



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

EXAME PARA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TÍTULO

Estudo do perfil temporal na liberação de neurotrofinas em ratos Wistar submetidos à sutura término-terminal imediata após lesão do nervo mediano

Trabalho apresentado como requisito parcial para defesa da dissertação

Aluno: Marcos Antonio dos Santos

Orientador: Prof^a Dr^a. Tânia Silvia Fröde

Florianópolis, 24 novembro de 2010.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Tânia Silvia Fröde, pelo comprometimento, dedicação, generosidade e um inefável amor à docência

Ao Ten. Cel. Sérgio dos Santos Szelbracikovisk, pela confiança e apoio recebidos.

À minha esposa Marluce, pela paciência e compreensão nas horas de ausência.

Ao Dr. Paulo Roberto Kechele, pelas orientações, apoio e amizade.

Sumário

ITEM	Pág.
Lista de abreviações	5
Lista de figuras	6
Lista de tabelas	6
Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução	9
1.1 Neurotrofinas	13
1.1.1 Fator de Crescimento do Nervo	15
1.1.2 Fator de Crescimento Derivado do Cérebro	16
1.1.3 Neurotrofina 3	16
2. Objetivos	17
3. Metodologia	17
3.1 Animais	18
3.2 Procedimento anestésico	18
3.3 Procedimento cirúrgico	19
3.4 Eutanásia	20
3.5 Técnicas utilizadas	20
3.5.1 Análise histológica do nervo mediano	20
3.5.1.1 Coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-Eosina	21
3.6 Análise da expressão do RNAm para as neurotrofinas	22
4. Análise estatística	23

5. Resultados	24
5.1 Análise histológica do nervo mediano	24
5.2 Análise da expressão do RNAm para as neurotrofinas	24
6. Discussão	33
7. Referências	38

Lista de abreviações

BDNF	Fator de crescimento derivado do cérebro
LTNP	Lesão traumática de nervo periférico
NGF	Fator de crescimento do nervo
NT-3	Neurotrofina -3
NTF	Neurotrofinas
RNAm	RNA mensageiro
TrKA	Tirosinoquinase A
TrKB	Tirosinoquinase B
TrKC	Tirosinoquinase C
p75NTR	Receptor neurotrófico comum p75
TNF	Fator de necrose tumoral
GADH	Gliceraldehido 3-fosfato desidrogenase

Lista de Tabelas e Figuras

	Pág.
Tabela 1	19
Tabela 2	23
Figura 1	25
Figura 2	26
Figura 3	27
Figura 4	28
Figura 5	29
Figura 6	30
Figura 7	31
Figura 8	32

Resumo

Introdução: As neurotrofinas regulam a plasticidade do sistema nervoso adulto, promovendo a sobrevivência de neurônios e estimulando sua regeneração após lesão. **Meta:** Este trabalho foi focado em avaliar a expressão de RNA-m das neurotrofinas (Fator de Crescimento de Nervo – NGF, Fator Neurotrófico Cerebral – BDNF e neurotrofina 3 – NT-3) no nervo mediano de ratos Wistar submetidos à sutura término-terminal imediata após neurotmeze. **Material e métodos:** Ratos Wistar foram usados no experimento. O nervo mediano foi seccionado e os animais receberam três pontos de sutura epiperineural após a neurotmeze. **Material e métodos:** Ratos Wistar foram usados no experimento. O nervo mediano foi seccionado e os animais receberam três pontos de sutura epiperineural após a neurotmeze. O estudo do RNA-m para BDNF, NT-3 e NGF no nervo mediano foi analisado nos períodos de 2, 7, 14, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico usando RT-PCR. Também foi feita a análise histológica do nervo mediano usando coloração por hematoxilina-eosina – HE. **Análise estatística:** A diferença estatística entre os grupos foi conduzida com a análise de variância (ANOVA), seguida por teste t de "Student's" e/ou Dunnett's ou teste de correlação de Pearson. Para todos os testes foi utilizada análise bicaudal. Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** Os resultados mostraram um aumento da expressão do nível de RNA-m para BDNF e NT-3 60 dias após o procedimento cirúrgico ($P=0,03$). Houve também aumento na expressão de RNA-m para NGF, que foi detectado aos 7 dias e manteve-se elevado até 60 dias após o procedimento cirúrgico ($p=0,0004$). **Conclusão:** Estes resultados confirmam e aumentam a evidência de que a sutura imediata término-terminal é eficiente na recuperação funcional do nervo mediano lesado, uma vez que esta técnica induz a liberação de RNA-m para neurotrofinas que estão relacionadas à regeneração do nervo.

Abstract

Background: Neurotrophins regulate the adult nervous system plasticity promoting the survival of neurons and stimulating nerve regeneration after injury. **Aim:** This work aimed to evaluate the neurotrophins (nerve growth factors (NGF), brain derived nerve factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3)) in the timing of RNAm expression in the median nerve in Wistar rat submitted to primary end-to-end repair after neurotmesis. **Material and Methods:** Wistar rat were used through the experiments. The rat median nerve was sectioned and the animals received primary end-to-end sutures with three epiperineurial stitches after neurotmesis. The study of RNAm to BDNF, NT-3 and NGF in the median nerve was analysed 2 to 60 days after surgical procedure using the RT-PCR. Also histological analysis of the median nerve was performed using hematoxylin-eosin (HE) **Statistical analysis.** Statistical differences between groups were conducted with the analysis of variance (ANOVA), following by Dunnett's and/or Student's t-tests or Pearson rank correlation test. P-values of less than 0.05 were considered statistically significant, and all tests were two-tailed. **Results:** The results showed an enhancement of mRNA expression levels to BDNF and NT-3 at 60 days after surgical procedure ($P = 0.03$). Also an increase of RNAm for NGF was detected at 7 to 60 days ($p = 0.0004$). **Conclusion:** These results confirm and extend the evidence that the immediate end-to-end suture procedure is efficient in the functional recovery of the injured median nerve, because this technique induces the neurotrophins RNAm release that are related to the nerve regeneration.

1. Introdução

As lesões traumáticas em nervos periféricos – LTNP são um grave problema de saúde pública em vários países ⁽¹⁻⁴⁾. O grau de gravidade das lesões varia em função do tipo de nervo acometido (se sensitivo, motor ou misto), do nível da lesão (se mais proximal ou mais distal da extremidade do membro) e da presença ou ausência de lesões associadas ^(2, 5-7).

Os traumas em mãos figuram entre as áreas do corpo que mais estão sujeitas a lesões pelos trabalhadores da indústria e são lesões de grande incidência nos serviços de trauma ^(2, 4, 8-10).

As lesões em nervos periféricos dos membros superiores, pela própria limitação de uso da mão seja total ou parcial, seja por déficit motor ou sensitivo ou ambos, geram perda na qualidade de vida, atividade social e aptidão laborativa do indivíduo ^(3, 7, 9-11). Estas lesões são muitas vezes incapacitantes e são, via de regra, responsáveis pelo afastamento do indivíduo de seu trabalho por tempo prolongado. Muitos casos são responsáveis pela aposentadoria precoce de indivíduos jovens, causando prejuízo tanto para o trabalhador quanto para o governo, por meio da manutenção do seguro social, além de custos diretos com procedimentos cirúrgicos e reabilitação ^(2, 3, 10-12).

O sistema nervoso periférico é formado pelos nervos cranianos e raquidianos. De acordo com sua função, o sistema nervoso periférico divide-se em sistema nervoso periférico voluntário ou somático e sistema nervoso periférico autônomo. O sistema nervoso periférico voluntário ou somático transmite impulsos nervosos aos músculos esqueléticos, enquanto o sistema nervoso periférico autônomo ou visceral transmite impulsos nervosos aos músculos lisos das vísceras

e à musculatura do coração. O sistema nervoso autônomo divide-se em sistema nervoso simpático e sistema nervoso parassimpático.

Os nervos periféricos podem conter fibras motoras (cujo órgão alvo é a placa motora dos músculos), fibras sensoriais (cujos órgãos alvo encontram-se na pele, músculos, tendões e articulações), e as fibras autonômicas (que se direcionam para os vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e os músculos esfínterianos). A capacidade do sistema nervoso periférico em se regenerar após uma lesão é uma característica que o distingue do sistema nervoso central ^(6, 13-15).

Após uma lesão traumática de nervo periférico – LTNP ocorrem várias alterações no axônio distal e também no corpo celular do neurônio.

A secção completa de um nervo é conhecida como neurotmeze, sendo esta a forma mais grave de lesão nervosa periférica e a mais fácil de ser diagnosticada, principalmente em ferimentos abertos.

As lesões podem ser classificadas ainda como: a) neuropraxia, quando ocorre um bloqueio na condução do impulso nervoso, mas não há um dano físico; b) uma lesão verdadeira nas estruturas anatômicas do nervo periférico, portanto, quando nenhum axônio está lesado e é esperada recuperação funcional total deste nervo após um período de tempo, que pode variar de poucos dias a algumas semanas. O mecanismo mais comum desta lesão é a compressão, como a que pode ocorrer após uso inadequado de torniquete ^(4, 5, 14, 16).

A neuropraxia de um nervo é a forma mais branda de lesão em nervo periférico.

Uma lesão de gravidade intermediária é a axonotmeze, onde ocorre lesão de axônios em uma proporção variada, mas o epineuro continua íntegro. A recuperação do nervo pode não ser completa, podendo variar de mínima

recuperação até a não recuperação. Pode haver, portanto, formação desde um neuroma que bloqueia totalmente a regeneração do nervo ou a formação de um neuroma em continuidade, em que há regeneração de alguns axônios que conseguem atingir o órgão-alvo, seja sensitivo ou motor, e outros que não conseguirão este êxito e formarão o neuroma. Neste caso, a recuperação, se houver, será mais demorada, podendo levar alguns meses ^(4-6, 14-17).

Após uma LTNP, com a perda da continuidade deste nervo, axonotmese, iniciar-se-á um processo degenerativo distal a área de lesão, conhecido como degeneração centrífuga ou Walleriana ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. Essas alterações começam de 48 a 96 horas após a transecção. A deterioração da mielina começa e o axônio torna-se desorganizado e degenerado. As células de Schwann proliferam e juntamente com macrófagos, que são atraídos para o local da lesão, fagocitam os restos de mielina e dos axônios. Sendo este um neurônio motor, a placa neuromotora deixará de ser inervada e conseqüentemente o músculo estriado entrará em processo de hipotrofia por desuso. Proximal a lesão, o corpo celular do neurônio também terá alterações. A estrutura da célula nervosa será alterada, o seu núcleo será deslocado para a periferia e haverá dissolução dos corpúsculos de Nissl e conseqüentemente diminuição da basofilia citoplasmática, processo conhecido como cromatólise. Essas alterações celulares refletem em alteração na prioridade metabólica da célula, alterando o foco na produção de neurotransmissores para a produção de materiais de construção celular necessários para o reparo e o crescimento do axônio, como por exemplo: a liberação de lipídios, actina, tubulina e síntese de proteínas associadas ao crescimento ^(4, 14, 15, 20).

Ocorrendo a axonotmese ou neurotmese de nervo periférico há, portanto, necessidade de correção cirúrgica adequada para o restabelecimento da

anatomia do nervo e, por conseguinte, restabelecimento da continuidade do nervo, permitindo a passagem do impulso nervoso até o órgão efector. Ou seja, a maneira ideal de se tratar as transecções nervosas seria a reconexão dos cotos axotomizados, visando restabelecer a continuidade anatômica entre os cotos (3, 4, 6, 14, 15, 20-22).

Apesar dos avanços em termos de técnicas cirúrgicas e materiais microcirúrgicos mais precisos e eficientes observados nos últimos vinte anos, há vários fatores inerentes ao próprio nervo que influenciam o resultado final de um reparo microcirúrgico em lesões de nervos periféricos, como a função do nervo, se sensitivo, motor ou misto, a distância entre o foco da lesão e a placa neuromotora do órgão efector (4, 23).

Com relação aos nervos mistos, durante o brotamento axonal, em que os axônios crescem de proximal para distal, pode ocorrer o chamado erro de agulhamento, em que um axônio de um neurônio motor não encontre o seu coto distal correspondente e inerve um coto distal de um axônio sensitivo, o que levará a déficit de neurônio motor em uma placa neuromotora. Como também pode ocorrer o inverso, um axônio em crescimento proveniente de um neurônio sensitivo, por erro de agulhamento, alcança um coto distal de um axônio motor. Haverá um órgão aferente sensitivo que perderá sua função. Além desses problemas citados, há ainda a necessidade de uma reinervação da placa motora o mais rápido possível. A reinervação deve ser realizada no menor tempo possível, visto que a placa neuromotora mantém sua capacidade de responder a estímulo por um período que varia de 12 a 24 meses. Após este tempo haverá lesão irreversível e mesmo que reinervada posteriormente, não possuirá capacidade de responder ao estímulo e acarretará alteração fibrótica definitiva da musculatura envolvida. Este tempo é

relativamente insuficiente, principalmente quando a lesão é distante do órgão alvo, como nos casos das lesões do plexo braquial. Como a taxa de regeneração (crescimento) axonal na espécie humana varia de 1 a 1,5 milímetro ao dia (em adultos), haverá pouca expectativa de que ocorra recuperação funcional significativa ou mesmo alguma recuperação funcional de um grupo muscular paralisado em distâncias superiores a 18 polegadas (aproximadamente 45,72 centímetros) ^(23, 24). Levando-se em conta, ainda, que este axônio consiga crescer até atingir o órgão efector, o mesmo não terá mais viabilidade de responder ao estímulo nervoso, seja pelo desaparecimento definitivo da placa motora ou pela atrofia degenerativa definitiva do músculo alvo ou mesmo as duas situações citadas em conjunto ^(4, 23-25).

Torna-se evidente que os estudos devem ser voltados para a descoberta de novos métodos que favoreçam a regeneração nervosa, bem como a proteção da apoptose da célula nervosa, e aumentem a densidade de axônios regenerados. Como objeto de estudo, destacamos o rato Wistar por possuir similaridade em termos de estrutura anatômica dos nervos periféricos quando comparados ao ser humano ⁽²⁶⁾.

Nesse contexto, também têm merecido destaque as neurotrofinas que possuem papel fundamental na regeneração de nervos periféricos ⁽²⁷⁻²⁹⁾.

1.1 Neurotrofinas

As neurotrofinas compõem uma família de fatores de crescimento importantes no desenvolvimento, manutenção e regeneração do sistema nervoso periférico ^(30, 31). Dentre as neurotrofinas podemos citar o Fator de crescimento do

nervo – NGF, o Fator de crescimento derivado do cérebro – BDNF e a Neurotrofina-3 – NT-3 ^(27, 28, 30-36).

As neurotrofinas pertencem a uma das conhecidas famílias de fatores neurotróficos formados por polipeptídios com estrutura e função relacionadas a mediar efeitos na sobrevivência e na diferenciação de uma grande variedade de populações de neurônios tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico ^(30, 31, 36-38). Em que pese as neurotrofinas serem caracterizadas por seu efeito na diferenciação e na sobrevivência dos neurônios, muitas delas influenciam também outros tipos celulares, uma vez que todas têm características bioquímicas semelhantes. Cerca de metade dos aminoácidos presentes na molécula destas proteínas são comuns a todas as neurotrofinas e todas elas possuem seis moléculas de cisteína em uma posição idêntica na cadeia estrutural. A presença destas moléculas de cisteína resulta na formação de pontes de dissulfeto, também comum para todas estas proteínas ^(36, 38, 39).

As neurotrofinas se ligam a dois tipos de receptores de membrana: os receptores do tipo tirosinaquinase (TrkA, TrkB, e TrkC) e o receptor neurotrófico comum p75 (p75NTR), que não é um receptor tirosinaquinase, mas pertence à família do fator de necrose tumoral – TNF ^(32, 35, 36, 38-41).

O Fator de crescimento do nervo – NGF foi o primeiro membro da família das neurotrofinas a ser isolado e identificado como uma proteína capaz de promover a sobrevivência de neurônios sensitivos e o crescimento de axônios de neurônios do sistema nervoso periférico ^(30, 38, 40, 42). Décadas mais tarde, a segunda proteína isolada desta família foi o fator de crescimento derivado do cérebro – BDNF, e com os avanços da biologia molecular outras duas proteínas foram identificadas,

em mamíferos, e adicionadas à classe das neurotrofinas, a neurotrofina 3 – NT-3 e a neurotrofina 4/5 – NT-4/5 ^(32, 34, 36, 38-40, 42, 43).

1.1.1 Fator de Crescimento do Nervo

O NGF foi o primeiro fator de crescimento a ser descrito e atualmente é o melhor caracterizado. Bioquimicamente é um polipeptídeo homodimérico não glicosilado de 26kDa. O NGF foi originalmente identificado em glândulas salivares de rato, por conter grande quantidade desta proteína ⁽⁴⁴⁾. O NGF durante a fase de desenvolvimento embrionário mantém e aumenta a sobrevivência de neurônios do gânglio dorsal e da grande maioria dos neurônios do sistema simpático e neurônios sensitivos aferente e eferente, mas não neurônios do sistema parassimpático ^(29, 44).

O NGF é produzido pelos órgãos-alvo, de onde é enviado para os corpos celulares por transporte axonal retrógrado após conexão a receptores específicos ^(37, 38).

A expressão do RNAm para o receptor do NGF aumenta rapidamente após ferimento do nervo quando comparado ao nervo saudável ⁽⁴⁴⁾.

O NGF liga-se, como todas as demais neurotrofinas, a dois receptores de membrana, sendo um de alta e outro de baixa afinidade. O de alta afinidade fica a cargo do TrkA e o de baixa afinidade a cargo do p75NTR ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

Apenas neurônios com o receptor de alta afinidade para o NGF (TrkA) podem responder aos efeitos biológicos desse fator neurotrófico. Exemplos importantes são os neurônios motores que podem promover a transcrição dos receptores TrkB e TrkC, mas não do TrkA. Dessa forma, fica claro que o NGF não tem ou tem muito pouca influência sobre neurônios motores, já que sua ação principal se restringe à ligação com o seu receptor TrkA ^(38, 43, 44).

1.1.2 - Fator de Crescimento Derivado do Cérebro

O Fator neurotrófico cerebral (BDNF) foi o segundo membro das neurotrofinas purificado e identificado, em 1982, por Barde e colaboradores (1982)⁽⁴⁵⁾. O BDNF é uma proteína formada por 120 aminoácidos e sua estrutura é aproximadamente 50% semelhante ao NGF^(44, 46). O BDNF como as demais neurotrofinas liga-se a dois receptores de membrana, sendo um de baixa afinidade (p75NTR) e outro de alta afinidade (TrKB)^(40, 44, 46). O BDNF é sintetizado e liberado por células de Schwann e do músculo esquelético^(47, 48) e estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram possuir importante efeito na sobrevivência e na diferenciação de neurônios sensitivos^(49, 50) e nos neurônios motores^(47, 50). Este fator foi observado ainda que em neurônios motores de rato adulto tratados por via intratecal com o BDNF promove a prevenção da apoptose de neurônios motores e estimulação do brotamento e do crescimento axonal^(44, 47). Este mesmo efeito antiapoptose não foi observado em estudos *in vitro* utilizando-se neurônios motores de embriões de frango⁽⁴⁴⁾.

1.1.3 - Neurotrofina 3

A neurotrofina 3 – NT-3 foi o terceiro membro das neurotrofinas a ser identificado^(33, 44). É formado por 119 aminoácidos e sua estrutura é 55% semelhante ao NGF⁽⁴⁰⁾. A NT-3 liga-se ao receptor de baixa afinidade p75NTR, semelhante aos demais membros da família de neurotrofinas (NGF e BDNF) e ao receptor de alta afinidade TrKC⁽³⁴⁾. A NT-3 é encontrada tanto no sistema nervoso central (bulbo olfatório, cerebelo e hipocampo) como também no sistema nervoso

periférico (timo, músculo, fígado, rins e baço) ^(44, 51). A NT-3 promove sobrevivência e diferenciação de neurônios sensitivos e do sistema parassimpático, possui pouca influência em neurônios do sistema simpático e promove a sobrevivência de neurônios motores "in vivo" ^(44, 49).

2. Objetivos

2.1 Geral

Verificar a participação de neurotrofinas na regeneração do nervo mediano, em ratos submetidos à neurotmese e a epineurorrafia imediata.

2.2 Específicos

- 1- Avaliar o efeito de Fator de crescimento do nervo – NGF, fator de crescimento derivado do cérebro – BDNF e neurotrofina-3 – NT-3 na regeneração do nervo mediano em ratos submetidos à neurotmese e epineurorrafia imediata em diferentes períodos de tempo;
- 2- Verificar qual célula produz estes fatores de crescimento no modelo experimental estudado;
- 3- Correlacionar os mediadores estudados no modelo experimental.

3. Metodologia

Delineamento do estudo

Estudo prospectivo experimental controlado

3.1 Animais

Neste protocolo experimental foram utilizados 30 ratos Wistar machos, pesando entre 250 a 270 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro controlado de 12 horas, em gaiolas de plástico, com livre acesso à água e ração.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC – protocolo N° 026/2006-16/08/2006).

3.2 Procedimento anestésico

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram medicados com 0,2 ml de sulfato de atropina a 0,2 %, na dose de 0,044 mg/kg, administrado na face interna da coxa do membro pélvico esquerdo por via intramuscular. Após 10 minutos foram anestesiados com injetado de 0,4 ml de solução de Cloridrato de Cetamina (Ketamina Agener®, União Química Farmacêutica Nacional - Embu-Guaçu - São Paulo, Brasil), quimicamente designado como 2-(o-clorofenil)-2-(Metil-Amina) Ciclo Hexanona, na dose de 100 mg/kg de massa corporal, por via intramuscular e 0,3 ml de solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-diidro-4H-1,3-tiazina (Coopazine®, Schering-Plough Coopers - Cotia - São Paulo, Brasil), na dose de 8 mg/kg, administrada por via intramuscular, na face interna da coxa do membro pélvico direito (Tabela 1).

Tabela 1: Protocolo de anestesia

Fármacos	Tratamento	Vias de Administração	Tempo de Duração da aplicação	Dosagem	Vol
sulfato de atropina (0,2 %)	Pré-anestésico	intramuscular	10 seg.	0,044 mg/kg	0,2 ml
Cloridrato de Cetamina (Ketamina Agener®),	Anestésico	intramuscular	10 seg	100 mg/kg	0,4 ml
cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-diidro-4H-1,3-tiazina (Coopazine®), 2%	Anestésico	intramuscular	10 seg	8 mg/kg	0,3 ml

3.3 Procedimento Cirúrgico

Neste protocolo experimental foram utilizados os seguintes procedimentos cirúrgicos:

- Nos animais controles (Sham) foi realizada cirurgia com dissecação do nervo mediano, sem causar lesão ao citado nervo. Fechamento por planos e pele suturada com fio de sutura polycril 6-0 (Polysuture Indústria e Comércio LTDA - São Sebastião do Paraíso - Minas Gerais - Brasil).
- Nos outros grupos de animais foi realizada a mesma cirurgia do grupo Sham, todavia, foi efetuada a neurotmese do nervo mediano e a epineurorrafia imediata do nervo lesado, com fio de sutura mononylon 10-0 e com agulha de 70 micras (Aro Surgical Instruments Corporation - Newport Beach - California - EUA) e utilizado 3 pontos de sutura no nervo. O fechamento da ferida cirúrgica foi efetuado por planos e o fechamento da pele com polycril 6-0 (Polysuture Indústria e Comércio LTDA - São Sebastião do Paraíso - Minas Gerais - Brasil).

De forma simplificada, os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

- **Grupo SHAM** (5 animais), cirurgia sem lesão do nervo mediano.
- **Grupo 1** (5 animais): Neurotmesa com epineurorafia imediata e sacrifício do animal em 2 dias;
- **Grupo 2** (5 animais): Neurotmesa com epineurorafia imediata e sacrifício do animal em 7 dias;
- **Grupo 3** (5 animais): Neurotmesa com epineurorafia imediata e sacrifício do animal em 14 dias;
- **Grupo 4** (5 animais): Neurotmesa com epineurorafia imediata e sacrifício do animal em 30 dias;
- **Grupo 5** (5 animais): Neurotmesa com epineurorafia imediata e sacrifício do animal em 60 dias.

3.4 Eutanásia

A eutanásia foi realizada por overdose de anestésico, no caso específico o tionembutal. Foram colhidas duas amostras do nervo mediano do rato. Uma amostra com 01 (um) cm de comprimento, que foi imediatamente colocada em Trizol e fragmentada com a tesoura de microcirurgia até formar pequenos fragmentos, e outra amostra do nervo mediano do rato de 05 (cinco) milímetros, que foi colocada em solução de formol a 10%. A primeira amostra foi colhida para dosagem do RNAm para as neurotrofinas e a segunda amostra foi colhida para análise histológica.

3.5 Técnicas utilizadas

3.5.1 Análise histológica do nervo mediano

Os segmentos de nervos do grupo controle (Sham) e dos animais submetidos à neurotmesa com epineurorrafia imediata (2 a 60 dias) foram colocados em cápsulas de plástico, e estas, inseridas em cesta de metal do aparelho histotécnico. No aparelho, os segmentos teciduais foram sucessivamente desidratados em etanol (70° G.L., 80° G.L. e 95° G.L. e absoluto, respectivamente), durante 1 hora em cada etapa. Em seguida, foram incubadas consecutivamente em solução de xilol P.A. e posteriormente solidificação em parafina. As cápsulas contendo os segmentos desidratados e parafinados foram então retiradas do aparelho histotécnico e cada fragmento foi envolto num quadrado metálico (*Leockart*) e imediatamente embebido novamente em parafina líquida. Os quadrados foram posteriormente armazenados em geladeira, para a completa solidificação. Os fragmentos teciduais foram cortados à espessura de 3 micras, com auxílio do micrótomo (LEICA-Instruments, Nussloch, Alemanha). Posteriormente, procedeu-se a desparafinação em banho-maria, e o material foi então transferido para uma lâmina de vidro. A seguir, estas lâminas foram secadas em estufa a 60°C, durante 20 min. e armazenadas à temperatura ambiente, para posterior coloração pela hematoxilina-eosina. O parâmetro histopatológico avaliado foi: infiltração celular. As quantificações dos parâmetros histopatológicos foram analisadas atribuindo-se graus de 0 a 3, sendo 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado e 3 = abundante, utilizando-se uma adaptação do índice morfológico semiquantitativo das escalas propostas por MOTOHIRO et al., (1986) e LOSSOS et al., (2000) ^(52, 53).

3.5.1.1 Coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-Eosina

Após secagem das lâminas em estufa (60°C), procedeu-se a coloração, por hematoxilina (0,4%) (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cuba de vidro, por 3 min, seguida da lavagem em água corrente (10 min). Na etapa seguinte, adicionou-se solução de água amoniacal (1 mMol) (Merck, Darmstadt, Alemanha), na cuba de vidro, e logo a seguir, novo banho em água corrente por 10 min. Posteriormente, as lâminas foram imersas em eosina amarelada (0,35%) por 2 min (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), lavadas em água corrente e em seguida novo banho em álcool absoluto (04 banhos). Após esta etapa as lâminas foram imersas em xilol P.A., em cuba de vidro. Por fim, foi realizada a fixação das lâminas com entellan e lâminula, para posterior quantificação da celularidade em microscópio ótico comum (aumento de 40X), contando-se 100 células. Os resultados foram expressos de acordo com parâmetros histológicos propostos por MOTOHIRO et al., (1986) e LOSSOS et al., (2000) ^(52, 53).

3.6 Análise da expressão do RNAm para as neurotrofinas

A expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do NGF, BDNF e NT-3 foi pesquisada no tecido nervoso (seguimento de nervo mediano) do rato utilizando oligonucleotídeos específicos. Estes experimentos foram realizados no laboratório GENOLAB de Blumenau, utilizando-se a técnica da reação da polimerase em cadeia, utilizando-se a transcriptase reversa (RT-PCR).

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se os reagentes da *Ready-To-Go RTPCR Beads* (Amersham Biosciences, USA) e os iniciadores (*primers*) específicos (Gibco BRL, USA) (Tabela 2). As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, usando-se o termociclador PTC-100 (MJ Research,

Inc., USA). Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%) corada com brometo de etídio (5 mg/mL) e observadas com auxílio de equipamento de Ultra Violeta *ImageMaster VDS* (Amersham Pharmacia, Switzerland). A emissão de fluorescência foi fotografada para posterior análise de comparação com os grupos controles.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR-RT e condições de reação.

Gene	Oligonucleotídeos	Produto tamanho	PCR Ciclos	Temp. (°C) de desnaturação	Temp. (°C) de anelamento	Temp (°C) de extensão	Registro no GenBank
GAPD H	CCTCTGGAAAGCTGTGGCGT TTGGAGGCCATGTAGGCCAT	430	30	95	54	72	BC 0877431
BDNF	AATCCCATGGGTTACACGAA AAGTTGTGCGCAAATGACTG	385	38	95	53	72	BC 0876341
NGF	ATCCACCCACCCAGTCTTCCACAT GGCAGCCTGTTTGTCTGTCTGTTGT	292	37	95	50	72	M 36589
NT-3	TTTCTCGCTTATCTCCGTGGCATCC GGCAGGGTGCTCTGGTAATTTTCCT	167	37	95	50	72	BC 0705041

Toda a reação de PCR foi realizada num período de 5 min a 95°C seguido pelos períodos de ciclos de 7 min a 72°C.

4. Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros (dosagem do fator de crescimento do nervo) foram expressos através da média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas entre os animais de diferentes grupos experimentais foram determinadas utilizando-se o teste de ANOVA, complementado, quando necessário pelo pós-teste teste *T* de Student. Para avaliar as possíveis correlações entre os parâmetros analisados utilizou-se o teste de correlação de Pearson. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados

5.1 Análise histológica do nervo mediano

Os resultados obtidos da análise histológica demonstraram que tanto o grupo controle como os animais submetidos à neurotmesa com epineurorafia imediata apresentaram grande quantidade de células de Schwann, não sendo detectada diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$) (Figuras de 1 a 8).

5.2 Análise da expressão do RNAm para as neurotrofinas

A análise da expressão do RNAm para os marcadores neurotrofinas revelou que após os animais serem submetidos ao procedimento de neurotmesa com epineurorafia imediata ocorreu aumento significativo na expressão do RNAm da neurotrofina NT-3 60 dias após, quando comparado ao grupo controle (Sham) (% de aumento $59,56 \pm 16,91$ ($P = 0,03$)) (Figura 6).

Em relação à neurotrofina **BDNF** também se observou aumento significativo na expressão do RNAm para esta neurotrofina, observado 60 dias após (% de aumento $123,17 \pm 18,29\%$) ($P = 0,03$) (Figura 7).

O mais interessante resultado observado foi aquele obtido com o estudo da expressão do RNAm para a neurotrofina NGF, no qual houve aumento significativo na expressão deste RNAm em todos os períodos de tempo estudados, exceto no grupo de 2 dias (% de aumento 7 dias $24,53 \pm 11,32$, $p = 0,014$, 14 dias

$47,17 \pm 16,1$, $p = 0,004$, 30 dias $67,93 \pm 11,33$, $p = 0,0004$, e 60 dias $130,19 \pm 22,64$, $p = 0,0004$) (Figura 8).

Além disso, observou-se correlação positiva para as neurotrofinas BDNF vs NGF, $r = 0,84$, $p = 0,0007$, teste de correlação de Pearson).

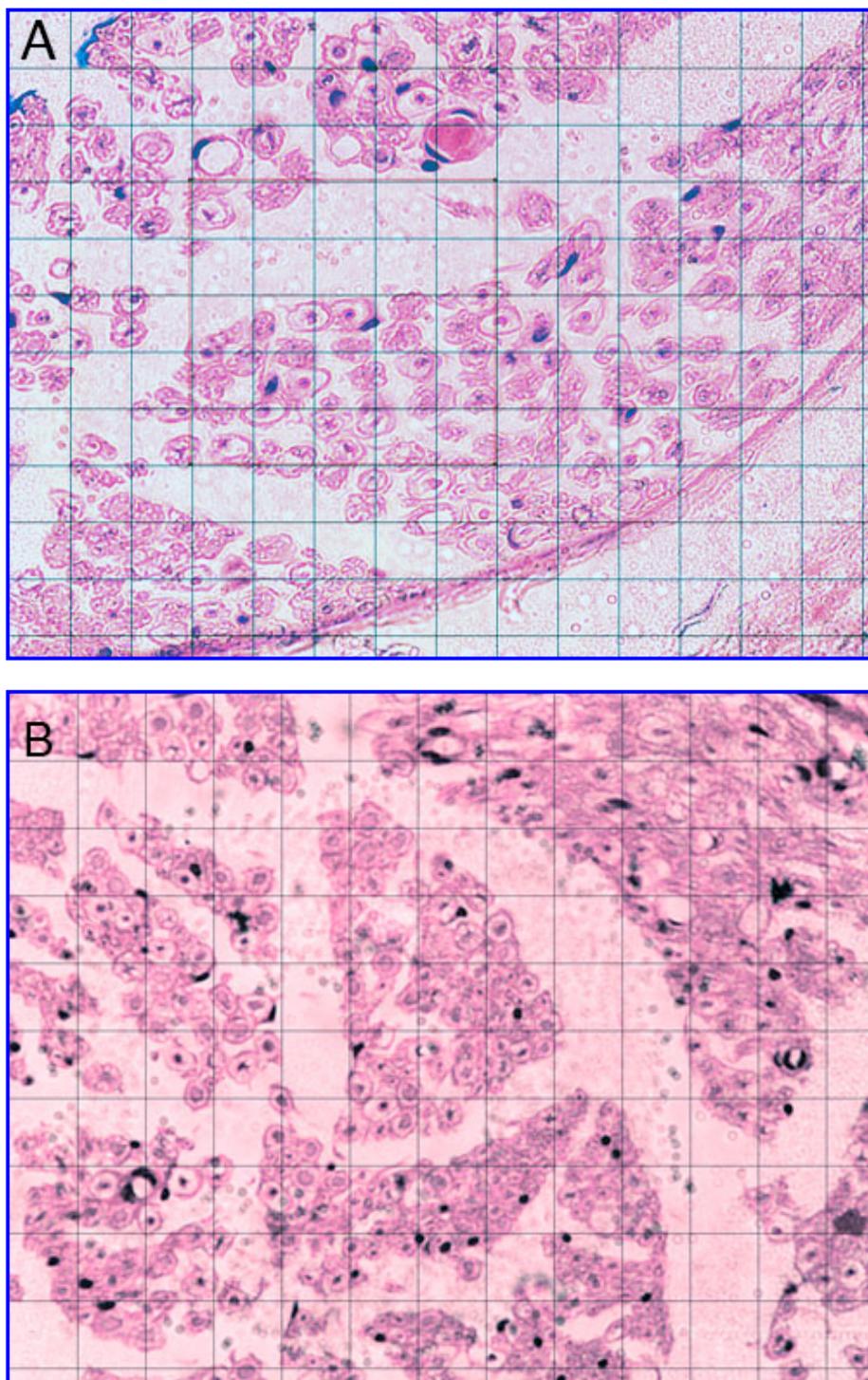


Figura 1. Análise comparativa de cortes histopatológicos do nervo mediano de rato. (A) = controle = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. (B). Animais submetidos à neurotmese e epineurorrafia imediata sobre a infiltração celular no período de 2 dias (coloração por HE, aumento de 40 x).

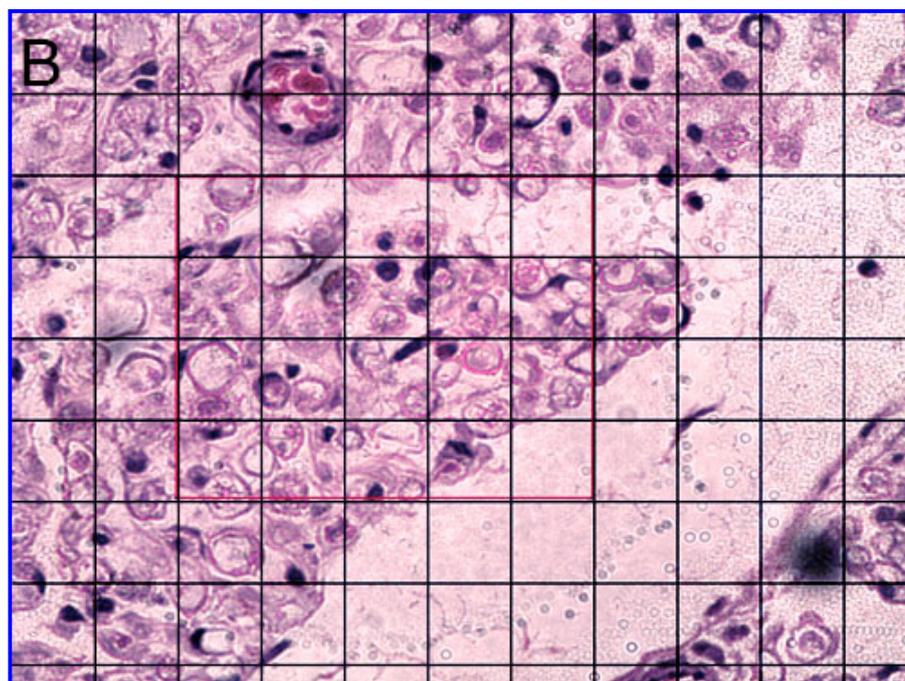
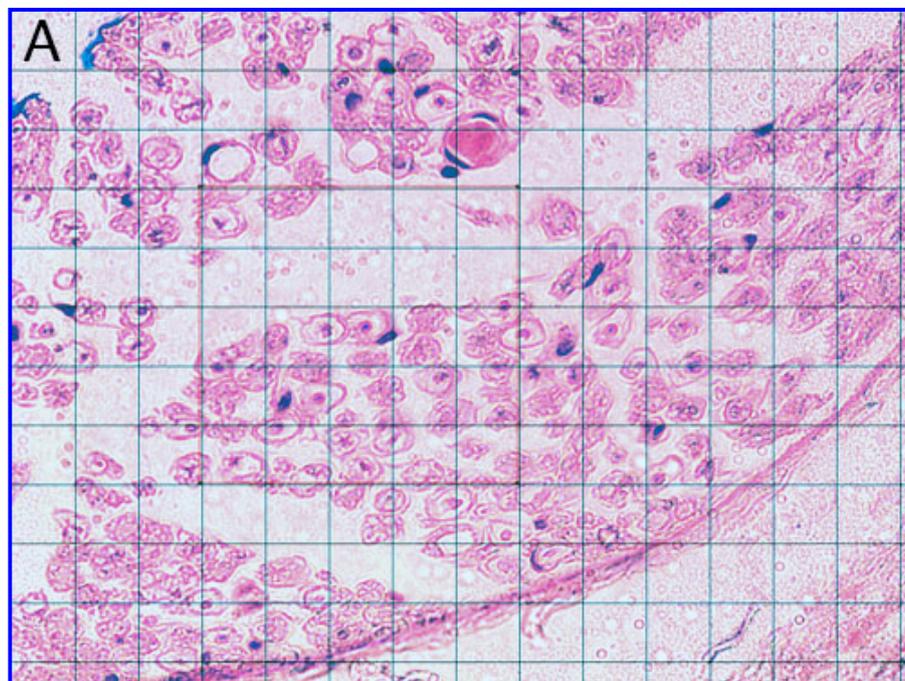


Figura 2. Análise comparativa de cortes histopatológicos do nervo mediano de rato. (A) = controle = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. (B). Animais submetidos à neurotmese e epineurorrafia imediata sobre a infiltração celular no período de 7 dias (coloração por HE, aumento de 40 x).

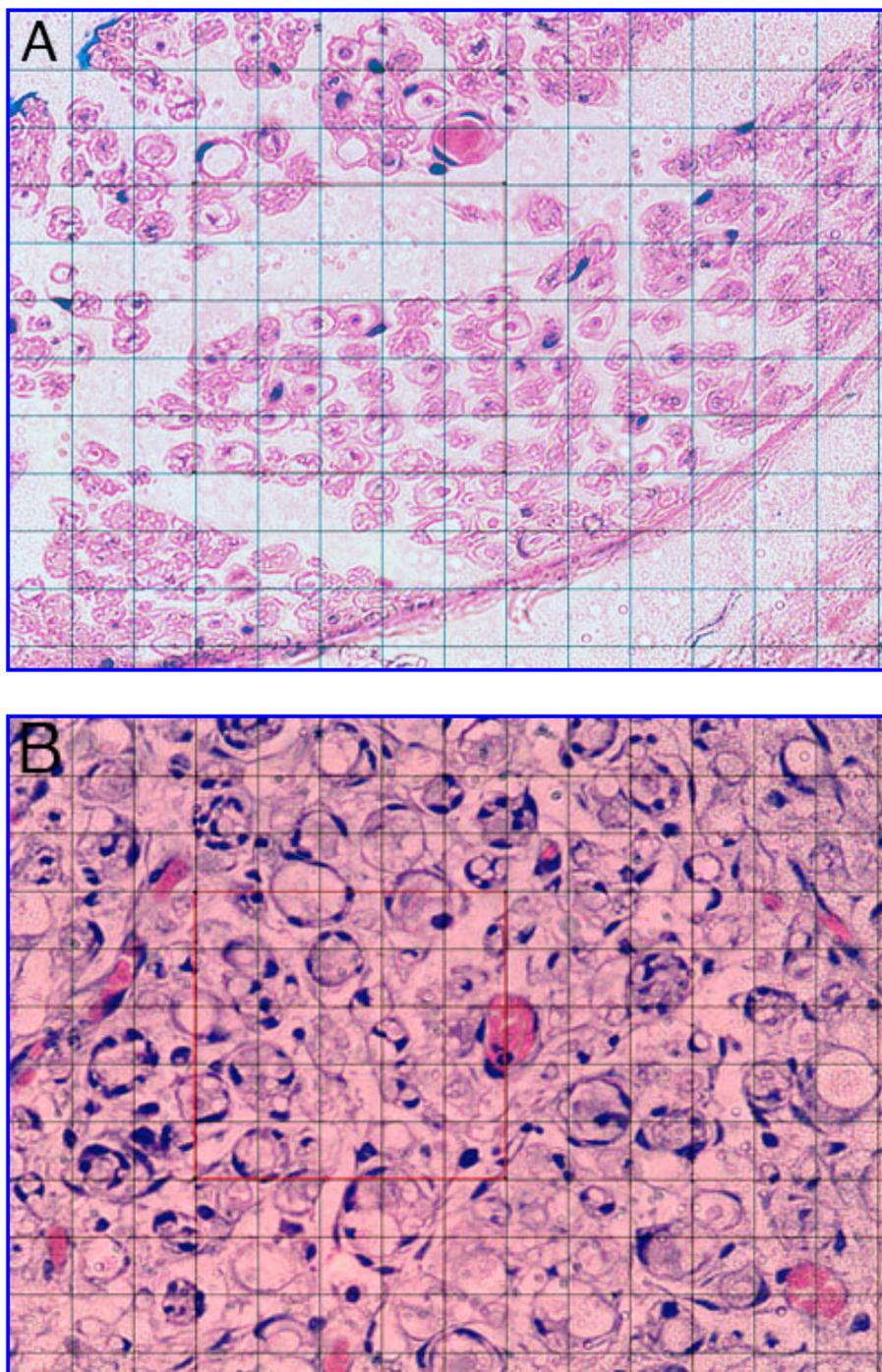


Figura 3. Análise comparativa de cortes histopatológicos do nervo mediano de rato. (A) = controle = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. (B). Animais submetidos à neurotome e epineurorrafia imediata sobre a infiltração celular no período de 14 dias (coloração por HE, aumento de 40X).

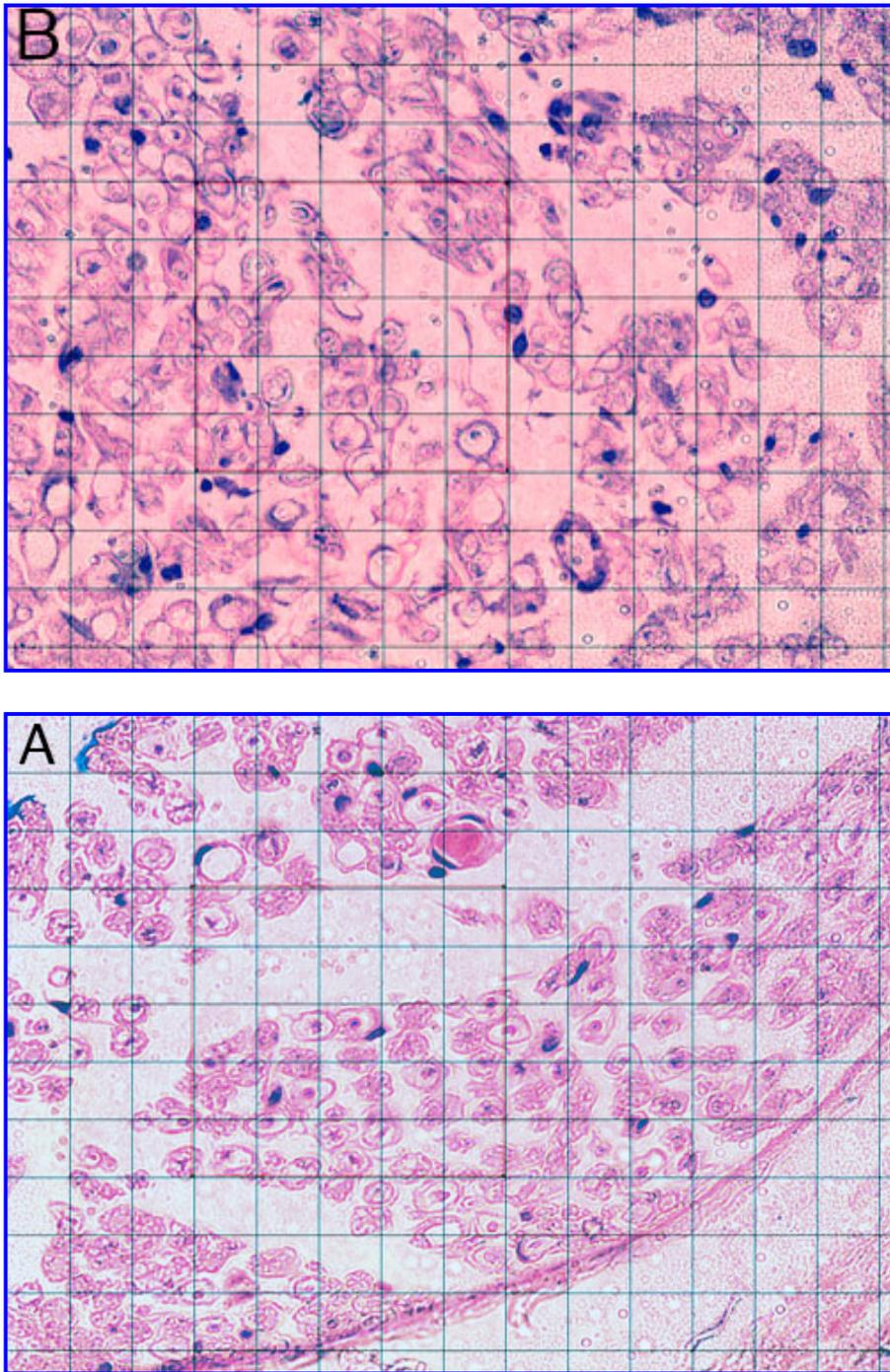


Figura 4. Análise comparativa de cortes histopatológicos do nervo mediano de rato. (A) = controle = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. (B). Animais submetidos à neurotome e epineurorrafia imediata sobre a infiltração celular no período de 30 dias (coloração por HE, aumento de 40X).

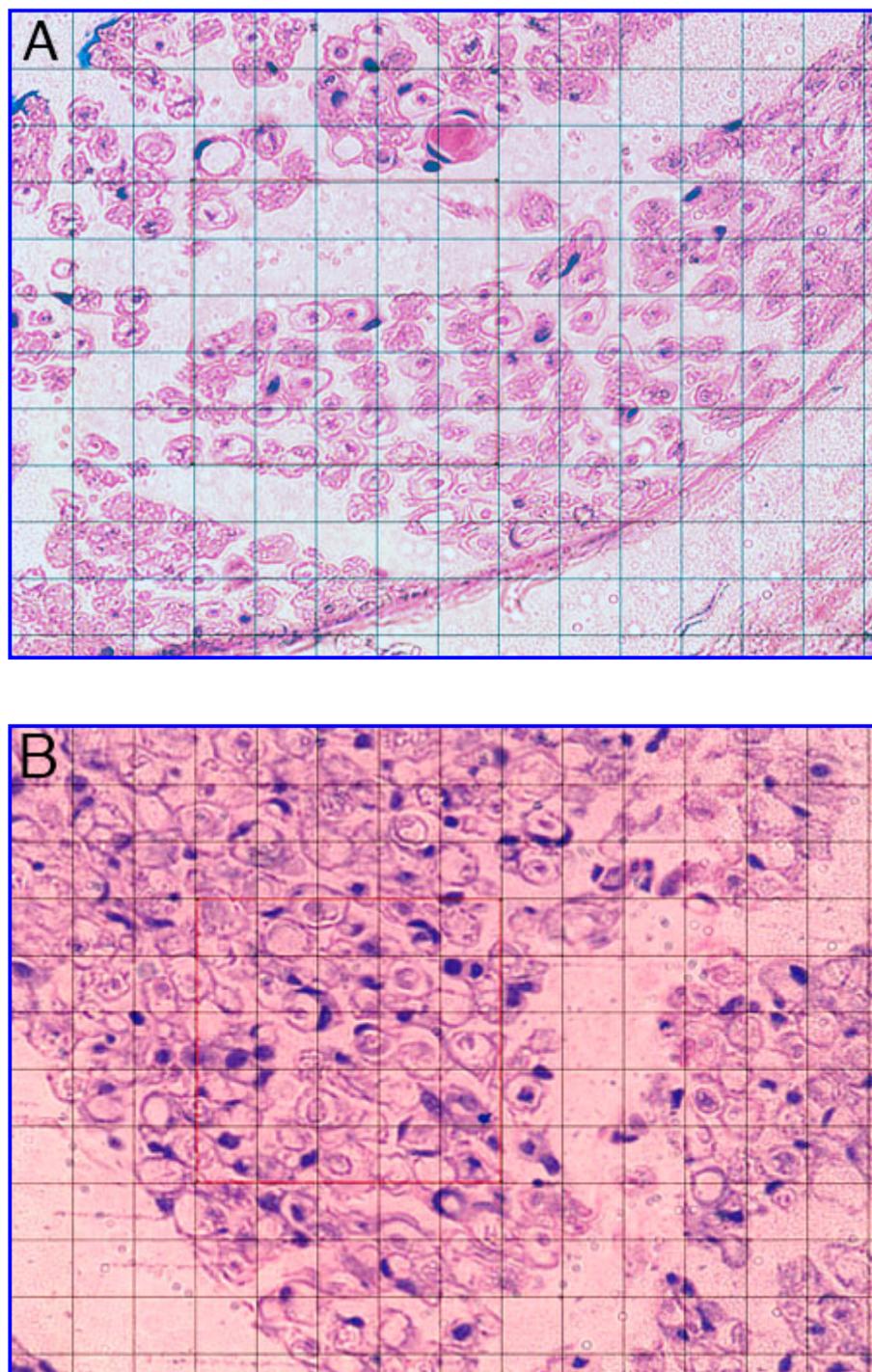


Figura 5. Análise comparativa de cortes histopatológicos do nervo mediano de rato. (A) = controle = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. (B). Animais submetidos à neurotomia e epineurotomia imediata sobre a infiltração celular no período de 60 dias (coloração por HE, aumento de 40X).

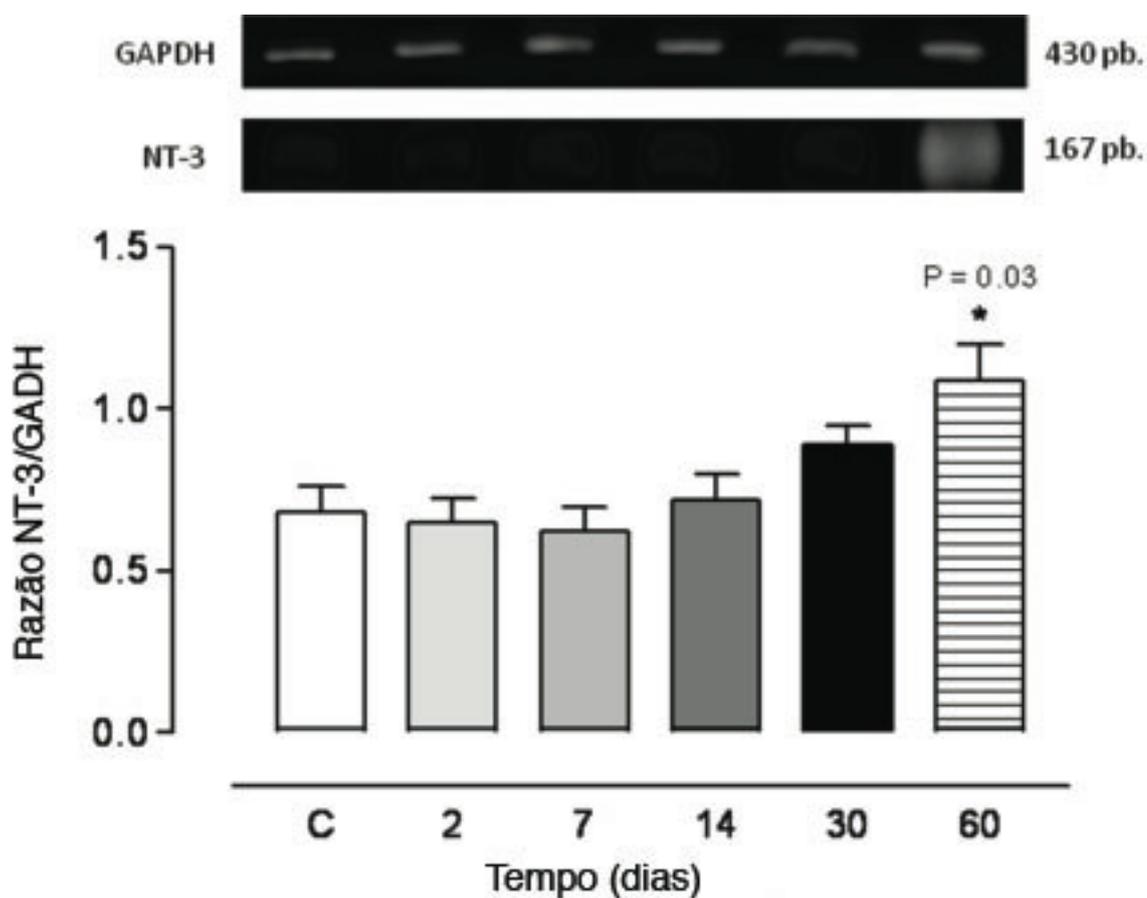


Figura 6. Análise da expressão do RNAm para NT-3 em animais submetidos à neurotmesa e epineurorrafia imediata nos períodos de 2, 7, 14, 30 e 60 dias após. C = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. Os valores representam a razão entre a expressão do RNAm da neurotrofina e o controle GAPDH.

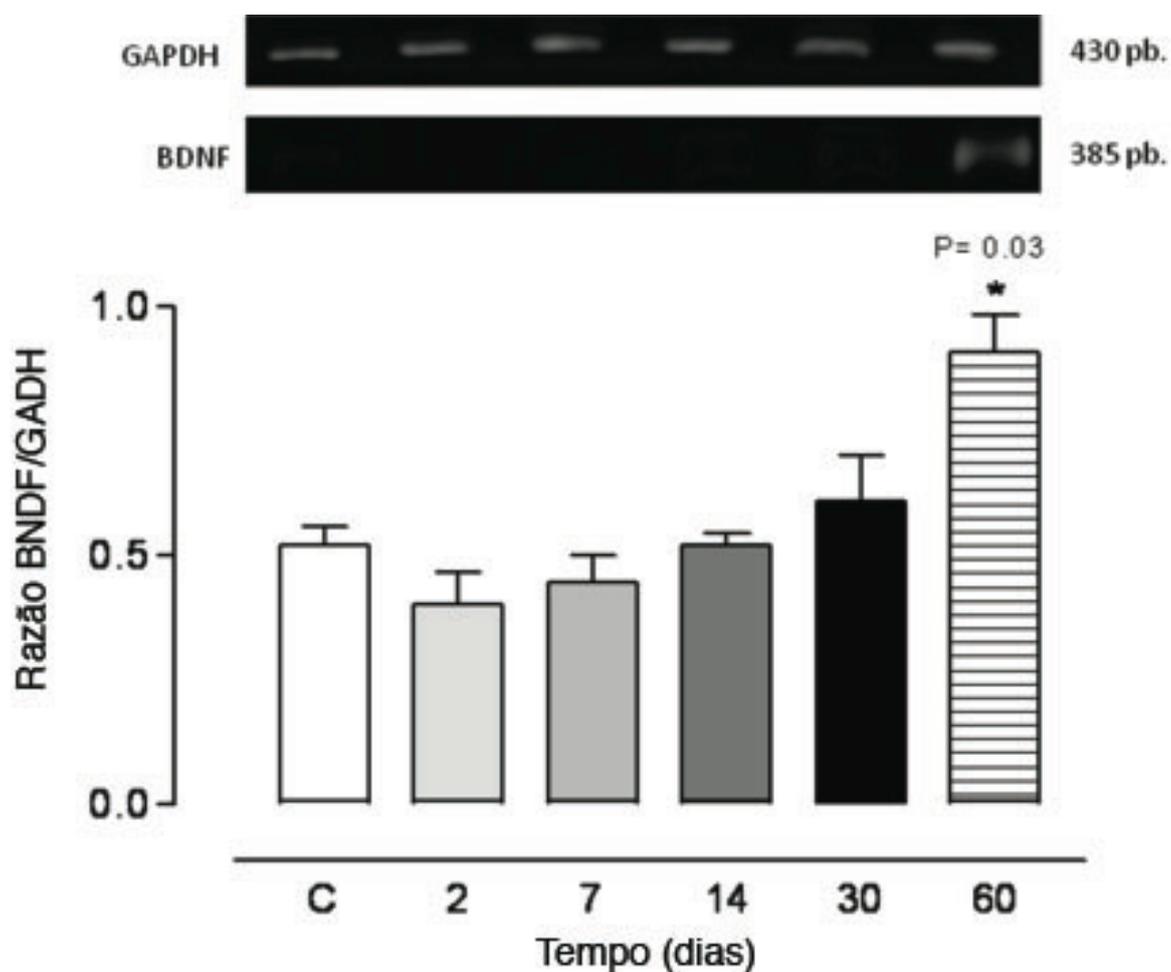


Figura 7. Análise da expressão do RNAm BDNF em animais submetidos à neurotmese e epineurorafia imediata nos períodos de 2, 7, 14, 30 e 60 dias após. C = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. Os valores representam a razão entre a expressão do RNAm da neurotrofina e o controle GAPDH.

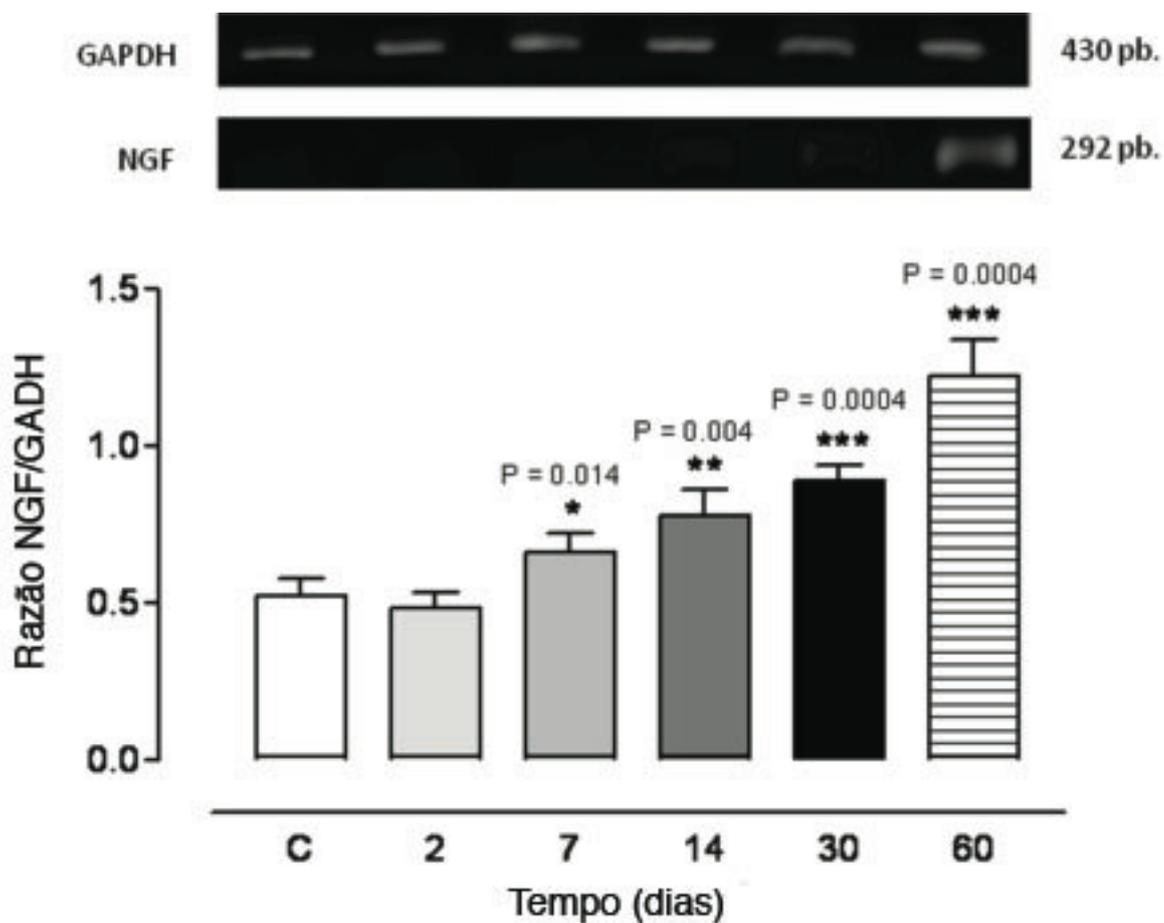


Figura 8. Análise da expressão do RNAm para NGF em animais submetidos à neurotmesa e epineurorafia imediata nos períodos de 2, 7, 14, 30 e 60 dias após. C = Sham = animais submetidos à cirurgia sem lesão do nervo mediano. Os valores representam a razão entre a expressão do RNAm da neurotrofina e o controle GADH.

6. Discussão

As lesões em nervo periférico são lesões graves e muito frequentes no mundo moderno, ocorrendo em acidentes domésticos, nos esportes, nas indústrias e em acidentes automobilísticos; via de regra são incapacitantes e responsáveis pelo afastamento do trabalhador de suas atividades laborativas ^(2, 3, 10, 11). A dificuldade de tratamento ocorre pela necessidade de cirurgiões habilitados ao tratamento dessas lesões, bem como material adequado para a realização de cirurgias, assim como uma equipe de reabilitação com formação especializada para tratar pacientes com lesão em nervo periférico ^(3, 11).

Nas últimas décadas, muito se avançou em relação aos materiais de microcirurgia, melhores microscópios e fios de sutura mais finos como 10-0, 11-0 e 12-0 com agulhas menores e menos traumáticas, ideais para o uso em nervo periférico, possibilitando uma melhor coaptação entre os cotos, com menor dano ao tecido neural. Por outro lado, há fatores que não dependem da habilidade e experiência do cirurgião por serem inerentes ao próprio nervo, como a velocidade de crescimento, capacidade de regeneração, resistência à morte celular espontânea (apoptose), a complexidade do nervo, se é motor, sensitivo ou misto e a distância entre o local da lesão e o órgão alvo a ser atingido pelo axônio regenerado ⁽²⁴⁾. Lesões muito distantes do órgão alvo, maior que 45 cm, por exemplo, com certeza não terão êxito em reinervar um músculo esquelético ⁽²³⁾.

Dentre os procedimentos cirúrgicos de reconstrução de nervo destaca-se o método de sutura imediata, que apresenta melhores resultados que a enxertia nervosa, uma vez que existe menor erro de agulhamento e, desta forma, melhor

regeneração do nervo, além do fato de existir apenas uma linha de sutura a ser vencida pelo brotamento axonal ⁽²⁰⁾.

A participação das neurotrofinas na regeneração dos nervos também é estudada há várias décadas, sendo o NGF o primeiro membro identificado por Levi-Montalcini e col., em 1953. O NGF é a neurotrofina mais estudada e melhor caracterizada até o momento. Em 1982 Barde e col. purificaram o segundo membro da família das neurotrofinas (BDNF) a partir do cérebro de porco ⁽⁴⁵⁾.

Em nossos estudos, durante todo o processo de resposta à lesão do nervo mediano, nós detectamos importante evidência de que as células de Schwann ativam a liberação de neurotrofinas em diferentes períodos de tempo (2-60 dias) após a neurotome e epineurorrafia imediata. Trabalhos realizados por Tomita et al. (2007) também demonstraram que as células de Schwann são importantes fontes de neurotrofinas, uma vez que expressam receptores de baixa afinidade (p75NTR), nos quais estes mediadores são capazes de se ligar, promovendo o efeito biológico que é a regeneração ⁽⁵⁴⁾.

Os resultados obtidos em relação à expressão do RNAm para as neurotrofinas NT-3, NGF e BDNF foram distintos. Para o NT-3, assim como para o BDNF , a expressão do RNAm ocorreu 60 dias após a lesão do nervo mediano. No entanto, para o NGF foi observado precocemente, já no sétimo dia, e manteve-se elevada até 60 dias após a lesão.

Nossos resultados estão em acordo com a literatura, demonstrando a participação das neurotrofinas na regeneração de nervo periférico em estudos experimentais como, por exemplo, aqueles realizados por Sterne, Coulton e colaboradores (1997) que revelaram que o NT-3 promoveu aumento significativo na regeneração axonal de neurônios motores, no modelo de lesão de nervo ciático, em

rato *Lewis*. Os autores mencionaram que este efeito pode ser muito importante nos processos de atrofia muscular após a lesão nervosa ⁽³¹⁾.

Outros estudos "*in vitro*" demonstraram que o NT-3 e o BDNF induziram aumento significativo no número e na extensão da neurite, no número de placas neuromotoras por fibra muscular e na área de fibra muscular inervada ao redor da medula espinhal, no modelo de co-cultura de miotúbulos de músculo esquelético humano em meio de cultura de medula espinhal de ratos⁽⁴³⁾. Trabalhos realizados por Sahenk et al. (2008) demonstraram que animais knockout para NT-3 apresentam uma pior regeneração axonal e que a NT-3 foi essencial para a sobrevivência de células de Schwann, no modelo experimental de neuropatia periférica, em ratos. Neste estudo as células de Schwann não foram capazes de produzir a neurotrofina NT-3 e, desta forma, observou-se diminuição no processo de regeneração axonal associado à mielinização pela diminuição da sobrevivência das células de Schwann. Os resultados deste estudo demonstram a importância na produção de NT-3 pelas células de Schwann, principalmente nas neuropatias desmielinizantes ⁽⁵⁵⁾.

O aumento da expressão de RNAm para a NT-3 em nosso estudo ocorreu tardiamente (60 dias após). Tais resultados são corroborados por Ockel et al. (1996) que demonstraram em experimentos *in vitro* que a NT-3 administrada precocemente em células embrionárias de galinha promoveu inicialmente uma diminuição no número de neurônios sensoriais periféricos ⁽³³⁾. Foi observado por Funakoshi e col. (1993) que a NT-3 diminuiu sua expressão logo após a neurotome de nervo ciático, retornando aos níveis do grupo controle duas semanas após a neurotome.

Os resultados de nossos estudos em relação ao BDNF , todavia, demonstraram que esta neurotrofina apresentou um comportamento semelhante àquele observado pela NT-3, não havendo alteração na primeira e segunda semanas, em comparação ao grupo controle, e somente apresentando um aumento em sua expressão com 60 dias da neurotrose, portanto, um aumento tardio na expressão do RNAm para esta neurotrofina. Os nossos resultados estão de acordo com a literatura. Oppenheim e col. (1992) publicaram um estudo demonstrando que o BDNF foi capaz de evitar a apoptose de neurônios motores em embriões de aves ⁽⁵⁶⁾. No mesmo ano Sendtner e col. demonstraram que o BDNF protegeu os neurônios motores da apoptose e ainda media a regeneração de axônios motores no nervo periférico após lesão axonal ^(45, 50, 56). Zhao et al. (2004) observaram aumento significativo do RNAm para BDNF 1 a 2 semanas após a transecção de nervo, em modelo experimental de lesão de nervo ciático ⁽⁵⁷⁾. Nesse contexto, trabalhos também têm demonstrado que o aumento de RNAm para BDNF ocorreu 2 semanas após transecção de nervo ciático.

Em relação ao NGF, observamos que a expressão do RNAm para esta neurotrofina ocorreu precocemente (7 dias) e manteve-se elevada até 60 dias após o procedimento cirúrgico. Este foi o principal resultado encontrado em nosso estudo. Além disso, o fato de observarmos a expressão do RNAm para esta neurotrofina a partir de 7 dias pode ser devido ao fato que a regeneração do nervo sensorial está relacionada diretamente com a produção de NGF ⁽⁵⁸⁾.

É importante salientar que as diferenças encontradas na expressão do RNAm para a NT-3, BDNF e NGF podem ser explicadas uma vez que trabalhos têm revelado que a expressão de RNAm para diferentes neurotrofinas são reguladas de forma diferente em lesão de nervo periférico ⁽⁵⁹⁾.

Além disso, não podemos descartar que a sensibilidade da técnica utilizada (RT-PCR) influencia nos resultados obtidos. Técnicas mais sensíveis como, por exemplo, Northern blot, testes de hibridização *in situ* possuem poder de sensibilidade maior que a utilizada neste estudo ⁽⁵⁹⁾.

Conclusão: Os resultados do presente trabalho demonstraram, no modelo experimental estudado, que as neurotrofinas NT-3, NGF e BDNF possuem importante papel na regeneração do nervo mediano em ratos, sendo que o NGF é a primeira neurotrofina a ter sua expressão aumentada, tendo as células de Schwann, possivelmente, como principais responsáveis por este aumento.

7. Referências

1. Allet mdA, Leite VM, albertoni WM, Fernandes FaS, Faloppa F. Graft versus graft covered with vein conduits in nerve repairs. *Rev Bras ortop.* 2003;38:193-200.
2. Eser F, Aktekin LA, Bodur H, Atan C. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol India.* 2009 Jul-Aug;57(4):434-7.
3. Scholz T, Krichevsky A, Sumarto A, Jaffurs D, Wirth GA, Paydar K, et al. Peripheral nerve injuries: an international survey of current treatments and future perspectives. *J Reconstr Microsurg.* 2009 Jul;25(6):339-44.
4. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008 Sep;119(9):1951-65.
5. Bowden RE. The factors influencing functional recovery of peripheral nerve injuries in man. *Ann R Coll Surg Engl.* 1951 May;8(5):366-76.
6. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Peripheral nervous system diseases.* 2004;01(02):177-85.
7. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil.* 2008 May;87(5):381-5.
8. IJkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials.* 2004 Apr;25(9):1583-92.
9. Jin K, Lombardi DA, Courtney TK, Sorock GS, Li M, Pan R, et al. Patterns of work-related traumatic hand injury among hospitalised workers in the People's Republic of China. *Inj Prev.* 2010 Feb;16(1):42-9.
10. Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, von Holst H. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology.* 2009;32(3):217-28.

11. Batista KT, De Almeida CEF. Epidemiology of the traumatic injuries of the upper limbs peripheral nerves. *Rev Soc Bras Cir Plást.* 2008;23(1):26-30.
12. Bruyns CN, Jaquet JB, Schreuders TA, Kalmijn S, Kuypers PD, Hovius SE. Predictors for return to work in patients with median and ulnar nerve injuries. *J Hand Surg [Am].* 2003 Jan;28(1):28-34.
13. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996 Jun;25(2):101-21.
14. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000 Jul-Aug;8(4):243-52.
15. Waldran M. Peripheral Nerve Injuries. *Trauma.* [Review article]. 2003;5(2):79-97.
16. Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol.* 1943 Sep 30;102(2):191-215.
17. Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2000 Mar;29(3):167-73.
18. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 2002 Mar;7(1):13-27.
19. Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 1850 21 de fevereiro 1850;140:7.
20. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000 May;25(3):391-414.
21. Rosen B, Lundborg G. The long term recovery curve in adults after median or ulnar nerve repair: a reference interval. *J Hand Surg [Br].* 2001 Jun;26(3):196-200.

22. Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: Early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol*. 2009 Jun 6.
23. Humphreys DB, Mackinnon SE. Nerve Transfers. *Plast Reconstr Surg*. 2002 2002/Aug;9(3):89-99.
24. Hoke A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol*. 2006 Aug;2(8):448-54.
25. Witzel C, Rohde C, Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol*. 2005 May 9;485(3):183-90.
26. Bertelli JA, Mira JC, Gilbert A, Michot GA, Legagneux J. Anatomical basis of rat brachial plexus reconstruction. *Surg Radiol Anat*. 1992;14(1):85-6.
27. Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 1989 jun;2(6):1525-34.
28. Bertollini L, Ciotti MT, Cherubini E, Cattaneo A. Neurotrophin-3 promotes the survival of oligodendrocyte precursors in embryonic hippocampal cultures under chemically defined conditions. *Brain Res*. 1997 Jan 23;746(1-2):19-24.
29. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987 Sep 4;237(4819):1154-62.
30. Lindsay RM. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996 Mar 29;351(1338):365-73.
31. Sterne GD, Coulton GR, Brown RA, Green CJ, Terenghi G. Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains 2b. *J Cell Biol*. 1997 Nov 3;139(3):709-15.
32. Arevalo JC, Chao MV. Axonal growth: where neurotrophins meet Wnts. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Apr;17(2):112-5.

33. Ockel M, Lewin GR, Barde YA. In vivo effects of neurotrophin-3 during sensory neurogenesis. *Development*. 1996 Jan;122(1):301-7.
34. Rosenberg SS, Ng BK, Chan JR. The quest for remyelination: a new role for neurotrophins and their receptors. *Brain Pathol*. 2006 Oct;16(4):288-94.
35. Ulfhake B, Bergman E, Edstrom E, Fundin BT, Johnson H, Kullberg S, et al. Regulation of neurotrophin signaling in aging sensory and motoneurons: dissipation of target support? *Mol Neurobiol*. 2000 Jun;21(3):109-35.
36. Xiao J, Kilpatrick TJ, Murray SS. The role of neurotrophins in the regulation of myelin development. *Neurosignals*. 2009;17(4):265-76.
37. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999 Jan;194 (Pt 1):1-14.
38. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:289-317.
39. Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res*. 2007 May;4(2):143-51.
40. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol*. 2003 Jun;27(3):277-324.
41. Radtke C, Vogt PM. Peripheral nerve regeneration: a current perspective. *Eplasty*. 2009;9:e47.
42. Pagadala PC, Dvorak LA, Neet KE. Construction of a mutated pro-nerve growth factor resistant to degradation and suitable for biophysical and cellular utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 21;103(47):17939-43.

43. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J Neurol Sci.* 1996 Mar;136(1-2):17-23.
44. Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg Br.* 1998 Aug;23(4):433-7.
45. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53.
46. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004 Sep;22(3):123-31.
47. Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, Nakayama C, Noguchi H. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp Neurol.* 1997 Apr;144(2):273-86.
48. Yan Q, Matheson C, Lopez OT, Miller JA. The biological responses of axotomized adult motoneurons to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 1994 Sep;14(9):5281-91.
49. Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, et al. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature.* 1993 May 20;363(6426):266-70.
50. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature.* 1992 Dec 24-31;360(6406):757-9.
51. Katoh-Semba R, Kaisho Y, Shintani A, Nagahama M, Kato K. Tissue distribution and immunocytochemical localization of neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats. *J Neurochem.* 1996 Jan;66(1):330-7.
52. Lossos IS, Izbicki G, Or R, Goldstein RH, Breuer R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. *Life Sci.* 2000 Oct 27;67(23):2873-81.

53. Motohiro A, Furukawa T, Yasumoto K, Inokuchi K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. *Eur Surg Res.* 1986;18(1):50-7.
54. Tomita K, Kubo T, Matsuda K, Fujiwara T, Yano K, Winograd JM, et al. The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia.* 2007 Aug 15;55(11):1199-208.
55. Sahenk Z, Oblinger J, Edwards C. Neurotrophin-3 deficient Schwann cells impair nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2008 Aug;212(2):552-6.
56. Oppenheim RW, Yin QW, Prevetie D, Yan Q. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature.* 1992 Dec 24-31;360(6406):755-7.
57. Zhao C, Veltri K, Li S, Bain JR, Fahnstock M. NGF, BDNF, NT-3, and GDNF mRNA expression in rat skeletal muscle following denervation and sensory protection. *J Neurotrauma.* 2004 Oct;21(10):1468-78.
58. Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol.* 1987 Jun;104(6):1623-31.
59. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1993 Oct;123(2):455-65.

ANEXO – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEUA

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00239

Título

Avaliação da regeneração do nervo mediano, em lesões agudas em ratos, por meio de testes de avaliação funcional motora e sensitiva e fatores de crescimento do nervo.

Data de Entrada

03/07/2008

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

03/10/2008

Considerações

Ofício nº 133/CEUA/PRPe/2008

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Silvia Frode - Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 252 ratos (*Rattus norvegicus*).

- Processo cadastrado sob o número: 23080.038265/2008-07.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo).

Data 08/01/2011

Parecer(es):

**Prof. Assóc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**



[Parecer02PP00239.pdf](#)