



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

---

**NAGIB PEZATI BOER**

**TÉCNICAS DE NEURORRAFIA: ESTUDO  
EXPERIMENTAL ESTEREOLÓGICO AXONAL  
COMPARATIVO**

**São José do Rio Preto**

**2012**

**Nagib Pezati Boer**

**Técnicas de Neurorrafia: Estudo Experimental  
Estereológico Axonal Comparativo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batigália

São José do Rio Preto

2012

Boer, Nagib Pezati

Técnicas de Neurografia: Estudo Experimental Estereológico Axonal Comparativo / Nagib Pezati Boer.

São José do Rio Preto, 2012

174 p.

Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batigália

1. Anatomia; 2. Estereologia; 3. Nervo periférico; 4. Neurografia

NAGIB PEZATI BOER

**Técnicas de Neurografia: Estudo Experimental  
Estereológico Axonal Comparativo**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fernando Batigália

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

Suplentes:

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos .....	ii
Epígrafe.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas .....	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
Geral.....	14
Específicos .....	14
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
Técnica Histológica .....	25
Técnica Estereológica .....	26
Pesagem Muscular .....	28
Análise Estatística.....	29
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
I. Porcentagem de pontos incidentes sobre axônio, endoneuro e bainha de mielina (dados absolutos presentes no apêndice I).....	31
I a. Nervo Tibial.....	31
I b. Nervo Fibular.....	32
II. Densidade de Volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina .....	33
II a. Nervo Fibular .....	33
II b. Nervo Tibial .....	52
III. Análise da Massa Muscular .....	71
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>113</b>
Anexo 2. Resumo enviado para apresentação no XXV Congresso Brasileiro de Anatomia, de 03 a 06 de outubro de 2012 em Salvador (Bahia). .....	114

<b>Anexo 3. Artigo End-to-side loop Neurorrhaphy: AXONAL COMPARATIVE STEREOLOGICAL STUDY .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>138</b>

*À minha esposa, Maria Betânia, sem seu apoio, ajuda e seu amor, nada disso teria acontecido. Meu muito obrigado por você existir e fazer parte de minha vida.*

*Meus filhos, Ana Luísa e Luís Fernando, razão de meu viver.*

*Meu pai e a minha mãe (que esta junto de Deus), que com muito sacrifício deram-se a oportunidade de ser Cirurgião Dentista, sem vocês não teria chegado aqui.*

*Ao Professor Dr. Fernando Batigália, meu eterno mestre, por sua dedicação e pelo espírito incansável e contagiante de pesquisador. Também por sua amizade, convivência, pela confiança em mim depositada, pela orientação, por sua sabedoria e estímulo na realização desse estudo.*

*À Dra. Ana Cláudia Polli Lopes pelo apoio na análise das lâminas histológicas.*

*Ao Ms. Roberto Racanicchi por sua ajuda na análise estatística.*

*Ao Ms. Humberto Regis Faleiros grande incentivador dessa pesquisa.*

*Ao Dr. Alex Tadeu Martins, À Dra. Mariângela Borghi Ingraci e Ms. Conrado Ingraci de Lucia pelas muitas horas de estudo e pelas longas discussões.*

*A Fundação Educacional de Fernandópolis (FEF) e Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo)- Instituições de Ensino que me apoiaram nessa conquista.*

*A todos os amigos e colegas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse estudo.*



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

*Madre Teresa de Calcuta*

Figura 01. Microfotografia de corte transversal de um nervo. ....	3
Figura 02. Corte transversal do nervo tibial.....	5
Figura 03. Tricotomia na face posterior da região glútea direita. ....	17
Figura 04. Exposição cirúrgica do nervo isquiático e seus ramos. ....	18
Figura 05. G1- Neurorrafia término-lateral.....	18
Figura 06. G2- Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm.....	19
Figura 07. Especímetro DBMCO GERMANY STAINIES.....	20
Figura 08. Mensuração das rafia látero-laterais de 0,25cm. ....	21
Figura 09. G3- Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm.....	22
Figura 10. Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm. ....	23
Figura 11. G4- Controle de Desnervação. ....	24
Figura 12. Grade de Weibel sobreposta a lâmina histológica de nervo periférico. .	28
Figura 13. Músculo tibial cranial removido (normalidade e desnervado). ....	29
Figura 14. Comparação da média aritmética da densidade de volume do nervo fibular seccionado. ....	70
Figura 15. Comparação da média da densidade de volume do nervo tibial seccionado. ....	70
Figura 16. Média aritmética da massa (em g) do músculo tibial cranial em todos os grupos. ....	71

---

Tabela 01. Porcentagem da densidade de volume de axônios no nervo fibular seccionado G4NF e G1NF.....	34
Tabela 02. Porcentagem da densidade de volume de axônios no nervo fibular seccionado G4NF e G2NF.....	35
Tabela 03. Porcentagem da densidade de volume de axônios no nervo fibular seccionado G4NF e G3NF.....	36
Tabela 04. Porcentagem da densidade de volume de axônios no nervo fibular seccionado G2NF e G3NF.....	37
Tabela 05. Porcentagem da densidade de volume de axônios no nervo fibular seccionado G1NF e G2NF.....	38
Tabela 06. Porcentagem da densidade de volume de axônios no nervo fibular seccionado G1NF e G3NF.....	39
Tabela 07. Densidade de volume de endoneuro no nervo fibular G4NF e G1NF.....	40
Tabela 08. Densidade de volume de endoneuro no nervo fibular G4NF e G2NF.....	41
Tabela 09. Densidade de volume de endoneuro no nervo fibular G4NF e G3NF.....	42
Tabela 10. Densidade de volume de endoneuro no nervo fibular G2NF e G3NF.....	43

Tabela 11. Densidade de volume de endoneuro no nervo fibular G1NF e G2NF.....	44
Tabela 12. Densidade de volume de endoneuro no nervo fibular G1NF e G3NF.....	45
Tabela 13. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo fibular G4NF e G1NF.....	46
Tabela 14. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo fibular G4NF e G2NF.....	47
Tabela 15. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo fibular G4NF e G3NF.....	48
Tabela 16. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo fibular G2NF e G3NF.....	49
Tabela 17. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo fibular G1NF e G2NF.....	50
Tabela 18. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo fibular G1NF e G3NF.....	51
Tabela 19. Densidade de volume de axônios no nervo tibial G4NT e G1NT .....	52
Tabela 20. Densidade de volume de axônios no nervo tibial G4NT e G2NT .....	53

Tabela 21. Densidade de volume de axônios no nervo tibial G4NT e G3NT .....	54
Tabela 22. Densidade de volume de axônios no nervo tibial G2NT e G3NT .....	55
Tabela 23. Densidade de volume de axônios no nervo tibial G1NT e G2NT.....	56
Tabela 24. Densidade de volume de axônios no nervo tibial G1NT e G3NT .....	57
Tabela 25. Densidade de volume de endoneuro no nervo tibial G4NT e G1NT.....	58
Tabela 26. Densidade de volume de endoneuro no nervo tibial G4NT e G2NT .....	59
Tabela 27. Densidade de volume de endoneuro no nervo tibial G4NT e G3NT .....	60
Tabela 28. Densidade de volume de endoneuro no nervo tibial G2NT e G3NT .....	61
Tabela 29. Densidade de volume de endoneuro no nervo tibial G1NT e G2NT .....	62
Tabela 30. Densidade de volume de endoneuro no nervo tibial G1NT e G3NT .....	63
Tabela 31. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo tibial G4NT e G1NT .....	64

Tabela 32. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo tibial	
G4NT e G2NT .....	65
Tabela 33. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo tibial	
G4NT e G3NT .....	66
Tabela 34. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo tibial	
G2NT e G3NT .....	67
Tabela 35. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo tibial	
G1NT e G2NT .....	68
Tabela 36. Densidade de volume de bainha de mielina no nervo tibial	
G1NT e G3NT .....	69

VV	Densidade de volume
Lv	Densidade de comprimento
Sv	Densidade de superfície
Nv	Densidade numérica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
G1NF	Corte transversal do nervo fibular, distal à neurografia término-lateral
G1NT	Corte transversal do nervo tibial, distal à neurografia término-lateral
G2NF	Corte transversal do nervo fibular, distal à neurografia látero-lateral de 0,25 cm
G2NT	Corte transversal do nervo tibial, distal à neurografia látero-lateral de 0,25 cm
G3NF	Corte transversal do nervo fibular, distal à neurografia látero-lateral de 0,5 cm
G3NT	Corte transversal do nervo tibial, distal à neurografia látero-lateral de 0,5 cm
G4NF	Controle de normalidade; corte transversal de nervo fibular
G4NT	Controle de normalidade; corte transversal de nervo tibial

Pp	Pontos contatos sobre a estrutura estudada
PT	Total de pontos no sistema teste
U	Valor tabelado
P(U)	Valor de U calculado
X	Média aritmética
NGF	Fator de crescimento neural
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
DW	Degeneração Walleriana
1L-1B	interleucina 1-B
1L-6	interleucina 6
1L-12	interleucina 12
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral $\beta$
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
Ca <sup>++</sup> S100 $\beta$	Proteína ligante



**Introdução:** Há grande variedade de lesões que acometem nervos periféricos, derivadas de doenças adquiridas ou degenerativas congênitas que afetam a parte central do sistema nervoso e que ocasionam perda de funções sensoriomotoras.

**Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi fazer estudo experimental estereológico axonal pós-neurorrafias término-lateral ou látero-lateral para comparar densidade de volume de axônios, de endoneuro e de bainha de mielina (bem como massa muscular) em nervos fibular e tibial, com anastomose de contato entre 0,25cm e

0,50 cm. **Material e Método:** Após aprovação do comitê de ética, foram utilizados 20 ratos machos da raça *Wistar* divididos em 04 grupos de 05 ratos cada, para realização de anastomose entre nervos fibular e tibial (G1=Neurorrafia término-lateral; G2=Neurorrafia látero-lateral de 0,25cm; G3= Neurorrafia látero-lateral de 0,50cm e G4= Controle de normalidade). Após 180 dias, fragmentos de nervos foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina e corados com Tricômico de Masson para estudo estereológico pelo programa *Image Pro Plus* versão 6.0, com grade de *Weibel* para determinação dos números absolutos e da densidade de volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina e aplicação do teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Também o músculo tibial cranial foi removido e pesado em balança de precisão. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, mas sim de todos os 03 grupos de estudo (G1, G2 e G3) em relação ao grupo controle (G4). **Conclusões:** Em estudo experimental estereológico comparativo entre neurorrafias, a densidade de volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina de nervos tibial e fibular do mesmo

modo que a massa muscular pós-cirúrgica se mantém equitativa em neurorrafias término-lateral e látero-lateral, independentemente da área de anastomose de contato. Pode-se inferir, como opções de reparo cirúrgico, tanto a neurorafia término-lateral que recupera e previne a atrofia de placa motora quanto a neurorafia látero-lateral que independe da distância entre os cotos nervosos.

Palavras-chave: 1. Anatomia; 2. Estereologia; 3. Nervo periférico; 4. Neurorafia.

There are many varieties of lesions of the peripheral nerves derived from acquired or congenital degenerate diseases which can affect the central nervous system and can cause loss of sensory and motor functions. The aim of this work was to make an experimental stereological study of the axons after end-to-side neurorrhaphies and after side-to-side neurorrhaphies to compare the axon, endoneural and myelin sheath volume densities (as well as the muscle mass) in the fibular and tibial nerves with contact anastomosis between 0.25cm and 0.50 cm. After approval by the Ethics Committee, twenty male Wistar rats were divided into four distinct groups of five rats each for the anastomosis between the tibial and fibular nerves (G1= end-to-side neurorrhaphy; G2= 0.25cm side-to-side neurorrhaphy; G3= 0.50cm side-to-side neurorrhaphy and G4= control group of normality and denervation). After 180 days, nervous fragments were fixed in 10% formaldehyde included in paraffin and stained with Masson's trichrome technique for the stereological study by the software Image Pro Plus ® version 6.0 with the adoption of Weibel stereological grid to set the axon, endoneural and myelin sheath volume densities. The Mann-Whitney (U Test) was applied for the statistical analysis. Also tibial cranial muscles were removed and then weighed in a precision scale. There was no statistically significant difference between the groups, but there were significant differences comparing the 3 groups (G1, G2 e G3) to the control group (G4). The axon, endoneural and myelin sheath volume densities of tibial and fibular nerves as well as the muscle mass during postoperative period keep egalitarian for both end-to-side and side-to-side neurorrhaphies of

anastomosis area of contact in experimental stereological study comparing neurorrhaphies. Therefore, both end-to-side neurorrhaphies (which recover and prevent the motor atrophy) and side-to-side I neurorrhaphies which is independent on the gap of the nerve stumps are recommended as surgical treatment options.

Key-words: 1. Anatomy; 2. Stereological; 3. Peripheral nerve; 4. Neurorrhaphy.

## ***INTRODUÇÃO***

---

## **INTRODUÇÃO**

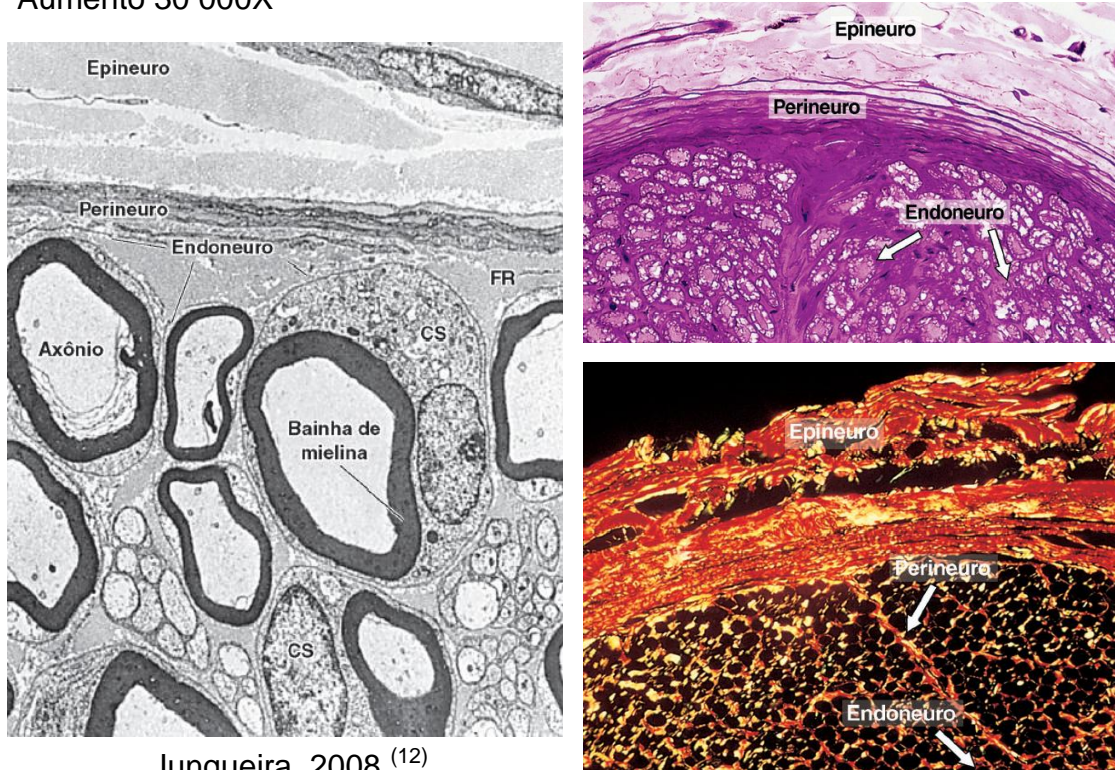
Há uma grande variedade de lesões que acometem os nervos periféricos. Muitas são derivadas de doenças adquiridas ou são degenerativas congênitas, e afetam parte central do sistema nervoso e pode também produzir sintomas periféricos.<sup>(1)</sup> Dentre as lesões, o trauma é relativamente comum sendo que, ao ponto de transecção completa, há grande possibilidade de perda das funções motoras e sensitivas.<sup>(2)</sup> Buscar restituir as funções nervosas sensitivo-motoras, um dos métodos estudados institui a neurorrafia, técnica já bem conhecida, e que evolui juntamente com o entendimento da Neurofisiologia, Anatomia e regeneração nervosa, resultando em maior efetividade na reparação dos nervos afetados.<sup>(3)</sup>

Os nervos periféricos são as estruturas funcionais responsáveis pela união da parte central do sistema nervoso com os órgãos periféricos, organizadas como uma união de fibras nervosas motoras, sensitivas e autonômicas, envoltas por tecido conjuntivo ou de sustentação.<sup>(4-6)</sup> Esta estrutura é capaz de propagar o potencial de ação através da sua extensão, por meio de um complexo conjunto de canais iônicos de membrana.<sup>(5)</sup>

O nervo periférico é constituído de tecido nervoso e não nervoso.<sup>(7)</sup> O tecido nervoso é de origem ectodérmica e a porção não nervosa, de origem mesodérmica. Esta tem função na sustentação e na nutrição, e não está ligada diretamente à condução do impulso nervoso.<sup>(8)</sup>

Os nervos periféricos compreendem axônios e as células de Schwann associadas, encerradas na membrana basal.<sup>(9)</sup> As células de Schwann embainham axônios individuais em fibras mielinizadas e grupos de axônios em fibras não mielinizadas.<sup>(10)</sup> A membrana basal é cercada de finas fibras de colágeno chamadas endoneuro. Assim, a composição axônio e célula de Schwann é denominada endoneuro.<sup>(11)</sup> A Figura 1 e a Figura 2 ilustram a composição de um nervo periférico.

Aumento 30 000X



Junqueira, 2008 <sup>(12)</sup>

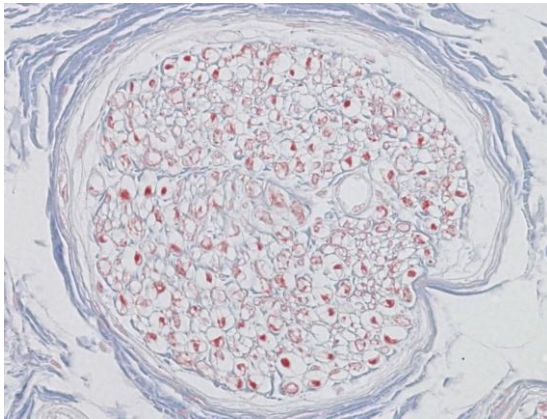
**Figura 01. Microfotografia de corte transversal de um nervo.**

Os tubos endoneurais ficam agrupados e formam um número variável de fascículos. O perineuro circunda cada fascículo. O perineuro é composto por fibras

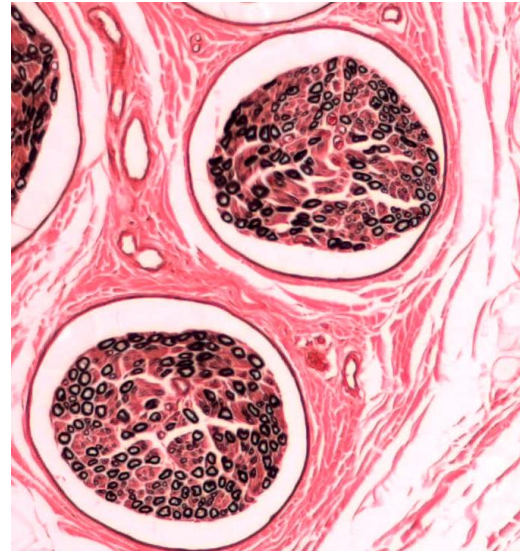
de colágeno e camadas concêntricas de células planas, que ficam muito próximas, unidas por junções apertadas. O perineuro cria uma barreira de difusão contra o ambiente de seu entorno semelhante à barreira hematoencefálica. O perineuro mantém uma pressão intrafascicular positiva e protege contra infecção.<sup>(13)</sup> O epineuro circunda camadas de perineuro. O epineuro que preenche o espaço entre os fascículos é chamado epineuro interno e o epineuro que cerca o nervo é denominado epineuro externo. O epineuro interno funciona como um amortecedor para os fascículos. No local onde os nervos periféricos abarcam articulações e onde são aplicadas forças compressivas maiores, há o aumento da espessura do epineuro interno. As camadas externas do epineuro são compostas por colágeno e algumas fibras de elastina.<sup>(9)</sup>

Os grupos fasciculares anatômicos são formados por condensações do epineuro interno. As interconexões entre fascículos formam um plexo fascicular.<sup>(11)</sup> Embora estes plexos fasciculares sejam abundantes nas partes proximais dos nervos periféricos, poucos estão localizados na parte mais distal dos nervos periféricos.<sup>(11-14)</sup> A localização e a posição dos fascículos dentro do nervo dependem do destino do ramo do fascículo na periferia.<sup>(11)</sup>





Tricômico de Masson

Souza, 2011 <sup>(15)</sup> Coloração: Tetróxido de ósmio  
Aumento 100X**Figura 02. Corte transversal do nervo tibial.**

A irrigação dos nervos periféricos geralmente se faz por meio do mesoneuro ou da suspensão do mesentério.<sup>(14)</sup> Os *vasa nervorum* são um sistema longitudinal de vasos dentro do nervo que permite a circulação, mesmo após a liberação dos tecidos em torno dele.<sup>(14,16)</sup>

As células de Schwann têm papel fundamental no processo de regeneração das células nervosas periféricas e produzem várias das moléculas responsáveis pela regeneração axonal orientada <sup>(17,18)</sup> e, dentre elas estão o colágeno, a laminina, a fibronectina, o nidogeno e a tenascina. <sup>(19-24)</sup> A lesão dos nervos periféricos pode resultar em comprometimentos motores, sensoriais e autonômicos incluindo paresias ou plegias, encurtamentos musculares, retrações teciduais, dor, edema, parestesias, áreas de hipoestesia ou anestesia, limitações

funcionais além de uma série de outras complicações secundárias. <sup>(5,25)</sup> A regeneração do nervo periférico após a lesão não se estabelece apenas do crescimento do prolongamento axonal comprometido, mas envolve a integração de processos interativos e dinâmicos compreendendo diversas moléculas e estruturas, que determina uma sequência temporal que precisa ser considerada na conduta terapêutica. <sup>(26)</sup>

A neurotmeose ocorre quando há bloqueio da condução do impulso nervoso, causado por uma solução de continuidade com transecção completa do nervo <sup>(27,28)</sup> e, só pode ser corrigida cirurgicamente.

Quando um nervo periférico é seccionado, mudanças celulares e moleculares se iniciam em toda sua extensão. <sup>(29,30)</sup> Ocorre degeneração walleriana no coto distal, onde o axônio se desintegra por ação proteolítica das enzimas presentes no axoplasma. Os macrófagos fagocitam tanto o axônio quanto as células de Schwann e impedem, assim, obstrução na próxima regeneração deste axônio, além de sintetizar fatores de crescimento nervoso que dela participam. <sup>(31-34)</sup>

A regeneração de um nervo periférico ocorre na taxa aproximada de 1mm /dia , <sup>(1,35-37)</sup> após lesão do tronco nervoso. Esta regeneração acontece em dependência de fatores fisiológicos ou de fatores cirúrgicos. Seu sucesso depende do comprimento do espaço provocado pela lesão. Por isso é necessário que, na reconstrução da solução de continuidade de um tronco nervoso, haja o reestabelecimento de sua Anatomia, feito pela reaproximação dos cotos nervosos, e nisto se baseia a técnica de neurorrafia. <sup>(38,39)</sup> A finalidade de todas as técnicas

de reparação microcirúrgicas utilizadas para que a regeneração nervosa aconteça é o realinhamento dos cotos nervosos com o mínimo de traumatismo cirúrgico.<sup>(40)</sup>

A técnica de neurorrafia data de muitos séculos. No século XIII, foi descrita a primeira neurorrafia término-terminal, por William de Saliceto (1210-1277), onde ocorreu o alinhamento dos condutos axonais pela sutura direta dos cotos lesados.<sup>(41)</sup> Desde então, várias técnicas de neurorrafia foram desenvolvidas, sendo as mais conhecidas a sutura epineural,<sup>(42-44)</sup> a perineural ou<sup>(45-47)</sup> e a epiperineural.<sup>(48)</sup>

Surgiram, então, estudos para determinar como seria a regeneração do nervo no interior de tubos confeccionados a partir de diversos materiais, sendo esta técnica de reparo denominada “regeneração guiada”. Desta feita, usaram-se tubos de silicone,<sup>(49-58)</sup> tubos de materiais sintéticos biodegradável,<sup>(59-65)</sup> tubos mesoteliais pré-formados,<sup>(66-68)</sup> tubos pseudosinoviais,<sup>(65)</sup> tubos de colágeno,<sup>(69,70)</sup> ou mesmo artérias<sup>(71)</sup> e veias.<sup>(72-76)</sup> Mesmo propostas extremamente radicais foram executadas para resolver a solução de continuidade do nervo, como o encurtamento ósseo do úmero e do fêmur, com a finalidade de realizar a sutura término-terminal dos cotos nervosos.<sup>(77)</sup>

Enxertos vascularizados de nervo<sup>(78-85)</sup> faziam parte de uma técnica mais elaborada, onde os vasos nutrientes eram anastomosados aos vasos da área receptora por meio de microcirurgia. Mas este fato limitou a sua utilização, que ficou indicada apenas para os casos onde o leito receptor era de má qualidade, com muito tecido fibroso e vascularização pobre. Isto porque, nestes casos, o enxerto convencional teria dificuldade de integração.<sup>(86)</sup>

Ademais, <sup>(86)</sup> foi proposta uma técnica de retalho ilhado de nervo, que só deveria ser utilizada quando houvesse nervo doador próximo. Solução semelhante já havia sido feita por Strange, <sup>(87)</sup> com a transferência de retalho nervoso vizinho em dois tempos cirúrgicos. Uma maneira de reinervar o músculo em situações especiais também foi proposta com a neurotização muscular direta (implantação de um nervo diretamente no tecido muscular). Este método é indicado quando não se dispõe do coto distal do nervo. <sup>(88-92)</sup>

O maior número de trabalhos da literatura mostra opções para o reparo de nervos de modo término-terminal, isto é, o coto proximal unido diretamente ao coto distal. <sup>(93-96)</sup> Entretanto, existem publicações que propõem um outro tipo de neurorrafia, a látero-terminal ou término-lateral, designada com o termo “anastomose de nervo periférico”. Os primeiros a utilizar esta técnica foram Letie Vant, em 1873 e Huber, em 1895, não observando recuperação do nervo implantado. <sup>(97)</sup> A primeira descrição desta técnica foi feita por Kennedy, em paciente com espasmo hemifacial, operado em 1899, embora só tenha publicado este caso em 1901. Ballance, em 1895, <sup>(98)</sup> utilizou a mesma técnica para tratamento de paralisia facial, ao suturar o coto distal do nervo facial lesado à região lateral do nervo acessório ipsilateral, com preservação de sua função. Observou-se retorno parcial da função motora da face, com a seqüela de estar sempre associado ao movimento de ombro. Harris, também em 1903, experimentou a neurorrafia látero-lateral em pacientes com paralisias obstétricas, porém, com péssimos resultados. <sup>(96)</sup>

Sheren testou a execução da neurorrafia término-lateral de várias maneiras.<sup>(99)</sup> Entre elas, a sutura do coto distal do nervo afetado na face lateral de outro nervo íntegro; a secção de um nervo íntegro e a sutura de seu coto proximal na face lateral do nervo afetado; a elevação de retalho do nervo íntegro e sutura término-terminal no nervo lesado. Além disso, enfatizou a necessidade de se fazer em todas as suturas término-laterais uma incisão longitudinal ou transversal no nervo íntegro que receberia o nervo lesado, o que visava estabelecer amplo contato entre os axônios dos dois nervos. Afirmava que sem este procedimento a neurorrafia não teria resultado. Vários autores não tiveram resultados sequer razoáveis com esta técnica.<sup>(99,100)</sup>

Stookey, em experimentos com cães, usou enxerto de nervo com uma de suas extremidades suturada lateralmente ao nervo doador e outra extremidade implantada diretamente no músculo desnervado. Também recomendava que se realizasse uma incisão no nervo doador, para promover a união término-terminal dos funículos. Seus estudos eletrofisiológicos e histológicos mostraram bons resultados.<sup>(101)</sup> Gatta, em 1938, introduziu a neurorrafia látero-lateral em trabalho experimental em coelhos, ao suturar o nervo fibular lateralmente ao tibial, manter uma superfície de contato de 3 a 4 mm entre os dois nervos.<sup>(102)</sup>

Afirmações categóricas de Babcock,<sup>(103)</sup> sugeriam o abandono definitivo de implante lateral de nervo, ou seja, da neurorrafia término-lateral. Isto desestimulou a maioria dos cirurgiões experimentais a empregar este tipo de neurorrafia, o que a delegou ao esquecimento. Na verdade, todas as tentativas iniciais de induzir o crescimento axonal por meio das neurorrafias término-laterais

e látero-laterais produziram resultados desapontadores e, então, ambas as técnicas foram abandonadas por quase um século.<sup>(104)</sup>

A publicação dos resultados de experimentos de Viterbo<sup>(105)</sup>, ao demonstrar por comparação clínica e eletrofisiológica, a reinervação da musculatura flexora da perna de ratos após a sutura do coto distal de um nervo fibular, previamente lesado, ao aspecto lateral do nervo tibial ipsilateral intacto, provocou o ressurgimento do interesse por esta técnica e estimulou uma série de pesquisas experimentais.<sup>(105)</sup> Em humanos, os primeiros trabalhos com esta técnica datam do fim da década de 1990, onde o próprio Viterbo demonstrou bons resultados clínicos no tratamento de paralisias faciais, ao usar o nervo facial contra lateral como fonte doadora de axônios, que denominou de “facial crossover”.<sup>(106,107)</sup>

O embasamento científico que justifica a neurorrafia término-terminal é fundamentado na necessidade de existir um coto proximal com axônios em regeneração, ao penetrar em um tubo endoneural vazio, pós-degeneração walleriana. Isto torna a neurorrafia término-terminal a forma mais compatível com o processo anátomo-fisiológico da regeneração nervosa. Entretanto, situações acontecem onde só se dispõe de um coto distal e isto justifica as tentativas de se obter a reinervação deste coto à custa de um nervo íntegro, isto é, que não foi seccionado.<sup>(108)</sup> O fato de não necessitar seccionar nervos, que poderiam servir como doadores potenciais, permitiu uma vasta gama de opções de reconstrução anastomóticas. Ao se utilizar a técnica desenvolvida por Viterbo, reinervou-se o retalho transversal do músculo reto abdominal, na reconstrução mamária.<sup>(108)</sup>

A neurografia término-lateral independe da distância entre os cotos, sendo necessário apenas um nervo doador próximo ao coto nervoso lesado, o que torna esta técnica preferida ao enxerto de nervo. <sup>(109)</sup> A técnica de neurografia término-lateral pode induzir o tratamento colateral funcional, tanto do axônio motor quanto do sensorial, do nervo periférico. <sup>(110)</sup> A neurografia látero-lateral é empregada como uma opção à neurografia término-lateral. <sup>(110)</sup>

Para reinervar a célula-alvo, um grande número de brotos de axônio deve ser capaz de cruzar o caminho da área de reconstrução látero-lateral, do nervo doador para o nervo lesado. Os fatores neurotrópicos, conhecidos desde 1898, quando foram sugeridos por Forssman como o conceito principal na regeneração nervosa, são essenciais para o crescimento neuronal. Mesmo que pareça que as células de Schwann tenham a capacidade de atrair, por quimiotaxia, os axônios em regeneração, a maioria dos fatores neurotrópicos é derivada das células-alvo, interiorizados e transportados de maneira retrógrada pelo axoplasma intacto. O suprimento constante destes fatores pela célula-alvo é a provável causa do retorno funcional superior na reparação látero-lateral. <sup>(3)</sup>

Nos anos 1847 e 1898, Delesse e Rosixal, respectivamente, tentaram demonstrar relação entre área ocupada por uma estrutura em estudo e a área bidimensional de outra estrutura que continha igual a densidade de volume da estrutura em estudo, por um método que foi considerado complicado. <sup>(111)</sup> Em 1930, Thomson e Glagoleff simplificaram o método e demonstraram a proporção de pontos que permaneceram sobre um componente na estrutura. Com isso, Chalkey em 1943, <sup>(112)</sup> pela primeira vez, utilizou o método em estudos histológicos

e expandiu a Estereologia na área da saúde. Assim, a necessidade de se obter dados quantitativos confiáveis foi estimulada.

Estereologia é um conjunto de procedimentos geométricos estatísticos com a finalidade de se obter informações quantitativas das estruturas tridimensionais a partir de suas imagens bidimensionais. <sup>(113)</sup> Em Histologia, a Estereologia se explica como um sistema metodológico de interpretação matemática de estruturas tridimensionais em secções histológicas.<sup>(114)</sup> A Estereologia estima densidades: volume (Vv), de comprimento (Lv), de superfície (Sv) e numérica (Nv). <sup>(112)</sup> Estudar densidade em Estereologia é fundamental devido à natureza do material de trabalho (cortes ou secções).<sup>(112)</sup> A análise quantitativa de uma estrutura é a densidade de seus componentes, e então, densidade do volume será quantidade de estruturas por unidade de volume, de superfície ou de comprimento.<sup>(112)</sup> A técnica estereológica é descrita como sendo a movimentação imaginária de um ponto matemático que se move aleatoriamente ao longo de um determinado tecido realizando esse trajeto em 3 dimensões. <sup>(112)</sup>

No projeto de pesquisa se buscou minimizar os processos de degeneração e favorecer o reparo. Justifica-se visando identificar possíveis variações no procedimento de reconstrução nervosa que resultem na menor agressão ao tecido subjacente.



**OBJETIVOS**

---

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Perfazer um estudo experimental estereológico axonal comparativo entre neurorrafias término-lateral e látero-lateral.

### **Específicos**

Determinar densidade de volume de axônios, de endoneuro e de bainha de mielina de nervos fibular e tibial de ratos Wistar após neurorrafias término lateral e látero-lateral.

Determinar densidade de volume de axônios, de endoneuro e de bainha de mielina nas diferentes áreas de anastomoses em neurorrafias término-lateral e látero-lateral.

Comparar peso do músculo tibial cranial em neurorrafia término-lateral e látero-lateral.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em conformidade com a lei 6.638 de 08 de maio de 1979, apreciado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP (FAMERP, com Protocolo CEEA 0554-2009).(Anexo 1).

Foram utilizados 20 ratos machos da raça Wistar, variedade *albinus*, com peso entre 300 e 350g e com idade média de 20 semanas. Os animais foram fornecidos pelo biotério da FAMERP e receberam alimentação e água *ad libitum* e permaneceram em local com luminosidade controlada.

Anestesia foi realizada por injeção intramuscular de xilazina 0,1 ml/ 100g e ketamina 0,1ml/ 100g e, após se verificar a não responsividade do animal a estímulos reflexos, estes foram posicionados ventralmente para execução da cirurgia.

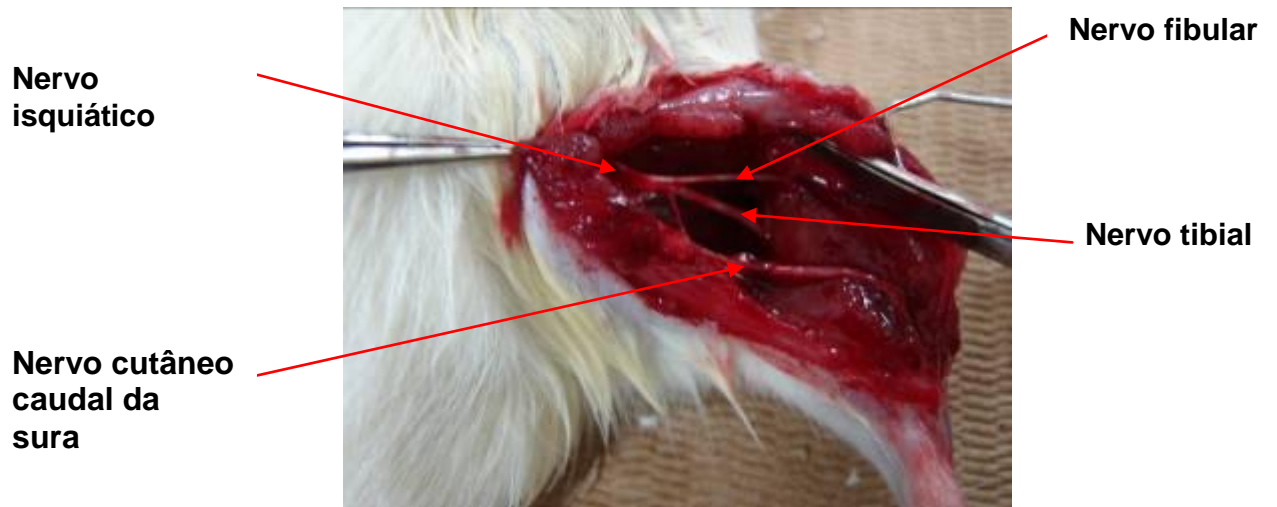
A Figura 03 ilustra a tricotomia dos animais, realizada em toda a face posterior da região glútea.



**Figura 03. Tricotomia na face posterior da região glútea direita.**

Os animais foram divididos em 4 grupos (G1 a G4), e cada grupo composto por 05 ratos. Nestes, o acesso cirúrgico se deu na região glútea direita.

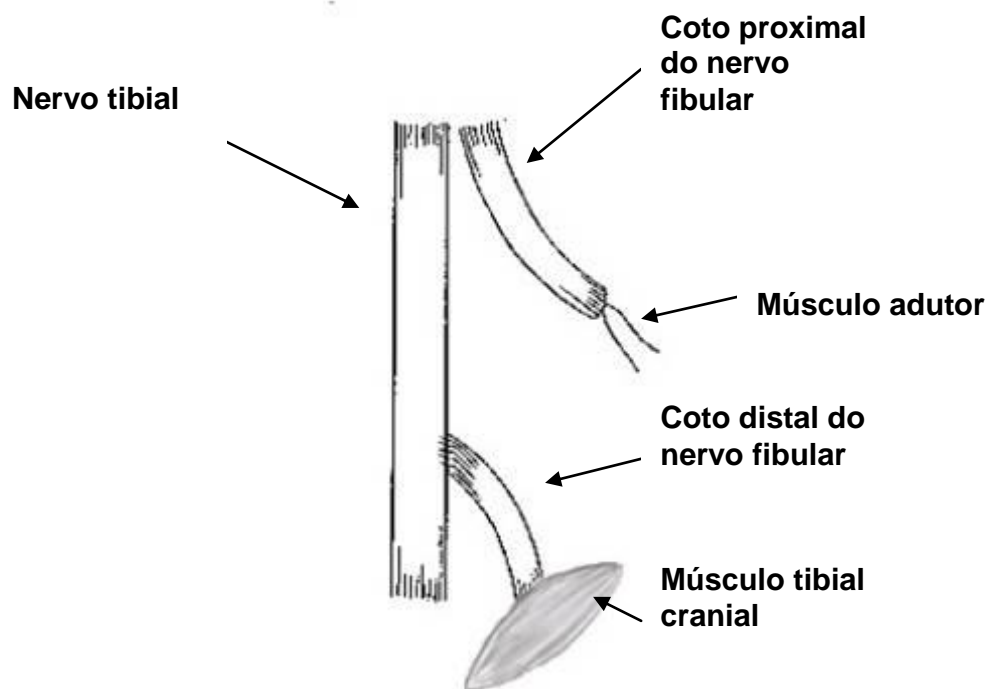
Realizou-se incisão mediana de 4 cm de extensão na região glútea com exposição de pele, tela subcutânea e músculo adjacente para evidenciar o nervo isquiático e seus ramos fibular, tibial e cauda da sura, conforme Figura 04.



**Figura 04. Exposição cirúrgica do nervo isquiático e seus ramos.**

O procedimento de neurorrafia foi realizado com auxílio de lentes bi-oculares BIOART de aumento de 6x .<sup>(115)</sup>

**1) Grupo 1 (G1):**



**Figura 05. G1- Neurorrafia término-lateral.**

O nervo fibular foi seccionado para a obtenção de 2 cotos, um proximal e um distal. O coto proximal foi encurvado medialmente e sepultado no interior do músculo adutor com 1 ponto simples de mononylon 8.0. <sup>(116)</sup>

O coto distal teve sua extremidade suturada ao nervo tibial por meio de sutura de neurorrafia término-lateral com 3 pontos simples de mononylon 10.0 sem retirada do epineuro (Figura 05).

## 2) Grupo 2 (G2):

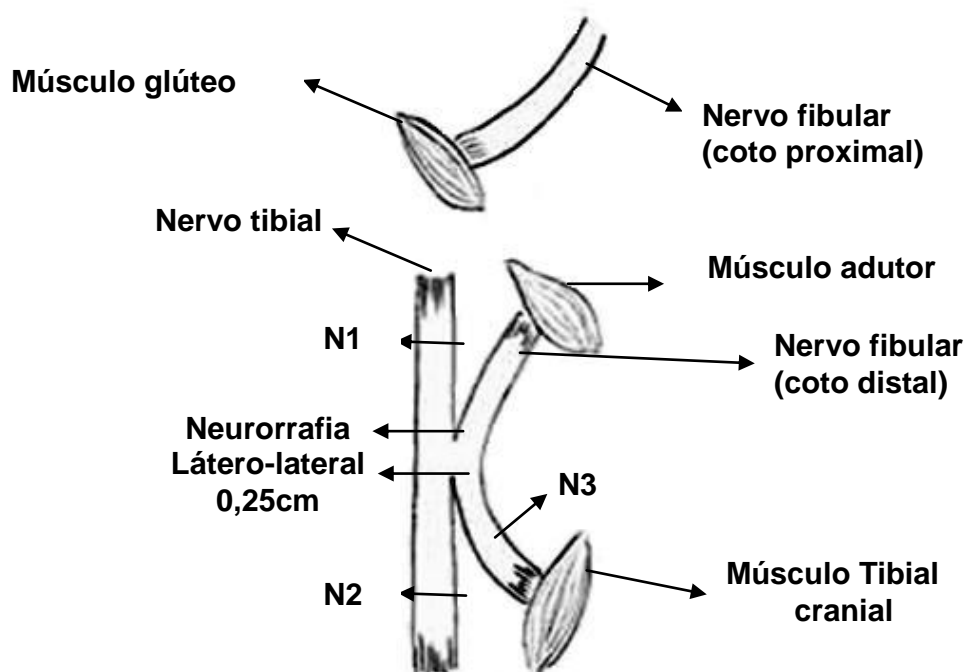


Figura 06. G2- Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm.

N1, N2 e N3 significam locais de corte para confecção de lâminas histológicas.

O nervo fibular foi seccionado para a obtenção de 2 cotos, um proximal e um distal. O coto proximal foi encurvado medialmente e sepultado no interior do músculo glúteo e com 1 ponto simples de mononylon 8.0.

O coto distal foi encurvado lateralmente, sua extremidade foi sepultada no músculo adutor com 1 ponto simples de mononylon 8.0, com manutenção da distância de 1 cm entre o coto proximal e o coto distal.

Realizou-se, então, neurorrafia látero-lateral de 0,25cm sem retirada do epineuro entre nervo tibial e fibular com fio mononylon 10.0 (Figura 06). Para medida da rafia (0,25cm), foi usado especímetro DBMCO GERMANY STAINIES (Figuras 07 e 08).<sup>(117)</sup>



**Figura 07. Especímetro DBMCO GERMANY STAINIES.**





**Figura 08. Mensuração das rafias látero-laterais de 0,25cm.**

### 3) Grupo 3 (G3):

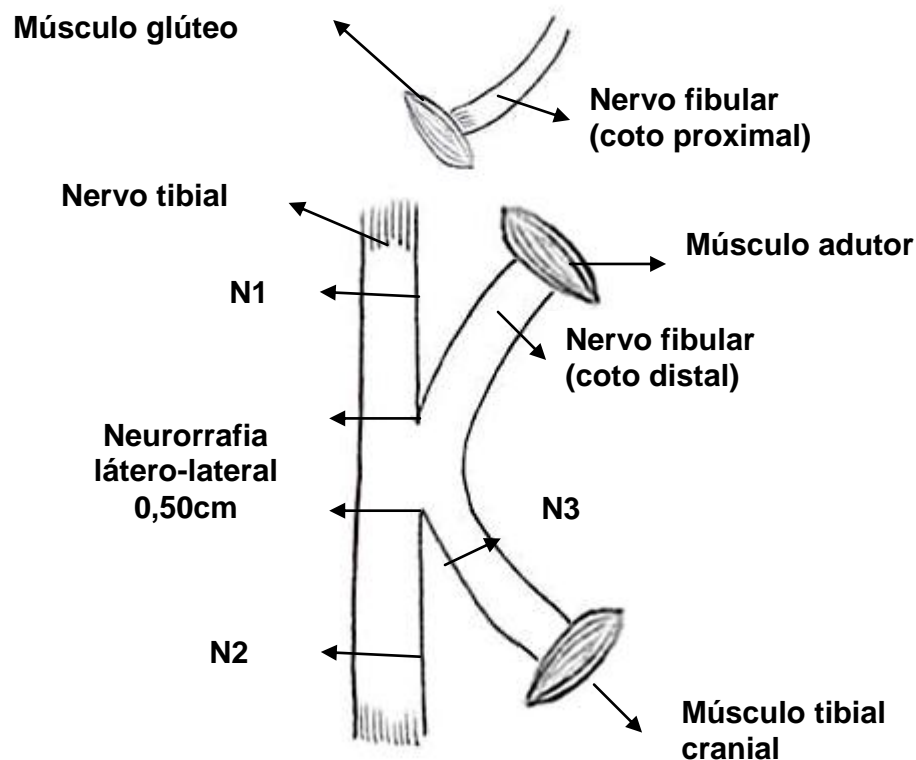


Figura 09. G3- Neurorafia látero-lateral com rafia de 0,50cm.

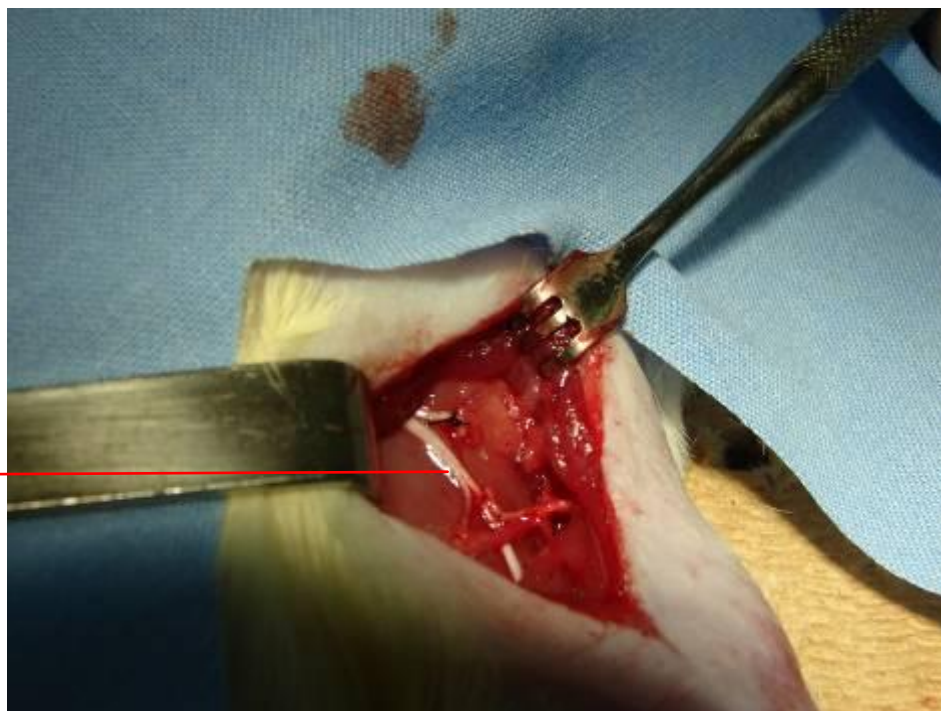
N1, N2 e N3 significam locais de corte para confecção de lâminas histológicas.

O nervo fibular foi seccionado para a obtenção de 2 cotos, um proximal e um distal. O coto proximal foi encurvado medialmente e sepultado no interior do músculo glúteo com 1 ponto simples de mononylon 8.0.

O coto distal foi encurvado lateralmente e sua extremidade foi sepultada no músculo adutor e com 1 ponto simples de mononylon 8.0, com a preocupação de manter a maior distância média possível (1 cm) entre o coto proximal e o coto distal.

Realizou-se, então, neurorrafia látero-lateral de 0,50cm (Figura 10) sem retirada do epineuro entre nervo tibial e fibular com fio mononylon 10.0. Para medida da rafia foi usado espécímetro DBMCO GERMANY STAINIES (Figura 07).

Rafia de  
0,50cm



**Figura 10. Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm.**

#### 4 ) Grupo 4 (G4)

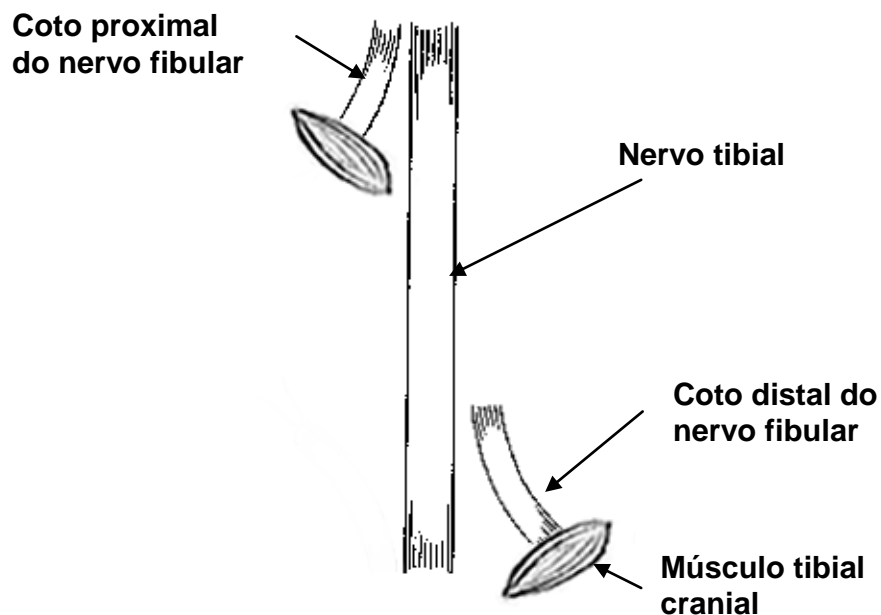


Figura 11. G4- Controle de Desnervação.

O nervo fibular foi seccionado e seus cotos proximal e distal foram encurvados e suturados em grupos musculares diferentes e distantes por meio de um ponto simples de mononylon 8.0. O nervo tibial permaneceu intacto. Este grupo serviu como controle de desnervação (Figura 11).

Todos os membros esquerdos serviram de controle de normalidade.

Após cada procedimento cirúrgico, os ratos permaneceram em gaiolas apropriadas e separadas por grupo. Receberam os mesmos cuidados (ração comercial e água *ad libidum* e a luminosidade apropriada) durante o intervalo de 6 meses, quando foram sacrificados por dose excessiva de anestésico para colheita de material para estudo estereológico. Na primeira semana, após a cirurgia, os animais receberam por via oral medicação analgésica (dipirona

sódica diluída em água) a cada 8 horas e anti-inflamatória (cetoprofeno diluído em água) a cada 8 horas.

Foi removido, além dos fragmentos nervosos, o músculo tibial cranial, com o cuidado para excisão desde a origem até a inserção, com conservação da musculatura para pesagem em balança de precisão.

### **Técnica Histológica**

Os nervos coletados foram identificados pelas seguintes siglas:

#### **Grupo 1 (G1):**

G1NF - corte transversal do nervo fibular, distal à neurografia término-lateral.

G1NT - corte transversal do nervo tibial, distal à neurografia término-lateral.

#### **Grupo 2 (G2):**

G2NT- corte transversal do nervo tibial, distal à neurografia látero-lateral de 0,25cm.

G2NF- corte transversal do nervo fibular, distal à neurografia látero-lateral de 0,25cm.

#### **Grupo 3 (G3):**

G3NT- corte transversal do nervo tibial, distal à neurografia látero-lateral de 0,50cm.

G3NF-corte transversal do nervo fibular, distal à neurografia látero-lateral de 0,50cm.

#### **Grupo 4 (G4)**

G4NT – Controle de normalidade; corte transversal de nervo tibial.

G4NF – Controle de normalidade; corte transversal de nervo fibular.

Após remoção, os nervos foram fixados em formaldeído a 10% e incluídos em parafina. A seguir, foram cortados transversalmente em espessura de 0,5  $\mu\text{m}$  e corados com Tricômico de Masson.<sup>(12)</sup>

#### **Técnica Estereológica**

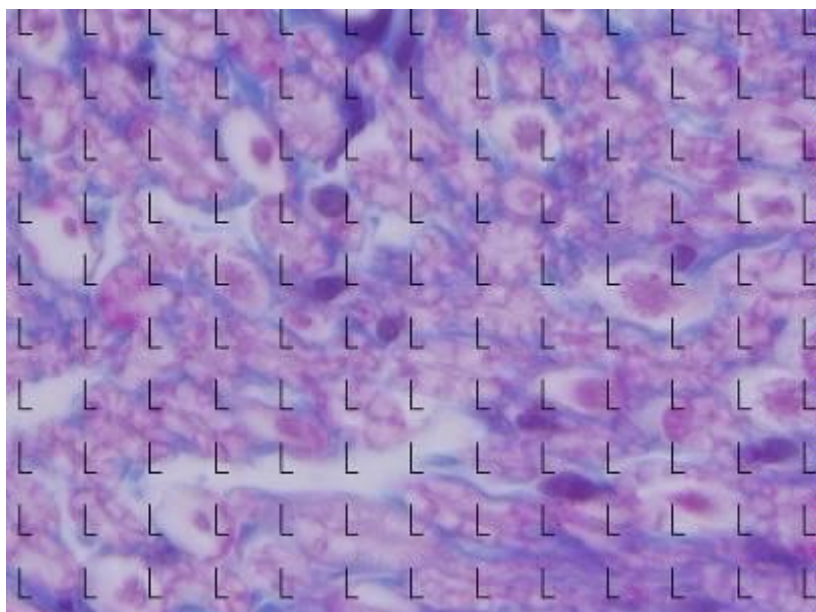
O parâmetro estereológico considerado para o estudo dos nervos periféricos (axônios, endoneuros e bainha de mielina) foi a densidade de volume, estimada pela técnica de Chalkley<sup>(112)</sup>, cuja fórmula é:

$$Vv = \frac{Pp}{Pt}$$

Onde  $Pp$  são os pontos que se sobrepõem à estrutura considerada na área-teste (ou pontos contados sobre a estrutura estudada, no caso cada nervo), e  $PT$  é o total de pontos-teste no sistema teste<sup>(118)</sup>, com resultados expressos em forma de proporção (número de pontos da estrutura considerada/ $\text{mm}^2$ ). Na análise dos nervos, resultados foram referentes à contagem de pontos de cada um dos fascículos nervosos incidentes em cada grade de *Weibel*<sup>®</sup>.<sup>(118)</sup>

Para a compilação dos dados estereológicos, foi utilizado o Programa *Image Pro Plus* versão 6.0. <sup>(119)</sup> Em resposta às especificações solicitadas pelo programa, empregou-se a grade estereológica de Weibel<sup>®</sup> com 130 pontos (Figura 12) e se padronizou distância real entre os pontos de 1  $\mu\text{m}$  e número de campos microscópicos igual a 20 (correspondente ao número de campos microscópicos aleatórios observados em cada lâmina histológica). Em seguida, foi analisado, em cada lâmina histológica, o número de pontos incidentes sobre o endoneuro, o número de pontos sobre os axônios e o número de pontos incidentes sobre a bainha de mielina.

Pôde-se, assim, obter para cada nervo a porcentagem e a densidade de volume das estruturas neurais (axônios, endoneuro e bainha de mielina). A porcentagem foi obtida por meio da média aritmética da soma dos vinte campos histológicos dos nervos seccionados em cada um dos ratos. A densidade de volume foi obtida pela divisão do total de estruturas contadas pelo padrão-teste multiplicado por cem. Para os valores decimais da média dos dados estereológicos mantiveram-se duas casas decimais.



**Figura 12. Grade de Weibel sobreposta a lâmina histológica de nervo periférico.**

### **Pesagem Muscular**

Após a eutanásia, dada por excesso de anestésico, o músculo tibial cranial de cada perna operada foi dissecado totalmente, desde a origem até a inserção com auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica (Figura 13) para então ser pesado em balança de precisão.



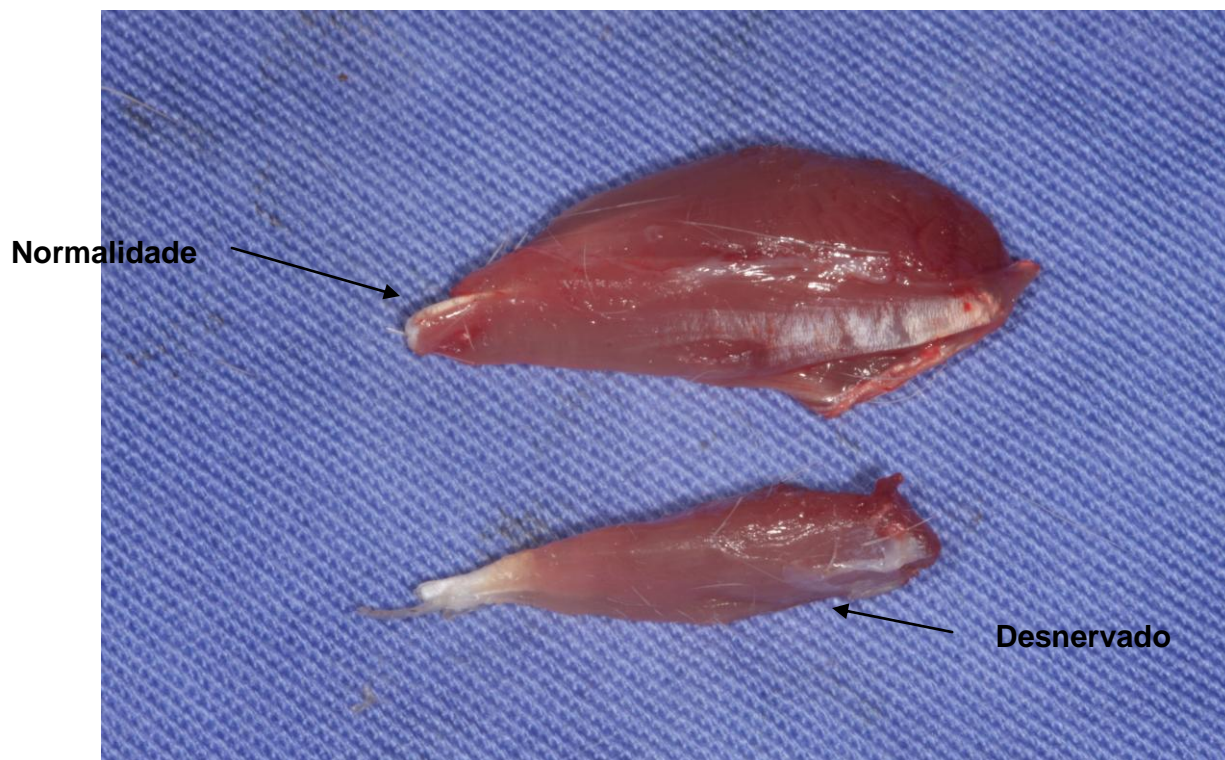


Figura 13. Músculo tibial cranial removido (normalidade e desnervado).

### Análise Estatística

Para avaliação estatística dos dados estatísticos quantitativos aplicou-se o teste não paramétrico de *Mann Whitney*<sup>(120)</sup> com intuito de verificar se a porcentagem da densidade de volume entre os grupos apresentou ou não diferença significativa. Adotou-se nível de significância de 5%.

***RESULTADOS***

---

## **RESULTADOS**

I. Porcentagem de pontos incidentes sobre axônio, endoneuro e bainha de mielina (dados absolutos presentes no apêndice I)

### I a. Nervo Tibial

A porcentagem de pontos incidentes sobre axônios presentes no nervo tibial seccionado foi de 16% no grupo G1NT, 12% em G2NT, 10% em G3NT e 23% no grupo controle G4NT. Houve redução significativa no número relativo de axônios dos grupos G1NT, G2NT e G3NT em relação ao grupo controle G4NT (valor  $p=0,0079$ ). Houve redução significativa entre os grupos G1NT e G3NT e entre G2NT e G3NT ( $p=0,0079$ ) quando comparados entre si.

Porcentagem de pontos incidentes sobre endoneuro foi 37% em G1NT, 54% em G2NT, 54% em G3NT e 34% no grupo controle G4NT. Não houve redução significativa do número relativo de endoneuro nos grupos G2NT e G3NT em relação ao grupo controle ( $p=0,8419$ ). Entre os grupos G1NT e G4NT, não houve diferença estatística ( $p=0,1508$ ).

Porcentagem de pontos incidentes sobre bainha de mielina foi de 42% em G1NT, 26% em G2NT, 28% em G3NT e 28% em G4NT. Não houve redução significativa entre os grupos G3NT e G2NT em relação ao grupo controle ( $p=0,6905$ ). Em relação ao grupo G1NT e G4NT, houve significância estatística

( $p=0,0079$ ). Entre os grupos G3NT e G2NT não houve diferença estatística significativa ( $p=1$ ).

#### I b. Nervo Fibular

A porcentagem de pontos incidentes sobre axônios foi de 12% em G1NF, 12% em G2NF, 9% em G3NF e 14% em G4NF. Houve redução significativa do número relativo de axônios do grupo G3NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0159$ ). Não houve redução significativa do número relativo de axônios em ambos os grupos G1NF e G2NF em relação ao grupo controle ( $p=0,3095$  e  $0,222$ , respectivamente). Não houve ainda diferença significativa entre os grupos G3NF e G2NF com  $p=0,0556$ , G1NF e G3NF com  $p=0,222$  e G1NF e G2NF com  $p=0,8413$ .

A porcentagem de pontos incidentes sobre endoneuro foi de 47% em G1NF, 53% em G2NF, 51% em G3NF e 33% no grupo controle G4NF. Não houve redução significativa do número relativo de endoneuro nos grupos G2NF e G3NF em relação ao grupo controle ( $p=0,6905$ ). Na comparação do grupo G1NF ao G4NF, não houve diferença estatística ( $p=0,1508$ ). Na comparação das raias de 0,50cm G3NF e 0,25cm G2NF, não houve redução significativa ( $p=0,6905$ ).

A porcentagem de pontos incidentes sobre bainha foi de 34% em G1NF, 28% em G2NF, 30% em G3NF e 44% em G4NF. Houve redução significativa do grupo G1NF em relação ao grupo controle ( $p=0,1508$ ). Houve redução significativa

dos grupos G2NF e G3NF em relação ao grupo controle ( $p=0,0079$ ). Entre os grupos G3NF e G2NF não houve diferença estatística significativa ( $p=0,6905$ ).

## II. Densidade de Volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina

### II a. Nervo Fibular

A Tabela 01 evidencia a porcentagem da densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G1NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de axônios de G1NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,3095$ ).

Tabela 01. Porcentagem da densidade de volume (mm<sup>2</sup>) de axônios no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G1NF = neurografia término-lateral do nervo fibular ao nervo tibial; X = média aritmética; *U*- valor tabelado e *p(U)*-valor calculado).

	G1NF	G4NF
	14	16
	7	13
	14	10
	13	16
	11	16
X	12	14
<i>U</i> 7		
<i>P(U)</i> 0,3095		

A Tabela 02 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G2NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de axônios de G2NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,222$ ).

Tabela 02. Porcentagem da densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G2NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm ; X = média aritmética, U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NF	G4NF
	12	16
	13	13
	10	10
	12	16
	14	16
X	12	14
	U 6	
	$P(U)0,222$	

A Tabela 03 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G3NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de axônios de G3NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0159$ ).

Tabela 03. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G3NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética, U- valor tabelado de U e  $p(U)$ -valor calculado).

	G3NF	G4NF
	12	16
	7	13
	7	10
	9	16
	10	16
X	9	14
<i>U</i> 1		
<i>P(U)</i> 0,0159		

A Tabela 04 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G2NF e G3NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de axônios entre os grupos ( $p=0,0556$ ).



Tabela 04. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo fibular seccionado (G2NF= neurografia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm; G3NF= neurografia látero-lateral do nervo fibular de 0,50cm;  $\bar{X}$  = média aritmética,  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NF	G3NF
	12	12
	13	7
	10	7
	12	9
	14	10
$\bar{X}$	12	9
$U$ 3		
$P(U)$ 0,0556		

A Tabela 05 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G1NF e G2NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de axônios entre os grupos ( $p=0,8413$ ).

Tabela 05. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo fibular seccionado (G1NF) neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G2NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G2NF
	14	12
	7	13
	14	10
	13	12
	11	14
X	12	12
	$U$ 11,5	
	$P(U)$ 0,8413	

A Tabela 06 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G1NF e G3NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de axônios entre os grupos ( $p=0,2222$ ).

Tabela 06. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo fibular seccionado (G1NF= neurografia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G3NF= neurografia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,50cm;  $\bar{X}$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G3NF
	14	12
	7	7
	14	7
	13	9
	11	10
$\bar{X}$	12	9
$U$ 6		
$P(U)$ 0,2222		

A Tabela 07 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G1NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de endoneuro de G1NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,1508$ ).

Tabela 07. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G1NF= neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo tibial;  $\bar{X}$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G4NF
	43	32
	49	40
	46	32
	46	31
	50	32
$\bar{X}$	47	33
	$U$ 5	
	$P(U)$ 0,1508	

A Tabela 08 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G2NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de endoneuro de G2NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0079$ ).

Tabela 08. Densidade de volume (mm<sup>2</sup>) de endoneuro no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G2NF= neurorrafia látero-*lateral* do nervo fibular com rafia de 0,25cm ; X = média aritmética, U-valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NF	G4NF
	49	32
	53	40
	59	32
	53	31
	49	32
X	53	33
	$U 0$	
	$P(U)0,0079$	

A Tabela 09 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G3NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de endoneuro de G3NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0079$ ).

Tabela 09. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G3NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética, U-valor tabelado de U e  $p(U)$ -valor de p).

	G3NF	G4NF
	44	32
	57	40
	46	32
	51	31
	56	32
X	51	33
$U = 0$		
$P(U) = 0,0079$		

A Tabela 10 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G2NF e G3NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de endoneuro entre os grupos ( $p=0,6905$ ).

Tabela 10. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo fibular seccionado (G2NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm; G3NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular de 0,50cm ; X = média aritmética, U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NF	G3NF
	49	44
	53	57
	59	46
	53	51
	49	56
X	53	51
<i>U</i> 10		
<i>P(U)</i> 0,6905		

A Tabela 11 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G1NF e G2NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de endoneuro entre os grupos ( $p=0,0317$ ).

Tabela 11. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo fibular seccionado (G1NF= neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G2NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G2NF
	43	49
	49	53
	46	59
	46	53
	50	49
$X$	47	53
$U 2$		
$P(U) 0,0317$		

A Tabela 12 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G1NF e G3NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de endoneuro entre os grupos ( $p=0,2222$ ).



Tabela 12. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo fibular seccionado (G1NF=neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G3NF=neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,50cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G3NF
	43	44
	49	57
	46	46
	46	51
	50	56
$X$	47	51
$U$ 6,6		
$P(U)$ 0,2222		

A Tabela 13 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G1NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de bainha de mielina de G1NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0079$ ).

Tabela 13. Densidade de volume (mm<sup>2</sup>) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G1NF= neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo tibial; X = média aritmética; *U*- valor tabelado e *p(U)*-valor calculado).

	G1NF	G4NF
	35	43
	32	43
	33	46
	36	44
	32	46
X	34	44
	<i>U</i> 0	
	<i>P(U)</i> 0,0079	

A Tabela 14 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G2NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de bainha de mielina de G2NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0079$ ).

Tabela 14. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G2NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm ; X = média aritmética, U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NF	G4NF
	33	43
	25	43
	26	46
	26	44
	30	46
X	28	44
$U \ 0$		
$P(U)0,0079$		

A Tabela 15 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G3NF e G4NF do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de bainha de mielina de G3NF em relação ao grupo controle G4NF ( $p=0,0079$ ).

Tabela 15. Densidade de volume (mm<sup>2</sup>) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G4NF = nervo fibular seccionado ou controle; G3NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética, U- valor tabelado de U e  $p(U)$ -valor de p).

	G3NF	G4NF
	29	43
	28	43
	40	46
	30	44
	24	46
X	30	44
$U 0$		
$P(U) 0,0079$		

A Tabela 16 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G2NF e G3NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de bainha de mielina entre os grupos ( $p=0,6905$ ).

Tabela 16. Densidade de volume (mm<sup>2</sup>) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G2NF= neurografia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm; G3NF= neurografia látero-lateral do nervo fibular de 0,50cm ; X = média aritmética, *U*- valor tabelado e *p(U)*-valor calculado).

	G2NF	G3NF
	33	29
	25	28
	26	40
	26	30
	30	24
X	28	30
	<i>U</i> 10	
	<i>P(U)</i> 0,6905	

A Tabela 17 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G1NF e G2NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de bainha de mielina de G1NF em relação ao grupo G2NF (*p*=0,0317).

Tabela 17. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G1NF= neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G2NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G2NF
	35	33
	32	25
	33	26
	36	26
	32	30
$X$	34	28
	$U 2$	
	$P(U) 0,0317$	

A Tabela 18 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G1NF e G3NF do nervo fibular seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de bainha de mielina de G1NF em relação ao grupo G3NF ( $p=0,1508$ ).

Tabela 18. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G1NF= neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G3NF= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,50cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NF	G3NF
	35	29
	32	28
	33	40
	36	30
	32	24
$X$	34	30
$U$ 5		
$P(U)$ 0,1508		

---

 II b. Nervo Tibial

A Tabela 19 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G1NT e G4NT do nervo tibial seccionado pós-neurorrafia. Houve redução significativa do número relativo de axônios de G1NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 19. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G1NT= neurorrafia término-lateral; X = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G4NT
	17	22
	16	25
	15	21
	16	21
	17	23
X	16	23
	$U \ 0$	
	$P(U) \ 0,0079$	

---



A Tabela 20 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G2NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Houve redução significativa do número relativo de axônios de G2NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 20. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G2NT= neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm ; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NT	G4NT
	13	22
	14	25
	13	21
	13	21
	7	23
X	12	23
	U 0	
	$P(U)0,0079$	

A Tabela 21 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G3NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Houve redução significativa do número relativo de axônios de G3NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 21. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G3NT= neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor de p).

	G3NT	G4NT
	10	22
	10	25
	11	21
	9	21
	11	23
X	10	23
	U 0	
	P(U) 0,0079	

A Tabela 22 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G2NT e G3NT do nervo tibial seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de axônios entre os grupos ( $p=0,1508$ ).

Tabela 22. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo tibial seccionado (G2NT= neurografia látero-lateral com rafia de 0,25cm; G3NT= neurografia látero-lateral com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NT	G3NT
	13	10
	14	10
	13	11
	13	9
	7	11
X	12	10
$U$ 5		
$P(U)$ 0,1508		

A Tabela 23 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G1NT e G2NT do nervo tibial seccionado. Houve redução significativa do número relativo de axônios entre os grupos ( $p=0,0079$ ).

Tabela 23. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo fibular seccionado (G1NT= neurorrafia término-lateral do nervo fibular ao nervo fibular; G2NT= neurorrafia látero-lateral do nervo fibular com rafia de 0,25cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G2NT
	17	13
	16	14
	15	13
	16	13
	17	7
$X$	16	12
	$U 0$	
	$P(U) 0,0079$	

A Tabela 24 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de axônios nos grupos G1NT e G3NT do nervo tibial seccionado. Houve redução significativa do número relativo de axônios entre os grupos ( $p=0,0079$ ).

Tabela 24. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de axônios no nervo tibial seccionado (G1NT= neurorrafia término-lateral; G3NT= neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G3NT
	17	10
	16	10
	15	11
	16	9
	17	11
$X$	16	10
	$U 0$	
	$P(U) 0,0079$	

A Tabela 25 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G1NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de endoneuro de G1NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,1508$ ).

Tabela 25. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G1NT= neurorrafia término-lateral; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G4NT
	43	32
	33	31
	39	42
	36	32
	36	33
X	39	34
	U 5	
	P(U) 0,1508	

A Tabela 26 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G2NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Houve aumento significativo do número relativo de densidade de volume de endoneuro de G2NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 26. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G2NT= neurrrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm ; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NT	G4NT
	54	32
	54	31
	51	42
	55	32
	55	33
X	54	34
	$U \ 0$	
	$P(U)0,0079$	

A Tabela 27 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G3NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Houve aumento significativo do número relativo de densidade de volume de endoneuro de G3NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 27. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo tibial seccionado

(G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G3NT= neurrrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética; U- valor tabelado e  $p(U)$ -valor de p).

	G3NT	G4NT
	46	32
	53	31
	56	42
	51	32
	62	33
X	54	34
$U 0$		
$P(U) 0,0079$		



A Tabela 28 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G2NT e G3NT do nervo tibial seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de endoneuro entre os grupos ( $p=0,8413$ ).

Tabela 28. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo tibial seccionado (G2NT= neurografia látero-lateral com rafia de 0,25cm; G3NT= neurografia látero-lateral om rafia de 0,50cm;  $\bar{X}$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NT	G3NT
	54	46
	54	53
	51	56
	55	51
	55	62
$\bar{X}$	54	54
$U$ 11		
$P(U)$ 0,8413		

A Tabela 29 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G1NT e G2NT do nervo fibular tibial seccionado. Houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de endoneuro entre os grupos ( $p=0,0079$ ).

Tabela 29. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo tibial seccionado (G1NT= neurografia término-lateral do nervo tibial ao nervo fibular; G2NT= neurografia látero-lateral com rafia de 0,25cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ -valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G2NT
	43	54
	33	54
	39	51
	36	55
	36	55
$X$	39	54
	$U 0$	
	$P(U) 0,0079$	

A Tabela 30 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de endoneuro nos grupos G1NT e G3NT do nervo fibular seccionado. Houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de endoneuro entre os grupos ( $p=0,0079$ ).

Tabela 30. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de endoneuro no nervo tibial seccionado (G1NT= neurorrafia término-lateral; G3NT= neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm; X = média aritmética; U- valor tabelado e p(U)-valor calculado).

	G1NT	G3NT
	43	46
	33	53
	39	56
	36	51
	36	62
X	39	54
	<i>U 0</i>	
	<i>P(U) 0,0079</i>	

A Tabela 31 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G1NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Houve aumento significativo do número relativo de densidade de volume de bainha de mielina de G1NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 31. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G1NT= neurografia término-lateral ; X = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G4NT
	35	26
	46	31
	45	29
	42	26
	42	25
X	42	28
	$U \quad 0$	
	$P(U) \quad 0,0079$	

A Tabela 32 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G2NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de bainha de mielina de G2NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,6905$ ).

Tabela 32. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo tibial seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G2NT= neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm ; X = média aritmética; U-valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NT	G4NT
	27	26
	27	31
	28	29
	26	26
	24	25
X	26	28
$U$ 10		
$P(U)$ 0,6905		

A Tabela 33 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G3NT e G4NT do nervo tibial seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de bainha de mielina de G3NT em relação ao grupo controle G4NT ( $p=0,6905$ ).

Tabela 33. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo fibular seccionado (G4NT = nervo tibial seccionado ou controle; G3NT= neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética; U-valor tabelado de U e  $p(U)$ -valor de p).

	G3NT	G4NT
	40	26
	25	31
	26	29
	30	26
	18	25
X	28	28
$U$ 10		
$P(U)$ 0,6905		

A Tabela 34 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G2NT e G3NT do nervo tibial seccionado. Não houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de bainha de mielina entre os grupos ( $p=1$ ).

Tabela 34. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo tibial seccionado (G2NT=neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm; G3NT=neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm ; X = média aritmética; U-valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G2NT	G3NT
	27	40
	27	25
	28	26
	26	30
	24	18
X	26	28
	$U$ 12	
	$P(U)$ 1	

A Tabela 35 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G1NT e G2NT do nervo tibial seccionado. Houve redução significativa do número relativo de densidade de volume de bainha de mielina de G1NT em relação ao grupo G2NT ( $p=0,0079$ ).

Tabela 35. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo tibial seccionado (G1NT=neurorrafia término-lateral; G2NT=neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G2NT
	35	27
	46	27
	45	28
	42	26
	42	24
X	42	26
$U_0$		
$P(U) 0,0079$		



A Tabela 36 evidencia a porcentagem de densidade de volume e a média aritmética da densidade de volume de bainha de mielina nos grupos G1NT e G3NT do nervo tibial seccionado. Houve aumento significativo do número relativo de densidade de volume de bainha de mielina de G1NT em relação ao grupo G3NT ( $p=0,0159$ ).

Tabela 36. Densidade de volume ( $\text{mm}^2$ ) de bainha de mielina no nervo tibial seccionado (G1NT=neurorrafia término-lateral; G3NT=neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,50cm;  $X$  = média aritmética;  $U$ - valor tabelado e  $p(U)$ -valor calculado).

	G1NT	G3NT
	35	40
	46	25
	45	26
	42	30
	42	18
$X$	42	28
	$U \ 1$	
	$P(U) \ 0,0159$	

A Figura 14 representa a comparação da média da densidade de volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina nos grupos G1NF, G2NF, G3NF e G4NF do nervo fibular seccionado.

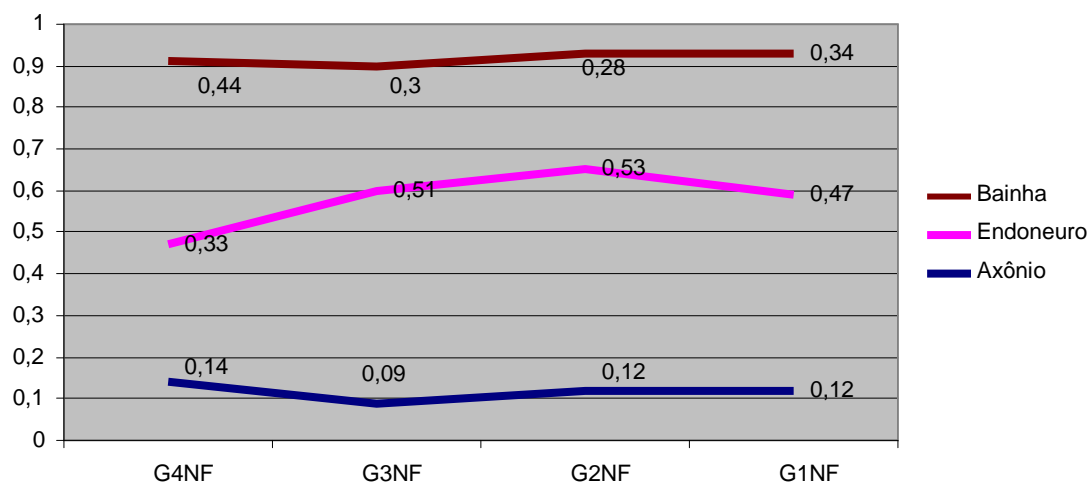


Figura 14. Comparação da média aritmética da densidade de volume do nervo fibular seccionado.

A Figura 15 representa a comparação da média aritmética da densidade de volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina nos grupos G1NT, G2NT, G3NT e G4NT do nervo tibial seccionado.

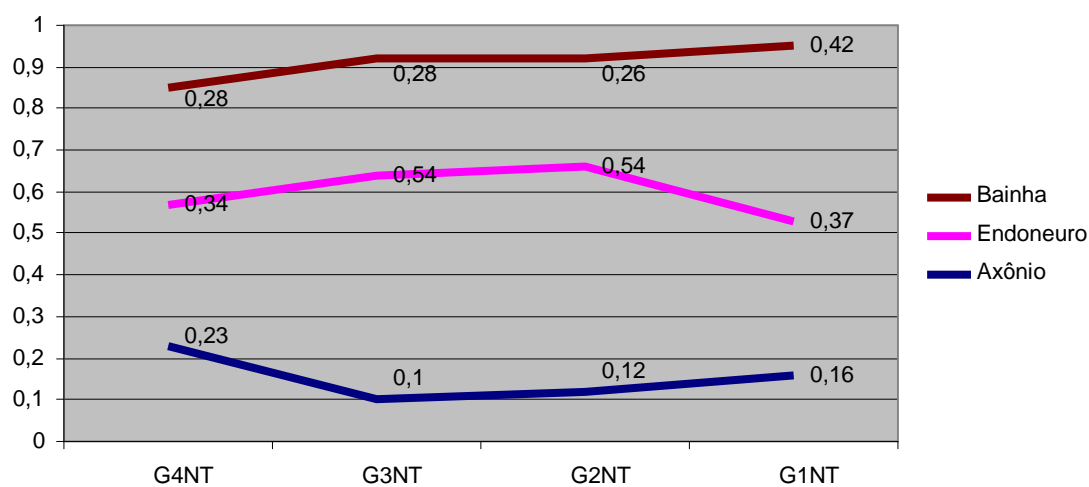


Figura 15. Comparação da média da densidade de volume do nervo tibial seccionado.

### III. Análise da Massa Muscular

Na avaliação do peso dos músculos ressecados (Figura 12) houve diferença estatisticamente significativa entre G1 e G4N (normalidade) com  $p=0,2222$ ; G2 e G4N (normalidade) com  $p= 0,0079$ ; G2 e G4D (desnervação) com  $p= 0,0079$ ; G3 e G4N com  $p= 0,0079$ ; G3 e G4D com  $p=0,0079$  e G4N e G4D com  $p= 0,0079$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2 com  $p=0,2222$ ; G1 e G3 com  $p=0,0556$  e G2 e G3 com  $p=0,0952$ .

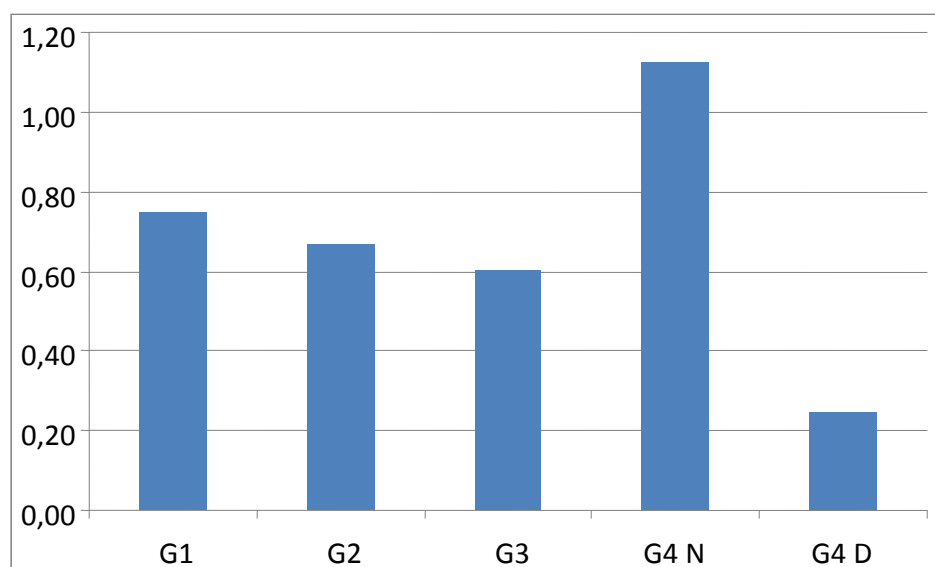


Figura 16. Média aritmética da massa (em g) do músculo tibial cranial em todos os grupos.

***DISCUSSÃO***

---

## **DISCUSSÃO**

Os objetivos do presente estudo foram determinar a densidade de volume de axônios, de endoneuro e de bainha de mielina de nervos fibular e tibial nas diferentes áreas de anastomoses após neurorrafias término-lateral e látero-lateral. Ainda, fez-se comparação do peso do músculo tibial cranial após execução das diferentes técnicas de neurorafia.

Lesões dos nervos periféricos do tipo neurotmeze não apresentam regeneração espontânea, por isso há a necessidade de intervenção cirúrgica.<sup>(5)</sup> A técnica de reparação primária, isto é, a realizada imediatamente após a secção do nervo, constitui-se na melhor opção, a depender do tipo de lesão.<sup>(40)</sup>

Na neurotmeze, acontece a solução de continuidade devida à transecção completa do nervo, o que a torna a forma mais grave de lesão e, conseqüentemente, a que mais chama a atenção dos estudiosos. Estes produzem diferentes protocolos visando a reparação da lesão devido a dificuldade encontrada para a recuperação nervosa.<sup>(5,6,40,121)</sup>

Devem-se considerar vários fatores para regeneração nervosa dentro de um ambiente adequado para sustentar o crescimento do axônio, assim como a capacidade de regeneração do próprio neurônio após a lesão. Sabe-se que os componentes neurais não são os mais importantes na regeneração neural; os componentes não-neurais organizam a região lesada, direcionam o crescimento dos axônios e são responsáveis pela produção de fatores de crescimento.<sup>(6)</sup>

A falta de estímulo nervoso ao órgão alvo leva a alterações degenerativas e isso pode ser irreversível com o passar do tempo. Pode ocorrer o desaparecimento das placas motoras, conseqüentemente atrofia dos músculos e posterior fibrose. Baseado nisso é que se preconiza a reinervação em, no máximo, três meses após o trauma.<sup>(121)</sup> Fawcett e Keynes<sup>(122)</sup> afirmaram que entre as causas do insucesso estão a falha na regeneração do axônio, qualidade do nervo regenerado, a inervação incorreta dos órgãos-alvo e o tempo decorrido até o tratamento.

A reparação microcirúrgica teve avanços consideráveis nas últimas décadas, mas, mesmo assim, continua a ser um desafio para os pesquisadores.<sup>(40,123)</sup> O conhecimento do tipo de lesão e das alterações que acontecem nas estruturas relativas ao local da lesão é imprescindível.<sup>(123,124)</sup> Por exemplo, a degeneração walleriana que ocorre no axônio do coto proximal até o nódulo de Ranvier mais próximo têm diversos mecanismos relacionados às respostas induzidas por fatores neurotróficos.<sup>(4,6,123)</sup> A ativação das células de Schwann é uma das mais importantes.<sup>(124,125)</sup>

As alterações metabólicas do corpo celular, assim como sua reorganização estrutural, devem-se aos fatores de crescimento neurotróficos e fatores neurotróficos ciliares, que são gerados pelas células de Schwann. Há, então, grande cromatólise e o conseqüente aumento das proteínas citoplasmáticas, o ingurgitamento celular, o deslocamento do núcleo para a periferia e sucede a dispersão dos ribossomos com degeneração da substância de Nissl. O metabolismo celular acelera e aumenta a expressão dos genes que

sintetizam proteínas, como a actina e a tubulina, colaborando, inclusive, para a regeneração do citoesqueleto do axônio.<sup>(5,123)</sup>

No coto distal, ocorrem as primeiras modificações, comandadas pelo aumento das atividades de proteinases e lipases, que terminam por desintegrar o axônio e a bainha de mielina.<sup>(5)</sup> Forma-se, no local da lesão, um cone de crescimento e há a reestruturação da matriz extracelular.<sup>(123)</sup> As células de Schwann proliferam, exprimindo as moléculas adesivas e neurotrofinas.<sup>(5)</sup> Essas células são responsáveis, então, por direcionar os axônios em regeneração,<sup>(126,127)</sup> liberar fatores de crescimento nervoso e promover o brotamento axonal sensoriomotor.<sup>(110,128)</sup>

A neurorrafia término-terminal é a técnica de escolha quando há proximidade dos cotos proximal e distal, uma vez que seus resultados são considerados melhores para a regeneração. Esta técnica, chamada técnica convencional, é realizada com pontos de fio de seda microcirúrgicos<sup>(8,129)</sup>. Mas existem situações em que o acesso a um dos cotos é dificultada e, em geral, conduzem a resultados pouco promissores, devido à tensão causada pelo fio de sutura.<sup>(106,130,131)</sup>

As neurorrafias término-laterais oferecem, teoricamente, dois benefícios. Primeiro, não sacrifica o nervo doador onde repousa o nervo defeituoso. Segundo, ao suturar o coto distal do nervo injuriado à lateral de um nervo doador hígido, promove-se recuperação e prevenção de atrofia da placa motora.<sup>(132)</sup>

Viterbo et al.<sup>(105)</sup> introduziram a neurorrafia término-lateral sem lesão do nervo doador e verificaram que não houve quaisquer tipos de danos ao nervo

hígido, considerado aqui como doador. Relataram, também, um novo fenômeno, ou seja, o crescimento dos axônios do nervo intacto em direção ao coto distal do nervo receptor.

As neurorrafias término-laterais com neurectomia parcial foram testadas, sendo aprovadas por alguns autores. <sup>(75,130,133-137)</sup> Entretanto, a técnica de neurectomia junto ao nervo hígido pode causar fibrose e interromper a passagem do estímulo nervoso. <sup>(138,139)</sup> No presente estudo, a neurorafia efetuada no grupo G1, similar à recomendada por Viterbo, <sup>(105)</sup> sem janela cirúrgica no nervo hígido, ou doador, obteve resultados satisfatórios, corroborando com os achados destes pesquisadores. Muito embora, Souza <sup>(140)</sup> em seu experimento com neurorafia término-lateral, com e sem a presença de janela epineural, consideraram as diferenças encontradas como não significantes. Concluíram, também, que ambas as técnicas não promovem remielinização suficiente.

No estudo em questão, para contornar a possível interferência nas atividades motoras do coto distal por crescimentos de brotos axonais originários do coto proximal, foi inserida, como preconizado por estudos já realizados, <sup>(105,130,141)</sup> a extremidade do coto proximal do nervo fibular em músculo adjacente, para que este, ao estar em um local isolado, ficasse impossibilitado de incorrer em ramificações que, ao atingir o coto distal, poderiam alterar os resultados.

Neurorrafias látero-laterais, por sua vez, independem da distância entre os cotos e têm sido apontadas como alternativas viáveis a enxertos nervosos, <sup>(142)</sup> uma vez que podem promover recuperação tanto sensitiva quanto motora. <sup>(110)</sup>



Nestas, grande número de brotos axonais do nervo doador podem ser capazes de atravessar a área de contato e promover a atuação de fatores neurotróficos ao crescimento axonal do nervo receptor, <sup>(3)</sup> com resultados similares aos das neurorrafias término-laterais. <sup>(143,144)</sup>

Os fatores neurotróficos atuam diretamente sobre o metabolismo celular ou de forma indireta sobre as células de Schwannn, que são consideradas células de suporte. Alguns destes fatores, que incluem o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico ligado à insulina e fator neurotrófico ciliar, agem como estimulantes para haver o crescimento dos brotos axonais. <sup>(5)</sup>

Ademais, os brotamentos axoplasmáticos são capazes de atravessar o epineuro hígido, o que vêm corroborar outros estudos <sup>(133)</sup> uma vez que o número de brotos de axônios em crescimento, medidos em milímetros quadrados, demonstra a capacidade de crescimento do axônio de maneira confiável. <sup>(145-147)</sup> Isto contradiz alguns estudos, onde se acreditava que só haveria bons resultados se houvesse a confecção de uma neurectomia parcial para o crescimento neural se efetivar. <sup>(106,148)</sup> Ainda, a ausência de secção cirúrgica do nervo intacto, ou doador por contato, minimiza riscos relacionados às disfunções em tecido-alvo, atrofia neural ou formação de neuroma indiferenciado, associado à dor local. <sup>(149)</sup>

No presente estudo, os animais utilizados foram ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, escolhidos por ser a espécie mais utilizada na literatura <sup>(150)</sup> e, assim, seus dados possibilitam comparações. Sua escolha se deve fácil obtenção, à alta velocidade de regeneração nervosa funcional, ao baixo

custo e à facilidade de manejo.<sup>(93)</sup> Além disso, por ocuparem pouco espaço, facilitam estudos de longa duração.<sup>(151)</sup>

De acordo com Viterbo,<sup>(105)</sup> ratos apresentam estruturas anatômicas adequadas para estudos sobre neurorrafias e regeneração muscular. Ratos *Wistar* têm sido utilizados em muitos estudos experimentais com neurorrafia término-lateral<sup>(105,128,130,140,152-156)</sup>, especialmente ratos do sexo masculino, que são conseguidos mais facilmente, porque fêmeas são normalmente utilizadas como matrizes. Além disso, machos são menos suscetíveis à ação dos hormônios adenohipofisários e hormônios gonadais, como o estrógeno e a progesterona.<sup>(157,158)</sup> Pesquisas têm mostrado que hormônios sexuais exercem efeitos neurotróficos em várias regiões do sistema nervoso adulto, incluindo aquelas não especificamente envolvidas com reprodução, como o brotamento de axônios sensoriais mielínicos.<sup>(159)</sup>

O uso de pontos simples, com fio de mononylon 10.0, tem apresentado resultados satisfatórios no reparo de nervos periféricos,<sup>(140,160)</sup> principalmente por causar menor lesão tecidual secundária, devido ao calibre reduzido do fio de sutura.<sup>(161,162)</sup> Acredita-se que as fibras mielinizadas contidas no nervo receptor descenderiam do brotamento lateral secundário à lesão provocada no ato cirúrgico, que ocorreria durante a realização da epineurectomia ou no próprio processo de sutura,<sup>(163)</sup> e existe concordância que a sutura epineural é de fácil e simples execução, com um número menor de pontos, o que diminui o traumatismo causado ao tecido nervoso.<sup>(40,164-166)</sup> Por isso, segundo este princípio foi utilizado

o fio de sutura 10.0 com a mesma quantidade de pontos de sutura, com diferença apenas no tamanho da área de contato com o nervo hígido.

Estudos indicam a presença de axônios em regeneração, mesmo que em menor número e sem a realização da janela epineural. Também há a presença de fibras nervosas e de células de Schwann, com aspecto degenerativo. Isto leva a crer que são resquícios da própria degeneração walleriana, que ocorre no nervo após um trauma. Os fatores neurotróficos presentes na degeneração walleriana criam um ambiente propício para que os axônios se desenvolvam, ao longo do gradiente destas substâncias, em todo o trajeto do coto distal.<sup>(133,166-169)</sup> Sugere-se,<sup>(30)</sup> que estes efeitos também acontecem por meio da via parácrina ou autócrina, em células não sensoriais do coto distal e não por efeitos diretos nos axônios em regeneração.

Com o intuito de investigar esta hipótese, lâminas para avaliação histológica, em estudo foram obtidas no sítio imediatamente distal à coaptação do nervo receptor. Em alguns casos, ficou demonstrada a presença de brotamento axonal secundário à pequena área de lesão.<sup>(20)</sup> Contudo, não houve correlação positiva entre estas lesões e um maior número de fibras mielinizadas.<sup>(133)</sup>

No presente estudo, a respeito das mensurações efetuadas no nervo fibular, constatou-se, quanto à densidade de volume de axônios do corte transversal, que todas as técnicas cirúrgicas apresentaram resultados semelhantes entre si e quando comparadas com o grupo controle, apenas a técnica látero-lateral com 0,50cm mostrou contagem mais baixa que o grupo controle, conforme Tabela 03. Já em relação à densidade de volume de

endoneuro, pôde-se observar que as técnicas de reparo látero-lateral com 0,25cm e látero-lateral com 0,50cm apresentaram maior densidade de volume que o grupo controle, conforme Tabela 08 e 09, embora tenham se mostrado similares quando comparadas uma com a outra, conforme Tabela 10. Apenas a neurorrafia término-lateral mostrou-se sem redução estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle, conforme Tabela 07. Esta mesma técnica de reparo ainda revelou uma densidade de volume menor que a látero-lateral com 0,25cm, mas sem diferença significativa quando comparada à látero-lateral com 0,50cm. Diferentemente ocorreu com a densidade de volume de bainhas de mielina.

Também no presente estudo, todas as técnicas de reestruturação nervosa apresentaram diminuição da densidade de volume de bainha de mielina em relação ao grupo controle, mas não apresentaram redução significativa quando comparadas umas com as outras, conforme Tabelas 13-18. Resultados similares foram descritos por Franco <sup>(172)</sup> nos cortes distais às cirurgias de neurorrafia com reestruturação do nervo fibular.

Quanto às mensurações realizadas para o nervo tibial no presente estudo, com relação à densidade de volume de axônios, todas as técnicas cirúrgicas de reparo apresentaram redução de densidade quando comparadas ao grupo controle, e quando comparadas entre si, a técnica término-lateral apresentou maior densidade de volume que ambas as técnicas látero-laterais, conforme Tabelas 23 e 24. Estas não apresentaram diferença estatística em comparação a seus 0,25cm e 0,50cm de sutura, conforme Tabela 22. Sobre o número de densidade de volume endoneuro as técnicas látero-laterais apresentaram maior

densidade volume que o grupo controle, enquanto a técnica término-lateral não foi estatisticamente diferente, conforme Tabela 25. E quando comparadas entre si há menor contagem de densidade de volume de endoneuro na técnica término-lateral do que em ambas as técnicas látero-laterais, sendo que estas não apresentaram diferença entre elas, conforme Tabela 28.

Em relação à densidade de volume de bainha de mielina, a neurografia término-lateral apresentou maior média aritmética em relação ao grupo controle, enquanto que a neurografia látero-lateral não se diferenciou do grupo controle, conforme Tabelas 31, 32 e 33. Quando comparadas entre si, quanto à densidade de volume de bainha de mielina, apenas se destacou a técnica término-lateral quando comparada com a neurografia látero-lateral com 0,50cm. O mesmo não ocorreu com a neurografia látero-lateral de 0,25cm e nem entre as duas neurografias látero-laterais, conforme Tabela 34. Isso contrasta com Souza <sup>(140)</sup> que verificou um número reduzido de fibras remielinizadas em seu estudo com neurografia término-lateral. Muller e Viterbo <sup>(170)</sup>, em seu estudo com outros grupos de nervos periféricos reestruturados com neurografia término-lateral, também encontraram redução no número de axônios, porém com resultados positivos nos testes de flexão muscular.

Pode-se que, neste estudo, as três técnicas cirúrgicas (neurografia látero-lateral com rafia de 0,25cm, neurografia látero-lateral com rafia de 0,50cm e a neurografia término-lateral) comportaram-se de maneira semelhante na coesão do nervo periférico, mostrando de uma maneira geral uma diminuição da densidade de volume de axônios e de bainha de mielina, conforme Tabelas 13,14 e 15, e um

aumento da densidade de volume de endoneuro em comparação ao grupo controle, com quadro similar em ambos os nervos fibular e tibial , conforme Tabelas 7,8,9,25,26 e 27. Apesar disto, na pesagem de massa dos músculos dissecados, observou-se menor massa no músculo totalmente desnervado em comparação com o dos nervos reestruturados , conforme Figura 16, o que sugere melhora no tônus muscular, e assim pode indicar retorno de função sensitivo-motora, embora esta massa ainda seja menor que a dos músculos do grupo controle não operado. Observou-se equivalência na massa muscular entre as diferentes técnicas de neurorrafia no estudo em questão, e fato semelhante foi detectado em outros estudos. <sup>(169,171,172)</sup>

Com relação à análise estatística, o Teste de Mann-Whitney é uma alternativa não paramétrica ao Teste *t* de Student para a diferença de médias. Este é o teste de escolha para a comparação de dois grupos cujos fatores de variação são independentes. No presente estudo, os resultados obtidos foram categorizados como não gaussianos na análise estatística inicial. Os grupos mostraram ter a mesma distribuição e foi adotado como hipótese nula quando as médias eram iguais para os dois grupos. <sup>(111,120)</sup> cada número de estruturas obtidas na análise histológica foi categorizado em porcentagem, a compor uma variável quantitativa em condição não paramétrica e eram independentes entre si. Além disso, as comparações deram-se sempre entre dois grupos de cada vez, verificando suas diferenças. Assumiu-se ainda que os grupos comparados não possuem a mesma variância. Assim se justifica a escolha do teste de Mann-Whitney para a análise estatística.

Quanto à análise estereológica, o presente estudo utilizou um sistema de testes normalmente composto por pontos-teste ou linhas-teste sobre uma imagem conhecida, denominada área-teste.<sup>(113)</sup> O objetivo principal da Estereologia é entender o arranjo tridimensional no interior da estrutura se baseando na análise de cortes que mostram apenas informações bidimensionais. Não se propõe a obtenção de um número exato na quantificação de células, que deve ser entendida de maneira estatística. Normalmente os estudos estereológicos comparam quantidades entre diferentes grupos, devendo o material ser preparado de maneira equivalente. Por meio de comparação, se a distorção pertinente ao preparo do material e corte das lâminas for a mesma para todos os grupos (método padronizado de preparo e corte), teoricamente não se faz necessário realizar correções matemáticas das distorções.<sup>(112-114)</sup>

A técnica estereológica estima a densidade da amostra, sendo que os parâmetros mais frequentemente estimados são a densidade da área e a densidade numérica por área. A acurácia do cálculo se baseia em princípios estatísticos (tamanho da amostra, aleatorização e isotropia do tecido).<sup>(173)</sup> Segundo trabalhos consagrados <sup>(112,118)</sup>, para serem utilizados os métodos estereológicos, os cortes analisados devem ser isotrópicos, ou seja, os diversos elementos que o constituem devem estar distribuídos ao acaso e homogeneamente no espaço. Dessa forma qualquer corte bidimensional, aleatório e uniformemente isotrópico, passa a ser representativo de um todo tridimensional, independentemente da direção em que esse corte seja realizado.<sup>(112,118)</sup>

Em Estereologia, a digitalização da imagem converte imagens de tecidos numa forma numérica de pixels. Para a obtenção de medidas válidas é necessário correlacionar o número de pixels com um sistema métrico. Para isso, no presente estudo, dispôs-se de software especializado na análise estereológica. A área da estrutura foi obtida quando se fez o delineamento, ao contornar o campo de interesse com ferramentas específicas do programa de computador, que depois a calculou de acordo com o número de pixels capturados. O comprimento foi mensurado com o desenho de uma linha reta na estrutura, e o programa calculou pela linha de pixels o correlato comprimento.<sup>(173)</sup>

Em Estereologia, o objeto de interesse deve ser dividido do plano de fundo pela função de segmentação do programa. Segmentação é o processo onde cores na imagem são identificadas e então isoladas. Os objetos que irão ser segmentados devem conter cores que se diferenciem do tecido remanescente para facilitar a seleção que será feita pelo programa. Além disso, para estimar as quantidades estereológicas absolutas é necessária a estimativa do volume de toda a estrutura.<sup>(173)</sup> No estudo em questão, o parâmetro estereológico considerado para o estudo dos nervos periféricos (axônios, endoneuro e bainha de mielina) foi a densidade de volume, estimada pela técnica de Chalkley.<sup>(112)</sup>

Na análise dos nervos deste estudo, procedeu-se à contagem de pontos de cada um dos fascículos nervosos incidentes em cada grade de Weibel.<sup>(118)</sup> As grades estereológicas, ou sistemas-teste, facilitam o emprego dessa metodologia. As grades são figuras, geralmente retangulares, de área conhecida, contendo em seu interior um número predeterminado de pontos e segmentos de retas ou de



arcos ciclóides, que podem ser sobrepostas às estruturas analisadas para a contagem de pontos e interseções das linhas que caem sobre o elemento em estudo, como o que ocorreu no presente estudo. A escolha da grade depende da experiência do pesquisador com seu uso ou do tipo de análise que se deseja realizar. <sup>(174)</sup> Devido à experiência na sua utilização foi selecionada para o estudo a grade de Weibel. <sup>(118)</sup>

Com relação a atualidades em neuroregeneração, outros trabalhos revelam números importantes na quantificação do reparo neuronal. Sabendo-se que um importante evento para o reparo do nervo injuriado consiste na Degeneração Walleriana (DW), que inclui o colapso do citoesqueleto dos neurônios, a fragmentação dos axônios, a quebra da bainha de mielina e a remoção dos *debris* por células de Schwann e macrófagos. As interações espaciais e temporais entre estas duas células são importantes para promover um microambiente favorável à proliferação e maturação de novos axônios. <sup>(175,176)</sup>

Como resposta apropriada à perda dos axônios, as células de Schwann se indiferenciam em um estágio anterior com maior metabolismo, proliferam e formam uma estrutura denominada bandas de Büngner, que servem como tubos-guia para a regeneração das fibras nervosas. Além disso, elas podem ser induzidas por macrófagos para mudar sua expressão de diversas moléculas neurotrópicas e neurotróficas. Assim, durante a DW macrófagos e células de Schwann expressam moléculas pró-inflamatórias como interleucina 1-B (IL-1B), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). <sup>(177)</sup>

Pode-se dizer, então, que a quantificação do número de células de Schwann e macrófagos são importantes para a qualificação do reparo nervoso, bem como sua disposição no local de reparo, para a identificação da estruturação da banda de Büngner. Pode-se, assim, evidenciar o número de células envolvidas na fagocitose da bainha de mielina por meio de coloração de Sudan Black (que revela os produtos de degradação mielínica) e realizar uma marcação de fluorescência com microscopia confocal para posicionar e diferenciar as células de Schwann e os macrófagos nas diferentes etapas da DW e da reestruturação nervosa. Também se pode realizar marcação imunohistoquímica das proteínas pró-inflamatórias nos diferentes tempos de reparo. <sup>(177,178)</sup>

Além disso, outro achado importante relacionado à neuroregeneração consiste na produção de fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2, bFGF) e a proteína ligante de  $Ca^{++}$  S100 $\beta$ , expressos pelas células de Schwann dos nervos e por células satélites do gânglio da raiz posterior (espinal). Estudos recentes indicam a importância das moléculas nos mecanismos parácrinos relacionados à manutenção neuronal e à plasticidade de neurônios periféricos motores e sensoriais.<sup>(178)</sup> Estas moléculas podem ser identificadas por imunohistoquímica e *western blot* e caracterizariam uma resposta de reparo do tecido lesado, quantificada pela concentração destas proteínas.

Em virtude do ineditismo do estudo em questão, pesquisas adicionais com imunohistoquímica seriam contributivas e trabalhos adicionais ainda são necessários para elucidação da forma de atuação do reparo nas células nervosas em neurorrafias. De modo efetivo, o presente estudo contribui em demonstrar,

estereologicamente, a similaridade de resultados para neurorrafias término-lateral e látero-lateral.

**CONCLUSÕES**

---

## **CONCLUSÕES**

Em estudo experimental estereológico comparativo entre neurorrafias, a densidade de volume de axônios, endoneuro e bainha de mielina de nervos tibial e fibular do mesmo modo que a massa muscular pós-cirúrgica se mantém equitativa em neurorrafias término-lateral e látero-lateral, independentemente da área de anastomose de contato.

Pode-se inferir, como opções de reparo cirúrgico, tanto a neurorafia término-lateral que recupera e previne a atrofia de placa motora quanto a neurorafia látero-lateral que independe da distância entre os cotos nervosos.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Terzis J, Faibisoff B, Williams H . The nerve gap. Suture under tension vs graft. *Plast Reconstr Surg* 1975; 56:166-170.
2. Colohan AR, Pitts LS, Rosegay H. Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV, Moore, EE, Mattox KL . *Trauma*. 3ª ed. Stamford Conn: Appleton & Lange; 1996. p.853-62.
3. Yüksel F, Karacaoglu E, Güler MM. Nerve regeneration through side-to-side neurorrhaphy sites in a rat model: a new concept in peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 2092-2099.
4. Machado ABM. *Neuroanatomia funcional*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 17-33.
5. Murray B. Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma. In: Bradley WG, editores. *Neurology in clinical practice: Principles of dignosis and management*. 4ª ed. London: Butterworth Heinemann; 2005.p. 1179-1198.
6. Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. *Revista Saúde e Pesquisa* 2010; 3: 93-98.
7. Kuczynski K. Function Micro-anatomy of the peripheral nerve trunks. *The Hand* 1974; 6:1-10.
8. Chem EM, Chem RC. Uso da cola de fibrina na anastomose nervosa: estudo comparativo experimental em ratos. *Rev AMRIGS* 2004; 48:171-4.

9. Schwartz SI. Principles of Surgery. 7<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1999: 2048-53.
10. Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery* 1999;44:825-39.
11. Trumble TE, Shon FG. The physiology of nerve transplantation. *Hand Clin* 2000;16:105-22.
12. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 129-158.
13. Rosa Filho BJ. Neurotmesis. 2000; <http://www.wgate.com.br/conteudo/medicinaesaudefisioterapia/neuro/neurotmesis.htm>.
14. Townsend PL. Microsurgical techniques in reconstructive surgery. In: Keen G, Farndon JR, eds. *Operative Surgery and Management*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann; 1994: 434-5.
15. Souza P. *Laminário de Histologia*. Fernandópolis: Universidade Camilo Castelo Branco, 2011.
16. Santos PM. A functional model system of an hypoxic nerve injury and its evaluation. *Laryngoscope* 2000; 110(5 Pt 1): 845-53.
17. Bungue RP, Bungue MP. Interrelationship between Schwann cell function and extracellular matrix production. *Neurosci* 1983; 82:77-82.
18. Cabaud HE, Rodkey WG, Nemeth TJ. Progressive ultrastructural changes after peripheral nerve transection and repair. *J Hand Surg* 1982;7:353-365.



19. Bailey SB, Eichler ME, Villadiego A, Rich KM. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol* 1993;22:176-184.
20. Madison R, Da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 1985; 88:762-772.
21. Ohbayashi K, Inoue HK, Awaya A, Kobayashi S, Kohga H, Nakamura M, Ohye C. Peripheral nerve regeneration in silicone tube: effect of collagen sponge prosthesis, laminin, and pyrimidine compound administration. *Neurol Med Chir* 1996; 36:428-433.
22. Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD, Padilla MA, Sabelman EE, Pham HN. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in rat model. *J Rehabil Res Dev* 1990;29:1-12.
23. Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniades HN, Hansson HA. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen and methylcellulose. *Exp Neurol* 1997; 146: 395-402.
24. Yoshii S, Yamamuro T, Ito S, Hayashi M. In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. *Exp Neurol* 1987; 96: 469-473.
25. Umphred D A. *Reabilitação Neurológica*. 4ª ed. São Paulo: Manole; 2004. p. 441-474.

26. Camargo VM, Costa J, André ES. Estudo comparativo entre dois tipos de raio laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica. *Fisioterapia em Movimento* 2006; 19: 127-134.
27. Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TPA. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-fac* 2003;3:50-4.
28. Mazzer PYCN, Barbieri,CH, Mazzer,N, Fazan,VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop Bras* 2006; 14: 220-225.
29. Mcallister RM, Calder JS. Paradoxical clinical consequences of peripheral nerve injury: a review of anatomical, neurophysiological and psychological mechanisms. *British J Plast Surgery* 1995; 48:384-95.
30. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of perirheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; 14: 67-116.
31. Stoll G, Griffin J W, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 1989; 18: 671-683.
32. de Medinaceli, L, Merle, M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by “cell surgery”. *J Hand Surg. Br.* 1991; 16(5): 495-498.
- 33.Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000; 25: 391-414.

34. Trumble TE. Peripheral nerve injury: pathophysiology and repair. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL. Trauma. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2000. p.10.
35. Greenfield L J. Surgery: Scientific Principles and practice. 2<sup>nd</sup>. ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 1997. p.2172-3.
36. Grant RT, Bayliss OB, Adams CW. Cholinesterases in peripheral nervous system. II. The motor, sensory and sympathetic nerves in the rabbit ear perichondrium and rat cremaster muscle. Brain Res 1967; 6:457- 474.
37. Ristic S, Strauch R J, Rosenwasser M P .The assessment and treatment of nerve dysfunction after trauma around the elbow. Clin Orthop 2000; 370;138-153.
38. Hakstian RW. Perineural neuroorrhaphy. Orthop Clin North Am. 1973; 4:945-956.
39. Rosegay H, Edwards M S. The language of neuroorrhaphy. J Neurosurg. 1980; 52: 143-144.
40. Dourado E. Reparación Microquirúrgica del nervio facial de conejo. Estudio comparativo de la sutura epineural y el sistema adhesivo de fibrina. [tese]. Barcelona: Departamento de Ciencias Morfológicas y Odontoestomatología da Universidad de Barcelona; 2002.
41. Daniel RK, Terzis JK. Reconstructive Microsurgery 1977; p.491.
42. Bora Jr FW, Pleasure DE, Didizian NA. A study of nerve regeneration and neuroma formation after nerve suture by various techniques. J Hand Surg 1976; 1: 138-143.

43. Bora Jr FW. A comparison of epineural, perineural and epineural methods of nerve suure. Clin Orthop Relat 1978; 133:91-94.
44. Roleau M, Crepeau J, Tetreault L, Lamarche J. Facial nerve sutures:epineural versus perineural sutures. J Otolaryngol 1981;10:338-342.
45. Sunderland S. The capacity of regeneration axons to bridge long gaps in nerves. J Comp Neurol 1953; 99(3):481-93.
46. Millesi H. Reappraisal of nerve repair. Surg Clin North 1981; 61:321-340.
47. McQuarrie IG. Peripheral nerve surgery. Neurol clin 1985;3:453-466.
48. Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived form cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. Brain Res 1982; 253:1- 12.
49. Ducker TB, Hayes G. Experimental improvements in the use of silastic cuff of peripherl nerve repair. J Neurosurg 1968; 28:582.
50. Scaravilli F. Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in a nerve encased in a plastic tube. J anat 1984; 139: 411-424.
- 51.Politis MJ. Specificity in mammalian peripheral nerve regeneration at the level of the nerve trunk. Brain Res 1985; 328:271-276.
52. Ashu H, Vilner Y, Finsterbush A, Rousso M, Weinberg H, Devor M. Extent of fiber regeneration after peripheral nerve repairs: silicone splint vs. sutre, gap repair vs. graft. Exp Neurol 19987; 97:365-374.

53. Bora Jr. FW, Bednar JM, Osterman AL et al. Prosthetic nerve grafts: a resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. *J Hand surg* 1987; 12: 685-692.
54. Muller H, Shibib K, Friedrich H, Modrack M. Evoked muscle action potentials from regenerated rat tibial and peroneal nerves: synthetic versus autologous interfascicular grafts. *Exp Neurol* 1987; 95:21-33.
55. Le Beau JM, Ellisman MH, Powell HC. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol* 1988; 17:161-172.
56. Gibson KL, Dniloff JK. Comparison of sciatic nerve regeneration through silicone tubes and nerve allografts. *Microsurgery* 1989;10:126-129.
57. Gibson KL, Remson L, Smith A et al. Comparison of nerve regeneration thorough different types of neural prostheses. *Microsurgery* 1991; 12:80-85.
58. Rende M, Granato A, LO Mônaco, Zelano G, Toesca A. Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10-mm gap within an impermeable chamber. *Exp Neurol* 1991; 111:332-339.
59. Seckel BR, Chiu TH, Nylas E, Sidman RL. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. *Plast Reconstr Surg* 1984; 74:173-81.
60. Madison RD, Archibald SJ, Lacin R, Krarup C. Factors contributing to preferential motor reinnervation in the primate peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999; 24:11007-16.

61. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82: 849-856.
62. Zelle RT, Miller DW, Kenning JA, Hoening EM, Buchheit NA. Experimental peripheral nerve repair: environmental control directed at the cellular level. *Microsurgery* 1989; 10: 290-301.
63. Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD, Padilla MA, Sabelman EE, Pham HN. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. *Ann Plast Surg* 1990; 25: 375-387.
64. Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC, Abraham G. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. *J Hand Surg* 1991; 16: 251-261.
65. Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg* 1991; 7:31-36.
66. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Larsson K. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium, and epineurium in preformed mesothelial tubes-an experimental study on the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Res* 1981; 6: 265-281.
67. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM et al. Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. *J Hand Surg* 1982; 7: 580-587.

68. Lundborg G, Longo F, Varon S. Nerve regeneration model and neuronotrophic factors in vivo. *Brain Res* 1982; 232: 157-161.
69. Colin W, Donoff RB. Nerve regeneration through collagen tubes. *J Dent Res* 1984; 63:987.
70. Archibald SJ, Krarup C, Shefner J, Li ST, Madison RD. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J Comp Neurol* 1991; 306: 685-696.
71. Weiss P, Taylor C. Guides for nerve regeneration across gaps. *J Neurosurg* 1946; 3: 375-389.
72. Chiu DTW, Janecka IP, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery* 1982; 91: 226-233.
73. Brunelli G, Monini L, Brunelli F. Problems in nerve lesions surgery. *Microsurgery* 1985; 6(4):187-98.
74. Suematsu N, Atsuta Y, Hirayama T. Vein graft for repair of peripheral nerve gap. *J Reconstr Microsurg* 1988; 4: 313-318.
75. Chiu DTW, Lovelace RE, Yu LT et al. Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study. *J Reconst Microsurg* 1988; 4: 303-309.
76. Suematsu N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. *Microsurgery* 1989; 10: 71-74.

77. Dandy WE. A method of restoring nerves requiring resection. *Jama* 1943; 122: 35-36.
78. Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 1976; 57: 413-426.
79. Taylor GI. Nerve grafting with simultaneous microvascular reconstruction. *Clin Orthop* 1978; 133:56-70.
80. Breidenbach WB, Terzis JK. The anatomy of free vascularized nerve grafts. *Clin Plast Surg* 1984; 11:65.
81. Doi K, Kuwata N, Sakai K et al. A reliable technique of free vascularized sural nerve grafting and preliminary results of clinical applications. *J Hand Surg* 1987; 12:677-684.
82. Townsend PL, Taylor GI. Vascularised nerve grafts using composite arterialised neuro-venous systems 1984; 37:1-17.
83. Kuenzel K, Fischer C, Anderl H. The ulnar nerve as vascularized nerve transplant. Anatomy: arterial vascular supply. *J Reconstr Microsurg* 1986; 2: 175.
84. Boorman JG, Sykes PJ. Vascularised versus conventional nerve grafting: a case report. *J Hand Surg* 1987; 12:91-94.
85. Breidenbach WB. Vascularized nerve grafts. A practical approach. *Orthop Clin North Am* 1988; 19: 81-89.



86. Dickinson JC, Bailey BN. Island pedicled nerve grafts. *Br J Plast Surg* 1989; 42:573-575.
87. Strange C. An operation for nerve pedicle grafting. *Br J Surg* 1947; 34: 423-425.
88. Malessy M, Hoffman C, Thomeer R. Initial report on the limited value of hypoglossal nerve transfer to treat brachial plexus root avulsions. *J Neurosurg* 1999; 91: 601-604.
89. Frey M, Gruber H, Holle J et al. An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization. *Plast Reconstr Surg* 1982; 69: 656-669.
90. Brunelli G, Monini L, Brunelli F. Problems in nerve lesions surgery. *Microsurgery* 1985; 6: 187-198.
91. McNamara MJ, Garrett WE, Seaber AV, Goldner JL. Neurotaphy, nerve grafting, and neurotization: a functional comparison of nerve reconstruction techniques. *J Hand Surg* 1987; 12: 354-360.
92. Brunelli G. Les neurotisations musculaires directes. *Ann Chir Main* 1989; 8: 324-328.
93. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg* 1989; 22: 257-273.
94. Millesi H. Peripheral nerve surgery today: turning point or continuous development? *J Hand Surg* 1990; 15: 281-287.

95. Brunelli G, Brunelli F. Strategy and timing of peripheral nerve surgery. *Neurosurg Rev* 1990; 13: 95-102.
96. Harris ME, Tindall SC. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin North Am* 1991; 2: 93-104.
97. Sunderland S. *Nerves and nerves injuries*. Edinburg: Churchill Livingtone; 1978. p. 483-650.
98. Ballance CA, Ballance HÁ, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med* 1903; 2: 1009-1013.
99. Sherren J. Some points in the surgery of the peripheral nerves. *Edinb Med J* 1906; 20: 297-332.
100. Yong J Z, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet* 1940; 3: 126-128.
101. Stookey B. Artificial nerve branches for innervation of paralyzed muscles. *Arch surg* 1923; 6: 731-738.
102. Gatta R. Sulla anastomosi látero-terminale dei tronchi nervosa. *Arch Ital Chir* 1938; 48: 155-171.
103. Babcock WW. A standard technique for operations on peripheral nerves with especial reference to the closure of large gaps 1927; 45: 364-378.
104. Beris A, Lykissas M, Korompilias A, Mitsionis G. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury. *J Neurotrauma* 2007;24: 909-16

105. Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorrhaphy. *Rev Soc Bras Cir Plást Est Reconstr* 1992; 8: 29-35.
106. Flores L P. Neurorrafia término-lateral: uma evolução da técnica de reparo de lesões de nervos periféricos? *Arq Bras Neurocir*. 2006; 25(2): 66-73.
107. Kakibuchi M, Tuji K, Fukuda k, Terada T, Yamada N, Matsuda K, Kawai K, Sakagami M. End-to-side nerve graft for facial nerve reconstruction. *Ann Plast Surg*. 2004; 53: 496-500;
108. Ögün TC, Özdemir M, Senaran H, Üstün ME. End-to-side neurorrhaphy as salvage procedure for irreparable nerve injuries. *J Neurosurg* 2003; 99:180-5.
109. Sananpanich K., Morrison W. A., A. M. Physiologic and morphologic aspects of nerve regeneration after end-to-end or end-to-side coaptation in rat model of brachial plexus injury. *J Hand Surg* 2002; 27A: 133-42.
110. Xiong G, Ling L, Nakamura R, Sugiura Y. Retrograde tracing and electrophysiological findings of collateral sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *Hand Surg*. 2003; 8:145-150.
111. Conover WJ. *Practical não paramétrico estatísticas*. 3 ed. New York: John Wiley&Sons, 1999.
112. Chalkley HW, Cornfield I, Park H A method for estimating volume-surface ratios. *Science* 1949; 110: 295-7.
113. Weibel ER. *Stereological methods: Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press, 1979.

114. Batigália F. Estudo Estereológico dos Vasa Vasorum em artérias coronárias com diferentes graus de aterosclerose. [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina; 2003. p.255-260.
115. Bioart [ acesso em 21 jan 2011]. Disponível <http://www.bioart.com.br>.
116. Mononyloon 8.0 [acesso em 21 jan 2011]. Disponível <http://www.medvel.com.br>
117. Especímetro DBMCO Germany Staines [acesso em 21 jan 2011]. Disponível <http://www.tecnobrasilloja.com.br>.
118. Weibel ER, Gomez DM. A principle for counting tissue structures on random sections. J Appl Physiol 1962; 17: 343-48.
119. Media Cybernetics Corporation. Image-Pro Plus Application Notes [acesso 21 jan 2011]. Disponível <http://www.mediacy.com/action.html>.
120. Callegari-Jacques SM. Bioestatística: Princípios e Aplicações. Porto Alegre: Artmed; 2003. p. 230-250.
121. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. J Neurosci Methods 2008;173(2): 249-58.
122. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. Ann Rev Neurosci 1990;13: 43-60.

123. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia* 2005; 24: 20-25.
124. Batista KT, Araújo HJ. Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo periférico do membro superior. *Rev Bras Cir* 2011; 26: 546-549.
125. Lacanna SN, Prandini MN, Pereiro JR, Moraes RF. Entubulation of sciatic nerve of rats with poly-l lactide-co p-lactide. *J Bras Neurocirurg* 2008; 19:37-40.
126. Yüksel F, Ulkür E, Baloğlu H, Celiköz B. Nerve regeneration through a healthy peripheral nerve trunk as a nerve conduit: a preliminary study of a new concept in peripheral nerve surgery. *Microsurgery* 2002; 22: 138-43.
127. Fukuda A, Hirata H, Akeda K, Morita A, Nagakura T, Tsujii M, Uchida A. Enhanced reinnervation after neurotization with Schwann cell transplantation. *Muscle Nerve*. 2005; 31 :229-34.
128. Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M. A New Surgical Technique for Polysyndactyly of the Toes without Skin Graft. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114(2): 433-8.
129. Becker, C. M.; Gueuning, C. O.; Graff, G. L. Sutures of fibrine glue for divided rat nerves. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 1984; 1: 139- 45.
130. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94(7):1038-47.

131. Kerns JM, Sladek EH, Malhshite TS, Bach H, Gonzales MH. End-to-side nerve grafting of the tibial nerve to bridge a neuroma-in-continuity. *Microsurgery* 2005; 25: 155-66.
132. Jung JM, Chung MS, Kim MB, Baek GH. Contribution of the proximal nerve stump in end-to-side nerve repair in a rat model . *Clin Ort Surg* 2009; 1:90-95.
133. Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg Br* 1994; 19(3):277-82.
134. Ting J, Huo G, Marin V, Rogers L, Gorlick N, Ascherman J et al. End- to-side neurorrhaphy using autogenous vein nerve conduits. *Surgical forum XLIX* 1998: 637-638.
135. Rovak JM, Cederna PS, Macionis V, Urbanchek MS, Van MJH, Kuzon WM. Término-lateral neurorrhaphy: the functional axonal anatomy. *Microsurg* 2000; 20: 6-14.
136. Matsuda K, Kakibuchi M, Fukuda K, Kubo T, Madura T, Kawai K et al. End-to-side nerve grafts: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg* 2005; 21: 581-91.
137. Viterbo F. Neurorrafia término-lateral. In Tatagiba M, Pereira Cu, editores. *Nervos periféricos. Tratamento clínico e cirúrgico*. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 85-87.
138. Viterbo F, Teixeira E, Hoshino K, Padovani CR. End-to-side neurorrhaphy with and without perineurium. *Rev Paul Med* 1998;116(5):1808-14.

139. Pienaar C, Swan MC, De Jager W, Solomons M. Clinical experience with end-to-side nerve transfer. *J Hand Surg Br* 2004; 29 (5):438-43.
140. Souza FI, Santos GB, Silva CF, Junior RM, Zumiotti AV. Avaliação histológica da neurografia término-lateral. Estudo experimental em ratos. *Acta ortop bras* 2011;19.
141. Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM Jr. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurotaphy. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 103(7): 1919-27.
142. Sananpanich K, Tu YK, Pookhang S, Chalidapong P. Anatomic variance in common vascular pedicle of the gracilis and adductor longus muscles: feasibility of double functioning free muscle transplantation with single pedicle anastomosis. *J Reconstr Microsurg* 2008; 24(4): 231-8.
143. Amr SM, Moharram AN, Abdel-Meguid KM. Augmentation of partially regenerated nerves by end-to-side side-to-side grafting neurotization: experience based on eight late obstetric brachial plexus cases. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2006; 1:6.
144. Viterbo F. Novo método para o tratamento da paralisia facial: o “cross-facial nerve” com neurografia término-lateral. *Rev Soc Bras Cir Plast Est Reconstr* 1993; 8: 29-35.
145. Feldman MD, Sataloff RT, Epstein G, Ballas SK. Autologous fibrin tissue adhesive for peripheral nerve anastomosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surgery*. 1987; 113(9): 963-7.

146. Hamm KD, Steube D, Pothe H, Beer R. Experimental studies in animals on the use of a fibrin glue from the human plasma fraction. *Zentralbl Neurochir* 1987; 48(3): 206-18.
147. Medders G, Mattox DE, Lyles A. Effects of fibrin glue on rat facial nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;100(2):106-9.
148. Al-Qattan MM. Terminolateral neuroorrhaphy: review of experimental and clinical studies. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17(2):99-108.
149. Sato KM. Comparação de neurorrafias término-terminais e terminal-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos. [monografia]. Florianópolis (SC): Univ. Federal de Santa Catarina; 2005.
150. Pereira FC, Lainetti RD, Da-Silvs CF. Exogenous gangliosides enhance peripheral nerve regeneration. In: 28 th Annual Meeting Society for Neuroscience 1998; 24: 1-2.
151. Hunt DM, McCarthy R, Green CJ. The effect of freezing on peripheral nerve repair. *Hand* 1983;15(3):317-24.
152. Schultes G, Gaggl A, Kleinert R, Kärcher H. Vascularized vs. Non-Vascularized Nerve Transfers: Histologic Study in Rats. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17:99-107.
153. Papalia I, Lacroix C, Brunelli F, d'Alcontres FS. Direct muscle neurotization after end-to-side neuroorrhaphy. *J Reconstr Microsurg* 2001;17(4):237-46.



154. Gravvanis AL et al. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery* 2004; 24:408-15.
155. Okuyama N, Nakao Y, Takayama S, Toyama Y. Effect of number of fascicle on axonal regeneration in cable grafts. *Microsurgery*. 2004; 24:400-7.
156. Manasseri B, Raimondo S, Geuna S, Risitano G, D'Alcontres FS. Ulnar nerve repair by end-to-side neurorrhaphy on the median nerve with interposition of a vein: an experimental study. *Microsurgery* 2007;27(1):27-31.
157. Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding nature's contraceptive. *Reprod Prog Horm Res* 1980; 36:1-52.
158. Carandente F, Angeli A, Candiani GB, Crosignani PG, Dammasco F, De-Cecco L, Marrama P, Massobrio M, Martini L. Rhythms in the ovulatory cycle. 2 nd: LH, FSH, estradiol and progesterone. *Chronobiol* 1989; 16: 353-63.
159. Kovacic U, Sketelj J, Bajrovic FF. Sex- related difference in collateral sprouting of nociceptive axons after peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol* 2003; 184: 479-88.
160. Vasconcelos BCE, Gay-Escoda C, Vasconcellos RJH, Neves RFSN. Conduction velocity of the rabbit facial nerve: a noninvasive functional evaluation. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17(2): 12631.
161. Braun RM. Epineural nerve suture. *Clin Orthop* 1982; 163: 50-56.

162. Santos NB. Estudo da regeneração axonal em enxerto nervoso sensitivo (n. sural) autólogo a partir de nervo craniano intacto (n. vago). [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.
163. Zhang F, Fischer KA. End-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery* 2002;22:122-7.
164. Urbaniak, J. R. – Fascicular nerve suture. *Clinical Orthopaedics and related research* 1997; 163:57-64.
165. Silva Neto JC. Estudo clínico e histopatológico do uso de gangliosídeos na regeneração nervosa em ratos após axonotmesis. [dissertação]. Camaragibe (PE): Faculdade de Odontologia de Pernambuco, Universidade de Pernambuco; 2003. 99 p.
166. Da- Silva CF. Biologia celular e molecular da regeneração do sistema nervoso periférico. *Atual Neurociênc* 1995b; 1-16.
167. Thanos PK, Okajima S, Terzis JK. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1998; 14: 423-436.
168. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosc Res* 1996; 25:101-21.
169. Franco RG. Estudo Comparativo com diferentes números de pontes na neurorafia término-lateral em ratos. [dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista , Faculdade de Medicina; 2010. p. 75-82.
170. Mueller SF, Viterbo F. Tratamento de lesão parcial do plexo braquial com neurorafia término-lateral– Estudo em Ratos. *Arquivos Catarinenses de Medicina* 2009; 38: 257-260.

171. Jaeger MRO, Braga-Silva J, Gehlen D, Pereira Filho GA, Zettler CG, Souza MAL, Veas JR, Sebben A. End-to-End Versus End-to-Side Motor and Sensory Neuroorrhaphy in the Repair of the Acute Muscle Denervation. *Annals of Plastic Surgery* 2011; 67.
172. Yoshitatsu S, Matsuda K, Yano K, Hosokawa K, Tomita K, Muscle Flap Mass Preservation by Sensory Reinnervation with End-to-Side Neuroorrhaphy: An Experimental Study in Rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 2008; 24.
173. Mandarim LCA, Fernandes SC, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. In: Hewitson TD, Darby JA. *Histology protocols: methods in molecular biology*. New Jersey: Human Press; 2010. p.211-225.
174. Lopes PF. Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. *Rev Bras Coloproct* 2002; 22(2): 73-76.
175. Beuche W, Friede RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 1984; 13: 767–796.
176. Son Y, Thompson W. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 1995; 14:125–132.
177. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 1999; 194: 1–14.
178. Duobles T, Lima TS, Levy BFA, Chadi G. S100 $\beta$  and fibroblast growth factor-2 are present in cultured Schwann cells and may exert paracrine actions on the peripheral nerve injury. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2008; 23: 555-560.



## ANEXOS

Anexo 1. Aprovação na Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-FAMERP).



*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*  
**Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA**  
FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Técnicas de Neurorrafia: Estudo estereológico axonal comparativo**” (Protocolo FAMERP nº 0554/2009), sob responsabilidade do Prof. Dr. Nagib Pezati Boer, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEEA-FAMERP).

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

We certify that Project entitled “**Neurorrhaphy techniques: comparative stereological axonal study**” (Protocol nº 0554/2009), agrees with the Ethical Principles for Animal Research established by Brazilian law nº11.794/2008 and Resolution nº 714/2002 and was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research of Faculty of Medicine from São José do Rio Preto (CEEA – FAMERP) on February 12, 2009.

São José do Rio Preto, 13 de fevereiro de 2009.

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil  
Presidente Da CEEA – FAMERP

Anexo 2. Resumo enviado para apresentação no XXV Congresso Brasileiro de Anatomia, de 03 a 06 de outubro de 2012 em Salvador (Bahia).

**TÉCNICAS DE NEURORRAFIA: ESTUDO EXPERIMENTAL ESTEREOLÓGICO AXONAL COMPARATIVO**

**Boer NP, Batigália F, Toyonaga LE\*, Marcatto G**

**Disciplina de Anatomia Clínica da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP (FAMERP)**

**RESUMO**

**Lesões que acometem nervos periféricos podem ser reparadas por meio de neurorrafias (ou suturas entre nervos ou partes de um mesmo nervo). Opções cirúrgicas mais indicadas para reconstrução nervosa incluem anastomose término-lateral ou látero-lateral. Inexistem, até o momento, estudos que correlacionem Estereologia (procedimentos geométricos estatísticos para obter informações de estruturas tridimensionais a partir de imagens bidimensionais) e neurorrafias. O objetivo do presente estudo foi fazer estudo experimental estereológico axonal comparativo entre neurorrafias término-lateral e látero-lateral. Após aprovação ética, foram estudados 20 ratos machos *Wistar*, divididos em 04 grupos de 05 ratos cada, para realização de anastomose entre os nervos fibular e tibial (G1=Neurorrafia término-lateral; G2=Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,25 cm; G3=Neurorrafia látero-lateral com rafia de 0,5 cm; e G4=Controle de Normalidade). Fragmentos de nervos foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina e corados com Tricômico de Masson para determinação da densidade de volume de axônios, em cada grupo, por meio do Programa *Image Pro Plus* versão 6.0 e aplicação do teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mas sim de todos os 03 grupos de estudo em relação ao grupo controle. Por meio de análise estereológica pode-se inferir, como opções de reparo cirúrgico, tanto a neurorrafia término-lateral que recupera e previne a atrofia de placa motora quanto a látero-lateral que independe da distância entre os cotos nervosos.**

**Palavras-chave: Anatomia; Nervo; Neurorrafia; Estereologia.**

Anexo 3. Artigo End-to-side loop Neurorrhaphy: AXONAL COMPARATIVE  
STEREOLOGICAL STUDY

**End-to-side loop Neurorrhaphy: AXONAL COMPARATIVE STEREOLOGICAL  
STUDY**

**Author's name: Humberto Regis de Paula FALEIROS, Fausto VITERBO, Nagib Pezati BOER, Fernando BATIGALIA, Ana Cláudia Polli LOPES, Ana Luísa Ricci BOER.**

**Author's degree**

Mailing address: nagib.pezati@terra.com.br

Abstract: Accidents or diseases can affect the peripheral part of the nervous system, which raises clinical and surgical therapies, among others. In this context, the technique of end-to-side neurorrhaphy is a treatment option, yet its modification loop needs some additional efficacy studies. The purpose of this study was to compare, amongs rats, stereological results (axons volume density) after end-to-side neurorrhaphy and after end-to-side loop neurorrhaphy. Thirty Wistar rats were used, divided into six groups (five animals per group), consisting of two control groups (for the fibular and tibial nerves), two study groups for the fibular nerve (one with an end-to-side neurorrhaphy, and the other with an end-to-side loop neurorrhaphy) and two study groups for the tibial nerve (with an end-to-side neurorrhaphy and the other one with an end-to-side loop neurorrhaphy). After 180 days, all groups were sacrificed for axonal stereological analysis (volume density) in distal nerve stumps. There was significant maintenance of neuronal-axonal density in the distal stumps to neurorrhaphy ( $p < 0.005$ ) compared with the normal stumps. The end-to-side loop neurorrhaphy is a therapeutic option as suture technique after complete nerve section, in order to restore most of the axonal functional integrity.

Keywords: Nerve; Axon; Stereology; Neurorrhaphy.

## **INTRODUCTION**

The broader understanding of anatomophysiology of nerve regeneration has provided significant advance in functional outcomes by improving surgical techniques<sup>1</sup> in recent years, strictly related to the axons integrity, Schwann cells (or neurolemmocytes) and the basement membrane of peripheral nerves<sup>2-5</sup>.

When a peripheral nerve is sectioned, the molecular changes start and affect the central and peripheral cells<sup>6</sup>. The distal stump of the injured axon disintegrates and undergoes Wallerian degeneration, and the action of proteolytic enzymes present in the axoplasm disintegrates neurofilaments and microtubules, whilst the rest of the axon is digested by macrophages<sup>7-9</sup>.

After nerve section, there is also induction of increased mitotic activity of Schwann cells and proliferation of surface receptors of neuronal growth factor (or NGF), which constitute the columns of Bunker. These structures help the growth of nerve sprouts that are formed in the proximal stump of the injured axon, traversing the area of injury and cause a growth cone that determines the direction of the nerve growth<sup>9</sup>.

**In the functional process of nerve repair, consecutively, the axons overlap between the plasma membrane of Schwann cells and the corresponding basement membrane and form the myelin sheath. At the same time, there is a reorganization of coatings of nerves tracts (epineurium, perineurium and endoneurium), as well as in the blood vessels, in order to restore local homeostasis<sup>10</sup>.**

Following the nerve trunk lesions, the peripheral fibers have a daily regeneration speed of 1 mm<sup>11</sup>, depending on neurophysiological and surgical factors. The probability of success for axonal growth depends on the length of the gap, which is space among the nerve stumps, caused by nerve injury<sup>12</sup>. The surgical reapproximation of the nerve stumps is called neurorrhaphy<sup>13,14</sup>.



The first descriptions of the neurorrhaphy was related to the alignment of the axonal conduits by direct suture of the injured stumps (or end-to-side neurorrhaphy)<sup>15</sup> in the nineteenth century. In the same century, another surgical option was to make the distal stump of a nearby intact nerve available to be sutured in a perpendicular direction to the injured nerve (or end-to-side neurorrhaphy), initially used in cases of hemifacial spasm or painful neuromas<sup>16</sup>. Another alternative of repairing the end-to-side technique was created, which was called latero-lateral neurorrhaphy (or approximation with the suture of the lateral faces of two nerves)<sup>17</sup>.

However, initial attempts to induce axonal growth by means of neurorrhaphy techniques have produced disappointing outcomes, which minimized its express indication for nearly a century<sup>18</sup>. On the other hand, in the early 1990s, comparative electrophysiological experimental studies have demonstrated muscle reinnervation after end-to-side neurorrhaphy, which led to resurgence of interest in this technique, as well as the development of new surgical options<sup>19</sup>. Thus, the crossover neurorrhaphy techniques emerged (or the use of contralateral nerve as a source of axonal donor)<sup>15,19,20</sup> and loop neurorrhaphy (end-to-side suture after total circular involvement of the injured nerve trunk)<sup>17</sup>.

Since the improvement of microsurgical techniques has proven essential for the rehabilitation of injured nerves<sup>3</sup> and ideas related to the use of adjacent healthy nerves have aroused great interest among surgeons<sup>17</sup>, the purpose of this present study is to compare stereological results (axons volume density) after end-to-side neurorrhaphy and after end-to-side loop neurorrhaphy in rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

After approval by the Ethics Committee Number , 40 male Wistar rats were studied, all of them from albinus variety, weighing between 200 and 250g with an

average of 20 weeks of age. The animals were provided by the Central Animal Laboratory of the Paulista State University (UNESP), at Botucatu campus.

Anesthesia was induced by intraperitoneal injection of pentobarbital (30 mg / kg) and, later, the rats were ventrally positioned.

After trichotomy in the posterior side of the right hind limb, a 4-cm incision was made composed of skin, SCT and the adjacent muscle to expose the right sciatic nerve and its fibular, tibial and sural branches.

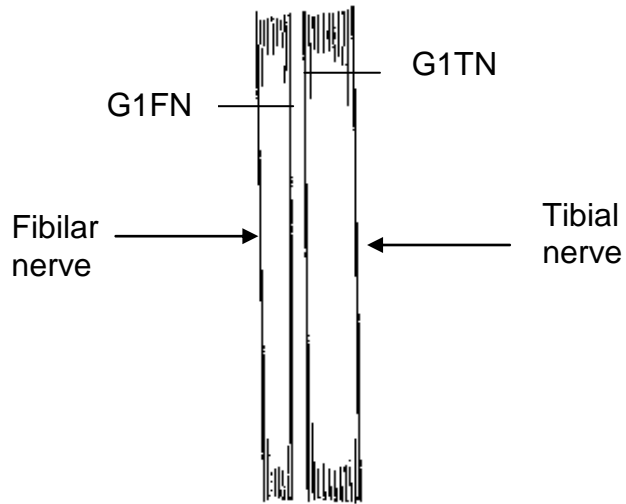
The procedure was performed under surgical DF Vasconcelos microscope with 10x magnifications, and neurorrhaphy were performed with mono nylon 10.0.

The 20 rats were divided into four distinct groups of ten rats each as follows:

1. Group 1 (normal control group), the sciatic nerve and its fibular and tibial branches were exposed, but they were kept intact and the incision was sutured by planes again. This group represented the normal control of tibial and fibular nerves (Figure 1)
2. Group 2 (control group of fibular nerve denervation), the sciatic nerve and its tibial and fibular branches were exposed. The fibular nerve was sectioned and its proximal and distal stumps were sutured in different and distant muscular groups through a nylon 6.0 single stitch. The tibial nerve remained intact. This group represented the control group of the fibular nerve denervation (Figure 2).
3. Group 3 (end-to-side neurorrhaphy): The fibular nerve was sectioned and its proximal stump was buried inside the adjacent musculature through a nylon 6.0 single stitch. The distal stump extremity was sutured to the tibial nerve by end-to-side suture with three mono nylon 10.0 simple stitches, without removing the epineurium (end-to-side neurorrhaphy - Figure 3).
4. Group 4 (end-to-side loop neurorrhaphy): The fibular nerve was sectioned and its proximal stump was buried inside the adjacent musculature by a nylon 6.0 single stitch. The distal stump completely

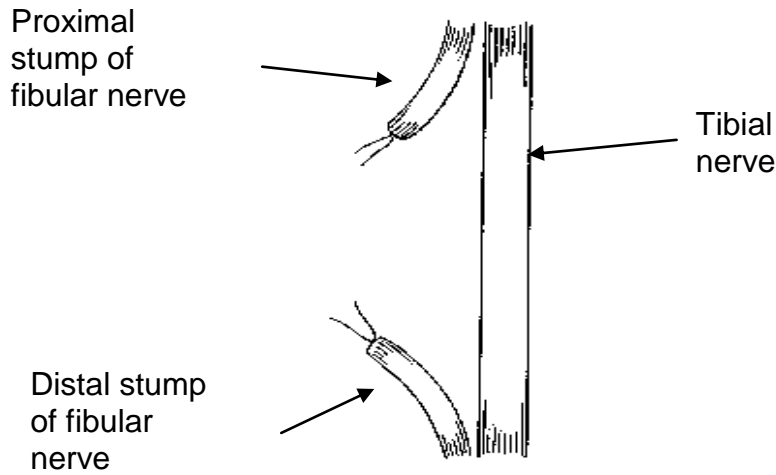
wrapped round the tibial nerve and then the stump was sutured to itself with three mono nylon 10.0 simple stitches. (end-to-side loop neurorrhaphy - figure 4 and 5).

**Group 1**



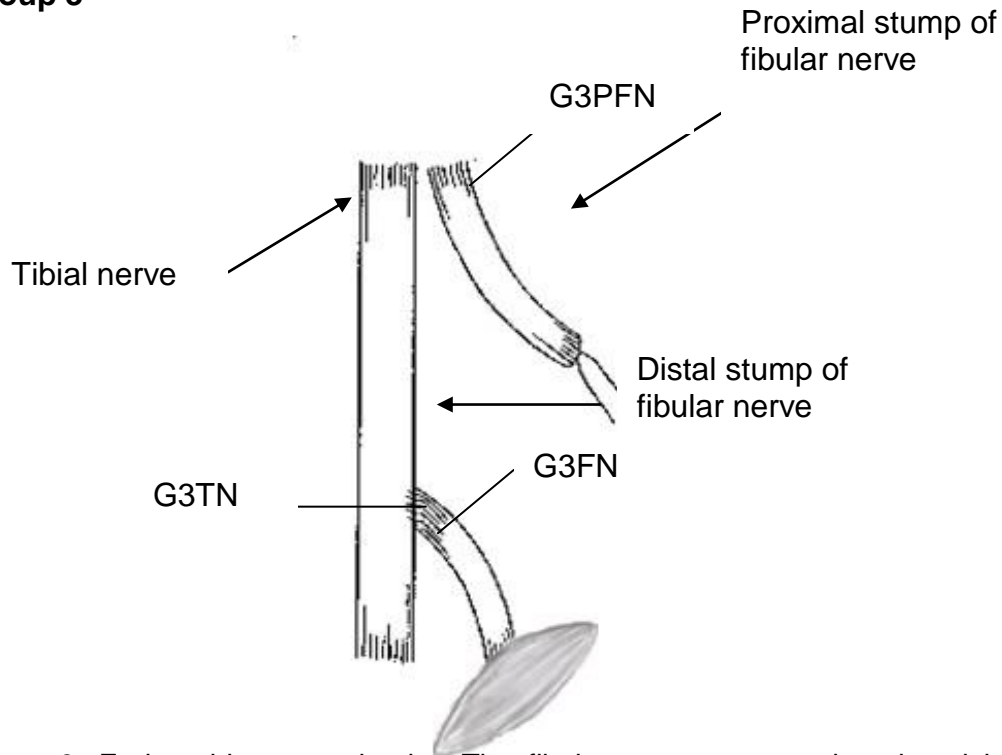
**Figure 1:** Normality control. Skin, SCT and muscles were incised and then sutured again.

**Group 2**

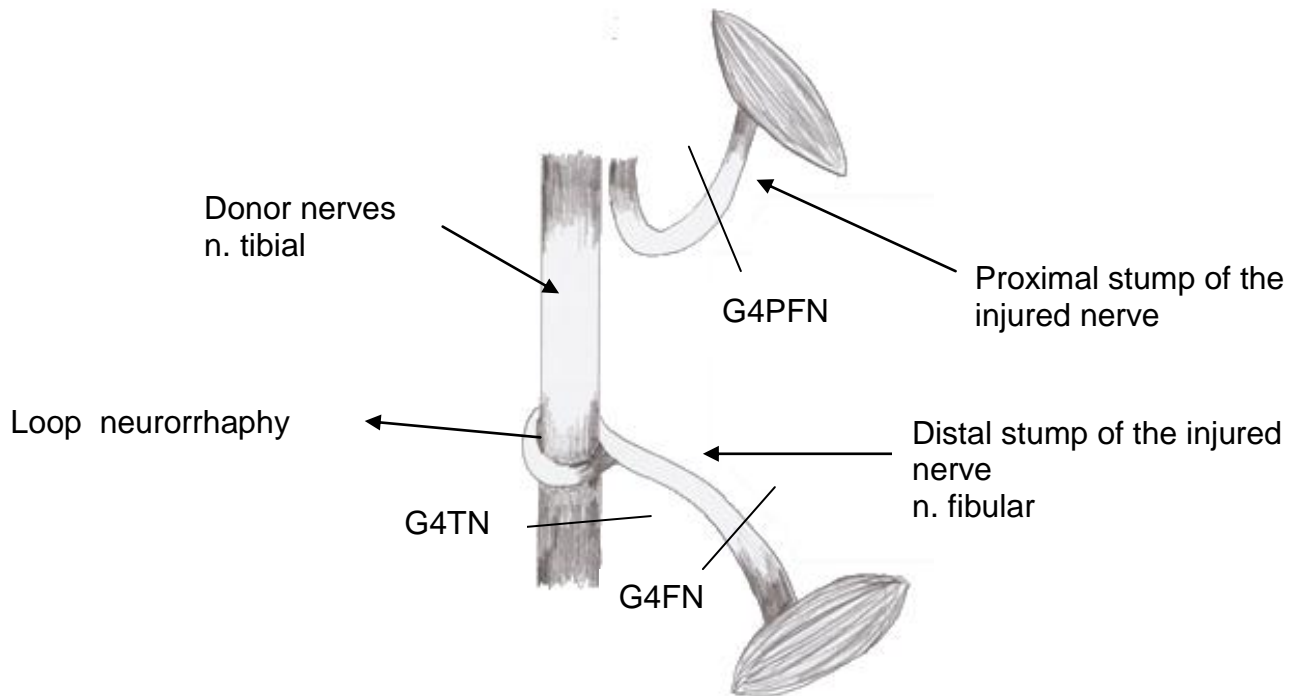


**Figure 2:** Control of the fibular nerve denervation. The fibular nerve was sectioned and its proximal and distal stumps were sutured in different and distant muscular groups by a nylon 6.0 single stitch. The tibial nerve remained intact.

**Group 3**



**Figure 3:** End-to-side neurorrhaphy. The fibular nerve was sectioned and its proximal stump was buried inside the adjacent musculature by a nylon 6.0 single stitch. The distal stump extremity was sutured to the tibial nerve by end-to-side suture with three mono nylon 10.0 simple stitches, without removing the epineurium.

**Group 4**

**Figure 4.** Schematic drawing of the proposed latero-lateral loop neurorrhaphy. The fibular nerve was sectioned and its proximal stump was buried inside the adjacent musculature by a nylon 6.0 single stitch. The distal stump completely wrapped round the tibial nerve and then the stump was sutured to itself with three mono nylon 10.0 simple stitches.

After the surgical procedures, the rats remained in appropriate cages and received commercial rat diet and *ad libitum* water during an interval of six months, then they were sacrificed by excessive use of anesthetic and nerve fragments were collected for the study above, as described below.

### **Histostereological study**

The cranial tibial muscles (innervated by the fibular nerve) and nerve fragments of approximately 0.5 cm were collected and identified as described below:

#### **Group G1**

G1TN - tibial nerve cross-section. The fibers were counted to obtain a parameter of normality of the tibial nerve.

G1FN - fibular nerve cross-section. The fibers were counted to obtain a parameter of normality of the fibular nerve.

G1CT - cranial tibial muscle. It was fully collected and weighed on a precision scale to obtain a parameter of normality of the muscle weight.

#### **Group G2:**

G2FN - distal stump of the fibular nerve cross-section. The fibers were counted to obtain a denervation parameter of the fibular nerve.

G2PFN - proximal stump of the fibular nerve cross-section. This material was collected to identify the neuroma in the proximal stump of the injured nerve and, thus ruling out the existence of possible reinnervation of the fibular nerve through its proximal stump.

G2CT - cranial tibial muscle. It was fully collected and weighed on a precision scale to obtain a denervation parameter of the muscle weight.

**Group G3:**

G3ESN- end-to-side neurorrhaphy cross-section. This material was collected in order to show the nerve sproutings emerging from the donor nerve (n. tibial) to the receptor nerve (n. fibular).

G3FN - distal stump of the fibular nerve cross-section (distal to neurorrhaphy). The fibular nerve fibers were counted and compared with normality, denervation and the latero-lateral loop neurorrhaphy.

G3PFN - proximal stump of the fibular nerve cross-section. This material was collected to identify the neuroma in the proximal stump of the injured nerve and, thus, ruling out the existence of possible reinnervation of the fibular nerve through its proximal stump.

G3TN - tibial nerve cross-section (distal to neurorrhaphy). The material was collected to identify if there was loss of axons of the donor nerve distal to neurorrhaphy, compared to the intact tibial nerve (normal control).

G3CT - cranial tibial muscle. Fully collected and weighed on a precision scale. The weight was compared with the normal group, denervation and latero-lateral loop neurorrhaphy.

**Group 4:**

G4LLN- latero-lateral loop neurorrhaphy cross-section. This material was collected in order to show the nerve sproutings emerging from the donor nerve (n. tibial) to the receptor nerve (n. fibular).

G4FN - distal stump of the fibular nerve cross-section (distal to neurorrhaphy). The fibular nerve fibers were counted and compared with normality, denervation and the latero-lateral loop neurorrhaphy.

G4PFN - proximal stump of the fibular nerve cross-section. This material was collected to identify the neuroma in the proximal stump of the injured nerve and, thus, ruling out the existence of possible reinnervation of the fibular nerve through its proximal stump.

G4TN - tibial nerve cross-section (distal to neurorrhaphy). The material was collected to identify if there was loss of axons of the donor nerve distal to neurorrhaphy, compared to the intact tibial nerve (normal control).

G4CT - cranial tibial muscle. Fully collected and weighed on a precision scale. The weight was compared with the normal group, denervation and end-to-side neurorrhaphy.

After removal, the nervous fragments TN, FN and PFN were fixed (in transverse position) in 10% glutaraldehyde and osmium tetroxide 1%, with inclusion in paraplast, microtome sections with a thickness of 0.5  $\mu\text{m}$  and toluidine blue staining. The nerve fragments ESN and LLN were stained with Masson's trichrome and Bielchowski techniques.

The cranial tibial muscles were removed and weighed. The weights were compared among the groups.

For capturing images and stereological calculations, the microscope and the software Image Pro Plus  $\text{\textcircled{R}}$  version 6.0 were used, with the adoption of Weibel stereological grid  $\text{\textcircled{R}}$ . We considered the actual distance between the 1 $\mu\text{m}$  stitches and 20 microscopic fields per histological slide in order to count the absolute number of stitches on axons, endoneurium and myelin sheath and obtain the arithmetic mean and volume density calculation. The volume density (Vd) was estimated by Chalkley technique 21.22. The Mann-Whitney (U Test) was applied for the statistical analysis, with a 5 % significance level.

## **RESULTS**

Table 01 shows the absolute number of axons and the arithmetic mean of the fibular nerve in each group (G1FN, G2FN, and G3FN G4FN). There was a



significant reduction in the number of axons in both groups (and G3FN and G4FN) compared to the control group ( $p < 0.0001$ ).

Table 02 shows the absolute number of axons and the arithmetic mean of the fibular nerve in each group (G1TN, G2TN, G3TN and G4TN). There was a significant reduction in the number of axons in both groups (and G3TN and G4TN) compared to the control group ( $p < 0.0001$ ).

Table 01. The absolute number count and arithmetic mean of axons in each group of sectioned fibular nerve (fibular nerve G1FN = control fibular nerve; G3FN = end-to-side neurorrhaphy with fibular nerve sutured to the tibial nerve; G4FN = loop neurorrhaphy with fibular nerve sutured to the tibial nerve; X = arithmetic mean).

	<b>G1FN</b>	<b>G3FN</b>	<b>G4FN</b>
	708	471	368
	590	432	386
	603	403	398
	593	336	431
	607	351	383
	608	445	325
	598	412	412
	615	455	365
	589	402	389
	602	409	414
X	611	412	387

Table 02. The absolute number count and arithmetic mean of axons in each group of sectioned tibial nerve (G1TN = normal tibial nerve; G3TN = distal tibial nerve to end-to-side neurorrhaphy; G4TN = distal tibial nerve to loop neurorrhaphy; X = arithmetic mean).

<b>G1TN</b>	<b>G3TN</b>	<b>G4TN</b>
783	721	751
847	705	706
739	695	710
748	618	691
752	698	695
735	689	708
748	712	701
789	718	697
801	688	712
808	699	718
X	694	709

Table 03 shows the volume density (mm<sup>2</sup>) of axons in each group of the sectioned fibular nerve (G1FN, G3FN and G4FN). Chart 01 shows the arithmetic mean of the volume density in each group of the fibular nerve (G1FN, G3FN, G4FN and denervation group (G2FN)). There was a significant reduction in the value of the volume density of axons in both groups (G2FN, G3FN, G4FN) in relation to the control group. (p-value <0.0001). Between G3FN and G4FN, there was no significant difference (p-value = 0.315). There were significant differences between the groups G3FN and G4FN compared to the G2FN denervation.

Table 04 and Chart 02 show the absolute values and the arithmetic mean of volume density (mm<sup>2</sup>) of axons in each group of the sectioned tibial nerve (G1TN, G3TN and G4TN). There was a significant reduction in the value of the volume density of axons in both groups (G3TN and G3TN) in relation to the control group. (p-value < 0,0001). Between G3TN and G4TN, despite the value of (p = 0.0147), we can not state that the means are significantly different, since all values are close to the 0.27 mean.

Table 03. Volume density (mm<sup>2</sup>) and arithmetic mean of axonal volume in each group of sectioned fibular nerve (G1FN = normal fibular nerve; G3FN = end-to-side neurorrhaphy with fibular nerve sutured to the tibial nerve; G4FN = loop neurorrhaphy with fibular nerve sutured to the tibial nerve; X = arithmetic mean).

	<b>G1FN</b>	<b>G3FN</b>	<b>G4FN</b>
	0.27	0.14	0.18
	0.23	0.14	0.17
	0.23	0.14	0.16
	0.23	0.13	0.13
	0.23	0.11	0.14
	0.23	0.13	0.17
	0.23	0.16	0.16
	0.24	0.14	0.18
	0.23	0.15	0.15
	0.23	0.16	0.16
X	0.24	0.14	0.16

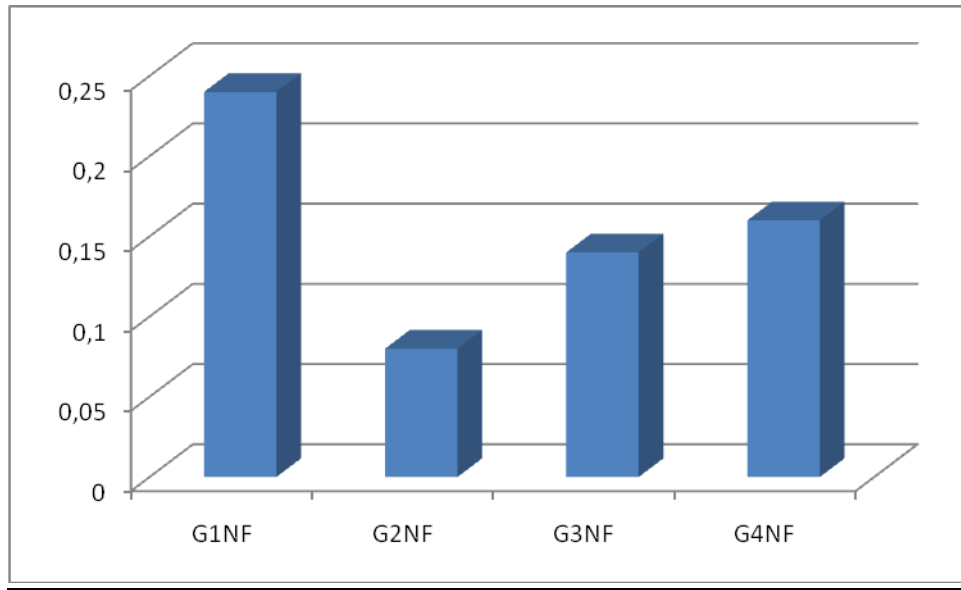
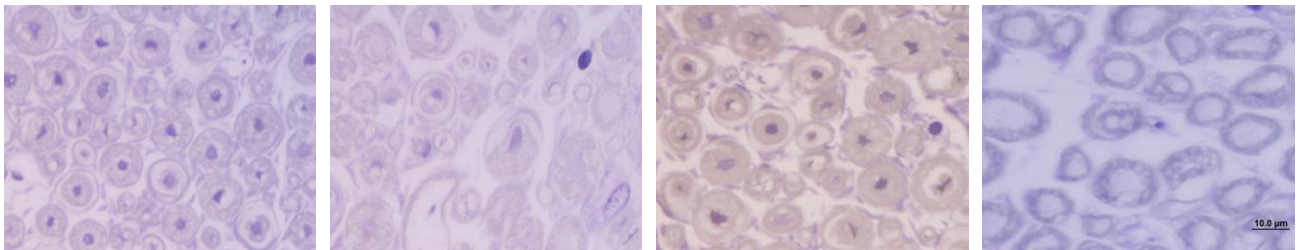


Chart 1 Average volume density



**1- normal**

**2- neurorrhaphy side  
to side**

**3- neurorrhaphy end  
to side**

**4 denervation**

Figures 1 to 4 slide show in korash toluidine blue

Table 04. Volume density and arithmetic mean of axonal volume in each group of sectioned tibial nerve (G1TN = normal tibial nerve; G3TN = distal tibial nerve to end-to-side neurorrhaphy; G4TN = distal tibial nerve to loop neurorrhaphy; X = arithmetic mean).

	<b>G1TN</b>	<b>G3TN</b>	<b>G4TN</b>
	0.30	0.27	0.29
	0.33	0.27	0.27
	0.28	0.24	0.27
	0.29	0.27	0.27
	0.31	0.27	0.27
	0.29	0.27	0.27
	0.28	0.28	0.27
	0.29	0.26	0.27
	0.30	0.27	0.27
	0.31	0.27	0.28
X	0.30	0.27	0.27

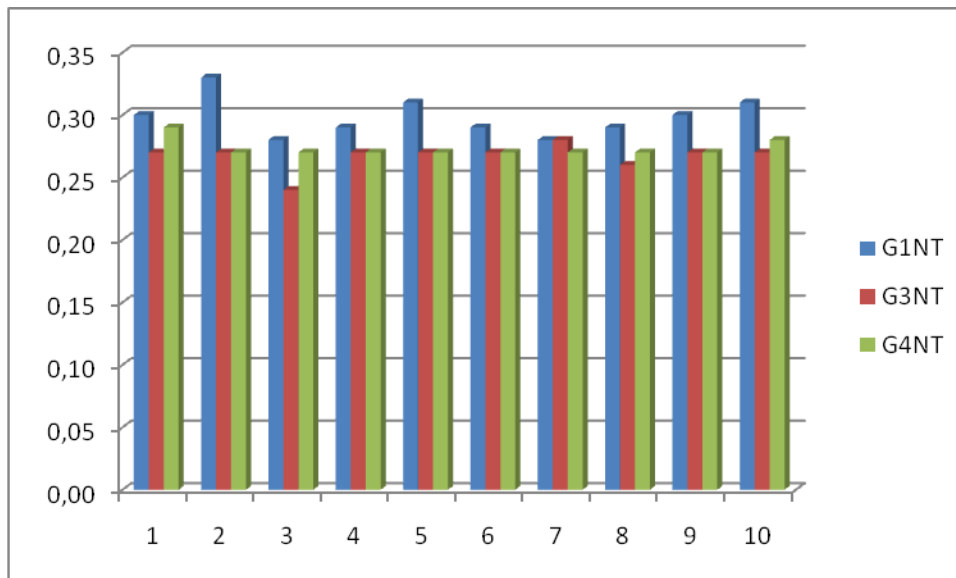


Chart 02 Volume density of the tibial nerve

Table 05 shows the weight of the cranial tibial muscle innervated by the fibular nerve in each of the analyzed groups. Significant reduction in the weight values in the groups (G2, G3 and G4) in relation to the control group (G1). ( $p$ -value  $<0.0001$ ). There was no significant reduction between G3 and G4.

Table 05. The weight of the Cranial tibial muscle in each group (G1 = control group; G2 = denervation group; G3 = end-to-side group; G4 = loop neuroorrhaphy group; X = arithmetic mean).

<b>Weight of Cranial tibial muscle in the groups (g)</b>			
<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
0.8085	0.0943	0.6924	0.7606
1.0021	0.1702	0.7511	0.8700
1.0858	0.1112	0.6100	0.8191
1.1881	0.1045	0.7708	0.5704
1.0665	0.0810	0.6860	0.7281
0.9329	0.1372	0.7187	0.7746
0.9965	0.0928	0.7341	0.6804
1.0352	0.1155	0.7235	0.9636
0.8910	0.0952	0.3312	0.6821
0.9733	0.1002	0.3310	0.5965

## **DISCUSSION**

In recent decades, a remarkable increase of molecular, genetic and morphofunctional knowledge of the neuronal regenerative process, as well as technological advances in microsurgery have provided better results in clinical recovery of peripheral nerve injuries<sup>23,24</sup>. It is known that Schwann cells are responsible for "directing" axon regeneration<sup>1, 25</sup>, release factors that increase the synthesis of nerve growth factor<sup>26</sup>, and thus, promote sensorimotor axonal sprouting<sup>27, 28</sup>.

There is the possibility of surgical functional regeneration as long as there is a suture of nerve segment to its trunk<sup>29</sup>, since neurons adjacent to the site of injury secrete substances that contribute to the neuronal survival<sup>30-32, 21</sup>. Thus, this study proposes a new technique for complete loop neurorrhaphy, and with maximum surface contact of the injured distal stump in relation to the healthy nerve, followed by end-to-side suture. The surgical technique of loop neurorrhaphy is justified for using intact nerve (which "stabilizes" the suture when reducing the local tension<sup>17.27</sup>), by reducing the intraluminal pressure and allowing neovascularization, axoplasmic flow, cell migration and advance of the axonal growth cone<sup>33</sup>.

The end-to-end neurorrhaphies performed in situations, where the access to the stumps is difficult, lead to little promising results due to tension in the suture site<sup>19,32,33</sup>. On the other hand, latero-lateral neurorrhaphies, are not dependent on the distance among stumps, and, have been identified as viable alternatives to nerve grafts<sup>34</sup>, because they can promote both sensory and motor functional recovery<sup>27</sup>. Moreover, in latero-lateral neurorrhaphy, a large number of axonal sprouts may be able to cross the suture area and then promote action of neurotrophic factors essential for the axonal growth, with similar results compared to end-to-side neurorrhaphy<sup>17.27</sup>.

It is assumed that the technique proposed by this study (or loop neurorrhaphy), direct contact between two nerve promotes greater possibility of action of neurotrophic factors, taking into account the fact that the epineurium is no impediment to axonal regeneration or to passage of the electric stimulus<sup>1.35</sup>, since the axoplasmic sproutings are able to cross the epineurium and allow responses in functional tests<sup>31</sup>. The absence of surgical section of the intact nerve (or donor by contact) minimizes risks related to dysfunction in target tissues, neuronal atrophy or undifferentiated neuroma formation associated with local pain<sup>36</sup>.

In this paper, the loop neurorrhaphy was performed in injured fibular nerve and healthy tibial nerves of rats, in order to fit the experimental models that recommend the choice of this animal, because of the possibility of high speed of

functional nerve regeneration in short postoperative period, the low cost and easy handling<sup>37</sup>. The use of simple points with 10.0 mononylon have shown satisfactory results in peripheral nerve repair<sup>38,39</sup>, mainly because there is less secondary tissue damage when reducing the thread caliber in the suture<sup>40,41</sup>.

Recent studies have indicated that end-to-side loop sutures that increase the contact area between the injured nerves and its receptor provide stability of the joint graft area receptor and function improvement<sup>15,17,19,20</sup>. In the current study, there is not a statistically significant reduction in the axons volume density after neurorrhaphy (both techniques), and it suggests that end-to-side loop neurorrhaphy can be a viable surgical alternative for peripheral nerve injuries repair.

## **CONCLUSIONS**

The loop neurorrhaphy or the "closed loop" technique are the surgical reconstruction after neural injury that occurs a complete involvement of the injured nerve trunk, with maximum contact, followed by end-to-side suture. The intact donor nerve is used with local low-tension, and that experimentally it does not cause significant reduction in axons volume density in the injured distal stump, as compared to conventional end-to-side neurorrhaphy. End-to-side loop neurorrhaphy is a therapeutic option as suture technique after complete nerve section, in order to restore most of the axonal functional integrity.



**REFERENCES:**

- 1 Yuksel F, Karacaoglu M E, Guler M. Nerve regeneration through side-to-side neurorrhaphy sites in a rat model: A new concept in peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104: 2092-2099.
- 2 Mira J C. Effets de une congélation localisée sur la structure des fibres nerveuses et leur régénération. *J Mier.* 1972; 14:155-168.
- 3 Bertelli A J, Mira J. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery.* 1993; 14: 135-140.
- 4 Lech O. Princípios básicos. In: Pardini A G Jr. *Cirurgia da mão lesão não Traumáticas.* Rio de Janeiro: Medsi, 1990. p.1-33.
- 5 Schwartz I. *Principles of surgery.* 7nd ed. New York: McGraw-Hill; 1999.
- 6 Calder, JS, Green CJ. Nerve-muscle sandwich grafts: The importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. *J Hand Surg Br.* 1995; 20: 423-428.
- 7 Stoll G, Griffin J W, Li C Y, Trapp B D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol., London* 1989;18: 671-683.
- 8 De Medinaceli, L, Merle, M. How exact should nerve stump coaptation be? A new answer given by "cell surgery". *J Hand Surg. [Br.], Edinburgh,* 1991;16(5) 495-498.
- 9 Lundborg G. 25th anniversary presentation. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg.* 2000; 25A: 391-414
- 10 Oliveira A L R. Capacidade regenerativa axonal em diferentes linhagens de camundongos isogênicos. [Dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 1996.
- 11 Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery.* 1999;44(4):825-39; discussion 39-40
- 12 Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.*1997; 190: 57-71.

- 13 Hakstian R. H. Perineural neurorrhapy. *Orthop Clin North Am.* 1973; 4:945-956.
- 14 Rosegay H, Edwards M S. The language of neurorrhaphy. *J Neurosurg.* 1980; 52: 143-144.
- 15 Viterbo F. Neurorrafia término-lateral. In: Tatagiba M, Mazzer N, Aguiar PHP, Pereira CU, eds. *Nervos periféricos. Diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico.* Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 85-7.
- 16 Tham SKY, Morrison WA. Motor collateral sprouting throught an end-to-side nerve repair. *J Hand Surg.* 1998; 23A: 844-51.
- 17 Amr SM, Moharram A, Abdel-Meguid K. Augmentation of partially regenerated nerves by end-to-side side-to-side grafting neurotization: experience based on eight late obstetric brachial plexus cases. *J Brach Plexus Periph Nerves Injury.* 2006; 1(6): 1-12.
- 18 HATA Y. The real history of end-to-side neurorrhaphy. *Br JPlast Surg.* 2000; 53:633-634.
- 19 Flores L P. Neurorrafia término-lateral: uma evolução da técnica de reparo de lesões de nervos periféricos? *Arq bras neurocir.* 2006; 25(2):66-73.
- 20 Kakibushi M, Tuji K, Fukuda k, Terada T, Kawai K, Yano K. End-to-side nerve graft for facial nerve reconstruc-tion. *Ann Plast Surg.* 2004; 53:496-500;
- 21 Chalkley H W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4:47-53.
- 22 Mandarim-de-Lacerda CA. *Métodos quantitativos em morfologia.* Rio de Janeiro: EdUERJ; 1995.p.71-109.
- 23 Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997; 14(1-2): 67-116.
- 24 Myckatyn T M, Mackinnon S E. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res.* 2004; 26:124-138.
- 25 Fukuda A, Hirata H, Akeda K, Morita A, Nagakura T, Tsujii M, Uchida A. Enhanced reinnervation after neurotization with Schwann cell transplantation. *Muscle Nerve.* 2005;31:229-234.

- 26 Heumann R. Regulation of the synthesis of nerve growth factor. *J Exp Biol.* 1987;132: 133-150.
- 27 Xiong G, Ling I, Nakamura R, Sugiura Y. Retrograde tracing and eletrophysiological findings of collateral sprouting after end-to-side neurorrhaphy. *Hand Surg.* 2003;8:145-150.
- 28 Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114:129.
- 29 Zhang Z, Soucacos P N, Bo J, Beris A E. Evaluation of collateral sprouting after end-to-side nerve coaptation using a fluorescent double-labeling technique. *Microsurgery.* 1999; 19:281-286.
- 30 Da Silva C.F. Biologia celular e molecular da regeneração nervosa do sistema nervoso periférico. *Atualização em Neurociências.* 1995; 1: 1-16.
- 31 Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surgery. (Br.)* 1994;19B:277-82.
- 32 Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 94(7):1038-47.
- 33 Kerns Jm, Sladek Eh, Malhshite Ts, Bach H, Gonzales M H. End-to-side nerve grafting of the tibial nerve to bridge a neuroma-in-continuity. *Microsurgery.* 2005; 25:155-66.
- 34 Sananpanich K, Morrison W A, A. M. Physiologic and morphologic aspects of nerve regeneration after end-to-end or end-to-side coaptation in rat model of brachial plexus injury. *J Hand Surg* 2002;27A:133-42.
- 35 Viterbo F. A new method for treatment of facial palsy: the cross-face nerve transplantation with end-to-side neurorrhaphy. *Rev Soc Bras Cir Plást Est Reconstr.* 1993; 8:29-35.
- 36 Sato K M. Comparação de neurorrafias término-terminais e término-laterais na reconstrução do nervo mediano: pesquisa experimental em ratos Wistar adultos.[Monografia].Florianópolis: Univ Fed de Santa Catarina, Faculdade Medicina; 2005.
- 37 Mackinnon S E. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg, Boston* 1989;22(3):257-273.

38 Vasconcelos BCE, Gay-Escoda C, Vasconcellos RJH, Neves RFSN. Conduction velocity of the rabbit facial nerve: a noninvasive functional evaluation. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(2):12631.

39 Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TPA. Nervous regeneration technic: cirurgical process and alternatives. *Ver Cirur Traumatol Buco-Maxilo-Facial* 2003;3(2).

40 Braun R M. Epineurial nerve suture. *Clin Orthop Relat Res*, Philadelphia 1982 Mar; 163:50-56.

41 Santos NR. Estudo da regeneração axonal em enxerto nervoso sensitivo (n. sural) autólogo a partir do nervo craniano intacto (n. vago).[Disertação] . Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

**APÊNDICES**

---

**APÊNDICES**

Apêndice 1. Contagem do número de pontos incidentes sobre axônios, endoneuro e bainha de mielina nos grupos G1, G2, G3 e G4 no nervo fibular.

Axônio			
Controle (G4NF)	0,5 cm(G3NF)	0,25 cm (G2NF)	Término-lateral (G1NF)
420	316	311	368
325	188	347	179
271	188	268	372
425	239	318	331
410	270	364	283

Endoneuro			
Controle (G4NF)	0,5 cm(G3NF)	0,25 cm (G2NF)	Término-lateral (G1NF)
842	1152	1286	1129
1050	1487	1366	1284
825	1197	1546	1197
793	1324	1380	1188
842	1453	1286	1292

Bainha			
Controle (G4NF)	0,5 cm(G3NF)	0,25 cm (G2NF)	Término-lateral (G1NF)
1128	751	854	900
1110	728	660	844
1204	1046	670	868
1147	783	664	925
1195	611	770	826

Apêndice 2. Contagem do número de pontos incidentes sobre axônios, endoneuro e bainha de mielina nos grupos G1, G2, G3 e G4 no nervo tibial.

Axônio			
Controle (G4NT)	0,5 cm (G3NT)	0,25 cm (G2NT)	Término-lateral (G1NT)
583	253	343	447
647	257	368	405
539	275	362	395
548	232	343	418
608	290	189	430

Endoneuro			
Controle (G4NT)	0,5 cm (G3NT)	0,25 cm (G2NT)	Término-lateral (G1NT)
827	1200	1405	1111
810	1376	1405	848
1081	1463	1332	1008
837	1313	1417	935
862	1616	1432	935

Bainha			
Controle (G4NT)	0,5 cm (G3NT)	0,25 cm (G2NT)	Término-lateral (G1NT)
684	1040	711	921
814	647	694	1197
741	663	737	1175
679	770	670	1104
660	478	612	1082

Apêndice 3. Peso em gramas dos músculos ressecados nos grupos G1, G2, G3, G4 (desnervação e normalidade).

<b>Grupo</b>	<b>Peso (gramas)</b>
G1	0,87
	0,81
	0,57
	0,76
	0,72
G2	0,65
	0,64
	0,76
	0,65
	0,63
G3	0,52
	0,61
	0,55
	0,71
	0,62
G4	1,25
	1,05
	1,2
	1,03
	1,1
G4- Desnervação	0,24
	0,28
	0,23
	0,24
	0,25



Apêndice 4. Aplicação do teste não paramétrico de *Mann-whitney* nos grupos G1, G2, G3 e G4 no nervo fibular.

FIBULAR						
Axônio						
	G4NF/G3NF	G4NF/G2NF	G4NF/G1NF	G3NF/G2NF	G1NF/G3NF	G1NF/G2NF
Mann-Whitney test						
P value	0,0159	0,222	0,3095	0,0556	0,2222	0,8413
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes	No	No	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	39,16	34,21	33,22	18,37	34,21	29,26
Mann-Whitney U	1	6	7	3	6	11
Endoneuros						
	G4NF/G3NF	G4NF/G2NF	G4NF/G1NF	G3NF/G2NF	G1NF/G3NF	G1NF/G2NF
Mann-Whitney test						
P value	0,0079	0,0079	0,1508	0,6905	0,2222	0,0317
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Gaussian Approximation	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	No	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	40,15	40,15	20,35	25,30	215,33.5	17,38
Mann-Whitney U	0	0	5	10	6.5	2
Bainha						
	G4NF/G3NF	G4NF/G2NF	G4NF/G1NF	G3NF/G2NF	G1NF/G3NF	G1NF/G2NF
Mann-Whitney test						
P value	0,0079	0,0079	0,0079	0,6905	0,1508	0,0317
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	40,15	40,15	40,15	30,25	35,20	38,17
Mann-Whitney U	0	0	0	10	5	2

Apêndice 5. Aplicação do teste não paramétrico de *Mann-whitney* nos grupos G1, G2, G3 e G4 no nervo tibial.

TIBIAL						
Axônio						
	G4NT/G3NT	G4NT/G2NT	G4NT/G1NT	G3NT/G2NT	G1NT/G3NT	G1NT/G2NT
Mann Whitney test						
P value	0,0079	0,0079	0,0079	0,1508	0,0079	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	40 , 15	40 , 15	40 , 15	20 , 35	40 , 15	40 , 15
Mann-Whitney U	0	0	0	5	0	0
Endoneuro						
	G4NT/G3NT	G4NT/G2NT	G4NT/G1NT	G3NT/G2NT	G1NT/G3NT	G1NT/G2NT
Mann Whitney test						
P value	0,0079	0,0079	0,1508	0,8413	0,0079	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	40 , 15	40 , 15	20 , 35	26 , 29	40 , 15	40 , 15
Mann-Whitney U	0	0	5	11	0	0
Bainha						
	G4NT/G3NT	G4NT/G2NT	G4NT/G1NT	G3NT/G2NT	G1NT/G3NT	G1NT/G2NT
Mann Whitney test						
P value	0,6905	0,6905	0,0079	1	0,0159	0,0079
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	No	Yes	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	30 , 25	30 , 25	40 , 15	27 , 28	39 , 16	40 , 15
Mann-Whitney U	10	10	0	12	1	0

Apêndice 6. Aplicação do teste não paramétrico de *Mann-whitney* nos grupos G1, G2, G3 e G4( normalidade e desnervação) para peso da massa muscular.

Peso massa muscular										
	G1/G2	G1/G3	G1/G4N	G1/G4D	G2/G3	G2/G4N	G2/G4D	G3/G4N	G3/G4D	G4N/G4D
Mann Whitney test										
P value	0,2222	0,0556	0,0079	0,0079	0,0952	0,0079	0,0079	0,0079	0,0079	0,0079
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact	Exact
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	33,50 , 21,50	37 , 18	15 , 40	40 , 15	36 , 19	15 , 40	40 , 15	15 , 40	40 , 15	40 , 15
Mann-Whitney U	6,5	3	0	0	4	0	0	0	0	0

Apêndice 7. Modelo de ficha para o registro da contagem de pontos que sobrepõem à estrutura considerada (axônios, endoneuros, bainha de mielina e outras estruturas). A ficha corresponde ao rato 01 do grupo G2 e as vinte lâminas (lâminas de 21 à 40)

GRUPO 02 RATO 01	LAMINA 21
AXÔNIOS 05	
Endoneuro, 36	
Bainha, 70	
Outras estruturas. 19	
GRUPO 02 RATO 01	LAMINA 22
AXÔNIOS 04	
Endoneuro, 37	
Bainha, 58	
Outras estruturas. 31	
GRUPO 02 RATO 01	LAMINA 23
AXÔNIOS 10	
Endoneuro, 33	
Bainha, 57	
Outras estruturas. 30	
GRUPO 02 RATO 01	LAMINA 24
AXÔNIOS 9	
Endoneuro, 38	
Bainha, 55	
Outras estruturas. 28	

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 25

AXÔNIOS 13

Endoneuro, 31

Bainha, 68

Outras estruturas. 18

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 26

AXÔNIOS 9

Endoneuro, 28

Bainha, 73

Outras estruturas. 20

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 27

AXÔNIOS 12

Endoneuro, 31

Bainha, 69

Outras estruturas. 18

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 28

AXÔNIOS 8

Endoneuro, 29

Bainha, 74

Outras estruturas. 19

GRUPO 02 BATO 01

LAMINA 29

AXÔNIOS 5

Endoneuro, 36

Bainha, 70

Outras estruturas. 19

GRUPO 02 BATO 01

LAMINA 30

AXÔNIOS 04

Endoneuro, 37

Bainha, 58

Outras estruturas. 31

GRUPO 02 BATO 01

LAMINA 31

AXÔNIOS 10

Endoneuro, 33

Bainha, 57

Outras estruturas. 30

GRUPO 02 BATO 01

LAMINA 32

AXÔNIOS 9

Endoneuro, 38

Bainha, 55

Outras estruturas. 28

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 33

AXÔNIOS 13

Endoneuro, 31

Bainha, 68

Outras estruturas. 18

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 34

AXÔNIOS 9

Endoneuro, 28

Bainha, 73

Outras estruturas. 20

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 35

AXÔNIOS 12

Endoneuro, 31

Bainha, 69

Outras estruturas. 18

GRUPO 02 RATO LAMINA 36

AXÔNIOS 8

Endoneuro, 29

Bainha, 74

Outras estruturas. 19

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 37

AXÔNIOS 14

Endoneuro, 30

Bainha, 67

Outras estruturas. 19

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 38

AXÔNIOS 9

Endoneuro, 28

Bainha, 73

Outras estruturas. 20

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 39

AXÔNIOS 11

Endoneuro, 32

Bainha, 58

Outras estruturas. 29

GRUPO 02 RATO 01 LAMINA 40

AXÔNIOS 9

Endoneuro, 38

Bainha, 54

Outras estruturas. 29



