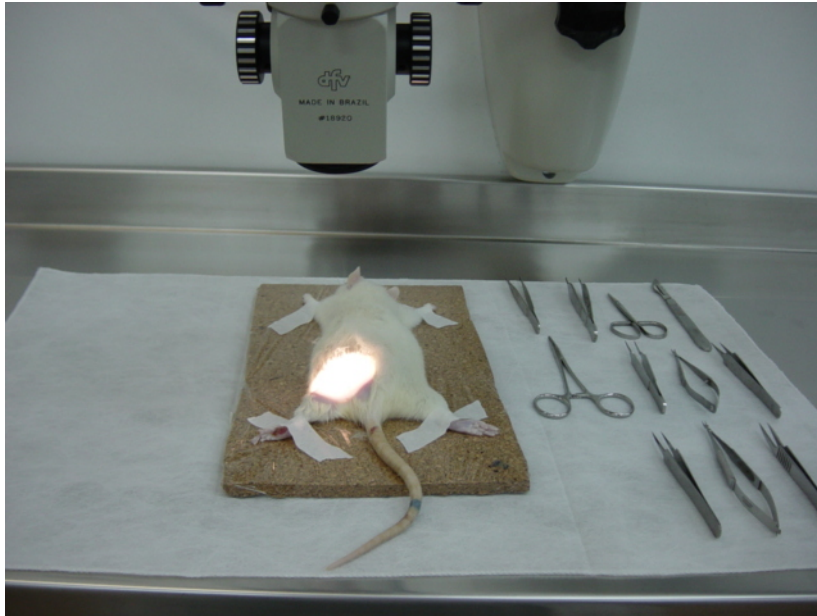


**Figura 3:** Microscópio cirúrgico e material de microcirurgia

No grupo-experimento, depois do posicionamento dos animais na placa de cortiça e da tricotomia do membro inferior esquerdo foram executados os seguintes passos:



- posicionamento do animal sob o microscópio (Figura 4);
- marcação da incisão da pele de 1,5cm (Figura 5);
- incisão com lâmina de bisturi n. 15, dissecação e posicionamento dos afastadores confeccionados pelos autores com arame de aço moldado e borracha tipo elástico (Figura 6);
- hemostasia com simples apreensão do vaso;
- identificação da fáscia muscular (Figura 7);
- coleta do enxerto da fáscia muscular (Figura 8);
- preparação e padronização do enxerto com o auxílio de papel milimetrado, formando um quadrado de 5 mm de altura por 5 mm de largura, sempre mantido em ambiente úmido em soro fisiológico (Figura 9);
- dissecação e identificação do nervo ciático (Figura 10);
- preparo para o encapamento, posicionando-se o enxerto de fáscia muscular sob o nervo ciático, antes da sutura microcirúrgica (Figura 11);
- sutura do enxerto da fáscia muscular no nervo ciático com fio de náilon 10-0, 4 ou 5 pontos, por meio de técnica microcirúrgica (Figura 12);
- preparo para a secção do nervo ciático, 2 mm acima do início de sua bifurcação. O nervo foi posicionado em uma pinça apropriada para secção nervosa (Figura 13);
- secção do nervo ciático com lâmina n. 11 através do instrumento para secção nervosa (Figura 14);
- o nervo ciático foi então dividido em coto proximal e distal. O encapamento com fáscia muscular fica junto ao coto proximal. Foi feito mais um ponto microcirúrgico para completar o encapamento junto à ponta seccionada do nervo (Figura 15);
- o coto distal é identificado e ressecado (Figura 16);
- o coto proximal encapado é devolvido ao seu leito original (Figura 17);
- fechamento por planos. Camadas musculares com fio de poligalactina 4-0 e pele com fio de náilon 6-0 (Figura 18).



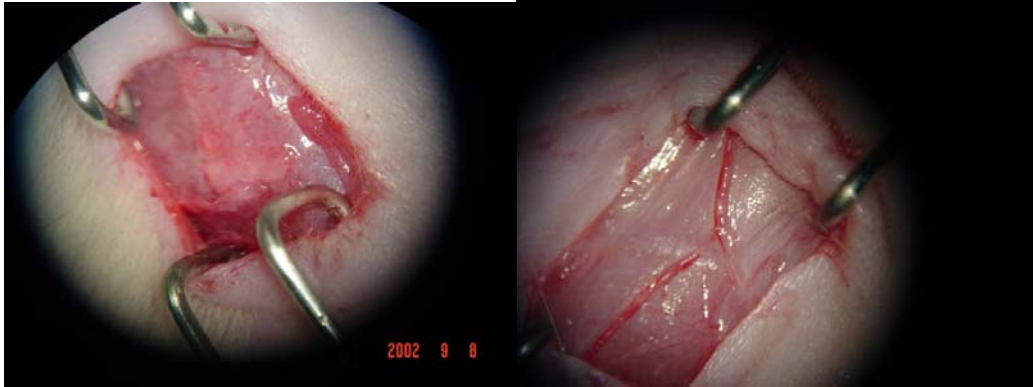
**Figura 4:** Animal anestesiado, posicionado sob o microscópio, fixado na placa de cortiça e material microcirúrgico



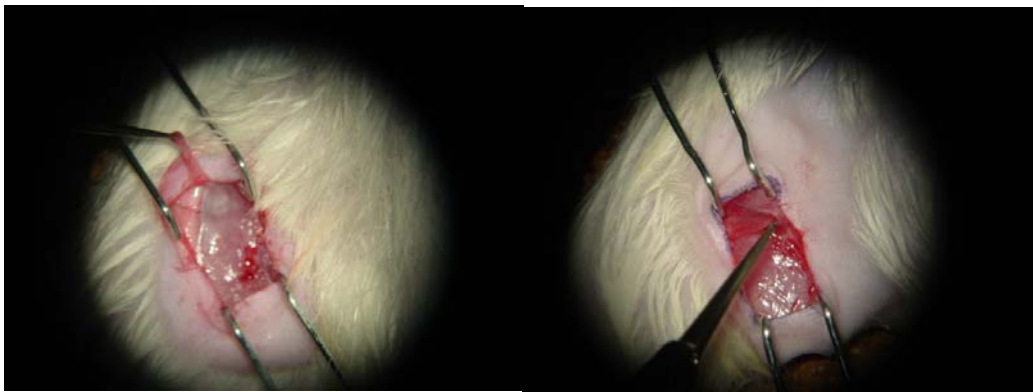
**Figura 5:** Campo cirúrgico (à esq.) e marcação da incisão (à dir.)



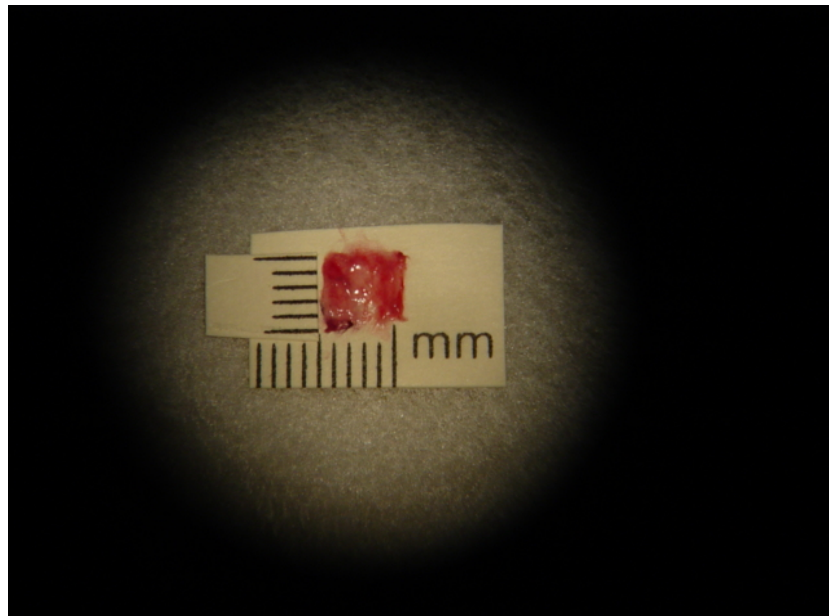
**Figura 6:** Incisão da pele (à esq.) e posicionamento dos afastadores (à dir.)



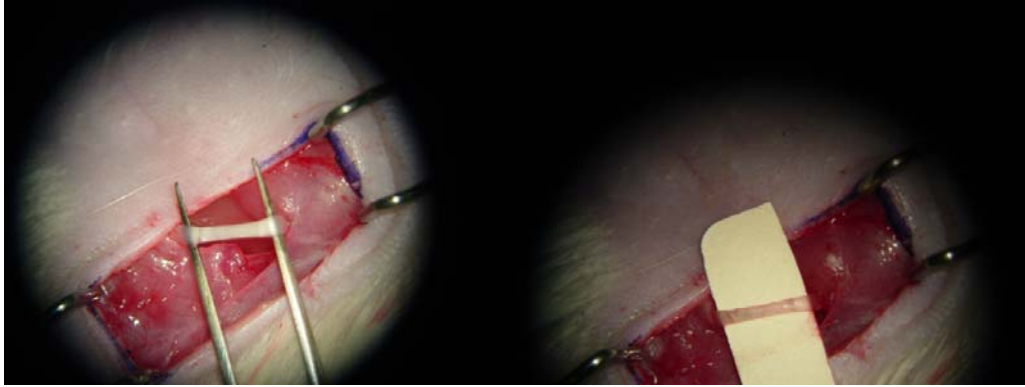
**Figura 7:** Identificação da fáscia muscular (visão sob microscópio)



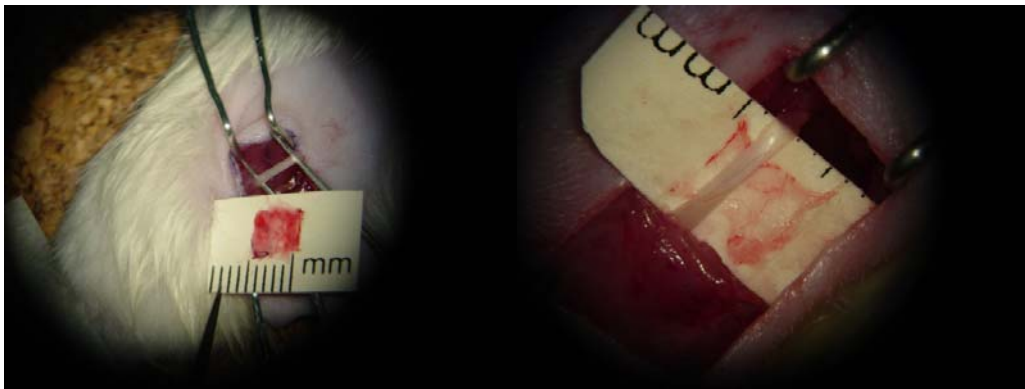
**Figura 8:** Coleta do enxerto de fáscia muscular



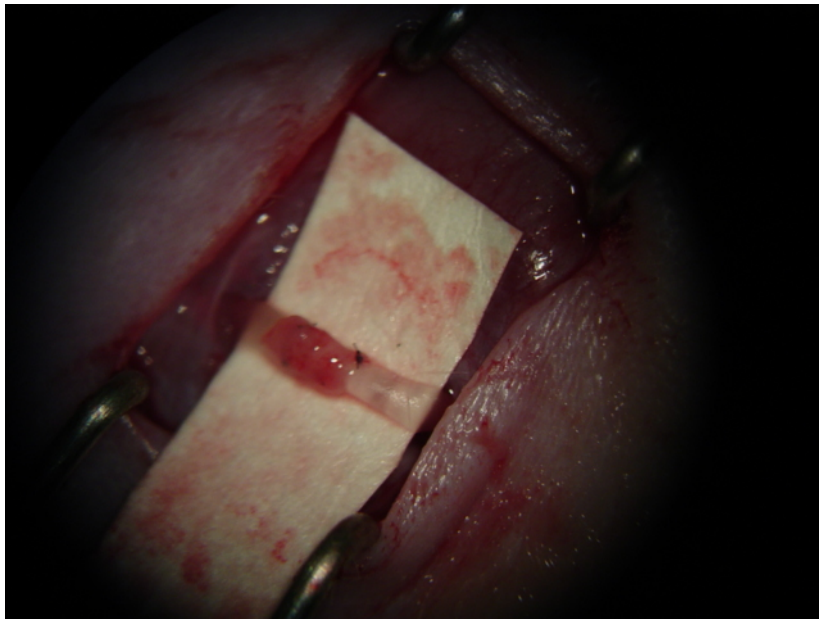
**Figura 9:** Padronização do enxerto com o auxílio de papel milimetrado (5mm por 5mm)



**Figura 10:** Identificação do nervo ciático

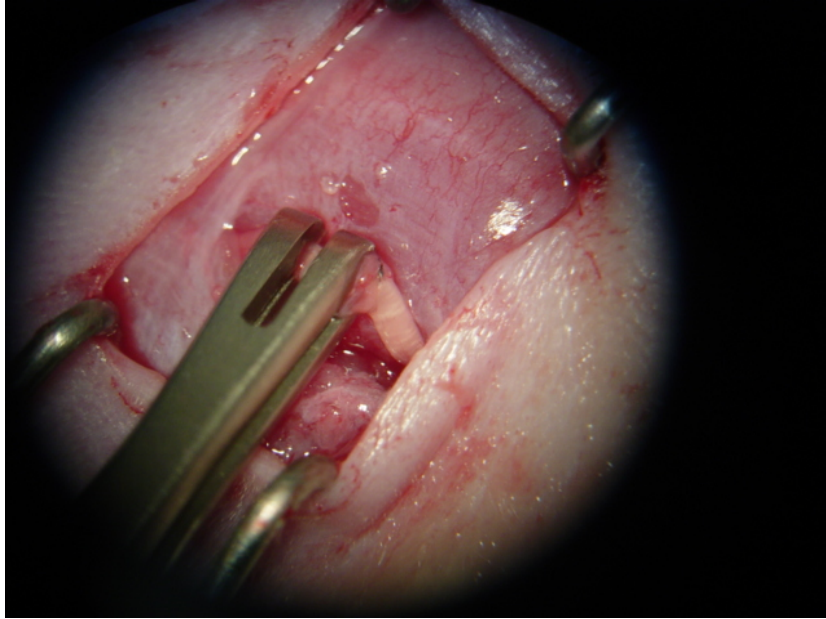


**Figura 11:** Preparo para o encapamento (à esq) e posicionamento do enxerto sob o nervo ciático (à dir.), antes da sutura microcirúrgica

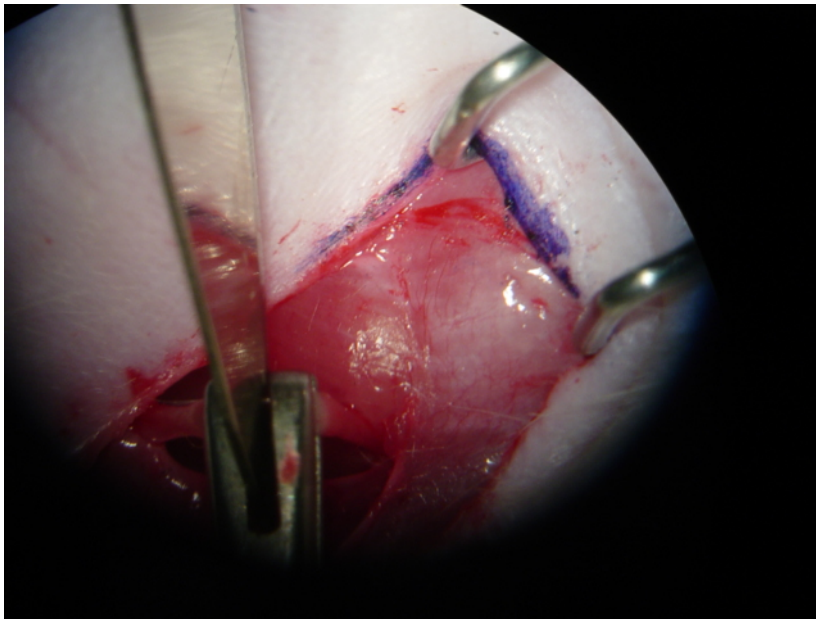


**Figura 12:** Encapamento do nervo ciático com enxerto de fáscia muscular, através de 4 ou 5 pontos com fio de náilon 10-0

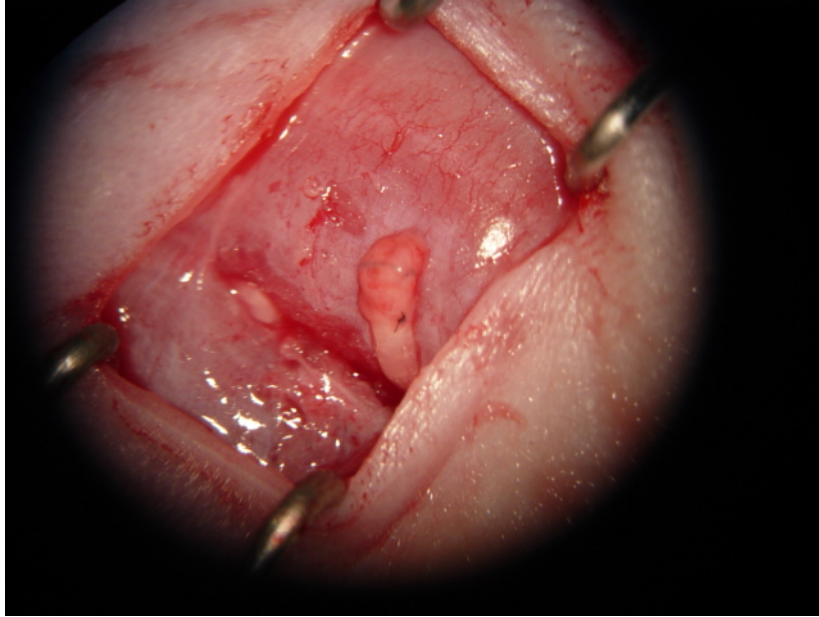




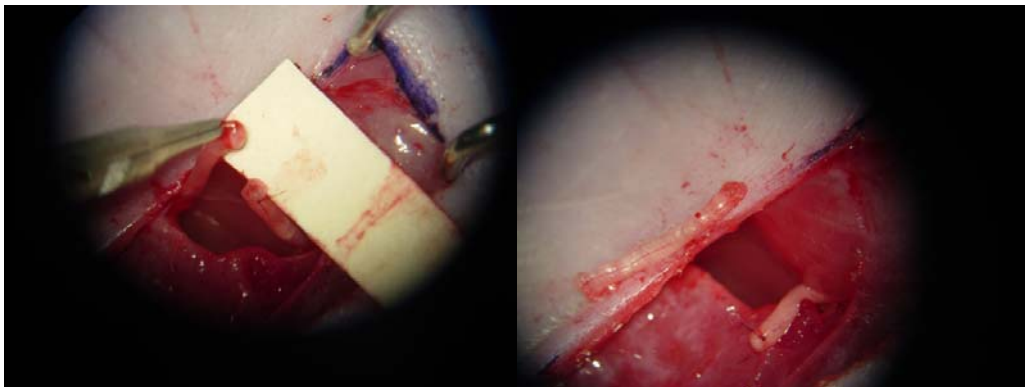
**Figura 13:** Nervo ciático já encapado, sendo preparado para a secção através do uso de instrumento apropriado para esse fim



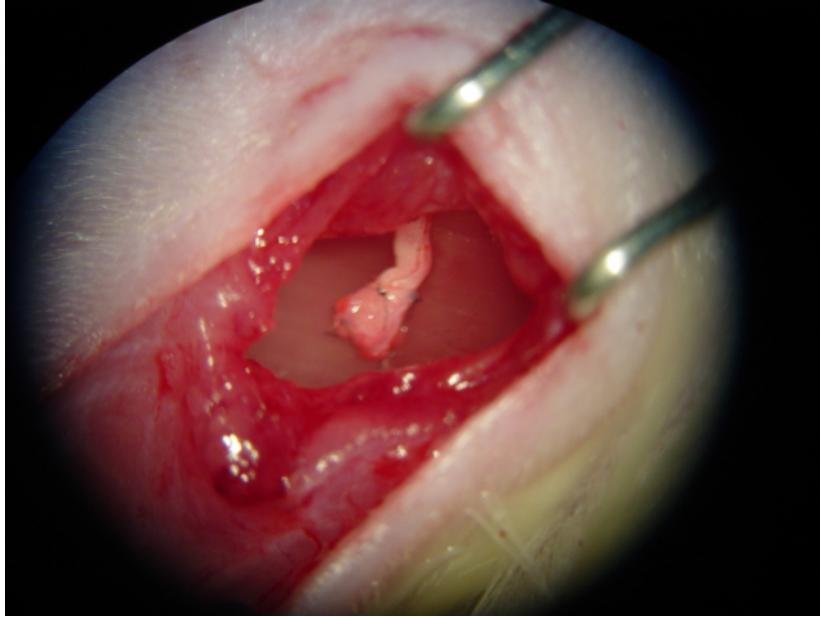
**Figura 14:** Lâmina de bisturi n. 11 sendo introduzida na pinça de secção nervosa. O nervo ciático é seccionado, e o encapamento fica preso ao coto proximal



**Figura 15:** Coto proximal encapado com enxerto de fásia muscular



**Figura 16:** O coto distal é identificado (à esquerda, preso por pinça) e ressecado (à direita sobre a pele)



**Figura 17:** Coto proximal encapado e reposicionado em seu local de origem



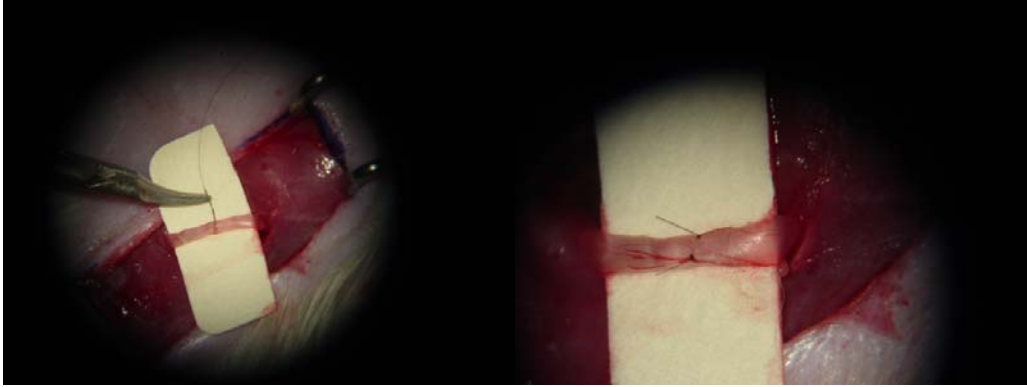
**Figura 18:** Fechamento

No grupo-controle, os procedimentos de anestesia e posicionamento dos animais foram executados de forma idêntica ao grupo-experimento.

Descrevem-se a seguir os passos cirúrgicos do grupo-controle:

- posicionamento do animal sob o microscópio (Figura 4);
- marcação da incisão da pele de 1,5cm (Figura 5);
- incisão com lâmina de bisturi n. 15, dissecação e posicionamento dos afastadores confeccionados pelos autores com arame de aço moldado e borracha tipo elástico (Figura 6);
- hemostasia com simples preensão do vaso;
- identificação da fáscia muscular (Figura 7);
- coleta do enxerto de fáscia muscular (Figura 8);
- o enxerto foi desprezado;
- dissecação e identificação do nervo ciático (Figura 10);
- sutura perineural com fio de náilon 10-0 4 ou 5 pontos sem o enxerto de fáscia muscular (Figura 19);
- preparo para a secção do nervo ciático, 2mm acima do início de sua bifurcação. O nervo foi posicionado em uma pinça apropriada para secção nervosa (Figura 13);
- secção do nervo ciático com lâmina n. 11 por meio de instrumento para secção nervosa (Figura 14);
- o nervo ciático foi então dividido em coto proximal e distal. O encapamento com fáscia muscular não foi realizado, sendo o único diferencial entre os dois grupos (Figura 20);
- o coto distal é identificado e ressecado (Figura 16);
- o coto proximal é devolvido ao seu leito original (Figura 21);
- fechamento por planos. Camadas musculares com fio de poligalactina 4-0 e pele com fio de náilon 6-0 (Figura 18).

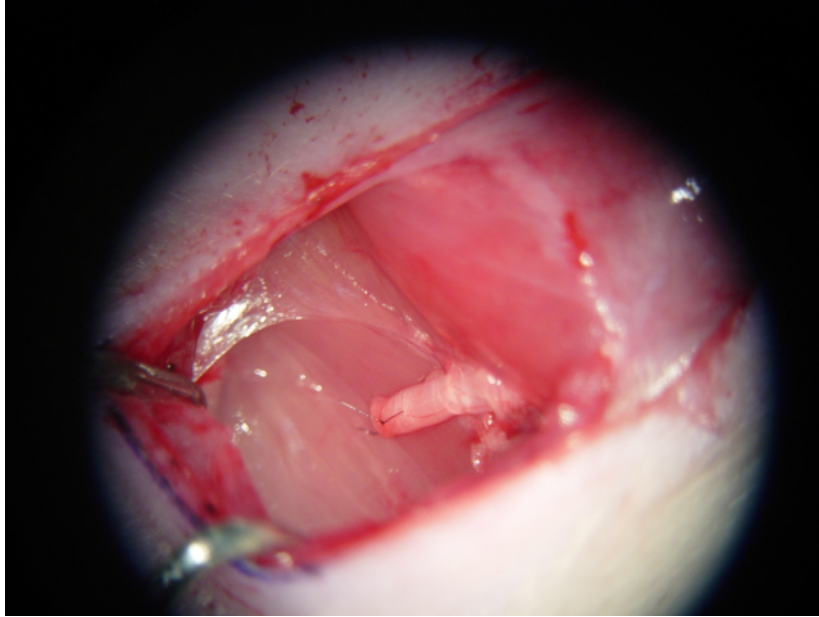




**Figura 19:** Sutura epineural no nervo ciático com fio de náilon 10-0



**Figura 20:** Nervo ciático já seccionado, coto proximal com pontos microcirúrgicos evidenciados pelo instrumento



**Figura 21:** Coto proximal sem encapamento (grupo-controle) devolvido ao seu leito original

Depois do procedimento cirúrgico os animais passaram por recuperação pós-anestésica.

Recuperados da anestesia, os ratos foram colocados em gaiolas apropriadas, recebendo ração comercial para ratos e água à vontade. Eram mantidos em sala adequada com controle de iluminação, temperatura e umidade (Figura 22).



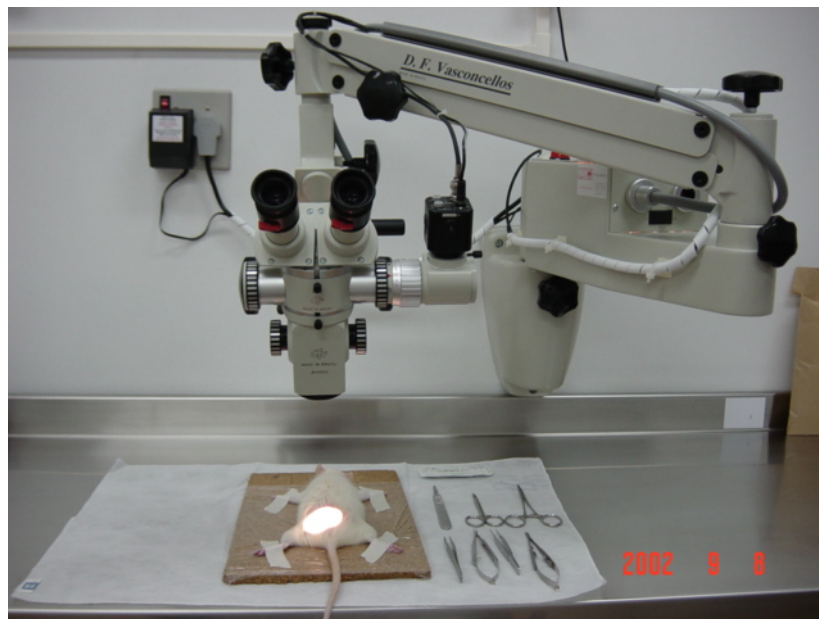
**Figura 22:** Animais acondicionados em gaiolas, aguardando o prazo de 45 dias para a segunda etapa do procedimento

Quarenta e cinco dias após, procedia-se à eutanásia, com superdosagem de tiopental sódico via intraperitoneal. Somente foi iniciado esse procedimento quando se tinha a certeza de que o animal não sofreria nenhum tipo de dor. O nervo ciático foi coletado de forma idêntica em ambos os grupos e preparado para fixação. A preparação consistiu em prender o nervo ciático através de sutura em uma haste plástica, para que o processo de fixação não causasse encolhimento do nervo ou artefatos que prejudicassem a análise histológica.

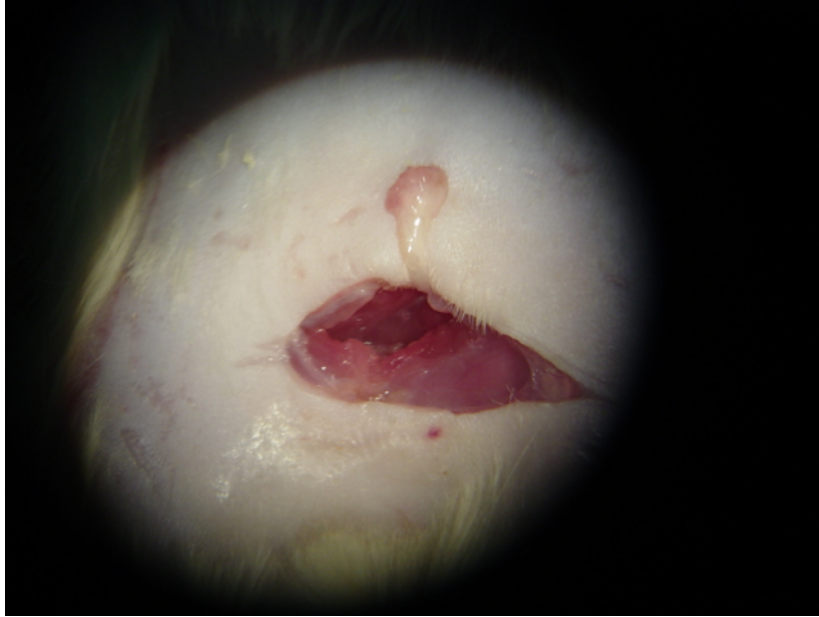
Descrição detalhada do processo de coleta dos neuromas após 45 dias:

- eutanásia dos animais com injeção em dose letal de tiopental sódico intraperitoneal;
- tricotomia do membro inferior esquerdo;
- posicionamento do animal sob microscópio e preparo do material microcirúrgico (Figura 23);
- marcação da pele, incisão com lâmina de bisturi n. 15;
- dissecação por planos até a identificação do nervo ciático;

- identificação do coto proximal do nervo ciático com o neuroma (Figura 24);
- ressecção do coto proximal e do neuroma, em uma peça cirúrgica de aproximadamente 2cm de comprimento (Figura 25);
- preparo da peça cirúrgica para fixação histológica. O nervo foi tracionado na horizontal, de forma que ficasse em linha reta, sem dobras ou torções que pudessem prejudicar posteriormente a análise histológica. Prendeu-se o coto nervoso em uma haste plástica através de pontos com fio de microcirurgia (náilon 8-0), para impedir o encolhimento do mesmo durante a fixação. Houve cuidados para não agredir a forma natural do neuroma com a sutura, buscando-se posicionar os pontos nos tecidos mais periféricos possível (Figura 26);
- fixação do coto nervoso com o neuroma em haste plástica, com solução fixadora formada por glutaraldeído à concentração de 2,5%, paraformaldeído a 2% e tampão fosfato 0,12M (Figura 26).



**Figura 23:** Preparo para coleta dos neuromas, 45 dias após o primeiro procedimento. Animal posicionado sob microscópio e material microcirúrgico

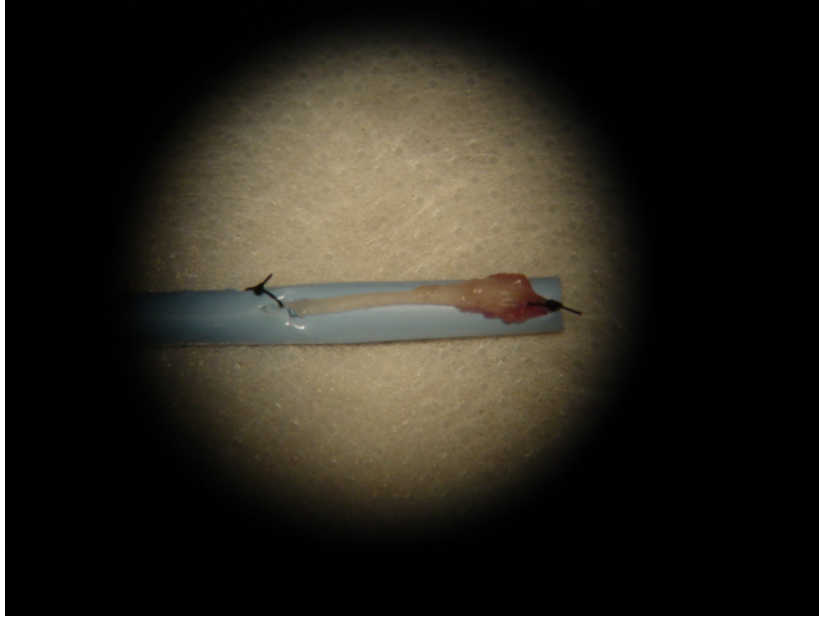


**Figura 24:** Coto proximal do nervo ciático e o neuroma



**Figura 25:** Coto proximal e neuroma ressecados em uma peça cirúrgica de aproximadamente 2 cm de comprimento





**Figura 26:** Neuroma (na ponta à direita da figura) e fragmento do nervo ciático presos com pontos em haste plástica



**Figura 27:** Haste plástica com a peça cirúrgica em solução fixadora

## 2.1 PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os nervos coletados *in vivo* foram imediatamente armazenados em uma solução fixadora formada por glutaraldeído à concentração de 2,5%, paraformaldeído a 2% e tampão fosfato 0,12M (Figura 27).

Na fase inicial de preparação, foram realizadas três lavagens (processo em que a amostra é submersa e mantida em repouso, também chamado de banho) consecutivas de 30 minutos com tampão fosfato 0,1M. Subseqüentemente, foi executada uma lavagem mais prolongada, de 45 minutos, composta por tetróxido de ósmio a 2% e tampão fosfato 0,2M na proporção de 1:1, chamada de pós-fixação. A seqüência de três banhos consecutivos de 30 minutos em tampão fosfato 0,1M foi repetida nesse momento.

O processo continua com a etapa de desidratação, realizada com lavagens em concentrações crescentes de acetona em tempos determinados, conforme ilustrado na tabela abaixo:

**Tabela 1:** método de lavagem com concentrações crescentes de acetona

<b>Concentração de acetona</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
30%	10
50%	10
70%	10
90%	10
90%	20
100%	10
100%	20

A pré-embebição foi feita com três banhos de duas horas cada. O primeiro em solução obtida através da mistura de duas partes de desidratante (acetona) para

uma de resina, seguido por um banho de uma parte de desidratante para uma de resina e outro de uma parte de desidratante para duas de resina.

Em seguida, na fase de embebição, a amostra foi submersa em resina pura e acoplada a um *Rotater* — dispositivo circular de 15 centímetros de diâmetro que gira na velocidade de uma rotação a cada dez segundos — permanecendo por um período de 24 horas.

Finalmente, a inclusão dos nervos foi feita em moldes de silicone com resina pura e armazenada em estufa com temperatura constante de 60° C por 72 horas.

#### 2.1.1 Da preparação dos cortes e confecção das lâminas

Os blocos de resina tiveram a amostra inclusa de maneira que o coto distal (encapado por fáscia muscular no grupo-experimento e livre no grupo-controle) fosse posicionado em contato íntimo com a periferia do bloco. Assim, eram trimados (processo de lapidação com estilete, ao microscópio, que expõe o máximo possível da amostra) e, enfim, preparados para cortes semifinos de 800 nanômetros de espessura no ultramicrótomo.

Foram feitos cortes subseqüentemente dispensados até que fosse possível a captação de unidades factíveis de serem analisadas, e, a partir desse ponto, dez eram obtidos consecutivamente e dispostas em seqüência à lâmina para que fosse possível sua orientação de proximal à distal no coto.

Terminada essa etapa, as lâminas passaram imediatamente à fase de coloração. Nesse momento, foram utilizados os corantes: azul de toluidina, fucsina e borato de sódio. Para esse processo, a lâmina era aquecida em aparato próprio e



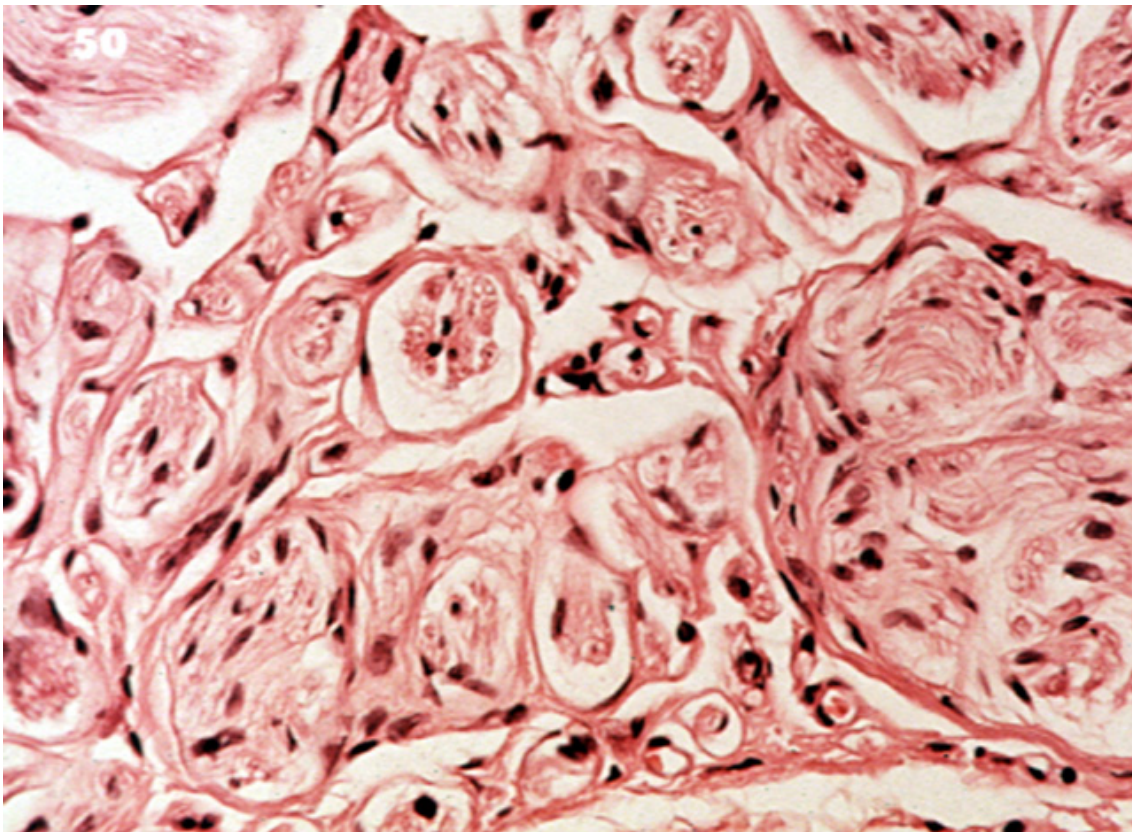
corada com azul de toluidina que permanecia por 30 (trinta) segundos e, após, foi lavada com água destilada até que todo o excesso de corante fosse retirado. Em seguida, a lâmina era novamente aquecida e, então, corada com solução de 1:1 de fucsina e borato de sódio, que permanecia por 30 (trinta) segundos, sendo lavada da mesma maneira com água destilada até a saída de todo o excesso de corantes. Terminado o processo de coloração, a lâmina era seca e entregue ao processo de análise morfométrica.

## 2.2 CAPTURA E ANÁLISE DE IMAGEM

A avaliação da espessura média da bainha de mielina de todos os casos e controles e o estabelecimento do número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado foram realizados por análise de imagem digital. Para tanto, cortes semifinos de todos os casos e controles, corados pelo azul de toluidina, foram digitalizados. Para tal, utilizou-se uma câmera digital, modelo *Sony SSC DC14* (*Sony Corporation*, Japão), acoplada a um microscópio marca *Zeiss* (modelo *Axiostar*). Esse conjunto é conectado a um computador por intermédio de uma placa de captura de imagens. Imagens foram adquiridas no aumento original de 400X (objetiva de 40X), obtendo-se imagens de todo o corte. A quantidade de imagens obtidas por caso variou de 2 a 9, de acordo com a superfície a ser examinada. As imagens foram armazenadas no formato TIFF no disco rígido do computador, e posteriormente gravadas em “compact disc” (CD). Utilizando o programa *Image Pro Plus*, versão 4.1 (*Media Cybernetics*), foi selecionada uma área retangular aleatória.

Determinado o tamanho dessa área marcada, o dado foi gravado em um arquivo separado. Dentro da área retangular, foi efetuada a medida da espessura das bainhas de mielina, em micrômetros, com a utilização do mesmo *software* (*Image Pro Plus*), sendo gerado um arquivo de dados para cada uma das imagens geradas.

O passo seguinte consistiu na contagem das fibras mielinizadas contidas na área retangular marcada, sendo esse dado acrescido ao arquivo criado para aquela imagem. Dessa maneira, utilizando o tamanho da área marcada e o número de fibras mielinizadas nela encontrado, foi possível determinar a quantidade de fibras mielinizadas por milímetro quadrado.



**Figura 28:** Histologia do neuroma. Pode-se perceber as células de Schwann e o tecido conjuntivo que dá suporte aos nervos. Neurônios seccionados podem ser vistos como pontos vermelhos circundados por uma zona clara de mielina, que, por sua vez, é cercada por fibras de tecido conjuntivo

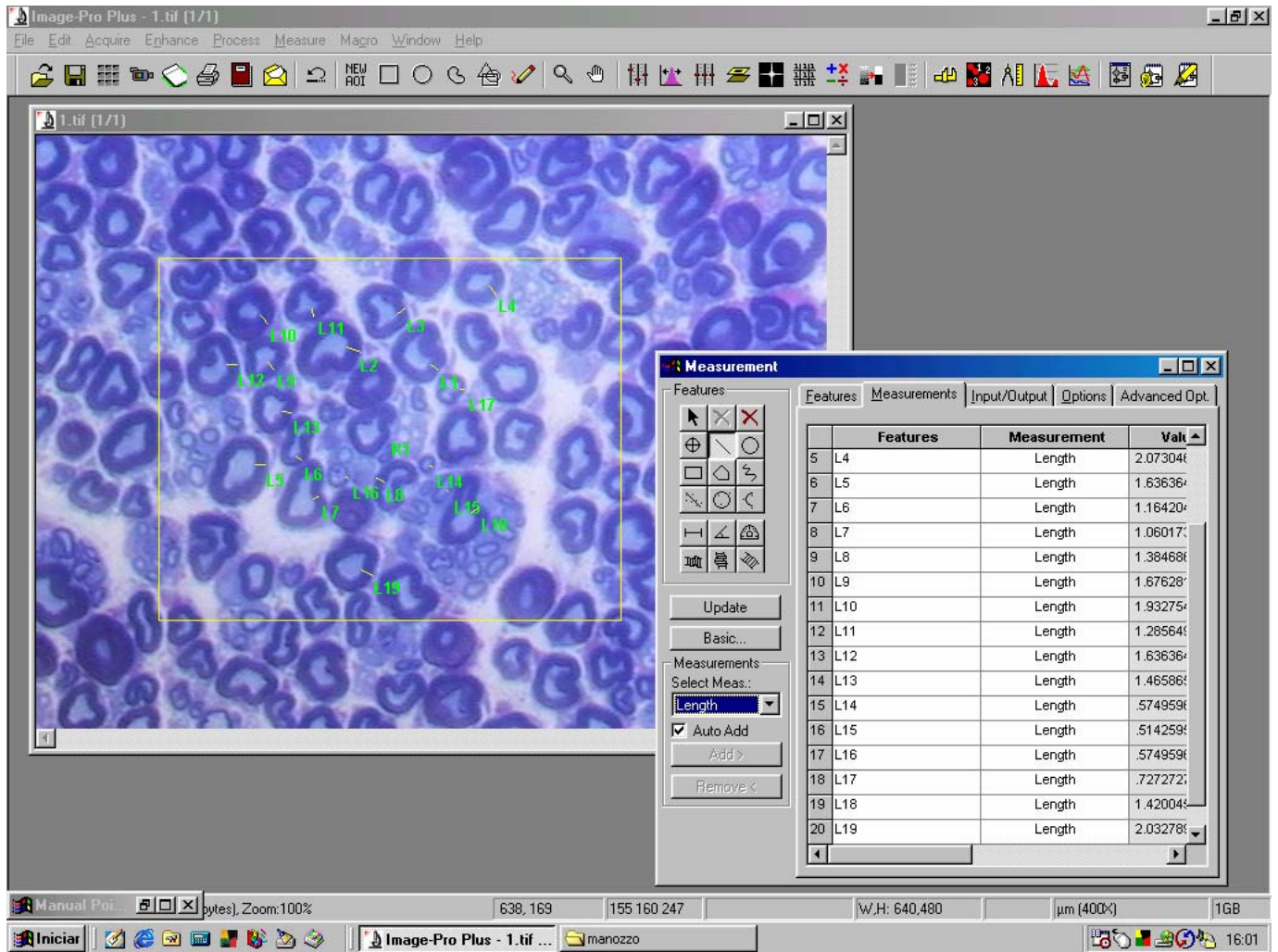


Figura 29: Tela de medição da espessura da bainha de mielina

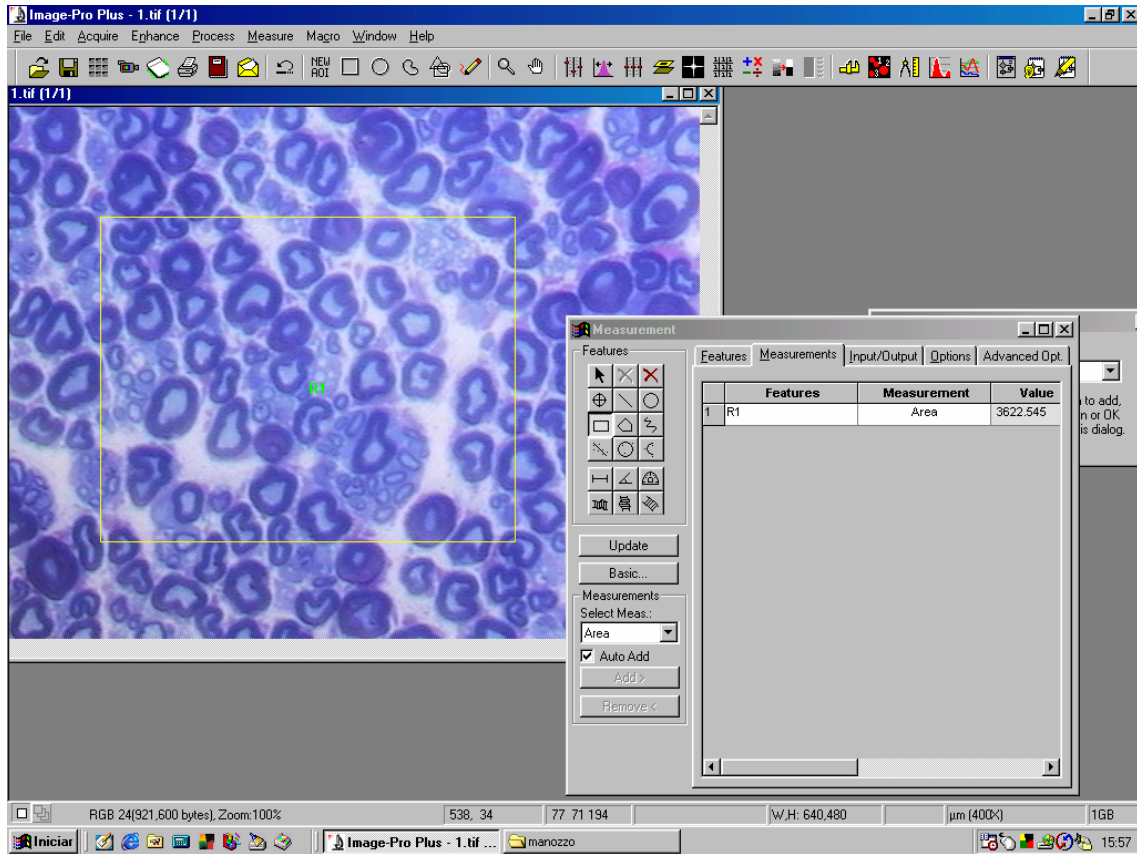
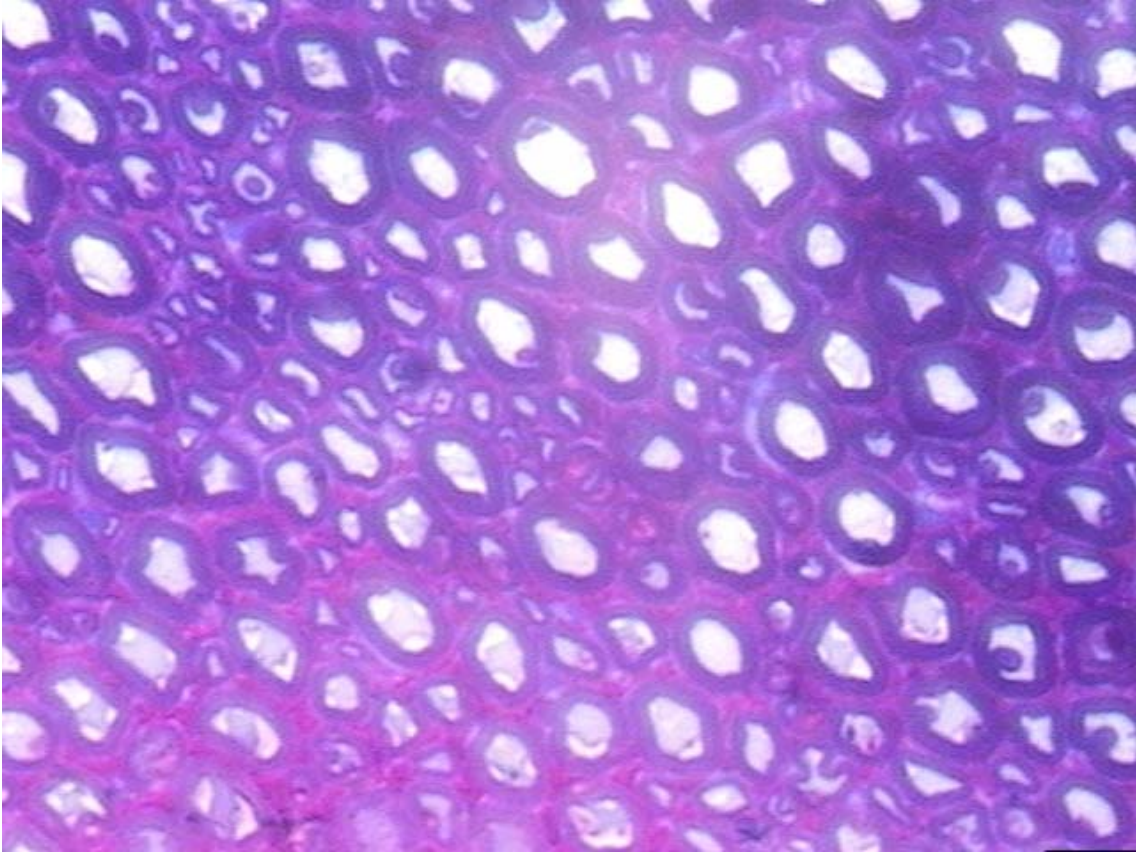
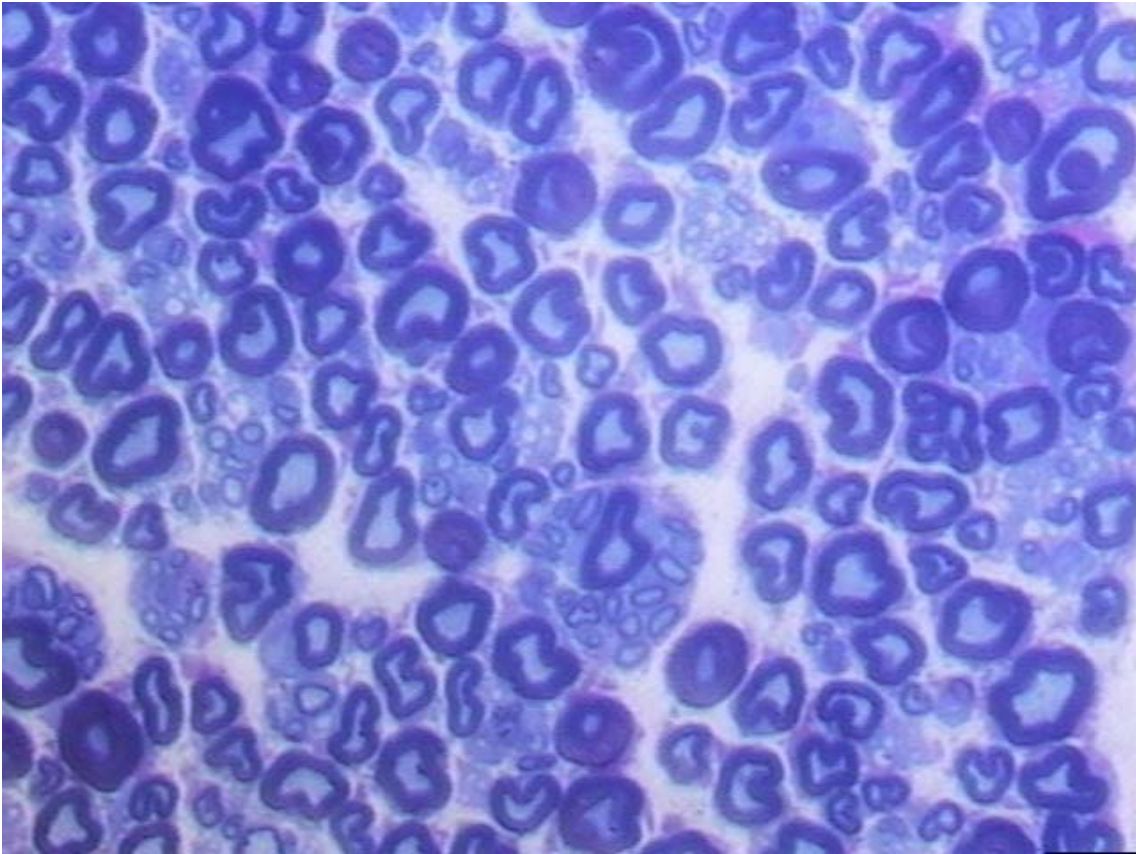


Figura 30: Tela de contagem do número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado





**Figura 31:** Histologia do neuroma não encapsado (coloração pelo azul de toluidina)



**Figura 32:** Imagem histológica de neuroma encapsado (coloração pelo azul de toluidina)

### 3 RESULTADOS

Para a quantificação da formação de neuromas, em cada grupo de ratos, foram usadas duas variáveis. Primeiramente utilizou-se a mensuração da espessura média da bainha de mielina. A segunda variável quantificada foi o número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado.

#### 3.1 ESPESSURA MÉDIA DA BAINHA DE MIELINA

Para a descrição dos dados da espessura média da bainha mielínica de cada axônio, obtiveram-se estatísticas descritivas para representar os grupos, como a média, o desvio padrão, o mínimo e o máximo, que encontram-se na Tabela 2. Para completar a descrição, foram obtidas também a mediana, o intervalo interquartilício (Q1 e Q3) e a amplitude interquartilícia para os diferentes grupos, que aparecem na Tabela 3.

**Tabela 2:** Valores (em micras) da média, desvio-padrão, mínimo e máximo, da espessura média da bainha de mielina, para os diferentes grupos

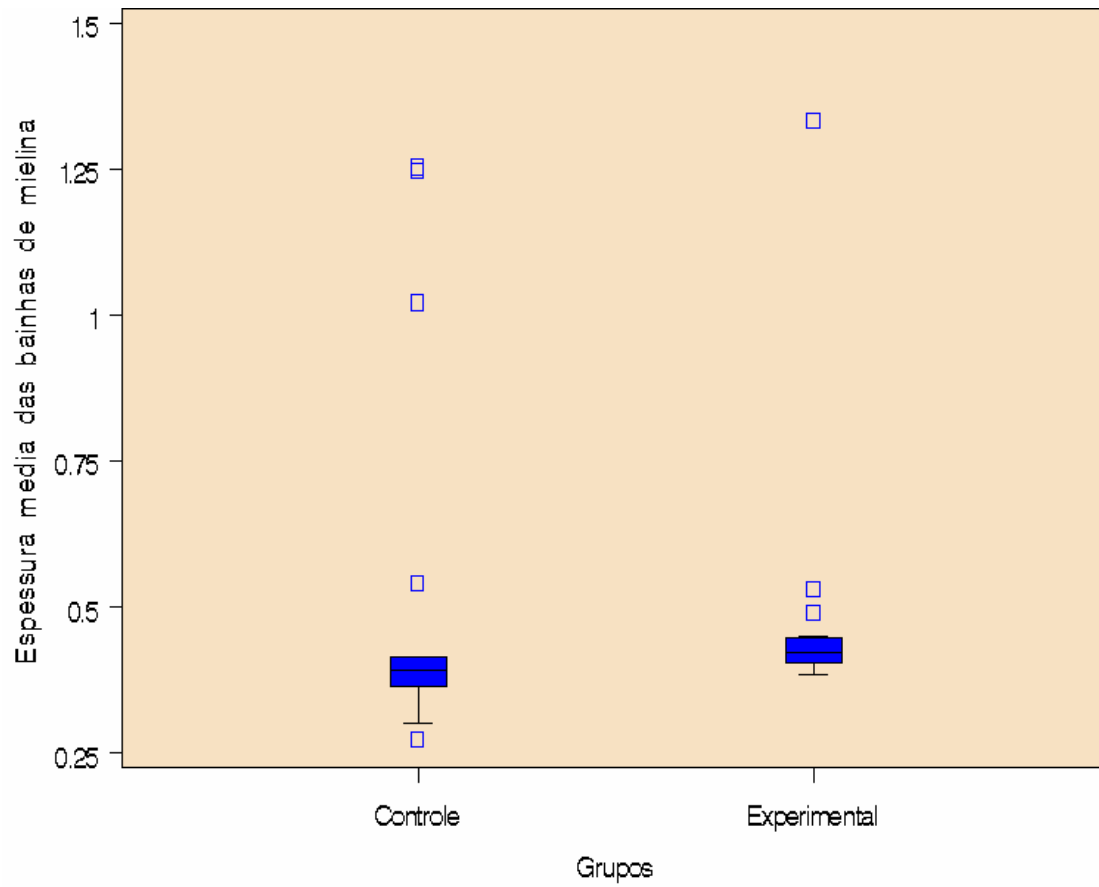
<b>Grupo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Controle</b>	0,5401	0,3498	0,2722	1,2538
<b>Experimento</b>	0,4892	0,2363	0,3848	1,3342

**Tabela 3:** Valores (em micras) da mediana e intervalos e amplitudes interquartílicos da espessura média da bainha de mielina, para os diferentes grupos

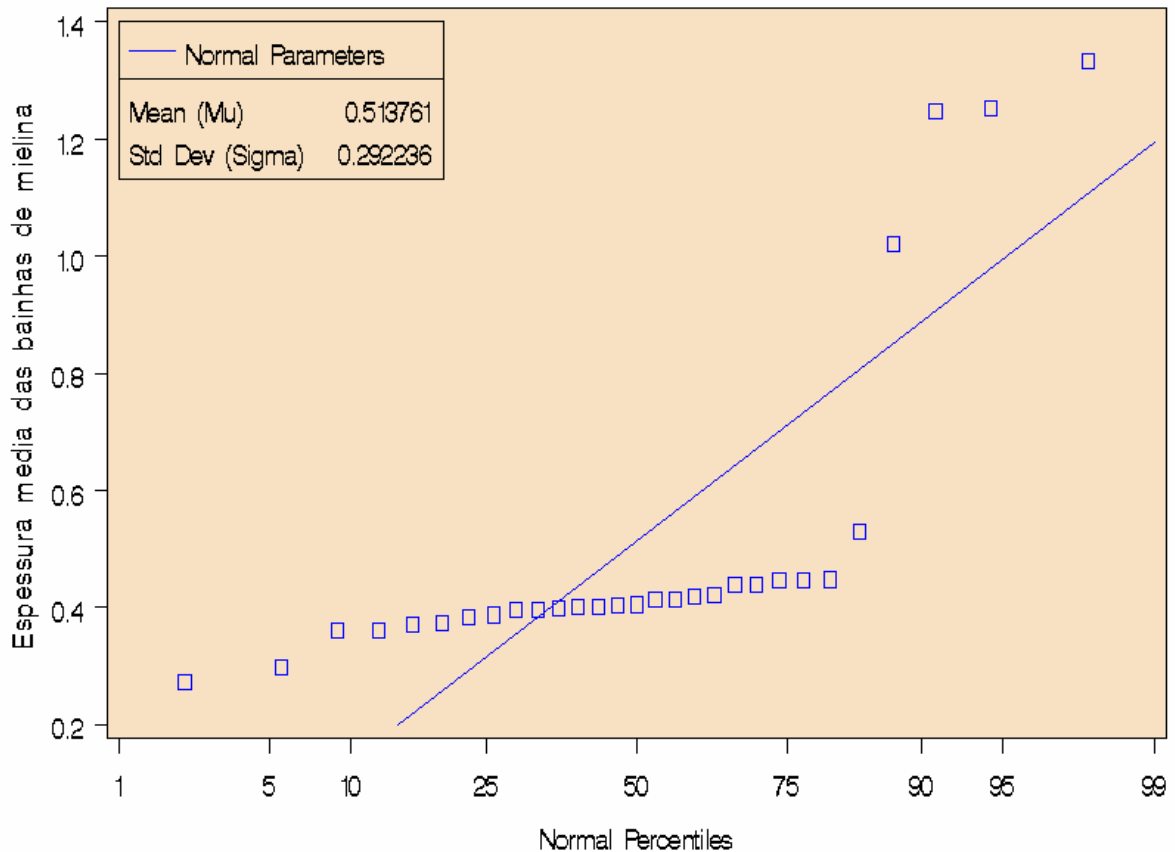
<b>Grupo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Intervalo Interquartílico</b>	<b>Amplitude Interquartílica</b>
<b>Controle</b>	0,3919	0,3622-0,4134	0,0512
<b>Experimento</b>	0,4211	0,4048-0,4479	0,0431

Para a avaliação do comportamento dos dados da espessura média da bainha miélnica de cada axônio, construiu-se o *Box-plot* (Gráfico 1), foi feita a verificação de aderência à distribuição Gaussiana (curva normal) que foi procedida através do gráfico de probabilidade normal (Gráfico 2) e pelo teste de *Kolmogorof-Smirnov*.





**Gráfico 1:** *BOXPLOT* para espessura a média da bainha miélnica dos diferentes grupos



**Gráfico 2:** Gráfico de probabilidade normal para espessura média da bainha mielínica

No *Box-plot* verifica-se, tanto para o grupo-controle, quanto para o grupo - experimento, valores que destoam do conjunto dos dados. No gráfico de probabilidade normal, verifica-se claramente a falta de aderência à distribuição gaussiana, em função do completo afastamento dos pontos no gráfico em relação à linha reta. A falta de aderência à distribuição gaussiana foi comprovada estatisticamente através do teste de *Kolmogorov-Smirnov* ( $D=0,4166$ ;  $p<0,01$ ). Diante disso, procedimentos de inferência estatística que supõem distribuição gaussiana (normal), não seriam adequados para tratar a variável espessura média da bainha mielínica de cada axônio. Por essa razão, utilizou-se o teste não paramétrico da soma de postos de *Wilcoxon* (equivalente ao teste de *Mann-*

*Whitney*), para comparar os grupos no que se refere a essa variável. Os resultados para o teste da soma de postos de *Wilcoxon* encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4:** Comparação entre os grupos para a espessura média da bainha mielínica pelo teste da soma de postos de *Wilcoxon*

<b>Grupo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Média dos Escores</b>	<b>p</b>
<b>Controle</b>	0,3919	11,2857	0,0232
<b>Experimento</b>	0,4211	18,4667	

Pelo teste da soma de postos de *Wilcoxon*, verifica-se diferença significativa entre os grupos DE 5% ( $p=0,0232$ ). O grupo-experimento revelou mediana maior (0,4211) das espessuras médias da bainha mielínica.

### 3.2 NÚMERO MÉDIO DE FIBRAS MIELINIZADAS POR MILÍMETRO QUADRADO

A outra variável avaliada foi a quantificação do número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado. Para a descrição dos dados do número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado, obtiveram-se estatísticas descritivas para representar os grupos, como a média, o desvio padrão, o mínimo e o máximo, que encontram-se na Tabela 5. Para completar a descrição, foram obtidas também a mediana, o intervalo interquartilico (Q1 e Q3) e a amplitude interquartilica para os diferentes grupos, que aparecem na Tabela 6.

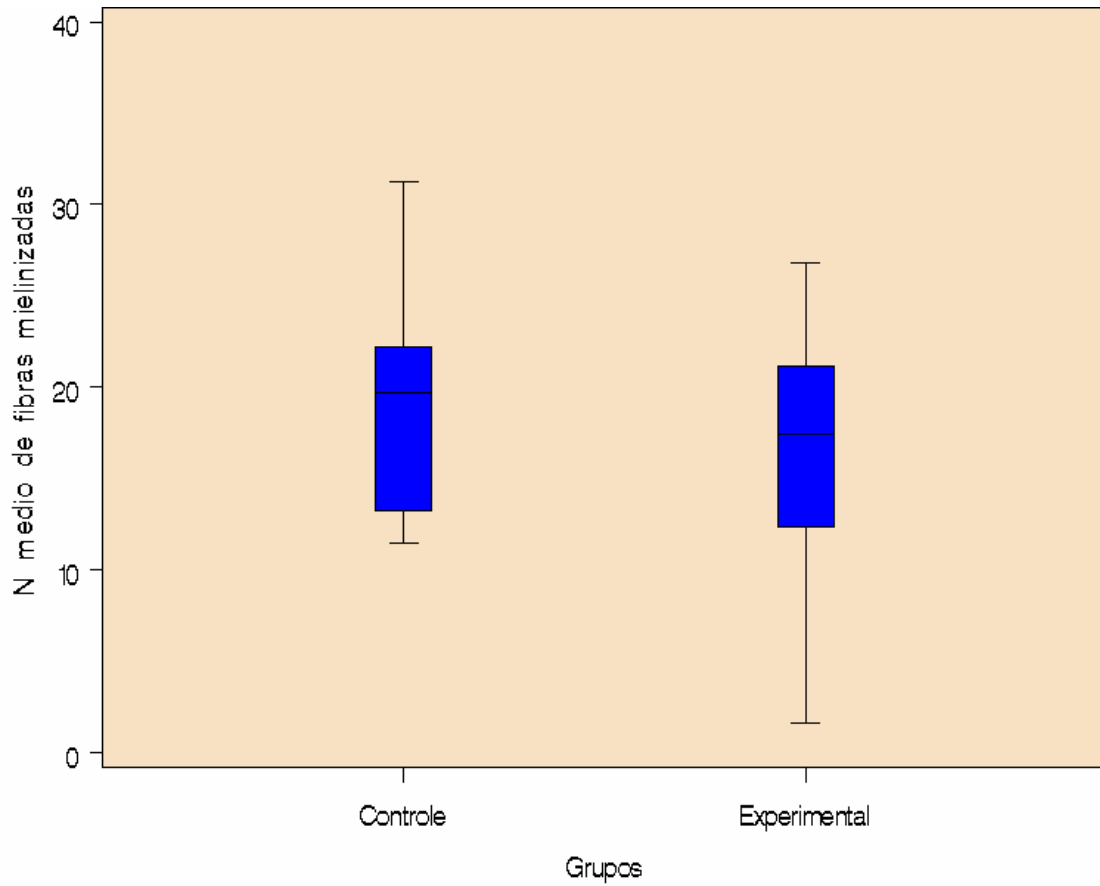
**Tabela 5:** Valores da média, desvio padrão, mínimo e máximo, do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos

<b>Grupo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Controle</b>	19,2557	5,9728	11,4400	31,2800
<b>Experimento</b>	16,8427	6,4793	1,6500	26,8000

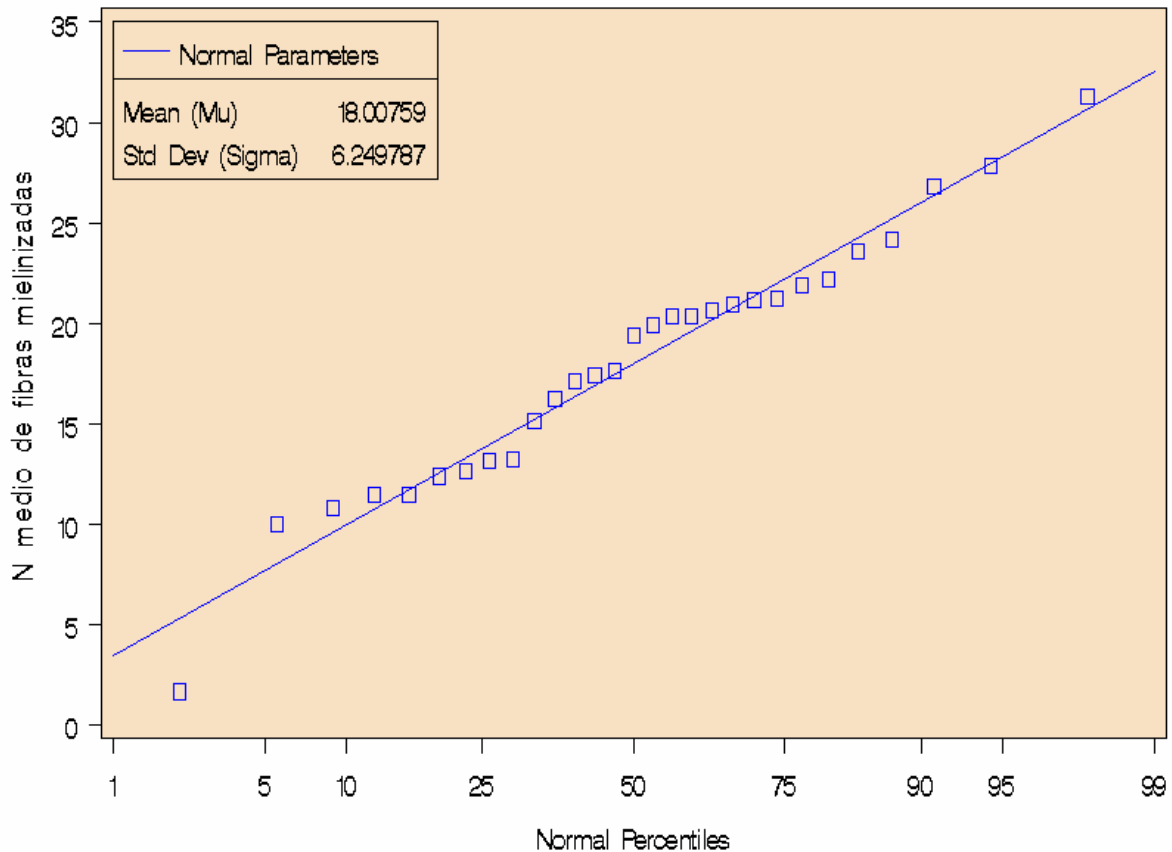
**Tabela 6:** Valores da mediana e intervalos e amplitudes interquartílicos, do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos

<b>Grupo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Intervalo interquartílico</b>	<b>Amplitude interquartílica</b>
<b>Controle</b>	19,67	13,23-22,21	8,98
<b>Experimental</b>	17,43	12,38-21,16	8,78

Para a avaliação do comportamento dos dados do número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado, construiu-se o *Box-plot* (Gráfico 3) e a verificação de aderência à distribuição gaussiana (curva normal) foi procedida através do gráfico de probabilidade normal (Gráfico 4) e pelo teste de *Kolmogorof Smirnov*.



**Gráfico 3:** *BOXPLOT* do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos



**Gráfico 4:** Gráfico de probabilidade normal do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos

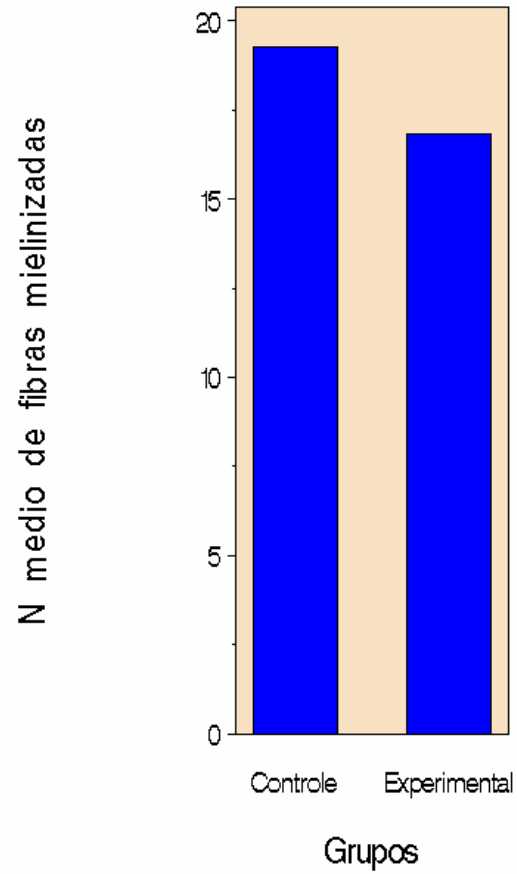
No *Box-plot* não se verifica, tanto para o grupo-controle, quanto para o grupo experimento, que existam valores que destoem do conjunto dos dados. Além disso, a estrutura das caixas é muito semelhante nos dois grupos. No gráfico de probabilidade normal, verifica-se que a aderência à distribuição gaussiana é extremamente razoável, em função do pequeno afastamento dos pontos no gráfico em relação à linha reta. A razoabilidade da aderência à distribuição gaussiana foi comprovada estatisticamente, por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov* ( $D=0,1066$ ;  $p>0,15$ ). Diante disso, procedimentos de inferência estatística, que supõem distribuição gaussiana (normal), poderiam ser adotados para tratar a variável número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado. Por essa razão utilizou-se o

teste t para comparar os grupos no que se refere a essa variável. Os resultados para o teste t encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7:** Comparação entre os grupos para número médio de fibras mielinizadas pelo teste t

<b>Grupo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
<b>Controle</b>	19,2557	1,5963	1,041	0,3073
<b>Experimento</b>	16,8427	1,6729		

Pelo teste t, para a variável número médio de fibras mielinizadas, não se verifica diferença significativa entre os grupos de 5% ( $t=1,041$ ;  $GL=27$ ;  $p=0,3073$ ). O poder do teste para o tamanho de amostra considerado ( $n=29$ ) é de 0,171. O tamanho de amostra mínimo necessário para se atingir significância, mantidas as condições do experimento, é de 106 ( $n=106$ ). O gráfico de barras para as médias dos grupos aparece no Gráfico 5. Com o objetivo de dar uniformidade ao procedimento de análise, utilizando-se o teste de soma de postos de *Wilcoxon* no caso da variável número médio de fibras mielinizadas, para comparar os grupos, obtém-se  $p=0.4321$ , não alterando a conclusão no nível de significância de 5%.



**Gráfico 5:** Gráfico das médias do número médio de fibras mielinizadas, para os diferentes grupos



## 4 DISCUSSÃO

Quando um nervo periférico é seccionado, a porção distal sofre degeneração walleriana pela perda de macromoléculas essenciais que são transportadas do corpo celular para os axônios (59). As células de Schwann, que revestem os axônios nos sítios de lesão, secretam fatores tróficos que são necessários à regeneração neural (60). O processo de regeneração nem sempre é perfeito, os axônios crescem aberrantemente, formando os neuromas. Esse crescimento aberrante é especialmente evidente nos casos onde falta o coto distal, como nas amputações. A ocorrência de neuromas pós-trauma é tão prevalente que muitos autores consideram a formação de neuromas como resultado inevitável de dano nervoso (61). Outros tipos de dor neuropática podem se desenvolver independentemente da formação do neuroma, como a dor do membro-fantasma que pode ocorrer em 10% dos casos de amputação (62).

A etiologia da dor neuropática, proveniente dos neuromas, tem sido explicada por diversos autores. Uma das hipóteses postula que os impulsos nervosos são originados pelas fibras não mielinizadas regenerantes que formam os neuromas. Os neuromas estão envoltos em tecidos cicatriciais que impedem o fluxo sanguíneo.

Esse ambiente de hipóxia poderia ser um dos vários gatilhos dos impulsos nervosos dolorosos (75 - 76).

Os tratamentos cirúrgicos têm como objetivo afastar o coto nervoso dos tecidos cicatriciais periféricos ao nervo lesado e minimizar estímulos nocivos com hipóxia, tensão ou pressão (2).

De acordo com as recomendações de Dellon e Mackinnon (10 - 63) a técnica cirúrgica de tratamento dos neuromas deve incluir a ressecção, evitar a proximidade do coto proximal de áreas de possível formação de cicatrizes (através da ressecção alta do coto proximal ou sua implantação massiva em tecido muscular) e evitar tensão no nervo remanescente.

Perspectivas terapêuticas futuras, baseadas nos conhecimentos fisiopatológicos atuais, devem ser focadas no bloqueio da geração de estímulos no coto nervoso e/ou no bloqueio do transporte desses estímulos ao corpo celular. Fármacos antagonistas ou bloqueadores competitivos de sinais ou peptídeos, responsáveis pela regeneração nervosa, são uma perspectiva terapêutica. Tais terapias não podem ser desenvolvidas até que a biologia regenerativa da célula nervosa, em nível molecular e genético, não possa ser plenamente investigada e compreendida. Conhecimentos de ciência básica são fundamentais para a expansão das opções terapêuticas (2).

Um dos modelos mais utilizados para o estudo de lesões de nervos periféricos é o rato, por seu custo baixo, pela facilidade de obtenção e manuseio. O chimpanzé parece apresentar resposta similar ao ser humano, mas é de difícil aquisição e manuseio (65). Investigações prévias indicam que o processo regenerativo nervoso em ratos apresenta uma progressão inicial que varia de 1,5 a 2 meses, atingindo um platô após essa fase (64). Lee (2003) coletou os espécimes de

nervo ciático de ratos para avaliar a regeneração neural após 6 semanas (71). Baseados nesses estudos, utilizou-se o prazo de 45 dias para realizar a coleta dos neuromas.

O preparo da histologia foi realizado com muito cuidado, pois há diversas dificuldades na elaboração das lâminas, o que dificultaria a avaliação posterior das mesmas. Morris (1972) destaca quatro aspectos fundamentais de uma boa técnica, os quais podem ser observados na maior parte das lâminas deste experimento:

- anéis de mielina com curvas suaves, sem angulações abruptas;
- forma das fibras não alteradas por sobreposição de outras adjacentes, com ausência de distorções de sua circularidade;
- ausência de separação das múltiplas lamelas de mielina;
- ausência de espaço entre a bainha de mielina e o axônio (66).

Consideram-se dois parâmetros para medir a formação dos neuromas: número médio de fibras mielinizadas e espessura média da bainha de mielina. Kuzbari (1996) utilizou a medida de tecido conjuntivo circunjacente às fibras nervosas, ao diâmetro e à mielinização das fibras nervosas (56). Fisher (1983) utilizou contagem de fibras mielinizadas como critério de medição dos neuromas (58). Lee (2003) utilizou a análise histomorfométrica para avaliar a regeneração nervosa do nervo ciático de ratos (71). Chen (1995) utilizou número de fibras mielinizadas e diâmetro de fibras mielinizadas como parâmetros. Derby (1993) e Doezie (2002) também empregaram contagem de fibras mielinizadas como critério de estimativa de regeneração neural em nervo ciático de ratos (72,74). De uma forma geral, a literatura considera que fibras bem mielinizadas são menos compatíveis com a formação de neuromas. Fibras não mielinizadas em grande quantidade são características dos neuromas.

Neste trabalho, quanto ao número de fibras mielinizadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Verificou-se diferença significativa entre os grupos a 5% ( $p=0,0232$ ) no que se refere à média da espessura da bainha de mielina, segundo o teste da soma de postos de *Wilcoxon*. O grupo experimental revelou mediana maior (0,4211) das espessuras médias da bainha de mielina em relação ao controle (0,3919). Cravioto (1981) descreveu que neuromas dolorosos contêm um grande número de pequenas fibras não mielinizadas, aparentemente em quantidade muito maior que as mielinizadas. Com esse fato em vista, sugere que um grande número de fibras não mielinizadas pode estar relacionado com sintomas dolorosos em alguns pacientes. Neste trabalho, o grupo-experimento apresentou melhor mielinização de fibras, indicando menor formação de neuromas nesse grupo.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta investigação, pode-se concluir que o modelo experimental da utilização de nervo ciático de ratos para estudo dos neuromas é factível e adequado.

A análise dos dados morfométricos permitiu concluir que, no grupo onde foi realizado o encapamento do nervo ciático, com enxerto de fáscia muscular, houve formação de fibras melhor mielinizadas. A literatura demonstra que neuromas dolorosos são compostos por fibras pouco mielinizadas.

Não houve diferença estatisticamente significativa na variável número de fibras mielinizadas por milímetro quadrado.

Apesar dos resultados obtidos, ainda é cedo para sugerir a técnica de encapamento do coto nervoso com enxerto de fáscia muscular, como alternativa terapêutica para o tratamento de neuromas na prática clínica. Os dados não podem ser sobrepostos de maneira direta aos seres humanos.

O tratamento e a prevenção de neuromas são áreas que permanecem abertas à investigação científica, na busca de meios que permitam bloquear a regeneração neural, objetivo maior do tratamento dos neuromas.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Low CK, Chew SH, Song IC, Ng TH. Implantation of a nerve ending into a vein. *Clin Orthop* 2000 Oct; (379):242-6.
- (2) Wu J, Chiu DT. Painful neuromas: a review of treatment modalities. *Ann Plast Surg* 1999 Dec; 43(6): 661-7.
- (3) Low CK, Chew SH, Song IC, Ng TH, Low YP. End-to-side anastomosis of transected nerves to prevent neuroma formation. *Clin Orthop* 1999 Dec; (369): 327-32.
- (4) Smahel, J. Some thoughts and observations concerning the prevention of neuroma. *Acta Chir Plast* 1998;40(1):12-6.
- (5) Al-Quattan MM. Prevention and treatment of painful neuromas of the superficial radial nerve by end-to-side nerve repair by end-to-side nerve repair concept: a experimental study and preliminary clinical experience. *Microsurgery* 2000;20(3):99-104.
- (6) Belcher HJ, Pandya AN. Centro-central union for the prevention of neuroma formation after finger amputation. *J Hand Surg [Br]* 2000 Apr; 25(2): 154-9.
- (7) Chiu DT. Treatment of painful neuromas: a case report. *Ann Plast Surg* 2000;44(3):340-2.
- (8) Gorkisch K, Boese-Landgraf J, Vaubel E. Treatment and prevention of amputation neuromas in hand surgery. *Plast Reconstr Surg* 1984 Feb; 73(2):293-9.
- (9) FERREIRA, A.S. Lesões nervosas periféricas. São Paulo: Santos, 1999. p. 1-9.
- (10) Dellon AL, Mackinnon SE. Treatment of painful neuroma by neuroma resection and muscle implantation. *Plast Reconstr Surg* 1986;77:427-438.
- (11) Clarke E. The human brain and spinal cord: a historical study. Berkeley, University of California Press, 1968.
- (12) Seddon H. Surgical disorders of peripheral nerves. Baltimore: William & Wilkins, 1972.
- (13) CHEM RC. Estudo comparativo, em ratos, de diferentes técnicas de reaproximação de nervo ciático completamente seccionado: macrocirúrgico e microcirúrgico. 1998: Dissertação ( Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1983.
- (14) Waller: Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos Trans R Soc Lond* 1850; 140: 423-5.
- (15) Nissl F. Über die veränderungen der ganglienzellenam facialiskern des kaninchens nach ausreissung der nerven. *All Z Psychiatry* 1892; 48: 197-204.
- (16) Ranvier L. L'histologie et la physiologie des nerfs. *Arvh Physiol Norm Pathol* 1891; 4:427-431.
- (17) Terzis J, Daniel R. *Reconstructive Microsurgery*. Boston: Little Brown and Company, 1977.

- (18) Mackinnon SE: Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75:384-8.
- (19) Dellon, AL. Basic scientific and clinical application of peripheral nerve regeneration. *Surg Ann* 1988; 20:59-100.
- (20) PÓLVORA, V.P. Avaliação funcional e histopatológica por morfometria no período inicial da regeneração neural após microneurotrafias em ratos. 1988. Dissertação (mestrado) — Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988.
- (21) CHEM, R.C. Introdução a microcirurgia reconstrutiva: microcirurgia reconstrutiva em nervos periféricos. Ed. Médica e Científica Ltda., 1993. p.129-141.
- (22) Herbert TJ, Filan SL. Vein implantation for treatment of painful cutaneous neuromas. A preliminary report. *J Hand Surg [Br]* 1998 Apr;23 (2)220-4.
- (23) Battista A, Cravioto H. Neuroma formation and prevention by fascicle ligation in the rat. *Neurosurgery* 1981 Feb; 8(2): 191-204.
- (24) Laborde KJ, Kalisman M, Tsai TM. Results of surgical treatment of painful neuromas of the hand. *J Hand Surg [Am]* 1982 Mar; 7(2): 190-3.
- (25) Kirvela O, Nieminen S. Treatment of painful neuromas with neurolytic blockade. *Pain* 1990 May; 41(2): 161-5.
- (26) William HB. The painful stump neuroma and its treatment. *Clin Plast. Surg* 1984 Jan; 11 (1): 79-84.
- (27) Pataky PE, Graham WP, Munger BL. Terminal neuromas treated with triamcinolone acetonide. *J Surg Res* 1973 Jan; 14 (1): 36-45.
- (28) Brander MD, Buncke HJ, Campagna-Pinto. Experimental treatment of neuromas in the rat by retrograde axoplasmic transport of ricin with selective destruction of ganglion cells. *J Hand Surg [Am]* 1989 Jul 14 (4): 710-4.
- (29) Cravioto H, Battista A. Clinical and ultrastructural study of painful neuromas. *Neurosurgery* 1981 Feb; (2): 181-90.
- (30) Wood VE, Mudge MK. Treatment of neuromas about a major amputation stump. *J Hand Surg [Am]* 1987 Mar; 12 (2): 302-6.
- (31) Barbera J, Albert-Pamplo R. Centro-central anastomosis of the proximal nerve stump in the treatment of painful neuromas of major nerves. *J Neurosurg* 1993 Sep; 79(3): 331-4.
- (32) Gonzalez-Darder J, Barbera J, Abellan MJ, Mora A. Centro-central anastomosis in the prevention and treatment of painful terminal neuroma. An experimental study in the rat. *J Neurosurg* 1985 Nov; 63 (5): 754-8.
- (33) Yuksel F, Kislaoğlu E, Durak N, Ucar C, Karacaoglu E. Prevention of painful neuromas by epineural ligatures, flaps and grafts. *Br J Plast Surg* 1997 Apr; 50 (3): 182-5.
- (34) Menovsky T, Beek JF, Weerman MV, van Overbeeke JJ. Effect of a modified Nd:YAG laser technique on neuroma formation: an experimental study in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med* 1999; 25(3):213-8.

- (35) Davies E, Pounder D, Mansour S, Jeffery IT. Cryosurgery for chronic injuries of the cutaneous nerve in the upper limb. Analysis of a new open technique. *J Bone Joint Surg Br* 2000 Apr; 82(3):413-5.
- (36) England JD, Happel LT, Liu ZP, Thouron CL, Kline DG. Abnormal distributions of potassium channels in human neuromas. *Neurosci Lett* 1998 Oct 9; 255(1): 37-40.
- (37) Battista AF, Cravioto HM, Budzilovich GN. Painful neuroma: changes produced in peripheral nerve after fascicle ligation. *Neurosurgery*, 1981 11,9:5 589-600.
- (38) Brandt and Mackinnon. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerves grafts. In: Grabb and Smith's: plastic and reconstructive surgery ed Lippincott-Raven fifth edition, 1997. 79-90.
- (39) Xu QG, Zochdone DW. Ischemia and failed regeneration in chronic experimental neuromas. *Brain Res* 2002 Aug 9; 946 (1):24-30.
- (40) Caporusso EF, Fallat LM, Moore RS. Cryogenic neuroablation for the treatment of lower extremity neuromas. *J Foot Ankle Surg* 2002 Sep-Oct; 41(5): 286-90.
- (41) Harpf C, Daeberrig J, Humpel C. Receptors for NGF and GDNF are highly expressed in human peripheral nerve neuroma. *Muscle Nerve* 2002 Apr; 25(4):612-5.
- (42) Kretschmer T, England JD, Happel LT, Liu ZP, Thouron CL, Nguyen DH, Beuerman RW, Kline DG. Ankirin G and voltage gated sodium channels colocalize in human neuroma-key proteins of membrane remodeling after axonal injury. *Neurosci Lett* 2002 Apr 26; 323(2): 151-5.
- (43) Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001 Oct 19; 429(1-3): 23-37.
- (44) Liu CN, Raber P, Ziv-Sefer S, Devor M. Hyperexcitability in sensory neurons of rat selected for high versus low neuropathic pain phenotype. *Neuroscience* 2001; 105(1): 265-75.
- (45) Brooks D, Panthaki Z, Buncke HJ, Buncke GM. Neuroma transposition and intramuscular implantation using the Mitek "soft-tissue anchor": a new technique. *Ann Plast Surg* 2001 Sep;47(3):257-62.
- (46) Kretschmer T, Happel LT, England JD, Nguyen DH, Tiel RL, Beuerman RW, Kline DG. Clinical article accumulation of PN1 and PN3 sodium channels in painful human neuroma-evidence from immunocytochemistry. *Acta Neurochir (Wien)* 2002 Aug; 144(8): 803-10.
- (47) Stahl S, Rosemberg N. Surgical treatment of painful neuroma in medial antebrachial cutaneous nerve. *Ann Plast Surg* 2002 Feb;48(2):154-8; discussion 158-60.
- (48) Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* Aug 1; 22(15): 6696-703.
- (49) Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* 2001 Apr; 12(2): 341-52.



- (50) Kryger GS, Kryger Z, Zhang F, Shelton D L, Lineaweaver WC, Buncke JH. Nerve growth factor inhibition prevents traumatic neuroma formation in the rat. *J Hand Surg[Am]*2001 jul;26 (4): 635-44.
- (51) Zhang B, Guo Y Liang, Y. *Zhongguo. Xiu Fu Chongg Jian Wai Ke Za Zhi.* 1997 Nov;11 (6): 325-7.
- (52) Risitano G, Cavallaro G, Merrino T, Coppolino S, Ruggeri F. Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein graft in emergency hand reconstruction. *Chir Main* 2002 May ;21 (3): 194-7.
- (53) Koch H, Herbert, TJ, Kleinert R, Humber M, Scharngl E Pierer G. Influence of nerve stump implantation into a vein on neuroma formation. *Ann Plast Surg* 2003 Apr; 50 (40): 354-360.
- (54) Dowsing BJ, Romeo R, Morrison WA. Expression of leukemia inhibitory factor in human nerve following injury. *J Neurotruma* 2001 Nov; 18(11): 1279-87.
- (55) Myers RR, Powell HC, Heckman HM, Costello ML, Katz J. Biophysical and pathological effects of cryogenic nerve lesion. *Ann Neurol.* 10:478-485, 1981.
- (56) Kuzbari R, Liegl C, Neumayer C, Moser H, Burggamasser G, Holle J, Gruber H, Happak W. Effect of CO2 miliwatt laser on neuroma formation in rats. *Lasers Surg Med* 1996; 18(1): 81-5.
- (57) Greene EC. In: *Anatomy of the rat.* Hafner Publishing CO. New York 1955. p.127-169.
- (58) Fischer DW, Beggs JL, Shetter AG, Waggener JD. Comparative study of neuroma formation in the rat sciatic nerve after CO2 laser and scalpel neurectomy. *Neurosurgery* 1983 Sep;(3): 287-94.
- (59) Wall PD, Gutnick M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol* 1974;242:S19-S21.
- (60) Bunge RP. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurol* 1994; 242: S19-S21.
- (61) Terzis JK. *Microreconstruction of nerve injuries.* 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1987: 39-52.
- (62) Herndon JH, Eaton RG, Littler JW. Management of painful neuromas in the hand. *J Bone Joint Surg* 1976; 58A:369-373.
- (63) Dellon AL, MacKinnon SE. Injury to the medial antebrachial cutaneous nerve during cubital tunnel surgery. *J Hand Surg [Br]* 1985; 10: 33-6.
- (64) Dellon AL; Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg* 1989; 23 (3): 197-202.
- (65) Kline DG; Hayes GJ; Morse AS. A comparative study of response of species to peripheral nerve injuries. *J Neurosurg,* 1964; 21: 968-70.
- (66) Morris JH, Hudson AR, Weddel G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. The traumatic degeneration of myelin in the proximal stump of the divided nerve. *Z Zellfirch* 1972; 124:76-102.

- (67) Ernberg LA, Adler RS, Lane J. Ultrasound in the detection and treatment of a painful stump neuroma. *Skeletal Radiol.* 2003 May; 32 (5): 306-9. Epub 2003 Feb 07.
- (68) Martinet N, Foisneau-Lottin A, Henrot P, Paysant J, Blum A, Andre JM. MRI and leg stump neuroma. *Ann Readapt Med Phys.* 2001 Dec; 44(9): 600-7.
- (69) Henrot P, Stines J, Walter F, Martinet N, Paysant J, Blum A. Imaging of the painful lower limb stump. *Radiographics.* 2000 Oct; 20 Spec No: S219-S35.
- (70) Martins RS, Siqueira MG, Tedesco-Marquese. Neuroma sintomático do nervo sural. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002 Sep; 60(3-B): 866-8.
- (71) Lee AC, Yu VM, Lowe JB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2003 Nov;184(1):295-303.
- (72) Derby A, Engleman VW, Friedrich GE, Neises G, Rapp SR, Roufa DG. Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1993 Feb;119(2):176-91.
- (73) Chen ZW, Wang MS. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1995;16(8):547-51.
- (74) Doezie AM, Lowe JB 3rd, Hunter DA, Mackinnon SE. Effects of tobacco smoke on recovery after nerve crush injury in rats. *Ann Plast Surg.* 2002, Dec; 49(6):628-34.
- (75) Martini A, Fromm B. A new operation for the prevention and treatment of amputation neuromas. *J Bone Joint Surg Br* 1989; 71:379-382.
- (76) White JC. Pain after amputation and its treatment. *JAMA* 1944; 124:1030-35.

## ANEXO 1

Tabela de dados: grupo 1: grupo-experimento; grupo 2: grupo-controle; média: espessura média da bainha de mielina; nfib: número médio de fibras mielinizadas por milímetro quadrado.

Grupo	media	nfib
1	0,421	21,16
1	0,402	1,65
1	0,399	20,94
1	0,406	17,43
1	0,530	10,00
1	0,440	20,68
1	0,420	10,83
1	0,439	17,11
1	0,385	20,37
1	1,334	12,38
1	0,447	15,12
1	0,415	26,80
1	0,405	21,89
1	0,448	23,62
1	0,448	12,66
2	0,397	21,26
2	0,402	16,23
2	0,372	20,33
2	1,022	11,44
2	0,361	22,21
2	0,362	19,92
2	1,254	13,14
2	0,413	13,23
2	0,396	27,83
2	0,272	31,28
2	1,248	11,48
2	0,388	19,42
2	0,374	24,18
2	0,299	17,63