



OSVALDO MENDES DE OLIVEIRA FILHO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E HISTOMORFOMÉTRICA DA
LESÃO DE NERVO MEDIANO EM RATOS WISTAR
TRATADOS COM GM1**

***FUNCTIONAL AND HISTOMORPHOMETRIC
EVALUATION OF MEDIAN NERVE LESION IN WISTAR
RATS TREATED WITH GM1***

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

OSVALDO MENDES DE OLIVEIRA FILHO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E HISTOMORFOMÉTRICA DA
LESÃO DE NERVO MEDIANO EM RATOS WISTAR
TRATADOS COM GM1**

ORIENTADOR: PROF. DR. WILLIAM DIAS BELANGERO

***FUNCTIONAL AND HISTOMORPHOMETRIC
EVALUATION OF MEDIAN NERVE LESION IN WISTAR
RATS TREATED WITH GM1***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de concentração Medicina Interna.

Doctoral thesis presented to the Posgraduate Program of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, for obtainment of the Ph.D degree in Medical Sciences, specialization in Internal Medicine.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO OSVALDO MENDES DE OLIVEIRA FILHO,
ORIENTADO PELO PROF. DR. WILLIAM DIAS BELANGERO.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS - SP
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

OL4a Oliveira Filho, Osvaldo Mendes de, 1964-
Avaliação funcional e histomorfométrica da lesão de nervo mediano em ratos wistar tratados com GM1 / Osvaldo Mendes de Oliveira Filho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: William Dias Belangero.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nervo mediano. 2. Ratos Wistar. 3. Gangliosídeo G(M1). 4. Traumatismos dos nervos periféricos. 5. Regeneração nervosa. I. Belangero, William Dias, 1952-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional and histomorphometric evaluation of median nerve lesion in wistar rats treated with GM1

Palavras-chave em inglês:

Median nerve

Rats, Wistar

G(M1) ganglioside

Peripheral nerve injuries

Nerve regeneration

Área de concentração: Medicina Interna

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

William Dias Belangero [Orientador]

Nilton Mazzer

José Carlos Silva Camargo Filho

Ana Amélia Rodrigues

Marcondes Cavalcante França Júnior

Data de defesa: 18-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

OSVALDO MENDES OLIVEIRA FILHO

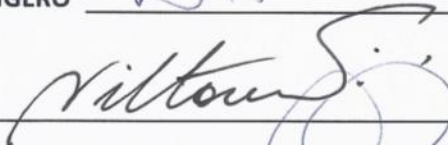
Orientador (a) PROF(A). DR(A). WILLIAM DIAS BELANGERO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). WILLIAM DIAS BELANGERO



2. PROF(A). DR(A). NILTON MAZZER



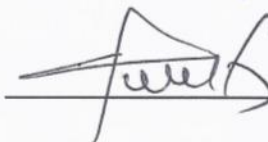
3. PROF(A). DR(A). JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO



4. PROF(A). DR(A). ANA AMÉLIA RODRIGUES



5. PROF(A). DR(A). MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 de julho de 2014

Dedico este trabalho...

aos meus filhos

Matheus, Gabriel, Samuel e Júlia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus melhores exemplos de vida, pelo carinho e amor, sempre.

Ao Prof. Dr. William Dias Belangero que, mais uma vez, aceitou ser meu orientador, ajudando-me na execução deste trabalho e nesta importante etapa da minha vida acadêmica.

À Profa. Dra. Heloisa Blotta que, com imensa competência, coordenou este Dinter.

Ao Prof. Dr. Viriato Campelo pelo seu grande entusiasmo e dedicação na condução do Dinter/UFPI.

Aos Professores da UNICAMP que se dispuseram a vir aqui ministrar as aulas com grande brilhantismo.

Ao Dr. Gustavo Bispo pela grande ajuda na fase de execução do trabalho.

Ao Dr. César Oliveira pela sua ajuda fundamental na avaliação estatística.

Aos primos e amigos Dr. Sílvio Mendes pelo apoio e à Dra. Maria Inês Mendes pela tradução dos trabalhos.

Ao meu irmão Moisés pela ajuda na informática.

Aos meus mestres e amigos da Cirurgia da Mão, Prof. Dr. Cláudio Barbieri e Nilton Mazzer minha eterna gratidão.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) por ter gentilmente cedido o GM1 para esta pesquisa.

Ao Prof. Airton Conde Júnior por ter cedido o espaço no seu Departamento para a realização dos procedimentos cirúrgicos.

À secretária Marcinha, da UNICAMP, que, com sua paciência, educação e competência me ajudou em todos os momentos a resolver as questões institucionais.

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi comparar através da avaliação funcional pelo *grasping test* e análise histomorfométrica o tratamento da lesão do nervo mediano em ratos de linhagem Wistar através da microneurorrafia tradicional com a microneurorrafia associada à administração do monossialogangliosídeo (GM1) e avaliar especificamente se o GM1 melhora a regeneração axonal do nervo mediano e a função da musculatura por ele inervado. **Material e Método:** Foram empregados 32 ratos machos de linhagem Wistar. Destes, foram selecionados aleatoriamente 10 animais, grupo 0, para obtenção da força de preensão média em ratos normais, antes do procedimento cirúrgico. Esses animais foram reintegrados aos grupos. Foram criados o grupo I, com 10 animais, em que foi feita ressecção de 5 mm do nervo mediano do membro anterior direito e não foi submetido a nenhum tratamento. Nos outros grupos foi produzida uma lesão transversa do nervo mediano proximalmente ao epicôndilo medial criando-se os grupos II, tratados com microneurorrafia epineural externa e o grupo III, tratado com a microneurorrafia epineural externa associada à administração intraperitoneal de GM1. A cirurgia foi realizada imediatamente após a lesão e a técnica utilizada foi a sutura término-terminal. Foi realizada análise funcional semanal durante seis semanas através do teste de preensão da musculatura flexora dos dedos, que é específico para avaliar a ação do nervo mediano. Após esse período, os animais foram submetidos a eutanásia. As porções proximal e distal dos nervos foram coradas com azul de toluidina a 1% e realizada a análise histológica. Pela análise morfométrica obteve-se o número e diâmetro dos axônios nos cotos proximais e distais, criando-se uma nova fórmula com inclusão tanto do número como do diâmetro dos axônios para a avaliação da regeneração nervosa. **Resultados:** Os valores médios da força de preensão exercida pelos ratos do grupo 0 foram comparados aos animais dos grupos II e III através da análise de variância (ANOVA one way). Para a comparação dos valores médios da força realizada pelos ratos do grupo II e III foi feito o teste de Wilcoxon. Do ponto de

vista funcional, o grupo III imprimiu uma maior força média com erro menor que 5% e realizou o teste de preensão mais precocemente. O grupo tratado com o GM1 apresentou um número 28% maior de axônios regenerados no segmento distal, com padrão histológico mais organizado e homogêneo e uma diferença significativa no diâmetro médio dos mesmos. **Conclusão:** Pode-se afirmar com erro menor que 5% que os grupos II (microneurorrafia) e III (microneurorrafia e GM1) apresentaram diferenças em relação à recuperação funcional, tendo o grupo III reagido melhor ao teste de preensão. O padrão histológico do grupo III apresentou maior grau de mielinização, tendo-se observado maior diâmetro médio nos axônios dos cotos distais ($p=0,0056$). Há um significativo indicio ($p=0,0536$) de que a utilização do GM1 nas cirurgias dos nervos periféricos melhora o padrão de regeneração axonal.

Palavras Chaves: Nervo mediano; Ratos Wistar; Gangliosídeo G(M1); Traumatismos dos nervos periféricos; Regeneração nervosa.

ABSTRACT

OBJECTIVES: The objective of this study was to compare the treatment of nerve median injuries in Wistar rats submitted to traditional microneurorrhaphy with the treatment that combined microneurorrhaphy and monossialoganglioside (GM1) administration while also specifically evaluating if GM1 promotes an increase in median nerve axonal regeneration, thus improving the function of the muscles in its territory of innervation. This comparison was done through functional evaluation measured by the grasping test and histomorphometric analysis. **MATERIAL AND METHODS:** Experiments were performed in thirty-two Wistar rats. Among them, 10 were randomly selected (group 0) to determine the average grasping strength in normal rats. These animals were then reunited with the others. There were three groups: group I (control group), submitted to a 5 mm lesion in the median nerve of the right forelimb and no treatment. Group II, submitted to lesion of the median nerve proximal to the medial epicondyle, treated with external epineural microneurorrhaphy, and group III, submitted to the same lesion and treated with external epineural microneurorrhaphy associated with intraperitoneal administration of GM1. Surgery was undertaken immediately after the damage to the nerve and end-to-end suture was used. Functional analysis through the grasping test of the flexor muscles of the fingers was assessed weekly; this test is specific to evaluate the action of the median nerve. In this experimental model, the animal is lifted by the tail and is stimulated to grasp a bar with its paw; the bar is located on the top of a conventional digital balance. While grasping the bar with its paw, the rat continued to be held by the tail until it releases the bar and the number on the scale is registered. After the functional evaluation the animals were euthanized. The proximal and distal portions of the nerves were colored with 1% toluidine blue dye. After the histologic exam, morphometric analysis was done by counting the number and diameter of the axons in the proximal and distal stumps. A new formula was designed including the number and diameter of the axons to evaluate

nerve regeneration. **RESULTS:** The mean values of grasping strength exerted by rats in group I (control), were compared with group II (only microneurorrhaphy) and group III (microneurorrhaphy and GM1) through the analysis of variance (ANOVA one way). To compare the mean values of the strength sustained by rats in groups II and III, the Wilcoxon test was applied. From the functional perspective, the group that received GM1 performed the grasping test earlier, exerting a greater mean strength (error inferior to 5%). The microscopic analysis demonstrated that the group treated with GM1 showed a higher number of regenerated axons better organized and homogenous. And also that this group had a slightly thicker myelin sheath. There was a significant difference in the mean diameter of the axons of the distal segment and a number 28% higher of regenerated axons in the group treated with GM1. **CONCLUSIONS:** The authors can state with error inferior to 5% that the groups II and III showed differences in relation to functional recovery, group III performing better when submitted to the grasping test. Histological pattern of the group that received GM1 showed a higher degree of myelination. It was observed a greater mean diameter in the axons of distal stumps ($p=0,0056$). There is a significant indication ($p=0,0536$) that the use of GM1 in peripheral nerve surgery improves the pattern of axonal regeneration.

Key Words: Median nerve; Rats, Wistar; G(M1) ganglioside; Peripheral nerve injuries; Nerve regeneration.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

cAMP	- monofosfato cíclico de adenosina
DMdist	- diâmetro médio distal
DMprox	- diâmetro médio proximal
Fp	- Força média de preensão
GM1	- Monossialogangliosídeo
G-PCR	- G protein coupled receptor
IRA	- Índice de Regeneração Axonal
IRA2	- Índice de Regeneração Axonal 2
NAdist	- número de axônios distais
NAprox	- número de axônios proximais
NGF	- Fator de Crescimento de Nervos
MP	- Metilprednisolona
TrK	- Tirosinoquinase

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. ARTIGOS	41
4. DISCUSSÃO	95
5. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	123

1. INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos são extensões do sistema nervoso central e são responsáveis pelas funções sensitivas e motoras das extremidades. Traumas podem provocar lesões variadas nos nervos e interromper a transmissão dos impulsos nervosos. Essas lesões podem ser provocadas por esmagamento, compressão, trauma contuso, ou por objetos pérfuro-cortantes (CAMPBELL, 2008; MATTAR JÚNIOR, 2008). Embora sejam causadas, na sua maioria, por acidentes envolvendo veículos motores, há um grande número provocado por atos de violência, especialmente feridas causadas por armas de fogo. A incidência de lesão dos nervos periféricos apesar de baixa, 1,5 a 2,8%, está associada com elevada morbidade, principalmente quando o tratamento é realizado tardiamente (YEGYANTS et al., 2010). Os membros superiores são acometidos em 73,5% e o nervo ulnar é o mais lesado (CAMPBELL, 2009). Dessa forma, essas lesões constituem um problema médico e de saúde pública grave e crescente, acometendo principalmente adultos jovens com idade entre 18 e 35 anos (GUTIERREZ; ENGLAND, 2014).

Histórico

Herophilus da Alexandria (325-225 a.C.), o maior anatomista da antiguidade, após dissecções secretas em cadáveres humanos, foi quem primeiro distinguiu nervos de tendões e Galeno (131-201 d.C.) foi o pioneiro nos estudos sobre os efeitos das transecções nervosas. Mas foi no século XIX que aconteceram grandes contribuições para a melhor compreensão dos nervos periféricos. Theodor Schwann (1810-1882) descreveu a célula que hoje leva seu nome, tão importante para o funcionamento e regeneração nervosa, a célula de Schwann. Augustus Waller (1816-1870), seccionando os nervos glossofaríngeo e hipoglosso de sapos, descreveu há 163 anos as alterações degenerativas que acontecem no segmento do nervo distal à lesão, conhecida hoje como Degeneração Walleriana. Santiago

Ramon y Cajal (1853-1934), considerado o pai da moderna neurociência, foi pioneiro na investigação da estrutura microscópica do nervo, estabelecendo que a regeneração axônica dos animais estudados era cerca de 2-3 mm por dia.

Após as guerras civis europeias e, principalmente, após a Segunda Guerra Mundial houve também grandes avanços no conhecimento e tratamento das lesões dos nervos periféricos. Foi nessa época que Herbert Seddon (1903-1977) preconizou o uso do enxerto de nervo nas lesões com perda de tecido nervoso, além disso, classificou as lesões dos nervos em três graus e para cada categoria de lesão estabeleceu prognóstico e tratamento. A grande experiência do pós-guerra transformou Sidney Sunderland (1910-1993) numa grande autoridade no assunto e, além da sua classificação, contribuiu com uma meticulosa descrição da topografia interna do nervo, identificando que os funículos sensitivos e motores variavam suas relações nos diferentes níveis do nervo. Essas observações foram relevantes após 1960 com o advento do reparo microcirúrgico interfunicular, que possibilitaram um melhor resultado do tratamento (SEDDON; MEDAWAR; SMITH, 1943)(GOHRITZ, ANDREAS; LEE DELLON, 2013).

O nervo periférico

A unidade funcional do nervo periférico é a célula denominada neurônio, que possui um corpo celular e sua expansão, que é a fibra nervosa, formada pelo axônio e pelo endoneuro que o envolve. O corpo celular localiza-se na medula ou no gânglio espinhal e é constituído por delgadas expansões chamadas dendritos, a substância de Nills e o núcleo com o nucléolo. Existem neurônios mielinizados, cuja camada de mielina é produzida pelas células de Schwann e neurônios não mielinizados. Nódulos de Ranvier são estreitamentos onde acontecem trocas iônicas na condução do impulso nervoso. Os axônios cobertos pela bainha de mielina apresentam camadas concêntricas da membrana plasmática das células de

Schwann, sendo interrompidas apenas pelos nódulos de Ranvier (JOHNSON; ZOUBOS; SOUCACOS, 2005). As fibras amielínicas são envolvidas também pelas células de Schwann, mas não formam a bainha de mielina (GEUNA et al., 2009).

O nervo periférico é formado por um ou vários feixes de fibras nervosas, sendo as fibras motoras originadas da coluna anterior da medula e as sensitivas da coluna posterior e gânglio posterior. São cordões esbranquiçados e possuem como componentes os axônios, células de Schwann e tecido conjuntivo. A bainha de mielina funciona como isolante elétrico, melhorando a rapidez da condução do impulso nervoso. As células de Schwann participam do processo regeneração axonal, servindo de via de crescimento para as fibras nervosas. Sobre a bainha de mielina, o axônio está envolvido por uma bainha protetora de tecido conjuntivo frouxo chamada endoneuro, que reveste cada axônio individualmente, tendo a função de suporte e proteção. Os fascículos nervosos são agrupamentos de várias fibras nervosas de tamanhos variados e são envolvidos por um tecido conjuntivo denso chamado perineuro que contém fibroblastos, macrófagos, mastócitos, linfócitos e adipócitos. Esta bainha, o perineuro, oferece proteção mecânica e serve como barreira à difusão perivascular e também a macromoléculas danosas às fibras nervosas (FREDERICKS, 1996). Há ainda um tecido conjuntivo frouxo que envolve o nervo em toda sua extensão, protegendo-o de traumas externos, chamado epineuro.

A irrigação dos nervos periféricos se dá através de ramos de artérias vizinhas e vasos epineurais, estes chamados de vasa nervorum, (sistema de irrigação extrínseca) que penetram no tronco nervoso e formam internamente verdadeiras redes arteriais que percorrem as três camadas do nervo (sistema de irrigação intrínseca), conferindo-lhe a capacidade de longos períodos de isquemia (GEUNA, STEFANO; HAASTERT-TALINI, KIRSTEN; NAVARRO, 2013).

Classificação das Lesões dos Nervos Periféricos

As lesões dos nervos periféricos foram classificadas por Seddon em 1947 e por Sunderland em 1951, sendo as classificações mais utilizadas na prática clínica. As lesões mais leves de perda motora e sensitiva que podem durar horas ou semanas são chamadas de Neuropraxia (*Sunderland grau I*), cujos danos afetam apenas a bainha das células de Schwann. Lesões por contusão, estiramento ou até mesmo esmagamento, em que ocorre perda da continuidade da camada de células de Schwann e do axônio, seguida de degeneração Walleriana, é chamada por Seddon de Axoniotmese (*Sunderland grau II*). Dentro das axoniotmeses, Sunderland classificou de *grau III* quando, além da camada de células de Schwann e do axônio, o endoneuro também estivesse em descontinuidade e *grau IV* quando apenas o epineuro estivesse com sua continuidade preservada. Nestes tipos de lesão, a recuperação muitas vezes é incompleta, dependendo da distância do órgão terminal e do grau de desorganização axonal. As lesões nervosas com transecções completas e afastamento dos cotos e, portanto, interrupção do crescimento axonal devido a formação de fibrose tecidual é chamada Neurotmese (*Sunderland grau V*) e não ocorre recuperação nestes casos se não houver tratamento cirúrgico. A transecção completa do nervo pode ser acompanhada de perda de substância, um tipo de lesão que pode ser chamada de *Sunderland grau VI* (SEDDON; MEDAWAR; SMITH, 1943)(BURNETT; ZAGER, 2004)(GEUNA, STEFANO; HAASTERT-TALINI, KIRSTEN; NAVARRO, 2013)(YEGIYANTS et al., 2010).

Lesão Nervosa e Degeneração Walleriana

Quando um nervo periférico sofre uma lesão, ocorre um processo de degradação das estruturas do axônio no segmento distal à lesão, chamado degeneração Walleriana, que começa imediatamente após a transecção do nervo e se completa em torno de 3 a 6 semanas quando todos os debris celulares e de

mielina são fagocitados. Nesse processo de degeneração Walleriana, além do fenômeno degenerativo (degeneração axonal e mielínica), ocorre proliferação de células de Schwann e recrutamento de células do sistema imune, que leva a um remodelamento tecidual do coto distal do nervo, transformando-o em um meio adequado para a regeneração axonal. Alguns milímetros ou centímetros proximais à lesão acontece a degeneração axônica. As células de Schwann em proliferação fagocitam os debris de mielina até certo ponto e, em torno do segundo e terceiro dias após a lesão, os macrófagos hematógenos assumem essa função com mais intensidade, sendo atraídos por citocinas inflamatórias e quimiotáticas secretadas pelas células de Schwann reativas. A proliferação das células de Schwann induzida pela lesão axonal atinge o pico em torno no terceiro dia e diminui em um período de duas a três semanas. Chegam a um aumento de três vezes a quantidade normal e após o terceiro dia começam a se organizar, alinhando-se dentro do tubo endoneural em colunas, as colunas de Bungner, que representam o melhor caminho para a regeneração axonal. Com a ação conjunta das células de Schwann e dos macrófagos, o tubo endoneural vazio está preparado para receber o axoplasma produzido pelo corpo celular durante o processo de regeneração nervosa. Os axônios do coto proximal, nos primeiros dias ou semanas, produzem grande número de brotos que irão em busca de substâncias tróficas produzidas pelos órgãos alvos que estão no coto distal. O número total de axônios do coto distal pode exceder ao número de axônios em crescimento, em decorrência do excesso de brotos que invadem as colunas de Bungner, porém, com o tempo, esse número diminui em decorrência de um fenômeno chamado repressão sináptica que acontece quando os brotos axonais fazem suas conexões com os órgãos alvos (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011). O primeiro sinal responsável pelo início e manutenção da resposta neuronal regenerativa após uma lesão axonal que alcança o corpo do neurônio é uma explosão de potencial de ação gerado no sítio

da lesão. Essa descarga inicia as alterações cromatolíticas mediadas pelo rápido aumento do cálcio intracelular e do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O segundo sinal acontece pelo bloqueio do transporte retrógrado de moléculas, incluindo os fatores de crescimento derivados dos órgãos alvos que, com isso, informa ao neurônio que seu axônio está desconectado do órgão alvo. Durante os dias seguintes, as células de Schwann reativas e o infiltrado macrofágico liberam citocinas e fatores neurotróficos que alcançam o corpo neuronal lesado por transporte retrógrado e contribuem para sustentar o programa de regeneração neuronal (GEUNA, STEFANO; HAASTERT-TALINI, KIRSTEN; NAVARRO, 2013).

As alterações no corpo celular após a lesão nervosa são chamadas de cromatólise, ocorrendo entre a segunda e terceira semana após a lesão, e neste evento, o retículo endoplasmático ou substância de Nills se dispersa pelo citoplasma da célula, o núcleo e o nucléolo aumentam de tamanho dirigindo-se à periferia da célula, aumenta a quantidade de DNA e RNA, havendo intenso metabolismo e produção de axoplasma que invadirá o tubo endoneural distal à lesão. Ou seja, quando temos uma lesão de nervo periférico, não só os componentes periféricos são comprometidos, mas também os componentes centrais, incluindo alterações no corpo celular, a cromatólise, na região da medula espinal e até mesmo na região encefálica (LUNDBORG, 2003). O crescimento axonal em animais de laboratório nas neurotmeses é de 2 a 3,5 mm/dia (ratos, camundongos e coelhos) e pode chegar a 3,0 ou 4,5 mm nas lesões tipo axoniotmeses. Nos seres humanos, estima-se que a média de velocidade do crescimento axonal seja menor, em torno de 1-2 mm/dia, mas continua ainda um tema em discussão (BURNETT; ZAGER, 2004)(LUNDBORG, 2005)(COLOMÉ et al., 2008).

O sucesso do processo de reparação de um nervo periférico seccionado, ou seja, para que ocorra o crescimento do cone, também depende da existência de um “micro ambiente” propício à regeneração. Esse substrato neural fundamental está presente localmente no momento da lesão do nervo e é composto de fatores tais como células de Schwann, fibroblastos perineurais, componentes da matriz extra-celular, laminina, fibronectina, moléculas de adesão e moléculas produzidas pelas extremidades do nervo seccionado estimuladoras da regeneração, os chamados fatores neurotróficos (COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, 2009), que auxiliam na sobrevivência e maturação do axônio (GIGER; HOLLIS; TUSZYNSKI, 2010).

O Plexo Braquial e o Nervo Mediano do Rato

A anatomia do membro anterior do rato apresenta semelhanças com a humana e grande parte da musculatura e principais ramos nervosos possui a mesma nomenclatura. O plexo braquial em ratos origina-se dos nervos espinais de C5 a C8, além de T1. Isso permite a utilização destes animais como modelos de estudos de lesões de nervos periféricos. As raízes se formam pela união das fibras sensitivas dorsais e das motoras ventrais. A união de C5 e C6 formam o tronco superior, C7 forma o tronco médio e C8 e T1 formam o tronco inferior. A união dos ramos anteriores de todos os troncos formam o cordão lateral, do qual origina-se o nervo musculocutâneo e o cordão medial de onde ramifica-se os nervos mediano, ulnar e cutâneos medial do braço e antebraço. A união dos ramos posteriores de todos os troncos formam o cordão posterior, de onde se originam os nervos axilar e radial. O nervo frênico surge à partir de um ramo descendente de C4 e um ramo ascendente de C5. O diâmetro do nervo mediano é, em média, 1,1 mm no plexo braquial e no braço e 0,6 mm no antebraço. O nervo mediano nos ratos é originado das raízes de C5 a T1, resultado da fusão de três ramos vindos dos cordões lateral,

posterior e medial do plexo braquial, sendo os ramos dos cordões posterior e medial mais desenvolvidos que os ramos do cordão lateral. No braço, o nervo mediano não se ramifica, mas próximo ao cotovelo emite ramo para o músculo pronador redondo que recebe um ramo anastomótico do nervo musculocutâneo. A poucos milímetros distalmente do cotovelo surge um ramo do nervo mediano que corresponde ao nervo interósseo no homem. Esse ramo inerva o flexor radial do carpo e os flexores dos dedos. No terço distal do antebraço, o nervo mediano emite um ramo recorrente para a porção do flexor profundo dos dedos e se divide em ramos medial e lateral. O ramo lateral inerva a região tenar e os músculos lumbricais antes de terminar como um nervo colateral para o primeiro e segundo dedos. O ramo medial finaliza como um nervo colateral no segundo e terceiro dedos. O músculo flexor radial do carpo é inervado por um único ramo do nervo mediano que penetra no corpo muscular no terço proximal, o flexor superficial dos dedos por dois ramos e o flexor profundo dos dedos por um ramo no terço proximal e um ramo recorrente do nervo mediano no terço médio do antebraço. O nervo ulnar não envia ramos para os flexores dos dedos. Contrariamente a Greene (1959) o estudo de Bertelli *et al* (1995) não encontrou ramos do nervo ulnar para os flexores dos dedos. O nervo mediano tem um importante componente sensitivo na pele da pata anterior. Neste modelo deve-se evitar a secção do nervo radial e do cutâneo lateral do antebraço que desnervaria toda a pata, ocorrendo automutilação. Uma vantagem da utilização desse modelo do nervo mediano é que os animais não sofrem contraturas articulares, nem há automutilações (BERTELLI *et al.*, 1995).

Justificativa para o Modelo Experimental e Avaliação Funcional Utilizados

Muitos modelos experimentais têm sido utilizados com o intuito de obterem-se maiores conhecimentos sobre a regeneração nervosa, buscando-se

meios de se alcançar uma regeneração mais rápida e eficiente, e, com isso, uma recuperação funcional adequada (RODRÍGUEZ; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2004). O modelo experimental que utiliza nervo ciático de ratos é um dos mais estudados, pois este nervo no rato fornece uma fonte de tecido nervoso periférico com detalhes celulares indistinguíveis dos nervos humanos (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989).

A recuperação funcional é o principal objetivo da pesquisa envolvendo os nervos periféricos e os métodos para realizar a avaliação da recuperação funcional ainda são insuficientes e muitas vezes de difícil realização. (BERTELLI; MIRA, 1995) utilizaram para suas pesquisas de nervos periféricos o nervo mediano de ratos, que é responsável pela flexão dos dedos. No experimento, o nervo mediano do rato era lesado por esmagamento e, semanalmente, cada animal era submetido ao teste de preensão (“grasping test”). Para a realização do teste, os animais eram levantados delicadamente pela cauda e eram permitidos apreender uma grade conectada a uma balança eletrônica. Com o rato segurando a grade da balança, ele continuava sendo segurado e elevado pela cauda até que soltasse a grade. Neste preciso momento em que soltava a grade, o valor da balança era gravado. A recuperação progressiva do nervo lesado era claramente mostrada pelo “teste de apreensão” (“grasping test”) (Figura 1).

Fatores Neurotróficos e Gangliosídeos

As lesões nervosas completas e com perda de substância são tratadas com cirurgia, utilizando-se o enxerto autólogo quando necessário. Entretanto, a técnica cirúrgica isolada pode apresentar resultados variáveis e, às vezes, insatisfatórios. Assim, muitos pesquisadores têm usado diferentes substâncias como terapia alternativa com o propósito de otimizar o reparo dos nervos periféricos. Diversos fatores conhecidos como fatores de crescimento têm sido utilizados. São proteínas

que atuam diretamente na proliferação e diferenciação de diferentes tipos celulares, promovendo reparo tecidual e recuperação funcional. No sistema nervoso periférico esses polipeptídeos que auxiliam no processo regenerativo são chamados fatores neurotróficos. Eles são responsáveis pelo crescimento e sobrevivência dos axônios após danos teciduais. O fator de crescimento neural (NGF) é a neurotrofina mais estudada e tem como receptor o TrKA. Hoje, temos mais de uma dezena de fatores neurotróficos (GILLESPIE, 2003)(SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, 2011)(ALOE, 2011).

Qualquer estratégia para melhorar a recuperação do nervo periférico afetará positivamente a reinervação deficiente, tendo um impacto importante na pesquisa neurobiológica (BERTELLI; GHIZONI, 2006).

O brotamento de nervos do gânglio da raiz dorsal de embriões de galinha induzido pelo fator de crescimento de nervo (NGF) é inibido em cerca de 70% quando se utiliza anticorpos anti-GM1. Já a utilização de anticorpos anti-GM2 apresenta um efeito inibitório apenas moderado, em torno de 25%. Esses resultados enfatizam a alta afinidade do gangliosídeo GM1 com o NGF no processo de brotamento dos nervos periféricos (SCHWARTZ; SPIRMAN, 1982).

O monossialogangliosídeo GM1 é um dos principais glicoesfingolípides do tecido nervoso de mamíferos, constituindo a maior subclasse de gangliosídeos cerebrais com efeitos sobre os processos de diferenciação e reparo neural, atuando sobre o brotamento e crescimento de neuritos *in vivo* e *in vitro* (CONSTANTINI, SHLOMO, 1994).

Foram estudados os efeitos da metilprednisolona (MP), do gangliosídeo GM-1 e de sua associação em ratos com lesão medular. A MP administrada na dose de 30 mg/Kg teve efeito significativo na redução do volume da lesão e impedindo a hiponatremia. O GM-1 administrado isoladamente na dose de 10 a 30 mg/Kg não

demonstrou efeito satisfatório e quando o GM-1 foi utilizado em associação à MP, ele antagonizava os efeitos da metilprednisolona, não devendo ser utilizados concomitantemente (CONSTANTINI, SHLOMO, 1994) .

O gangliosídeo GM1 tem um importante papel em manter a excitabilidade elétrica neuronal, atuando ao nível dos nódulos de Ranvier nas fibras mielinizadas e sua ação se daria pela modulação dos canais de sódio (QIAO et al., 2008).

Estudos têm demonstrado a eficácia do GM1 no auxílio à recuperação parcial em casos de sequelas de neuropatia periférica diabética, AVC e trauma raquimedular agudo em homens e animais. Estudos anteriores mostraram evidências de que a administração de gangliosídeos no local de reparo da lesão de nervo periférico produz um aumento do número de fibras mielinizadas regeneradas. Sua ação se daria preferencialmente sobre a regeneração de fibras motoras, uma vez que tem sido demonstrado que o GM1 responde por cerca de 15% de todos os gangliosídeos na mielina de nervo motor, em contraste responde por menos de 5% da mielina em nervos sensitivos. Embora não se entenda completamente o mecanismo molecular da ação neurotrófica dos gangliosídeos, os experimentos sugerem que o GM1 é um neuroprotetor, antineurotóxico, indispensável na excitabilidade neuronal de fibras mielínicas e amielínicas, e ainda atua no desenvolvimento, crescimento, diferenciação e maturação neuronal (HADJICONSTANTINO; NEFF, 1998).

O gangliosídeo GM1 foi utilizado em pacientes com lesões raquimedulares. Os pacientes seguiram um protocolo de 100 mg de GM1 diariamente, por um período de 18 a 32 dias, sendo a primeira dose aplicada dentro das primeiras 72 horas após a lesão. Os pacientes foram acompanhados por 01 ano e observaram que houve uma diferença significativa na melhora do grau da lesão de acordo com a classificação de Frankel comparando-se os grupos controle e o tratado. Houve

melhora de 0, 1, 2 e 3 graus em 13, 4, 1 e 0 pacientes respectivamente no grupo placebo e em 8, 1, 6 e 1 pacientes respectivamente no grupo do GM1, com $p=0,0034$. Concluíram que o estudo, apesar de pequeno, oferece evidências que o GM1 melhora a recuperação da função neurológica após um ano, mas que outras pesquisas devem ser realizadas para confirmar a segurança e os benefícios clínicos encontrados (GEISLER; DORSEY; COLEMAN, 1991).

Foi mostrado em estudo experimental que o emprego de GM1 (30 mg/kg) promove o brotamento axonal de nervos periféricos lesados em ratos Sprague-Dawley (GOETTL, VIRGINIA M., NORTON H. NEFF, 2003).

Quando o suprimento de fator neurotrófico diminui devido a lesão ou doença neurodegenerativa a célula neuronal sofre apoptose. Os gangliosídeos têm tanto função neurotrófica quanto neuritogênica. A administração do monossialogangliosídeo (GM1) tem mostrado efeito estimulatório sobre o crescimento dos neuritos e na prevenção da degeneração da célula neuronal do sistema nervoso central. Para avaliar o mecanismo de neuroproteção do GM1, ele foi injetado no corpo vítreo de ratos Sprague-Dawley que foram submetidos a axotomia do nervo óptico, ficando evidenciado que o GM1 inibiu a degeneração das células ganglionares da retina pela ativação das proteínas MAPK e CREB, que promovem a expressão da *bcl-2* (CHOI; KIM; JOO, 2003).

As propriedades neuroprotetoras do GM1 foram analisadas quanto a diminuição do dano definitivo em lesões centrais. O estudo concluiu que a ação protetora do GM1 é conferida pela diminuição ou abolição do efeito oxidativo através da mediação dos receptores tirosinoquinase (TrK) (SOKOLOVA et al., 2007).

A metilprednisolona (MP) e o GM1 foram testados experimentalmente no tratamento da lesão medular em ratos. Formaram os grupos MP, GM1, MP associado ao GM1 e controle. A dose empregada de GM1 foi de 30 mg/kg de peso.

Na conclusão do estudo, os autores afirmaram que a administração somente de GM1 ou MP não determinou melhora da função motora, enquanto que a associação de ambas conferiu melhor resultado funcional (CARVALHO; BARROS FILHO; TEBET, 2008).

O papel do monossialogangliosídeo, GM1, na regeneração de nervos ciático de ratos isogênicos da raça Lewis foram avaliados. Criaram-se defeitos de 5 mm no nervo ciático e formaram-se três grupos. No primeiro, o segmento removido foi suturado (enxerto autólogo), no segundo grupo foi interposto um tubo de silicone e colocado no seu interior solução salina heparinizada e no terceiro grupo foi utilizado uma solução de GM1 no interior do tubo de silicone interposto entre as extremidades do nervo. O grau de regeneração nervosa foi comparado entre os grupos através de análise histológica, contagem dos axônios mielinizados regenerados e análise funcional através do estudo da marcha (“walking track analysis”). Concluíram que não houve diferença significativa quanto à recuperação funcional, mas apresentaram padrões histológicos diferentes com o grupo que utilizou o GM1, evidenciando maior grau de mielinização (COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, 2009) .

O efeito do gangliosídeo GM1, oxigênio hiperbárico e a combinação dos dois foram avaliados no tratamento experimental de lesão medular em ratos. Foram realizadas lesões medulares em 32 ratos, formando quatro grupos onde um grupo recebeu tratamento apenas com o gangliosídeo GM1, um foi submetido a tratamento com terapia por oxigênio hiperbárico, o terceiro recebeu a combinação dos dois e o quarto foi o grupo controle, portanto, não recebeu tratamento. Não houve diferenças nas análises histológicas nem na comparação dos testes funcionais entre os lados direito e esquerdo. Contudo, houve uma melhor

recuperação nos testes locomotores no 14º dia para o grupo que usou o GM1 associado à terapia com oxigênio hiperbárico (MARCON et al., 2010).

Numa dissertação de tese para obtenção do título de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o autor estudou os efeitos do monossialogangliosídeo (GM1) em ratos com lesão medular administrado por via transdérmica por laser a baixa temperatura. Neste estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A avaliação histológica também não demonstrou resultados com significância estatística (DE SOUZA et al., 2013).

Além da perda sensitiva e motora após a lesão do nervo periférico há a uma alteração do mapa cortical somatosensorial. Com a instalação da fibrose em torno da lesão, associado à aderência aos tecidos circunvizinhos, o nervo diminui sua capacidade elástica e de extensibilidade, dificultando os movimentos. A perda da comunicação com os músculos esqueléticos leva a uma progressiva atrofia muscular, que pode provocar uma diminuição do diâmetro da fibra muscular de 25% já ao final da primeira semana. No terceiro mês após a lesão, a atrofia muscular pode chegar a 70-90%(FIRAT, 2013).

Diariamente nos deparamos com pessoas em franca idade produtiva com lesões de nervos periféricos que trazem danos muito grandes a si próprios, às suas famílias e à nação. São déficits motores e sensitivos que limitam as atividades de um indivíduo tanto na sua vida diária como no trabalho e levam o indivíduo a um período longo de tratamento e reabilitação, o que ocasiona um gasto financeiro elevado. Os custos são 87% devido a perda da produção no trabalho e o restante pelo tratamento realizado no sistema de saúde (ROSBERG et al., 2005). A escolha do melhor tratamento para estas lesões levou ao desenvolvimento de pesquisas sobre a fisiopatologia da lesão do nervo periférico, mecanismos de regeneração,

técnicas microcirúrgicas de reparo e aplicação de fatores neurotróficos na esperança de se obter resultados mais satisfatórios.

É importante que se busque constantemente meios de melhorar o tratamento das lesões nervosas, possibilitando um menor período de reabilitação dos pacientes acometidos. Para isso, o entendimento das alterações moleculares envolvidas na regeneração nervosa é, indubitavelmente, a chave para melhorar a recuperação funcional. As pesquisas atualmente estão focadas em novos agentes que tenham potencial de estimular e guiar a regeneração axonal. E dentro de poucos anos, algumas dessas substâncias poderão fazer parte do tratamento habitual das lesões dos nervos periféricos(DA GAMA et al., 2000)(GUTIERREZ; ENGLAND, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o fator GM1 promove aumento da regeneração axonal do nervo mediano, melhorando a função da musculatura por ele innervado.

2.2 Objetivos específicos

Artigo 1:

Comparar o resultado funcional através do teste de preensão (*“grasping test”*) do tratamento da lesão do nervo mediano em ratos Wistar através da microneurografia tradicional com a microneurografia associada ao monossialogangliosídeo (GM1).

Artigo 2:

Comparar, através de análise histomorfométrica, as alterações morfológicas encontradas entre a microneurografia tradicional e a microneurografia associada à administração intraperitoneal de GM1 após lesão do nervo mediano de ratos da linhagem Wistar.

3. ARTIGOS

ARTIGO 1

*MEDIAN NERVE INJURY IN WISTAR RATS TREATED WITH
GM1: FUNCTIONAL EVALUATION*

ARTIGO 2

*HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION OF MEDIAN NERVE
LESION IN WISTAR RATS TREATED WITH GM1*

ARTIGO 1
***“Median Nerve Injury in Wistar Rats Treated with GM1:
Functional Evaluation”***

Authors:

Osvaldo Mendes de Oliveira Filho (Oliveira Filho, OM)*

Márcia dos Santos Rizzo (Rizzo, MS)*

Antônio César Almeida de Oliveira (de Oliveira, ACA)*

Gustavo Bispo dos Santos (dos Santos, GB)**

William Dias Belangero (Belangero,WD)***

Universidade Federal do Piauí (UFPI)*

Department of Specialized Medicine-Experimental Surgery Sector

Universidade de São Paulo**

Microsurgery Laboratory

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)***

Department of Orthopaedics and Traumatology

Adress:

Av. Mal Castelo Branco, 611/402

Cabral

Teresina-Piauí

CEP 64000-810

osvaldomendes@me.com

MEDIAN NERVE INJURY IN WISTAR RATS TREATED WITH GM1: Functional Evaluation

ABSTRACT

The sole use of microsurgical techniques for treating peripheral nerve injuries is not sufficient to promote an axonal regeneration that will lead to complete recovery of the functions of the injured nerves. Many studies are being conducted that use pharmacological agents as associated therapy. In this study, the action of monosialoganglioside (GM1) as a neuroprotector, antineurotoxic and anti-inflammatory agent is evaluated, as well as an enhancer of the neurotrophic factors in peripheral nerve injuries. Thirty-two male Wistar rats were used, of which ten rats were randomly selected to determine the mean grasping strength of normal rats (group 0). There were three groups; the first was the control group whose animals were submitted to a 5 mm lesion and received no treatment (group I). In the other two groups, a complete section of the median nerve was performed by microsurgical technique. One group was submitted to external epineural microneurorrhaphy (group II) and the other group was treated with epineural microneurorrhaphy associated with intraperitoneal administration of GM1 (group III). The microsurgical technique of neurorrhaphy was the end- to- end suture type, performed immediately after the lesion. Functional analysis was performed weekly through the use of the grasping test assessing the flexor muscles of the fingers; this test is specific for the median nerve evaluation. In this experimental model, the animal is lifted by the tail and stimulated to grasp with its paw a bar at the top of a pyramid connected to a conventional digital balance. While the animal is grasping the bar, it continues to be lifted by the tail until it loosens its grip. Then, the value shown in the balance is registered. The test shows not only the day that recovery began but also the improvement with time. The mean values in rats of group 0 were compared to the values of the animals of groups II and III through the analysis of variance (ANOVA one way). For comparison of the mean values of the strength sustained by rats of the groups II and III, the Wilcoxon test was applied. We can conclude, stating with error inferior to 5%, that from the functional perspective, the group that received the association of epineural microneurorrhaphy and administration of GM1 (group III) presented better performance, by doing the grasping test in less time and applying a higher mean strength.

Key Words: GM1, median nerve, axonal regeneration, Wistar rats, functional evaluation

Introduction

The diagnosis and treatment of peripheral nerve injuries continue to be challenging. Sometimes patients present peculiar symptoms which may lead to delay in diagnosis and initiation of treatment. The incidence of peripheral nerve injuries varies around 1.5 to 2.8% but despite the low rates these lesions increase morbidity, particularly when treatment is delayed or inadequate. As a result, patients suffer considerable long-term distress. In addition, the cost of treatment to society has been escalating (YEGİYANTS et al., 2010)(URABE et al., 1995).

After peripheral nerve injury, changes occur not only at the site of injury, but also in the cerebral cortex and target organ distal to the lesion, leading to uncomfortable consequences such as loss of sensitivity and motor function, pain and cold intolerance (BURNETT; ZAGER, 2004). Since these traumatic injuries affect mostly the upper limb, the hand is the most compromised organ.

We do not fully understand the neurobiological phenomena that occur in the cerebral cortex and peripheral nerves after injury. However, we know that post-traumatic nerve regeneration occurs only after alteration in the metabolic mechanism of the cell body, which passes from a resting state to a regenerative state. The cell body of the nerve cell suffers change induced by intracellular signaling systems which are activated after injury, resulting in neuronal death (LUNDBORG; LONGO; VARON, 1982)(ABE; CAVALLI, 2009) (GLAUS; JOHNSON; MACKINNON, 2011)(LUNDBORG, 2013).

In the presence of axonal nerve injury, typical morphologic alterations occur in the nerve cells that are termed chromatolysis. It is believed that these changes result from a lack of neurotrophic factors originating from target organs, since retrograde axonal transport is interrupted. While some cells die due to passive necrosis, the majority of axotomized sensory neurons die through a process termed apoptosis. Neuronal cells suffer apoptosis when the supply of neurotrophic factors is limited by ischemia, trauma or degenerative disease (REID, AJ; TEREINGUI, G; WIBERG, M; HART, 2013).

Distal axonal degeneration is an issue that is not influenced by pharmacological interventions and regenerating axons must run the whole course until reaching the target organ. This complicated process that occurs in the segment distal to the nerve lesion also requires the activation and interaction of Schwann, inflammatory and endothelial cells. The more proximal the peripheral nerve injury, the more difficult the axonal regeneration, owing to the long distance travelled and also the need for a longer time for completion. This leads to major changes in the target organ resulting from denervation (LUNDBORG; LONGO; VARON, 1982)(LUNDBORG, 2013).

Since action at the axonal level is not possible, microsurgical nerve repair is performed by approximating the epineurial or perineurial sheaths. Even when performed with the maximum precision, some axonal misdirection still occurs. The direction of axonal sprouting regeneration in the distal nerve segment is dependent on biochemical factors produced by target organs (LUNDBORG, 1987).

Immediate primary tension-free microsurgical epineurial repair or use of autologous graft in cases where there is failure of the neural tissue is still the gold standard in clinical practice. Delay in surgical repair damages motor and sensory nerve recovery. As a result, cortical remapping of the corresponding innervated territories will occur (MILLES, 1982)(LUNDBORG, 2013).

Despite advances in isolated surgical technique, results are varied and researchers have used different substances to optimize peripheral nerve repair. Diverse known factors such as growth factors have been tested. These factors are proteins that act directly on the proliferation and differentiation of different cell types, promoting tissue repair and functional regeneration (SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, 2011). Substances used to improve axonal growth are proteins that are termed neurotrophic factor. The first neurotrophic factor was identified about five decades ago and named nerve growth factor (GILLESPIE, 2003).

There are still few studies on neuroprotective intervention for the peripheral nervous system. However, diverse substances have been tested with the purpose of blocking cell death. Nerve growth factors have experimentally reduced neuronal loss, but became problematic due to the side effects presented (REID et al., 2009).

In this study, monosialoganglioside (GM1) was used as an adjuvant along with surgical treatment. It acts on neurite sprouting and growth. There is evidence that GM1 administration increases the number of regenerated myelinated fibers. It acts preferentially on motor fiber regeneration, since GM1 accounts for 15% of all gangliosides in motor nerve myelin and less than 5% in sensory nerve myelin (HADJICONSTANTINOU; NEFF, 2002).

The majority of studies with GM1 were conducted in traumatic spinal cord injuries in both experimental animals and humans, revealing improvement in recovery of neurologic function (FH; FC; WP, 1990)(CONSTANTINI, SHLOMO, 1994)(CARVALHO; BARROS FILHO; TEBET, 2008) (MARCON et al., 2010). There are fewer studies on the effect of GM1 on peripheral nerves. However, these studies also demonstrated positive effects on electrical modulation, neuronal excitability and histologic pattern, indicating a higher degree of myelination (QIAO et al., 2008).

Increased knowledge of the biological mechanisms involved in peripheral nerve injury and axonal regeneration may lead the surgeon to early repair of the lesion, reducing the negative cellular events. In addition, there will be a more extensive search for strategies promoting a better and more rapid functional recovery of peripheral nerve loss, such as the use of neurotrophic factors (BERTELLI; GHIZONI, 2006)(MCKAY HART et al., 2002).

The study of monosialoganglioside (GM1) use associated with microsurgical techniques is justified because this combination may qualitatively improve the regeneration of peripheral nerve injuries, shortening recovery time and facilitating rehabilitation. Thus, the enormous social costs incurred with these injuries would be reduced.

The overall aim of this study was to compare the functional result of treatment of median nerve injury by the grasping test in Wistar rats, using traditional microsurgical neurorrhaphy associated with the use of monosialoganglioside (GM1) and specifically evaluate whether GM1 promoted an increase in axonal median nerve regeneration, improving function of the muscles innervated by the median nerve.

Material and Method

Experimental Design and Ethical Precepts

This research was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the *Universidade Federal do Piauí* (CEEa/UFPI), registered under number 093/12.

The animals used in this study underwent microsurgical technique for section of the median nerve of the right forelimb, following anesthetic procedure. Subsequently, these animals were divided into different treatment groups. Functional assessment of the median nerve regeneration process was done by the grasping test of the thoracic limb operated.

Animals and Anesthetic Procedure

Thirty-two (32) Wistar male rats were used, ranging in age from 120 to 140 days, weighing from 250g to 332g. The animals were kept in cages in groups of up to 5 animals, receiving food and water *ad libitum* until the end of the experiment.

Prior to the surgical procedure, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 to 40mg/kg). After induction, anesthesia was

maintained with Xylazine (5 mg/kg) associated with cetamine(80mg/kg), administered by the intramuscular route(SMITH, 1993)(WIXSON et al., 1987)(CHENTANEZ et al., 2009).

Surgical Procedure and Experimental Groups

Section of the median nerve of the right forelimb was performed in all animals involved in the research study by microsurgical technique. Following the anesthetic procedure, each rat was placed in the supine position. After shaving the ventral axillary region of the right forelimb and cleansing the region with povidone-iodine (Povidine®), a 3-cm longitudinal cutaneous incision of the axillary region was performed with dissection of the median nerve. The nerve was then transected about 5 mm proximal to the medial epicondyle of the humerus.

Initially, from the original group of 32 animals studied, a random sample of 10 animals were submitted to a functional test before undergoing any surgical procedure (Group 0), to determine the normal median grasping strength of the animals studied.

Based on treatment administered, the following groups were defined: Group I (10 animals) undergoing a 5-mm resection of the median nerve at a distance of 5 mm from the medial epicondyle of the humerus, with no treatment applied (ANGIUS et al., 2012); Group II (10 animals) undergoing primary epineural microsurgical neurorrhaphy with 2 simple equidistant sutures with mononylon 9.0 suture (Ethicon®) with a magnification of X 5.5 using microsurgical loupe; group III (12 animals) undergoing primary epineural suture also with mononylon 9.0 suture (Ethicon®) associated with intraperitoneal administration of GM1 (30 mg/Kg), kindly provided by the Department of Cellular Biology and Development of the Institute of Biomedical Sciences of the *Universidade de São Paulo* (USP).

Nerve repair was performed immediately after injury by end-to-end microsurgical neurorrhaphy technique.

After nerve repair of all animals in the study, the surgical wound was sutured with mononylon 4.0 suture. Every six hours after the surgical procedure, analgesia with Tramadol (6.0mg/kg) during 24h was administered by deep intramuscular route. In the immediate postoperative period, the animals received single-dose antibiotic prophylaxis by deep intramuscular injection of Benzathine Penicillin, Procaine Penicillin, Potassium Penicillin, Erythromycin and Sodium Diclofenac (Pensivet Plus) and were followed daily for six weeks.

Functional Analysis

Functional analysis of the rat median nerve was performed by the grasping test in the right forelimb. Initially, the grasping test was performed with group 0 animals (before they were regrouped to groups I, II and III and underwent surgical procedure).

Animals from groups I, II and III, underwent the grasping test in the immediate postoperative period and weekly during the six weeks of the experiment.

For the performance of the test, a device in the shape of a pyramid was used. In the upper extremity of the device, a metal rod was used for grasping. The device weighed 696 g and was connected to a conventional digital balance.

The test consisted in lifting the animal by the tail, allowing it to grasp the rod located at the top of the pyramid with its right operated forelimb, which was free to move during the test. The left forelimb of the animal was immobilized to prevent its use during execution of the test. The rat performed digital flexion of the operated limb to grasp the metal rod, as it was being lifted. The moment the animal grasped the rod, while still lifted by the tail, another observer filmed the procedure, writing the weight recorded on the scale at the exact moment that the rat released the rod. The difference between the weight of the rod (696g) and the weight recorded by the second observer at the time the rat released the rod served to estimate the strength applied by the digital flexor muscles. Values were ignored when the animal performed carpal flexion. This test was performed three times in each rat and the end result was the median value of these three attempts.

The grasping test assesses the function of the digital flexor muscle groups. It allows us to adequately analyze the regeneration of the median nerve undergoing complete transection and compare different techniques used for nerve regeneration (BERTELLI; MIRA, 1995).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the results obtained from measurements of the median grasping strength executed by the animals from the functional test groups. A random variable (F_p) that was representative of the median grasping strength was defined.

To test the equality of median F_p distributions in the groups, since F_p distributions were not perfectly adequate for application of parametric tests, the Kruskal Wallis, Wilcoxon-

Mann-Whitney tests were used, in addition to analysis of variance (one-way ANOVA) with Bonferroni correction.

Results

Functional analysis was performed by the grasping test, where the estimated measures of grasping strength obtained (Fp variable) allowed us to compare the performance between different groups. The same procedure was performed three times, and the three attempts were recorded, obtaining the median Fp value. The grasping test was performed in the preoperative period of group 0, in the immediate postoperative period and every week during the following six weeks with the operated animals.

The following results are shown in the Tables below:

Table 1, shows that group I (isolated injury to the median nerve, without suture) did not present any reaction during six weeks of observation, indicating that there was no lesion regeneration in this group and also proving that the median nerve alone is actually responsible for digital flexion. For these reasons, comparative analyses were fundamentally aimed at identifying the differences in Fp variable between groups 0, II and III,

In group II (suture), only in the sixth week, the majority of animals started grasping with the operated limb (Table 2).

In group III (suture + GM1), starting in the fourth week, there was already a clear demonstration that the majority of animals initiated grasping digital movement of the operated limb (Table 3).

To perform a comparative analysis between groups 0, II and III, the histograms and box plots of the Fp variable in groups were analyzed and the Shapiro-Wilk test was performed to determine normality of Fp in groups (Graphs 2,3 and 4); (Table 5).

The results of the Shapiro-Wilk test (values $p > 0.05$) (Table 5) do not permit us to reject the null hypothesis of distribution normality and the result of the Bartlett test do not allow us to reject the null hypothesis of equality of Fp variances in the groups. However, the number of rats per group (lower than 30) is inadequate to perform parametric comparative tests. For these reasons, in addition to the one-way ANOVA, the nonparametric Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests—Mann – Whitney were also applied. Analysis of box plots, Kruskal-Wallis, Wilcoxon—Mann—Whitney and one-way ANOVA,

showed the difference between Fp distributions in groups 0, II and III (Graph 2; Tables 6,7,8, 10 and 11).

Results obtained in the Wilcoxon – Mann – Whitney test allowed us to reject the null hypothesis that Fp distributions between groups II and III are equal with an error lower than 5%. An estimate of 70.9% was also obtained for odds that a sample removed from a rat population operated with GM1 will have a higher median value than the value obtained in a sample removed from a population of rats operated with suture and without GM1 use (Table 7).

A comparison between values of Fp distribution in groups 0 and III was also made. It was observed that Fp values were higher in Group 0 than in group 3. However, a value of 3% in the Wilcoxon test and the probability that only 65.3% of the sample removed from the population of rats not operated will have a median value higher than the value obtained in a sample removed from a rat population operated with GM1, gives us a perspective of the therapeutic efficacy of GM1 use in these circumstances (Table 8).

Analysis of the results obtained in the grasping test allowed us to conclude that over six weeks, regeneration tended to be more effective in Group III than in Group II rats. This fact was shown by the number of rats that reacted and exerted some strength in the grasping test.

The tests, graphic analyses performed and box plot format of distributions, in addition to the difference observed between the decline in trend lines of two time series formed by the line graphs of Groups II and III (Graph 1), demonstrated a difference between both therapeutic options evaluated graphically and statistically.

Discussion

After peripheral nerve injury, a number of cellular and molecular events occur, which prevent complete restitution of motor and sensory functions in the patient, despite the best microsurgical approach performed. The most important factor for this incomplete regeneration is intense cell death of neuronal tissue, since the fundamental neurobiological prerequisite for good regeneration is a viable neuron. Neuronal death is clinically translated by loss of thin motor function, compromise of discriminatory sensitivity and reduction in proprioceptive control (LUNDBORG, 2000, 2013).

More recently, there has been a consensus about the meaning of neuronal loss and its impact on regeneration (HALL, 2005). In studies of sciatic nerves in rats undergoing axonal injury, the relationship between time of injury and amount of sensory nerve cell

death was demonstrated. Cell death begins 24 hours after nerve transection. At one week, there is a 15% loss, achieving a peak in two weeks, with 21% of neuronal death. A plateau is reached within two months after injury, with 35 to 45% of neuronal death. Primary sensory neurons are more vulnerable than motor neurons. In addition, smaller neurons are more susceptible to degeneration than larger neurons and those with myelinated axons (MCKAY HART et al., 2002).

With the understanding of the process of neuronal death in common patterns of peripheral nerve injury, a clinical window of opportunity is opened for neuroprotection (REID et al., 2009). In the new approach to peripheral nerve treatment, surgical intervention should consider axonal death induced by axotomy, since experimental studies have shown that immediate epineural nerve repair reduces neuronal death from 21% to 5% in two weeks. When surgical repair is delayed for a week, neuronal death is already 12%. The mechanism of neuroprotection may be the release of neurotrophic factors by regenerative Schwann cells from the distal stump to guide cone growth (MCKAY HART et al., 2002).

In this experiment, microsurgical neurorrhaphy was performed in both groups immediately after axotomy, attempting to establish the first strategy of neuroprotection.

For pharmacological neuroprotection, monosialoganglioside (GM1) was used. It is an antineurotoxic, anti-inflammatory agent, essential in neuronal excitability of myelinated and non-myelinated fibers. Although there is no consensus in the literature, it has been used in several clinical studies of patients with spinal cord injury. Its safety has been confirmed, with few complications and promising results, improving motor regeneration (DE SOUZA et al., 2013).

GM1 has a stimulatory effect on neurite growth, preventing nerve cell degeneration of the central nervous system. In addition, it mimics or is synergistic with neurotrophic factors, potentiating their actions. Experimental trials in rats show that GM1 protects retinal ganglion cells from cell death after optic nerve axotomy. In this case, cell death occurs by neurotrophin deprivation (CHOI; KIM; JOO, 2003)

Nerve growth factor is connected to gangliosides, preferentially to GM1 and induces sprouting of dorsal root ganglia in studies conducted in chick embryos. When anti-GM1 antibody is added, this action is inhibited. Gangliosides are molecules associated with the cell membrane that act synergistically with the nerve growth factor. These molecules have a major role in several cellular events, e.g. differentiation, growth and regeneration, which are important to the survival and maturation of neurons (SCHWARTZ; SPIRMAN, 1982) (HUANG et al., 2010).

GM1 was administered by the intraperitoneal route. It has better diffusion in the organism, is easier to perform and offers the least risk to the researcher (CONSTANTINI, SHLOMO, 1994). Intraperitoneal administration is the most widely used route in research studies of spinal cord injuries. Studies using intraperitoneal GM1 for the investigation of peripheral nerves have not been found. Adverse reactions at the level of the nerve were not observed. These reactions were reported in local GM1 application with the use of conductors. There were no complications related to the route of administration such as peritonitis, which was been reported in studies using GM1 for animals with traumatic spinal cord injury (COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, 2009). In all operated animals, scarring occurred in a satisfactory manner both in the surgical wound and median nerve.

In this study, which strictly complied with the norms of biomedical research, Wistar rats were used. These animals are characterized by their small size, homogeneous nature, easy to manage, and with a short reproductive cycle. In addition, these rats are the most widely used species for research of nerve regeneration (URABE et al., 1995)(REID et al., 2009)(CARVALHO; BARROS FILHO; TEBET, 2008)(DE MEDINACELI, 1995)(ANGIUS et al., 2012). Assessment of nerve injury regeneration in experimental conditions is performed mainly through techniques of morphometry, histology and electrophysiology, and it is very difficult to perform functional tests in animals (DE MEDINACELI, 1995)(BERTELLI; MIRA, 1995).

The majority of experimental studies that evaluate peripheral nerve regeneration use the rat sciatic nerve to create a model of injury. For functional assessment, these studies employ a methodology by De Medinaceli, which analyzes the standard footprints of the animal and creates an Index of Sciatic Function. It permits the assessment of rat nerve regeneration, according to time (GOETTL, VIRGINIA M., NORTON H. NEFF, 2003)(ANGIUS et al., 2012). In addition, it allows the precise quantitative evaluation of functional regeneration of the sciatic nerve in animals submitted to different treatments, correlating the results obtained with histomorphometric studies. The method of functional evaluation by De Medinaceli, although reliable and reproducible, has difficulties in demarking the predetermined footprint parameters, especially those obtained in the first two weeks (MONTE-RASO et al., 2008), with limitations concerning the accurate evaluation of animal recovery (VAREJÃO et al., 2001). With the use of the rat sciatic nerve, the limb is anesthetized, motivating the animal to bite and cause injuries and amputations of the fingers and even the entire limb (BERTELLI; MIRA, 1995).

In this experiment, the median nerve was chosen, because its injury causes less mutilation. It does not provoke contractures in the animal, permitting motor and functional evaluation. It is situated at a small distance from the target organs, thus it

requires less time for functional regeneration than the hind limbs (BERTELLI; MIRA, 1995)(BONTIOTI; KANJE; DAHLIN, 2003). The rat median nerve is responsible for digital grasping function and is the only nerve responsible for innervation of the digital flexor muscles (BERTELLI et al., 1995). It was previously thought that the ulnar nerve also contributed to digital flexion in the rat (GREENE, 1935). Another advantage in using the median nerve is that surgical access is easier, with location immediately below the skin. No muscle section is required to reach the nerve. In addition, it measures about 1 mm in diameter, allowing adequate nerve manipulation. Since the median nerve of the rat is the sole nerve responsible for digital flexion, it can be easily approached by the grasping test, permitting the study of normal motor function, functional regeneration after injury and also assess the effects of drugs used to improve regeneration of peripheral nerve injuries, such as GM1, used in this study. The grasping test for functional evaluation of the median nerve is a non-invasive procedure that is easy to perform. It indicates the exact day of the beginning of recovery and its improvement over time (BERTELLI; MIRA, 1995; BERTELLI et al., 1995)(PAPALIA et al., 2003). It is a feasible and reproducible method that produces reliable results in the study of nerve regeneration. There is no need of complicated or expensive devices for its performance and its application can take place in any animal house or laboratory with limited resources.

After the animals in this study were submitted to the grasping test every week during six weeks, it was observed that none of the rats in group I (receiving a 5-mm resection and no treatment) recovered grasping function during the observation period. This reaffirms that only the median nerve is responsible for digital flexion, since the ulnar nerve was preserved in all research animals (BERTELLI et al., 1995). In a study by Bertelli & Mira (1995), rats undergoing median nerve resection did not recover active flexion and those sustaining crush injuries started to recover flexion eight days after injury. In the fourth week, they had already achieved digital flexion values that were close to normal.

In this experiment, the groups that received treatment: group II (conventional microsurgical neurorrhaphy) and group III (microsurgical neurorrhaphy and GM1 application) recovered nerve function over the six- week observation period. Through statistical evaluation, it was neither possible to ensure normality of strength distribution nor reject equality of variances. However, with nonparametric tests, differences between groups were noticed. Values of median strength applied by group III were greater than those in group II. This demonstrated that nerve regeneration of the group using GM1 was more effective, showing results closer to those of the control group (group 0, which did not undergo surgery). The majority of group III animals started digital grasping with the operated limb earlier than group II animals. Furthermore, group III animals had a greater median grasping strength.

Research remains open, but it became clear that the use of GM1 had a positive influence on rat median nerve regeneration. Thus, with an error lower than 5%, it can be stated that group III had a better performance in functional regeneration than group II.

Conclusion

With an error of less than 5%, it can be stated that groups II and III showed differences in functional regeneration. Group III, treated with GM1, reacted better to the grasping test.

References

ABE, N.; CAVALLI, V. Nerve injury signalling. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 18, n. 3, p. 276–283, 2009.

ANGIUS, D. et al. **A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds** **Biomaterials**, 2012.

BERTELLI, J. A. et al. The rat brachial plexus and its terminal branches: an experimental model for the study of peripheral nerve regeneration. **Microsurgery**, v. 16, n. 2, p. 77–85, jan. 1995.

BERTELLI, J. A.; GHIZONI, M. F. **Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction**. **Microsurgery**, 2006.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, p. 151–155, 1995.

BONTIOTI, E. N.; KANJE, M.; DAHLIN, L. B. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. **Journal of the peripheral nervous system : JPNS**, v. 8, p. 159–168, 2003.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical focus**, v. 16, n. 5, p. E1, 15 maio 2004.

CARVALHO, M. O. P.; BARROS FILHO, T. E. P. DE; TEBET, M. A. Effects of methylprednisolone and ganglioside GM-1 on a spinal lesion: a functional analysis. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 63, n. 3, p. 375–380, 2008.

CHENTANEZ, V. et al. Ganglioside GM1 (porcine) ameliorates paclitaxel-induced neuropathy in rats. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet**, v. 92, p. 50–57, 2009.

CHOI, J.-S.; KIM, J.-A.; JOO, C.-K. Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 44, p. 1747–1752, 2003.

CONSTANTINI, SHLOMO, AND W. Y. " 97-111. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. **Journal of neurosurgery**, v. 80, n. 1, p. 97–111, 1994.

COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, M. Tubo de Ácido Poliglicólico e GM1 na Regeneração de Nervos Periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 17, p. 286–290, 2009.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, p. 29–37, 1995.

DE SOUZA, F. I. et al. Transdermal monosialoganglioside with laser in the treatment of spinal cord lesion in rats. **Acta ortopedica brasileira**, v. 21, n. 2, p. 87–91, jan. 2013.

FH, G.; FC, D.; WP, C. GM1 gangliosides in the treatment of spinal cord injury: report of preliminary data analysis. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 50, p. 515–521, 1990.

GILLESPIE, L. N. Regulation of axonal growth and guidance by the neurotrophin family of neurotrophic factors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 10, p. 724–733, out. 2003.

GLAUS, S. W.; JOHNSON, P. J.; MACKINNON, S. E. **Clinical Strategies to Enhance Nerve Regeneration in Composite Tissue Allotransplantation** Hand Clinics, 2011.

GOETTL, VIRGINIA M., NORTON H. NEFF, AND M. H. Sciatic nerve axotomy in aged rats: response of motoneurons and the effect of GM1 ganglioside treatment. **Brain Research** 968.1 (: ., v. 968, n. 1, p. 44–53, 2003.

GREENE, E. C. **Anatomy of the rat**. [s.l.] American Philosophical Society, 1935. p. 47–50

HADJICONSTANTINO, M.; NEFF, N. H. GM1 Ganglioside: In Vivo and In Vitro Trophic Actions on Central Neurotransmitter Systems. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 4, p. 1335–1345, 14 nov. 2002.

HUANG, F. et al. GM1 and nerve growth factor modulate mitochondrial membrane potential and neurofilament light mRNA expression in cultured dorsal root ganglion and spinal cord neurons during excitotoxic glutamate exposure. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 495–500, 2010.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. A review. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 58, p. 145–169, 1987.

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **The Journal of hand surgery**, v. 25, n. 3, p. 391–414, maio 2000.

LUNDBORG, G. Preface. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 17–19.

LUNDBORG, G.; LONGO, F. M.; VARON, S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. **Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 157–161, jan. 1982.

MARCON, R. M. et al. Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. **Spinal cord**, v. 48, p. 808–13, 2010.

MCKAY HART, A. et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. **Experimental brain research**, v. 142, n. 3, p. 308–18, mar. 2002.

MILLES, H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve grafting. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. Supplementum**, v. 19, p. 25–37, 1982.

MILLES, H. Peripheral Nerve Surgery Past, Present, and Future. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 40–50.

MONTE-RASO, V. V. et al. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? **Journal of neuroscience methods**, v. 170, p. 255–261, 2008.

PAPALIA, I. et al. On the use of the grasping test in the rat median nerve model: a re-appraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 127, n. 1, p. 43–47, jul. 2003.

QIAO, G.-F. et al. GM1 ganglioside contributes to retain the neuronal conduction and neuronal excitability in visceral and baroreceptor afferents. **Journal of neurochemistry**, v. 106, p. 1637–1645, 2008.

REID, A. J. et al. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. **Neuroscience research**, v. 65, p. 148–155, 2009.

REID, AJ; TEREINGUI, G; WIBERG, M; HART, A. Pharmacological Treatment as an Adjunct to Surgical Procedures in Nerve Injury. In: DAHLIN, LB; LEBLEBICIOGLU, G. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. 1. ed. Zurich: Palme Publications, 2013. p. 70–80.

SCHWARTZ, M.; SPIRMAN, N. Sprouting from chicken embryo dorsal root ganglia induced by nerve growth factor is specifically inhibited by affinity-purified antiganglioside antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 6080–6083, 1982.

SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, ET AL. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, p. 81–89, 2011.

SMITH, W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Laboratory animals**, v. 27, p. 30–39, 1993.

URABE, T. et al. Effects of delayed nerve repair on regeneration of rat sciatic nerve. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 9, p. 1–5, 1995.

VAREJÃO, A. S. et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of neuroscience methods**, v. 108, p. 1–9, 2001.

WIXSON, S. K. et al. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. **Laboratory animal science**, v. 37, p. 736–742, 1987.

YEGYANTS, S. et al. Traumatic peripheral nerve injury: a wartime review. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 21, p. 998–1001, 2010.

FIGURES:

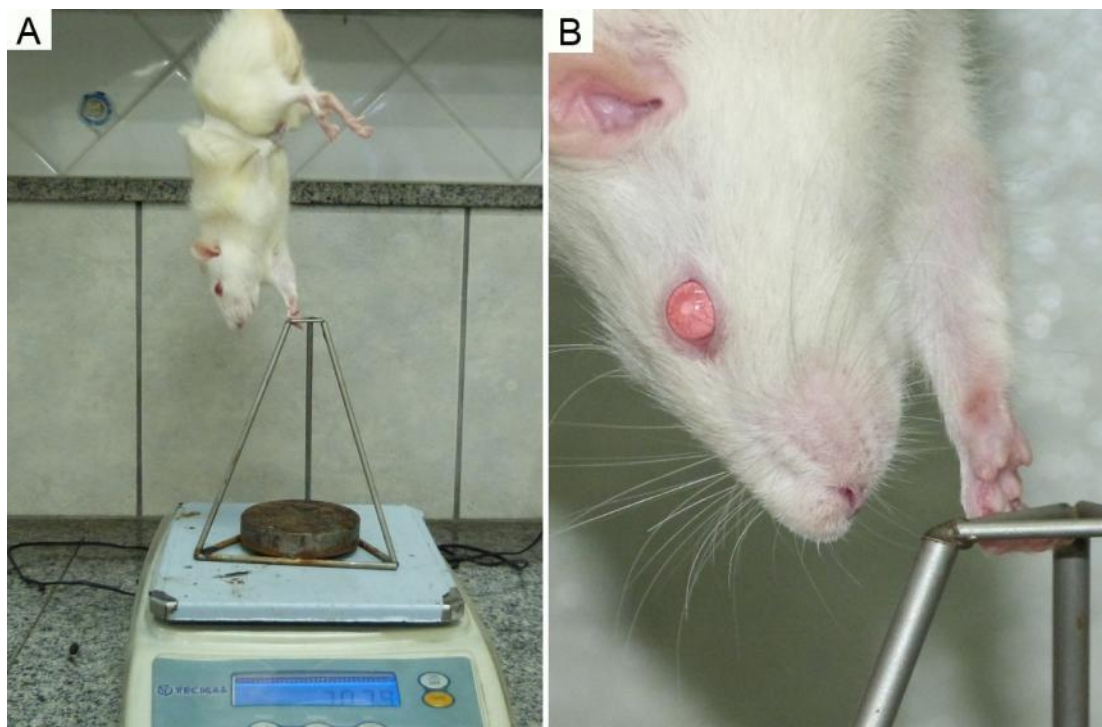


Figure 1: Wistar rat submitted to the grasping test (A); focus in the active flexion of the fingers (function of the median nerve) holding the base of the pyramid.

TABLES:

Table 1: Results of the Grasping Test performed in Group 1 (lesion only- no treatment)

Nº	1 st Immediate Post-operative evaluation	1 st Week	2 nd Week	3 rd Week	4 th Week	5 th Week	6 th Week
1	x	x	x	x	x	x	x
2	x	x	x	x	x	x	x
3	x	x	x	x	x	x	x
4	x	x	x	x	x	x	x
5	x	x	x	x	x	x	x
6	x	x	x	x	x	x	x
7	x	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x	x	x
9	x	x	x	x	x	x	x
10	x	x	x	x	x	x	x

The results observed in all cases (three attempts for each rat in each moment) were all null.

Table 2: Results of the Grasping Test performed in Group II (epineural microneurorrhaphy).

Nº	1 st Immediate Post-operative evaluation	1 st Week	2 nd Week	3 rd Week	4 th Week	5 th Week	6 th Week
1	x	x	x	x	x	x	54 63 85
2	x	x	x	x	x	98 4 32	48 84 98
3	x	x	x	x	32 18 8	15 34 46	115 135 82
4	x	x	x	x	x	x	94 110 124
5	x	x	x	x	x	x	46 54 x
6	x	x	x	x	x	x	49 61 72
7	x	x	8 0 0	x	x	x	73 81 98
8	x	x	x	x	x	x	49 x x
9	x	x	8 7 5	x	x	x	60 75 109
10	x	x	x	3 0 0	x	x	78 120 88

Group II (the injury to the median nerve was treated with epineural simple suture)

The values in the table correspond to the effort done (values are in grams) for each animal in the three attempts under observation. Value x corresponds to absence of strength in the three attempts.

Table 3: Results of the Grasping Test of Group III (epineural microneurorrhaphy plus intraperitoneal administration of GM1)

Nº	1 st Immediate Post-operative evaluation	1 st Week	2 nd Week	3 rd Week	4 th Week	5 th Week	6 th Week
1	x	8 11 15	14 21 x	x	x	50 54 5	109 183 164
2	x	3 5 x	x	x	44 35 51	56 11 42	116 95 62
3	x	x	x	x	71 51 55	4 4 15	79 112 131
4	x	x 2 3	2 x x	x	4 27 62	77 x 25	147 66 115
5	x	x	x	x	82 90 46	35 8 61	115 125 94
6	x	x	x	x	x	16 22 19	153 113 73
7	x	x	x	x	x	x	23 53 x
8	x	x	x	3 3 x	69 x x	108 109 100	178 126 76
9	x	x	4 8 5	x	36 55 83	35 50 41	156 118 184
10	x	x 9 7	x	x	x	49 17 84	165 156 113
11	x	8 9 10	15 6 x	9 8 4	43 29 34	18 32 41	14 53 123
12	x	6 6 2	6 x x	19 22 3	45 78 30	52 24 20	41 54 120

Group III in which injury to the median nerve was treated with epineurial suture associated with GM1.

The values in the table correspond to the effort done (values are in grams) for each animal in the three attempts under observation. Value x corresponds to absence of strength in the three attempts.

Table 4: Distribution of the results of the three attempts of the Grasping Test of groups 0, II and III in the 6th week (in grams)

Group 0 Preoperative	Group II Sixth Week	Group III Sixth Week
31	0	0
48	0	14
76	0	23
77	46	41
78	48	53
81	49	53
84	49	54
88	54	62
98	54	66
111	60	73
115	61	76
118	63	79
119	72	94
122	73	95
126	75	109
129	78	112
137	81	113
141	82	113
156	84	115
164	85	115
167	88	116
173	94	118
177	98	120
178	98	123
195	109	125
203	110	126
218	115	131
221	120	147
221	124	153
229	135	156
		156
		164
		165
		178
		183
		184

Table 5: Shapiro-Wilk Test to test the normalcy of the distributions

Group	Obs	W	V	z	Prob>z
0	30	0.96657	1.062	0.125	0.45016
II	30	0.96191	1.211	0.396	0.34622
III	36	0.96705	1.202	0.384	0.35045

Table 6: Kruskal-Wallis Test for equality of populations

Group	Obs	Sum of Ranks
0	30	1914.50
II	30	935.50
III	36	1806.00

p-Value = 0.0001

Table 7: Wilcoxon rank-sum(Mann-Whitney) for Groups II and III.

Group	Obs	Rank sum	expected
II	30	779.5	1005
III	36	1431.5	1206
combined	66	2211	2211

p-Value = 0.0037

Probability {Grasping(Group III)>Grasping(Group II)}=0.709

The probability of the result of the grasping test conducted in an animal removed from group III be greater than the result of the grasping test conducted in an animal taken from group II is 70.9%.

Table 8: Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test for Groups 0 and III.

Group	Obs	Rank sum	expected
0	30	1170.5	1005
III	36	1040.5	1206
combined	66	2211	2211

p-Value = 0.0330

Probability {Grasping(Group 0)>Grasping(Group III)}=0.653

The probability of the result of the grasping test conducted in an animal removed from group 0 be greater than the result of the grasping test conducted in an animal taken from group III is 65.3%.

Results of ANOVA Test one way with Bonferroni correction for results of the Grasping Test applied to groups 0 (preoperative) and II and III (sixth week)

Table 9: Descriptive Statistics

Group	Average	Standard Deviation	Freq.
0	136.03	54.30	30
II	73.50	34.77	30
III	105.69	48.11	36
Total	105.11	52.34	96

Table 10: Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	58675.634	2	29337.817	13.54	0.0000
Within groups	201556.106	93	2167.26995		
Total	260231.74	95	2739.28147		

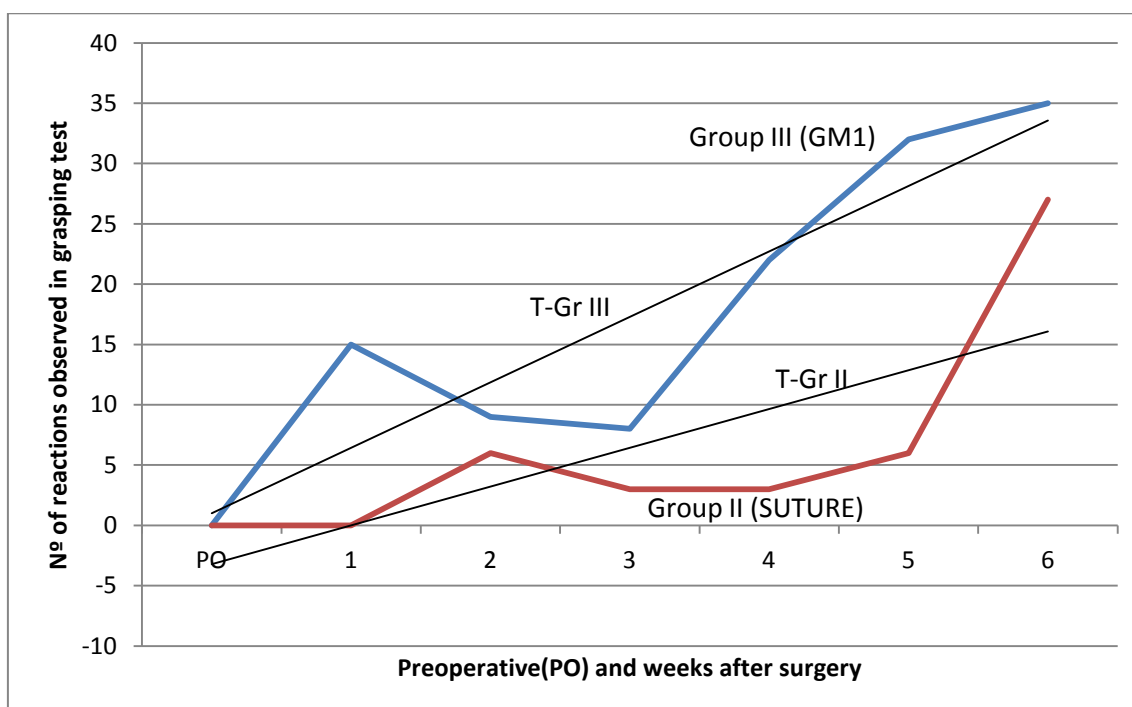
Bartlett's test for equality of variances: p = 0.060

Table 11: Comparison by Group with Bonferroni correction

	Group 0	Group II
Group II	-62.5333	
p-value	0.000	
Group III	-30.3389	32.1944
p-value	0.029	0.019

GRAPHICS:

Graphic 1: Number of reactions of rats in Groups II and III in the Grasping Test



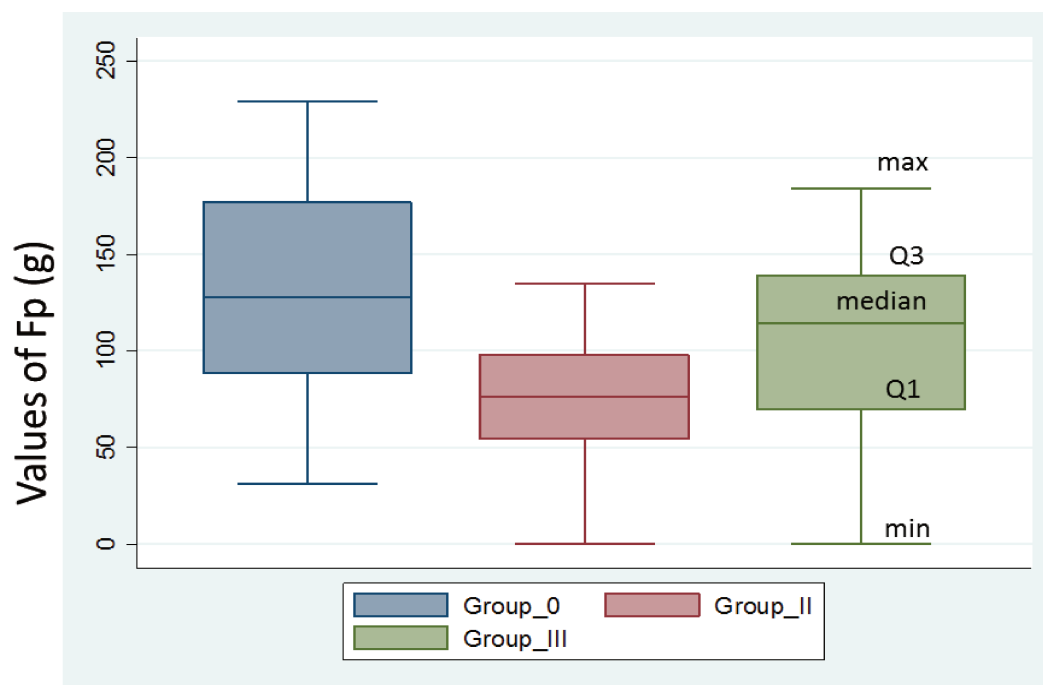
Group II (suture) - Number of reactions of rats in groups II in the grasping tests

Group III (GM1) - Number of reactions of rats in groups III in the grasping tests

(T Gr-II) – Tendency line of the time series formed by the points of Group II (suture)

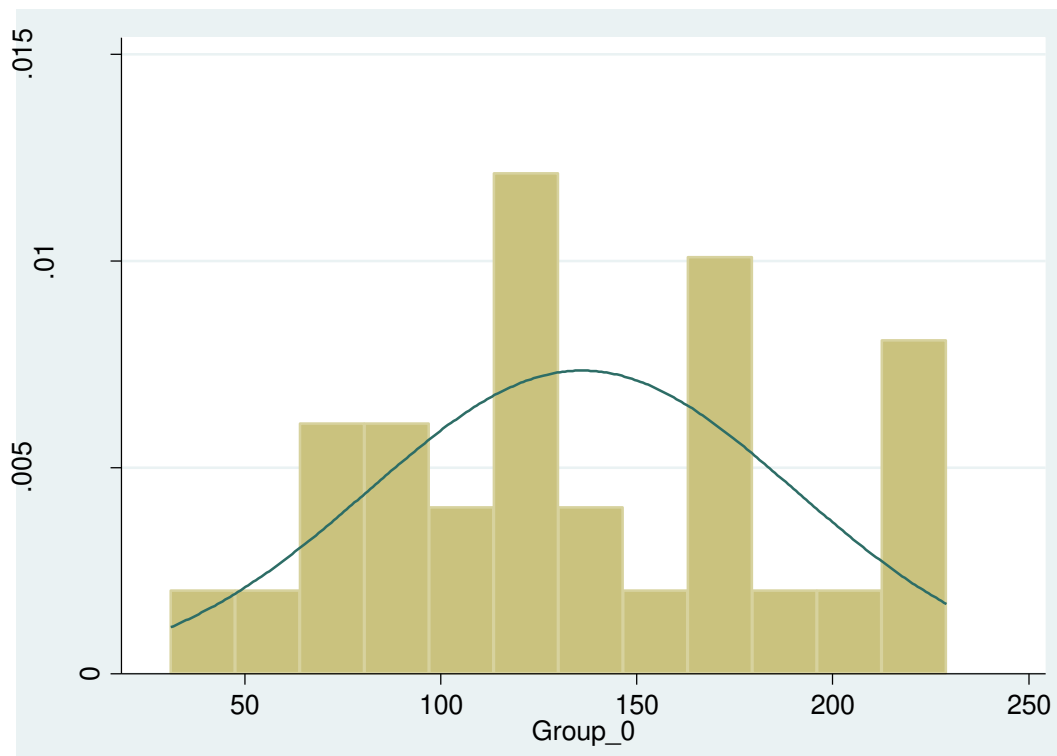
(T Gr-III) - Tendency line of the time series formed by the points of Group III (GM1)

Graphic 2: Box Plots of *Fp* distribution in Groups 0, II e II.

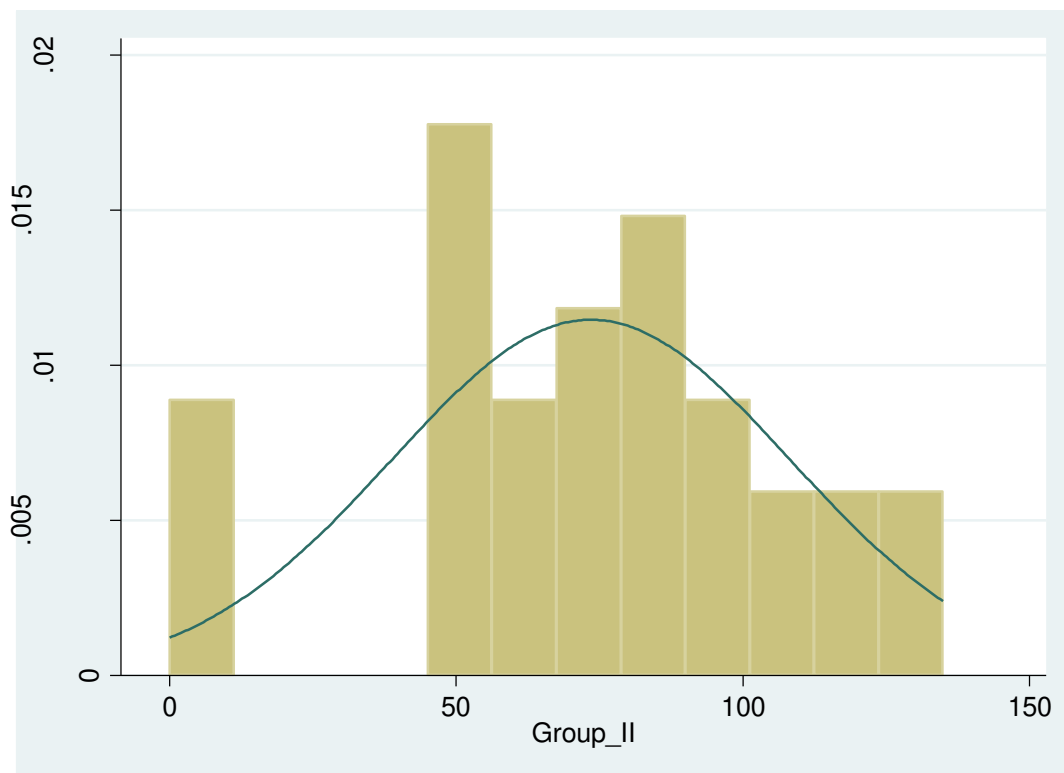


The box represents the interquartile range containing the median and 50% points distribution (interval between 3rd (Q3) and 1st (Q1) quartiles of the distributi.

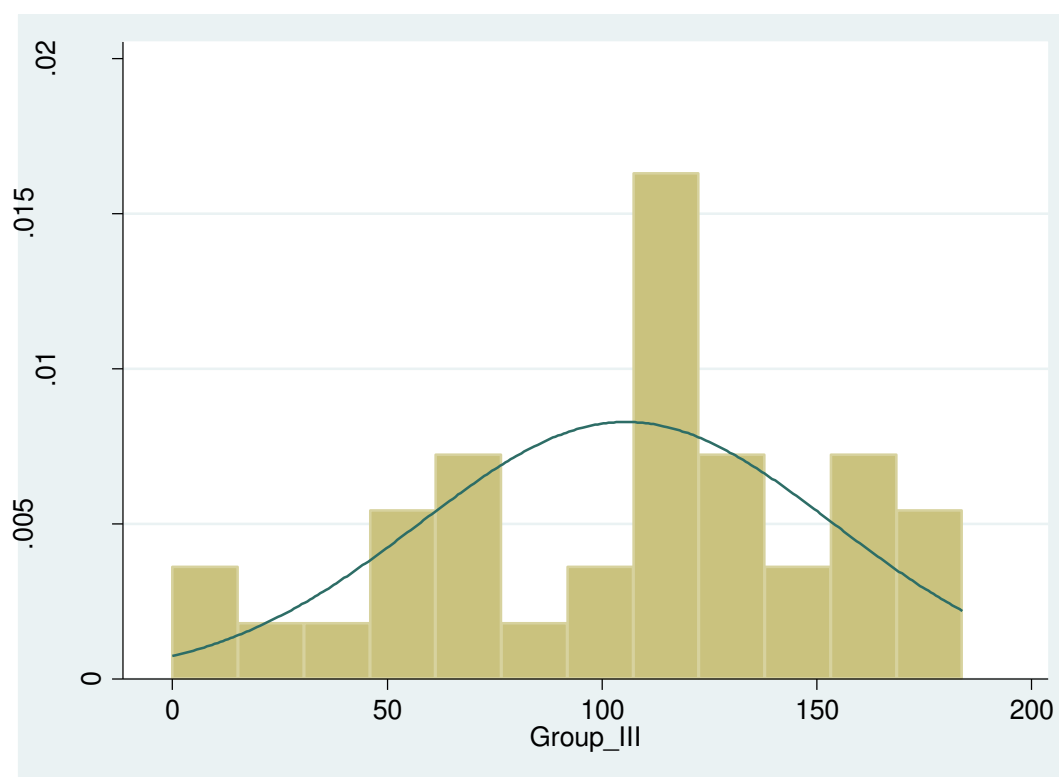
Gráfico 3: Histograma da distribuição de Fp no Grupo 0.



Graphic 4: Histogram of the distribution of Fp in Group II



Graphic 5: Histogram of the distribution of Fp in Group III



ARTIGO 2
***“Histomorphometric Evaluation of Median Nerve Lesion in Wistar
Rats Treated with GM1”***

Authors:

Osvaldo Mendes de Oliveira Filho (Oliveira Filho, OM)*
Márcia dos Santos Rizzo (Rizzo, MS)*
Antônio César Almeida de Oliveira (de Oliveira, ACA)*
Gustavo Bispo dos Santos (dos Santos, GB)**
William Dias Belangero (Belangero,WD)***

Universidade Federal do Piauí *
Department of Specialized Medicine-Experimental Surgery Sector

Universidade de São Paulo (USP) **
Microsurgery Department

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)***
Department of Orthopaedics and Traumatology

Adress:

Av. Mal. Castelo Branco, 611/402
Teresina-Piauí
CEP 64000-810
Brazil
E-mail: osvaldomendes@me.com

“Histomorphometric Evaluation of Median Nerve Injury in Wistar Rats Treated with GM1”

Abstract

The great challenge of peripheral nerve repair today is finding the pharmacological agent that combined with microsurgical technique may promote axonal regeneration for functional nerve recovery. In this study, monosialoganglioside (GM1), a neuroprotector that potentiates neurotrophic factors in peripheral nerve injury, was evaluated. Twenty-two male Wistar rats suffered microsurgical median nerve damage. Rats were further subdivided into two experimental groups: Group I (10 animals) treated with external epineurial neurorrhaphy and Group II (12 animals) treated with epineurial neurorrhaphy combined with intraperitoneal GM1. After histologic analysis, morphometric evaluation counted the number and diameter of axons in the proximal and distal nerve stumps. Microscopic analysis containing distal stumps revealed that Group II animals had more regenerated axons with slightly thicker myelin sheath than Group I animals and had a more homogeneous and organized regeneration pattern, with a looser endoneurium in the central nerve fiber. Traditional axonal regeneration index, obtained by axon counting in both segments was added to the diameter of axonal myelin layer. A significant difference ($p=0.0056$) in mean axonal diameter of the distal segment was observed. Group II had larger and more axons (28%) than Group I. Since nerve regeneration depends upon the association between the number of regenerated axons and myelin sheath diameter, data indicates that Group II is more highly myelinated than Group I. There is strong evidence ($p=0.0536$) that GM1 used as an adjuvant in peripheral nerve surgery improves axonal regeneration pattern.

Keywords: GM1, median nerve, axonal regeneration, morphometry, rats.

Introduction

Traumatic injuries to the peripheral nerves are increasingly common and prevalent, due to occupational accidents, in addition to motor vehicle accidents causing perforation, penetration, crush, compression and ischemic lesions. Despite the increased frequency of these lesions, definitive diagnosis of axonal injury is still challenging, owing to time elapsed from injury to patient evaluation. This often leads to a delay in initiating the most appropriate treatment for each case (CAMPBELL, 2008)(SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, 2011).

Peripheral nerve injuries differ from lesions in other tissues, since they cause functional and structural alterations not only at the injury site but also in the target organs and cerebral cortex. Both the central and peripheral nervous systems are functionally integrated regarding consequences due to neuronal injury, resulting in profound and prolonged modification, as well as central reorganization. Because the mechanisms of plasticity and reorganization of the spinal and cerebral circuits related to axotomized peripheral neurons are complex, beneficial or unfavorable adaptive functional alterations may occur. These changes are dependent on the efficiency of the regenerative process, interfering with patient clinical course (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007); (LUNDBORG, 2013).

Once the surgeon understands the complex biochemical processes that occur after injury, alterations at target organ level after denervation and axonal degeneration in the distal part of the lesion, he or she may comprehend that microsurgical techniques alone are not sufficient for a complete and effective treatment of peripheral nerve injuries. Knowledge of anatomy is still required to solidify the pathophysiological concepts involved in the clinical management of patients with peripheral nerve injury (CAMPBELL, 2008); (LUNDBORG, 2013).

Axonal regeneration occurs in the direction of peripheral target organs. Regeneration requires the activation of several cell elements, starting at the distal nerve end (GEUNA, STEFANO; HAASTERT-TALINI, KIRSTEN; NAVARRO, 2013). Although rupture of the injured axon interferes with retrograde influx signaling, calcium influx and exposure of the distal ends of the damaged axon to local inflammatory microenvironment propitious for degenerative process may synergistically activate axonal regeneration from the proximal nerve stump. In peripheral nerve injury, either in crush injuries or axotomy, Wallerian degeneration of the distal nerve stump is known to occur, with removal and recycling of myelin fragments by macrophages and Schwann cells (CHEN; YU; STRICKLAND, 2007); (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007)(GLAUS; JOHNSON; MACKINNON, 2011).

Immediately after neuronal injury, rapid signaling indicating cell injury is followed by induction of transcription factors, adhesion molecules, proteins associated with growth and structural components necessary for axonal prolongation, at the same time when Schwann cells go through undifferentiation and proliferation. Molecular changes are accompanied by alterations in cell organization, such as the appearance of growth cones, beginning at the proximal nerve stump of the damaged axon, tumefaction of neuronal cell body associated with intense increase in cellular metabolism and protein synthesis, increased dispersion of Nissl bodies within the cytoplasm, also termed chromatolysis. As soon as Schwann cells establish contact with the growing axon, these cells initiate a process of remyelination within eight days of nerve injury. Thus, the functional significance of axonal regeneration is replacement of the lost nerve segment during the degenerative process, allowing reinnervation of target organs and restoration of corresponding function (CHEN; YU; STRICKLAND, 2007); (NAVARRO; VIVÓ; VALERO-CABRÉ, 2007); (RAIVICH; MAKWANA, 2007); (RAIVICH, 2011).

Several studies using drugs to improve potential neurologic recovery in patients with traumatic spinal cord injury have been conducted, minimizing the secondary effects of this type of lesion. The clinical use of factors that aid in the regeneration of peripheral nerve injury may be exemplified by the use of monosialoganglioside (GM1), a neuroprotective, antineurotoxic and anti-inflammatory agent that has paramount importance for the excitability of myelinated and non-myelinated fibers. It has a major role in the promotion of growth, differentiation and neuronal maturation (CARVALHO; BARROS FILHO; TEBET, 2008); (DE SOUZA et al., 2013).

It has been demonstrated that GM1 has an affinity for nerve growth factor (NGF), which has a major role in nerve sprouting. In vitro studies showed that NGF action was inhibited in around 70% of cases when an anti-GM1 antibody was associated. However, when using GM2 that has a homologous structure to GM1, the inhibition of NGF action only occurred in about 25%(SCHWARTZ; SPIRMAN, 1982).

Nerve growth factor (NGF) is depleted in the skin of patients with diabetic peripheral neuropathy. A decrease in NGF affects the survival of small-diameter sensory nerve fibers. The degeneration of these fibers is related to the majority of symptoms that compromise quality of life in these patients. The use of GM1 potentiates the action of NGF. In these cases, there is improvement in paresthesia and electrophysiologic parameters, with protection against peripheral nerve dysfunction in hyperglycemic animals (KAKINOKI et al., 2006).

After axonal injury, the nerve cell goes through apoptosis, owing to a decreased supply of neurotrophic factors. GM1 exerts neuritogenic and neuroprotective action,

preventing cell degeneration. Two weeks after axotomy of the optic nerve, there is loss of 75 % of retinal cells. In contrast, when GM1 is added there is a 56% loss of retinal cells, demonstrating a protective effect on retinal ganglion cells after optic nerve injury (CHOI; KIM; JOO, 2003).

The aim of this study was to compare the morphologic alterations between traditional neurorrhaphy and neurorrhaphy combined with intraperitoneal administration of GM1 after median nerve injury of Wistar rats, using histomorphometric analysis.

Material and Method

Experimental Design and Ethical Principles

This research study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the *Universidade Federal do Piauí* (CEEa/UFPI), registered under number 093/12.

After anesthetic procedure, the animals used in this study underwent microsurgical technique for median nerve section about 5 mm proximally to the medial epicondyle of the humerus in the right forelimb. Subsequently, the animals were divided into two treatment groups: one group underwent neurorrhaphy and another underwent neurorrhaphy combined with GM1 therapy. Evaluation of the regenerative process of the injured nerve consisted in comparing both groups by histomorphometric analysis.

Animals and Anesthetic Procedure

Twenty-two (22) Wistar male rats were used, age ranging from 120 to 140 days and live weight ranging from 250g to 332g. The rats were kept in cages in groups of up to 5 animals, receiving food and water *ad libitum* until the end of the experiment.

Prior to the surgical act, the animals were anesthetized with intraperitoneal injection of sodium Pentobarbital (30 to 40mg/Kg). After induction, anesthesia was maintained with Xylazine (5 mg/kg) associated with Ketamine (80mg/kg) administered by the intramuscular route (SMITH, 1993)(WIXSON et al., 1987). Six weeks after surgical procedure, the animals were sacrificed with a lethal dose of sodium Pentobarbital (140mg/kg) by intraperitoneal injection (CLOSE et al., 1997). The animals were autopsied immediately after euthanasia. The median nerve was dissected and resected at its origin and sections were subsequently prepared for histologic procedures.

Surgical Procedure and Experimental Groups

Section of the median nerve in the right forelimb of all animals involved in the study was performed by microsurgical technique. Following anesthetic procedure, each rat was placed in the supine position. After shaving and cleansing the ventral axillary region of the right forelimb with povidone-iodine (Povidine®), a 3-cm longitudinal skin incision was made in the axillary region with median nerve dissection. The nerve was then cross-sectioned proximally at a distance of about 5 mm from the medial epicondyle of the humerus. Nerve repair was performed immediately after injury, using end-to-end neurorrhaphy technique. The animals were then subdivided into two groups.

In Group I (10 animals), primary epineurial microsurgical neurorrhaphy with 2 simple and equally distant stitches was performed with mononylon 9.0 (Ethicon®) under a magnification of x 5.5 with microsurgical loupe.

In group II (12 animals) a primary epineurial suture with mononylon 9.0 was also performed (Ethicon®), combined with intraperitoneal administration of GM1 (30 mg/Kg), kindly provided by the Department of Cell and Developmental Biology of the Institute of Biomedical Sciences of the *Universidade de São Paulo* (USP).

After nerve repair of all animals in the study, the surgical wound was sutured with mononylon 4.0. Every six hours after the surgical procedure, analgesia with deep intramuscular injection of Tramadol (6.0mg/kg) was administered during 24h. In the immediate postoperative period, the rats received single-dose antibiotic prophylaxis by deep intramuscular injection of Penicillin G benzathine, Penicillin G procaine, Penicillin potassium, Erythromycin and Diclofenac sodium (Pensivet Plus). Daily follow-up lasted six weeks.

Histomorphometric analysis

Portions that were proximal and distal to nerve injury repair, identified by the presence of sutures, were sectioned and fixed in osmium tetroxide solution 2%. Subsequently, these sections were processed and prepared in historesin block. Ultra-thin nerve tissue samples measuring a maximum of five-microns in thickness were sectioned, using an electronic microtome (Leica RM 2055). Sections were the mounted in discarded slides (Erviagas) and stained with 1% toluidine blue. The glass slides used in the process previously received a silane bath to improve material adhesion to the surface of the slide. Slides with histologic sections of nervous tissue were analyzed under light microscopy (Olympus BX51) and two random fields of each nerve segment were photographed, with a magnification of x 40, in addition to 10X microscope ocular lens. Reading of the slides was performed in a simple blind fashion and the pathologist was blinded to the experimental groups.

Morphometric analyses were performed by software Sigma Scan Pro 5.0 to count the axons considered regenerated and measure axonal diameter in the proximal and distal nerve segments. For the number of regenerated axons in the distal segment and number of axons in the proximal segment, the formula related to the Index of Axonal Regeneration (IAR) was applied. The IAR formula consisted in counting the number of regenerated axons in the distal segment and counting the number of axons in the proximal segment. To measure the mean axonal diameter, the IAR2 index was applied. The IAR2 index is calculated by the ratio between the number of axons and mean diameter of the distal stump and the number of axons and mean diameter of the proximal nerve stump. This new index permits a different evaluation of IAR because it considers a new parameter. When compared to the IAR value, it may suggest a new form of assessment of axonal regeneration.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results obtained from numerical counting and measurement of the mean diameter of axons present in the proximal and distal nerve stumps considered the distribution of the following variables: number of axons in the proximal segment (NAprox); number of axons in the distal segment (NAdist); mean diameter of proximal segment axons (MDprox); mean diameter of distal axon stump (distMD); product NAprox x MDprox (NAMDprox); product NAdist x distMD (NAMDdist), IAR; IAR2. The IAR index means $NAdist/NAprox$ and the IAR2 index means $NAdist \times MDdist/NAprox \times MDprox$. In this manner, the distribution of variables between groups by box plot analysis and application of the Wilcoxon test for independent samples were also assessed.

Results

Qualitative histologic evaluation revealed that proximal nerve stumps, both in Group I (simple suture) and Group II (suture + GM1), showed a normal histologic pattern with highly myelinated axons that are circumscribed by epineurium, in addition to the presence of newly formed vessels (Figure A and C).

Microscopic analysis of slides containing the distal nerve stumps (Figure B) from Group I median nerves (simple suture) showed a greater number of newly formed vessels, in large part congested. In this group, a high number of reasonably myelinated axon fibers of varying diameters were also observed, showing a lack of homogeneity in myelin sheath thickness. Furthermore, a large number of fibers demonstrated the presence of vacuoli within the myelin sheath, typical of Wallerian degeneration. In this group, the endoneurial

stroma was denser and there were mononuclear inflammatory infiltrates with foam cells (Figure C). In some cases, we noticed a more intense and diffuse mononuclear inflammatory infiltrate, suggestive of earlier stages of the axonal regeneration process.

Concerning the histologic evaluation of axonal regeneration in Group II, a larger number of regenerated axons was observed. The majority had a slightly thicker myelin sheath, when compared to regenerating axons from Group I (Figure D). The pattern of axonal regeneration in Group II was homogeneous and organized, with a looser endoneurium in the central portion of the nerve fiber, while areas proximal to the perineurium were thicker. A scarce distribution of macrophages mainly located in the periphery of the fiber was shown (Figure D).

From analysis of data from NA variables NA (number of axons) of the proximal and distal segments, and MD (mean diameter) of axons from the proximal and distal segments, 2 indicators were considered:

1. The Index of Axonal Regeneration (IAR), given by the ratio between the number of axons identified in the distal segment and the number of axons identified in the proximal segment.
2. In addition, we also used the Index of Axonal Regeneration 2 (IAR2), created specifically for this study, to simultaneously represent the impact of variables between the number of axons and the mean axonal diameter. The index is calculated by the ratio between the product of the number of axons by the mean axonal diameter in the distal segment, and the product of the number of axons by the mean axonal diameter in the proximal segment.

Use of IAR2 is justified by the assumption that axonal regeneration may be confirmed not only by comparing the number of axons in the proximal and distal nerve stumps, but also the mean axonal diameters.

In this study, a nonparametric test was chosen (Wilcoxon rank sum test) because sample dimension was smaller than 30 points for both experimental groups.

Data obtained with the use of IAR and IAR2 indexes for measurements recorded for groups receiving different treatments are shown, as follows:

In Table 1 the absolute values of the number and diameter (μm) of axons in the proximal and distal segments of median nerves from animals in both groups were confirmed. In addition, two indicators of axonal regeneration were obtained (IAR and IAR2) for each animal belonging to Groups I and II.

In graph 2, a Box Plot with IAR distribution for Groups I and II is shown. Graph 3 shows a Box Plot with IAR2 distribution for the same experimental groups. Although a difference between means in groups I and II was demonstrated in graphs 1 and 2, the null hypothesis could not be rejected (Mean GI equal to Mean GII), since the means (IAR and IAR2) of each group are contained in interquartile range obtained for the mean of the other group.

Since Box Plot analysis of the mean values of IAR and IAR2 indexes for Groups I and II did not permit us to reject the null hypothesis, the Wilcoxon test was chosen (rank sum test for independent samples), for each variable considered in the study. The results of test application are described in Table 2.

Results shown in Table 3 permit us to reject H0 regarding tests performed for the variables: DMDistal and NADMDistal, meaning that there is a difference between Groups I and II when compared to mean diameters of axons found in the distal stumps of animals observed. Although it cannot be affirmed, with an error < 5% that IAR II index is higher in Group II rats than in Group I animals, a p value=0.0536 indicates that there is a strong probability of a difference between experimental groups. This was demonstrated by the occurrence of biologic phenomenon, suggesting that the experiment is important and requires replication in the future, to confirm improved performance in the process of axonal regeneration.

Discussion

Microsurgical technique using completely tension-free sutures and extremities of nerve stumps prepared with interfascicular dissection for an adequate approximation of fascicles between injured limbs is still the gold standard in the treatment of peripheral nerve injuries. However, the new paradigm in the treatment of these lesions is the use of pharmacologic agents that may contribute to axonal regeneration (MILLES, 1982, 1985, 2013).

Diverse substances known as neurotrophic factors have been used in *in vivo* and *in vitro* research studies. The use of these substances aids in peripheral nerve regeneration. These polypeptides are able to promote tissue repair and functional recovery (SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, 2011). When axonal injury occurs, the neuron goes through apoptosis due to a reduction in neurotrophic factors. At this stage, a window of opportunity for the promotion of neuroprotection emerges. It has been observed that various substances can contribute to a decrease in neuronal death, improving nerve regeneration (REID et al., 2009).

In this study, monosialoganglioside, one of the main glycosphingolipids in mammalian nervous tissue was used. Gangliosides are natural components of the cell membrane. Laboratory studies suggest that GM1 acts on neurite sprouting and growth, potentiating the action of neurotrophic factors. It also produces an increase in regenerated myelinated nerve fibers, particularly motor fibers, increasing blood flow when used in spinal injury (CARVALHO; BARROS FILHO; TEBET, 2008; FH; FC; WP, 1990; GEISLER; DORSEY; COLEMAN, 1991) (COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, 2009). Since GM1 is a natural component of cell membranes, it has no toxicity and costs less than neurotrophic factors. GM1 has shown affinity mainly for the nerve growth factor (NGF) and its mechanism of action is linked to protein activation that promotes *bcl-2* expression with anti-apoptotic action. Furthermore, GM1 promotes neuronal survival by activating the *Trk* family receptors which are receptors of neurotrophic factors (CHOI; KIM; JOO, 2003). In the current study, GM1 was applied intraperitoneally (IP) for the treatment of median nerve injuries. In the literature, there are no other reports of GM1 use by this route for management of peripheral nerve injury. However, there are studies using intraperitoneal GM1 for the treatment of spinal injuries and others applying GM1 locally in nerve conductors for treatment of sciatic nerve injuries (COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, 2009). Wistar rats were used in this experiment because of their small size, docility and easy management. These animals are widely used in experimental research (ANGIUS et al., 2012).

The median nerve was used because it is easier to approach than the sciatic nerve, due to its location immediately below the skin. No other muscle needs to be sectioned in order to find the median nerve. Furthermore, with a diameter of about 1 mm it has no ramifications in the arm. The median nerve alone is responsible for digital flexion, permitting evaluation of functional recovery by the grasping test (BERTELLI & MIRA, 1995) (PAPALIA et al., 2003).

After euthanasia, it was observed that there was adequate scarring of the median nerve in all animals. There were no cases of autophagia of the operated limb. Segments removed for histologic evaluation were fixed with osmium tetroxide solution 2% and slides were stained with 1% toluidine blue, allowing better evaluation of myelin regeneration (MATSUMOTO et al., 2000) (GEUNA et al., 2009).

In 40% of group I rats and 50% in group II rats, the number of axons observed was higher in the distal segment than in the proximal segment (Table 1). This phenomenon has also been reported in other studies (GORIO et al., 1983; LUNDBORG, 1987) and is due to the excessive number of nerve sprouts that invade the bands of Bungner in the distal segment. That is why the number of nerve fibers detected in the distal stump surpasses

the number of fibers in the proximal segment. However, at a later stage, only axonal branches that reach the appropriate target organ will survive and proceed to the maturation phase. In contrast, others that do not reach the target organs will be cut away, a phenomenon known as synaptic repression (GEUNA et al., 2009)(GLAUS; JOHNSON; MACKINNON, 2011). The greater number of fibers in the distal segment compared to the proximal segment after nerve repair is considered a favorable sign. However, there is no correlation with the level of motor regeneration (DE MEDINACELI, 1995). It is most likely that improved conduction of nerve impulse in the distal stump is related to neurite diameter and thickness of the myelin layer. Myelination occurs only in axons larger than 1.5 μm in diameter and myelin layer thickness is proportional to the size of the axon and conduction velocity of the nerve fiber. Thus, histologic conditions of neurites should be adequate for the transmission of nerve impulses and morphometry is an important tool for this evaluation (DE MEDINACELI, 1995).

The majority of studies investigating peripheral nerve regeneration use the sciatic nerve as a model. For morphometric evaluation, photographs with objective lens are taken for adequate magnification of random fields of the proximal and distal stumps, in addition to amplification produced by microscope ocular lens (ANGIUS et al., 2012). Software was used to count axons in both segments from the photographs obtained. From the number of axons, a regeneration index was calculated. The regeneration index consisted in the ratio between the number of axons in the distal segment and the number of axons in the proximal segment.

Given that analysis of axonal regeneration is important for the number of regenerated axons and axonal diameter, an indicator was created in this study considering both variables: number and diameter of axons (IAR2).

Initially, the results were analyzed and shown in Tables, through the Index of Axonal Regeneration (IAR) which considers the relation between the number of axons regenerated in the distal segment and the number of axons present in the proximal segment. After applying the Wilcoxon test for evaluation of this index, we obtained a result that did not permits us to reject the null hypothesis predicting that MeanIAR from Group I and Group II are equal. Similarly, regarding Box Plots with distribution from groups I and II for Axonal Regeneration (IAR) and (IAR 2) Index, it was observed that despite the difference between means with better results for group II, the null hypothesis could not be rejected, since the mean in one group was contained in the interquartile range obtained for the mean in the other group.

In this study, histologic analysis of the lesion after six weeks showed a different pattern between the groups evaluated. Group II had a greater number of regenerated

axons (28%), which were more organized and homogeneous than Group I axons. Group II also showed a slightly thicker myelin sheath. There was a significant difference ($p=0.0056$) in mean axonal diameter in the distal segment that was greater in Group II. In this study, surgery was performed immediately after axotomy using adequate microsurgical technique that is also considered a neuroprotective factor, in comparison to delayed surgery where the rate of neuronal death is higher (MCKAY HART et al., 2002). Six weeks after surgery, neuronal loss was 20.8% in Group I and 8.9% in Group II.

By the IAR2 Index, the p-value obtained in the Wilcoxon test was 5.36%, allowing us to affirm that there is strong evidence that results in Group II are not equal to Group I results. This reinforces the concept that the use of GM1 in the treatment of peripheral nerve injuries in rats contributed to improved axonal regeneration, as observed in histologic evaluation.

Conclusion

The histologic pattern in group treated with GM1 had a higher degree of myelination and it was observed that mean axonal diameter was larger in distal nerve stumps ($p=0.0056$).

There is strong evidence ($p=0.0536$) that use of GM1 in peripheral nerve surgery improves the pattern of axonal regeneration.

References

ANGIUS, D. et al. **A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds** *Biomaterials*, 2012.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, p. 151–155, 1995.

CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951–65, set. 2008.

CARVALHO, M. O. P.; BARROS FILHO, T. E. P. DE; TEBET, M. A. Effects of methylprednisolone and ganglioside GM-1 on a spinal lesion: a functional analysis. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 63, n. 3, p. 375–380, 2008.

CHEN, Z.-L.; YU, W.-M.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 30, p. 209–33, jan. 2007.

CHOI, J.-S.; KIM, J.-A.; JOO, C.-K. Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 44, p. 1747–1752, 2003.

CLOSE, B. et al. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación. Parte 2. **Laboratory Animals**, v. 31, p. 1–32, 1997.

COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, M. Tubo de Ácido Poliglicólico e GM1 na Regeneração de Nervos Periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 17, p. 286–290, 2009.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, p. 29–37, 1995.

DE SOUZA, F. I. et al. Transdermal monosialoganglioside with laser in the treatment of spinal cord lesion in rats. **Acta ortopedica brasileira**, v. 21, n. 2, p. 87–91, jan. 2013.

FH, G.; FC, D.; WP, C. GM1 gangliosides in the treatment of spinal cord injury: report of preliminary data analysis. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 50, p. 515–521, 1990.

GEISLER, F. H.; DORSEY, F. C.; COLEMAN, W. P. Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. **The New England journal of medicine**, v. 324, n. 26, p. 1829–38, 27 jun. 1991.

GEUNA, S. et al. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. **International review of neurobiology**, v. 87, p. 27–46, jan. 2009.

GEUNA, STEFANO; HAASTERT-TALINI, KIRSTEN; NAVARRO, X. The Nerve Trunk in Injury and During Regeneration. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 51–61.

GLAUS, S. W.; JOHNSON, P. J.; MACKINNON, S. E. **Clinical Strategies to Enhance Nerve Regeneration in Composite Tissue Allotransplantation** *Hand Clinics*, 2011.

GORIO, A. et al. Muscle reinnervation—II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 403–IN1, mar. 1983.

KAKINOKI, B. et al. Orally active neurotrophin-enhancing agent protects against dysfunctions of the peripheral nerves in hyperglycemic animals. **Diabetes**, v. 55, p. 616–621, 2006.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. A review. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 58, p. 145–169, 1987.

LUNDBORG, G. Preface. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 17–19.

MATSUMOTO, K. et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)–collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. **Brain Research**, v. 868, n. 2, p. 315–328, jun. 2000.

MCKAY HART, A. et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. **Experimental brain research**, v. 142, n. 3, p. 308–18, mar. 2002.

MILLESI, H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve grafting. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. Supplementum**, v. 19, p. 25–37, 1982.

MILLESI, H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 2, p. 21–31, 1985.

MILLESI, H. Peripheral Nerve Surgery Past, Present, and Future. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 40–50.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in neurobiology**, v. 82, n. 4, p. 163–201, jul. 2007.

PAPALIA, I. et al. On the use of the grasping test in the rat median nerve model: a re-appraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 127, n. 1, p. 43–47, jul. 2003.

RAIVICH, G. Transcribing the path to neurological recovery-From early signals through transcription factors to downstream effectors of successful regeneration. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 193, n. 4, p. 248–58, jul. 2011.

RAIVICH, G.; MAKWANA, M. The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. **Brain research reviews**, v. 53, n. 2, p. 287–311, fev. 2007.

REID, A. J. et al. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. **Neuroscience research**, v. 65, p. 148–155, 2009.

REID, AJ; TEREINGUI, G; WIBERG, M; HART, A. Pharmacological Treatment as an Adjunct to Surgical Procedures in Nerve Injury. In: DAHLIN, LB; LEBLEBICIOGLU, G. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. 1. ed. Zurich: Palme Publications, 2013. p. 70–80.

SCHWARTZ, M.; SPIRMAN, N. Sprouting from chicken embryo dorsal root ganglia induced by nerve growth factor is specifically inhibited by affinity-purified antiganglioside antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 6080–6083, 1982.

SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, ET AL. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, p. 81–89, 2011.

SMITH, W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Laboratory animals**, v. 27, p. 30–39, 1993.

WIXSON, S. K. et al. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. **Laboratory animal science**, v. 37, p. 736–742, 1987.

FIGURES:

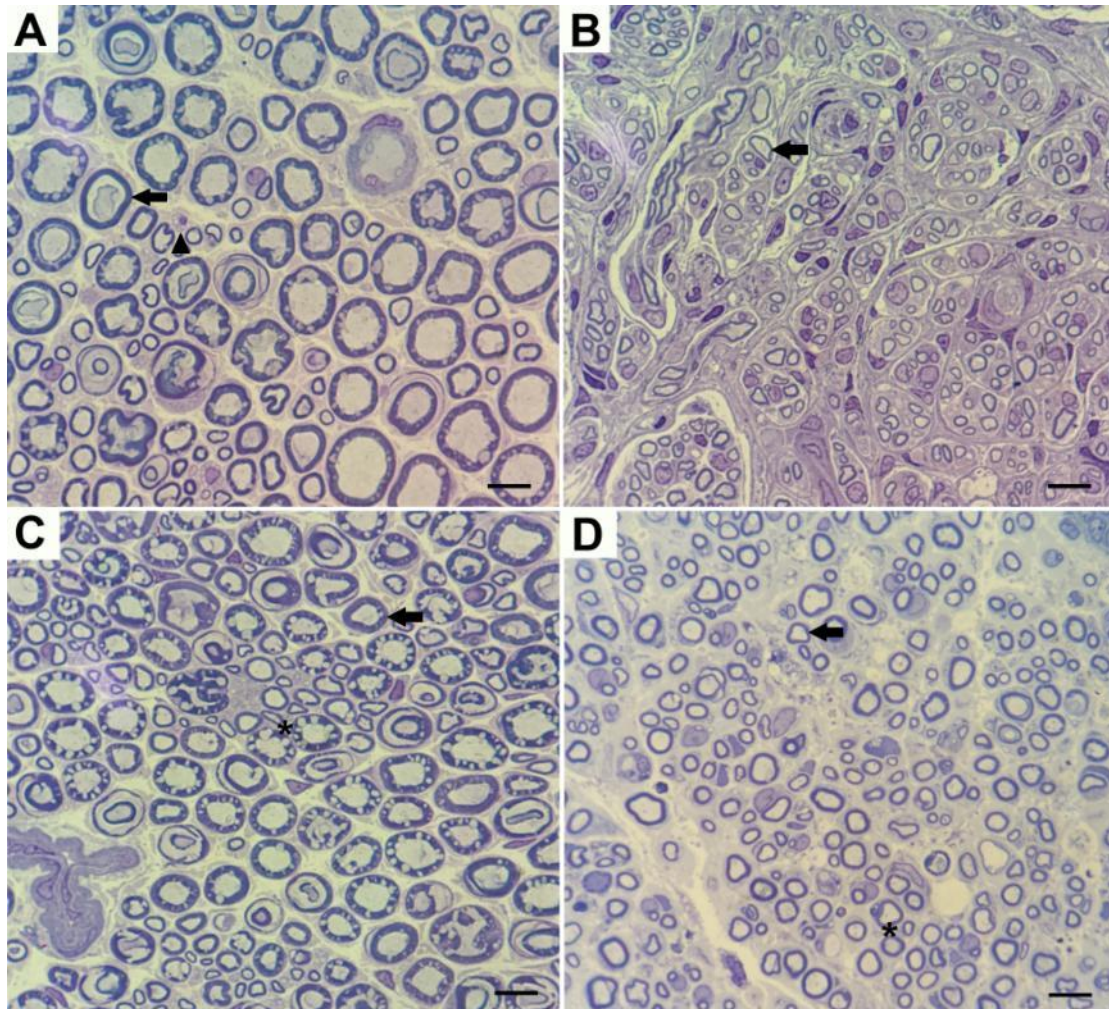


Figure1: Photomicrographs of the median nerve of Wistar rats. Cross section of proximal median nerve in Group I (A) and Group II (C) showing large myelinated fibers (arrow) and some axons with myelin vacuolation (*). Note the presence of myelin debris in Schwann cells and the presence of foamy macrophages (foam cells) (arrowhead). B, Transverse section of the distal median nerve in Group I showing a large number of small axonal aggregates with thin myelin sheath (arrow), and the presence of unstained non myelinated fibers. D, Cross section of distal median nerve in Group II showing a greater number of aggregates of small myelinated fibers (*), with the myelin sheath a little thicker than observed in figure B (arrow), and a less dense endoneuro with presence of macrophages (Dye:Toluidine Blue. Ultrathin Section. Scale 10 μ).

TABLES:

Table 1 – Treatment of sample data observed

Id	Group	NAProx	NADistal	DMProx	DMDistal	NAXDM_Proximal	NAXDM_Distal	IAR	IAR2
1	Group I	828	186	3.887	1.009	3218.436	187.674	0.225	0.058
2	Group I	510	336	4.213	1.897	2148.630	637.392	0.659	0.297
3	Group I	408	750	3.287	4.234	1341.096	3175.500	1.838	2.368
4	Group I	792	552	7.453	6.326	5902.776	3491.731	0.697	0.592
5	Group I	588	678	3.358	6.112	1974.504	4143.936	1.153	2.099
6	Group I	468	624	4.776	2.354	2235.168	1468.896	1.333	0.657
7	Group I	462	643	4.789	3.223	2212.518	2072.389	1.392	0.937
8	Group I	774	252	3.778	1.232	2924.172	310.464	0.326	0.106
9	Group I	564	234	7.332	1.788	4135.474	418.392	0.415	0.101
10	Group I	870	360	4.110	2.767	3575.700	996.120	0.414	0.279
1	Group II	126	489	3.765	6.115	474.390	2990.235	3.881	6.303
2	Group II	384	888	4.767	6.882	1830.528	6111.216	2.313	3.338
3	Group II	738	420	9.007	11.777	6647.166	4946.340	0.569	0.744
4	Group II	780	750	9.008	3.887	7026.240	2915.250	0.962	0.415
5	Group II	1206	696	3.766	7.567	4541.796	5266.632	0.577	1.160
6	Group II	246	450	1.987	6.887	488.802	3099.150	1.829	6.340
7	Group II	486	630	3.762	3.625	1828.332	2283.750	1.296	1.249
8	Group II	540	954	5.873	4.223	3171.420	4028.742	1.767	1.270
9	Group II	738	534	7.219	4.871	5327.622	2601.114	0.724	0.488
10	Group II	306	792	1.878	3.111	574.668	2463.912	2.588	4.288
11	Group II	1404	384	8.989	5.134	12620.556	1971.456	0.274	0.156
<u>12</u>	<u>Group II</u>	<u>1590</u>	<u>324</u>	<u>8.222</u>	<u>3.023</u>	<u>13072.980</u>	<u>979.452</u>	<u>0.204</u>	<u>0.075</u>

Id: Identification of each rat in Groups I and II.

NAProx: number of axons in the proximal stump.

NADist: number of axons in the distal stump.

DMProx: average diameter of axons in the proximal stump (µm)

DMDistal: average diameter of axons in the distal stump (µm)

NAXDM_Distal: product of the number of axons in the distal stump by the average diameter of the distal stump.

NAXDM_Proximal: Product of the number of axons in the proximal segment by the average diameter of the proximal segment

IAR: Index of Axonal Regeneration

IAR: (number of axons in the distal segment / number of axons in the proximal segment) x 100.

IAR2: Index of Axonal Regeneration that considers the number of axons and the average diameter

IAR2 = (NAXDM (Distal) / NAXDM (Proximal))

Table 2: Results of Histomorphometric Analysis

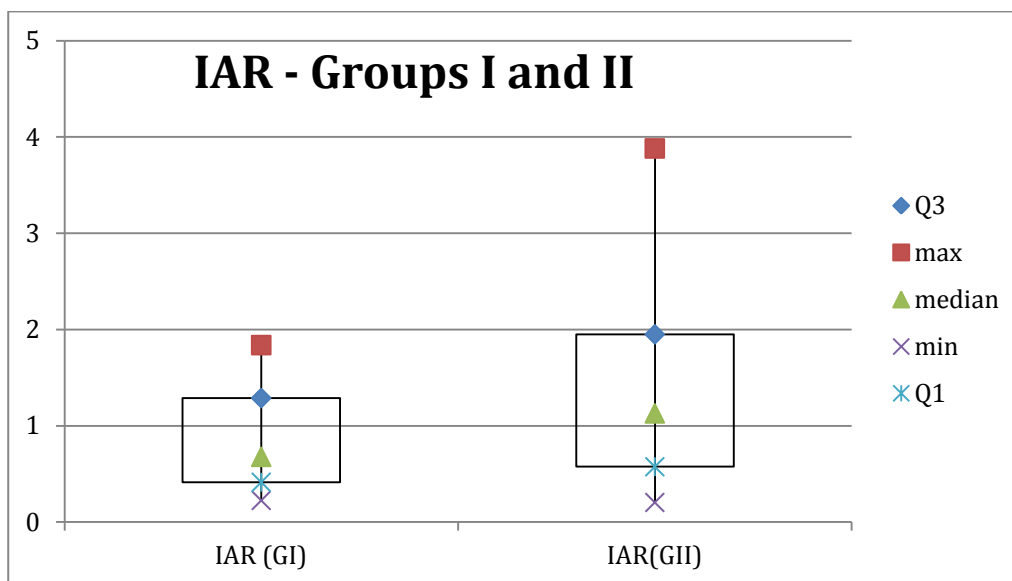
Box Plot	IAR (Group I)	IAR (Group II)	IAR2 (Group I)	IAR2 (Group II)
3rd quartile	1.28827	1.95008	0.86679	3.57576
maximum	1.83824	3.88095	2.36784	6.34030
median	0.67790	1.12892	0.44410	1.20434
minimum	0.22464	0.20377	0.05831	0.07492
1st quartile	0.41407	0.57511	0.14927	0.46990

Table 3: Median and p-values obtained in the Wilcoxon Test for two independent samples with HO: similar for groups I and II; H1: results of group II are superior to results of group I.

	NA Prox	NA Distal	DM Prox (μm)	DM Distal (μm)	NAxDM Prox	NAxDM Distal	IAR	IAR2
Median GI	576	456	4.16	2.5605	2579.67	1232.51	0.6779	0.4441
Median GII	639	582	5.32	5.0025	3856.61	2952.74	1.1289	1.2043
p-value	0.6040	0.0606	0.3100	0.0056	0.3612	0.0213	0.1568	0.0536

GRAPHICS:

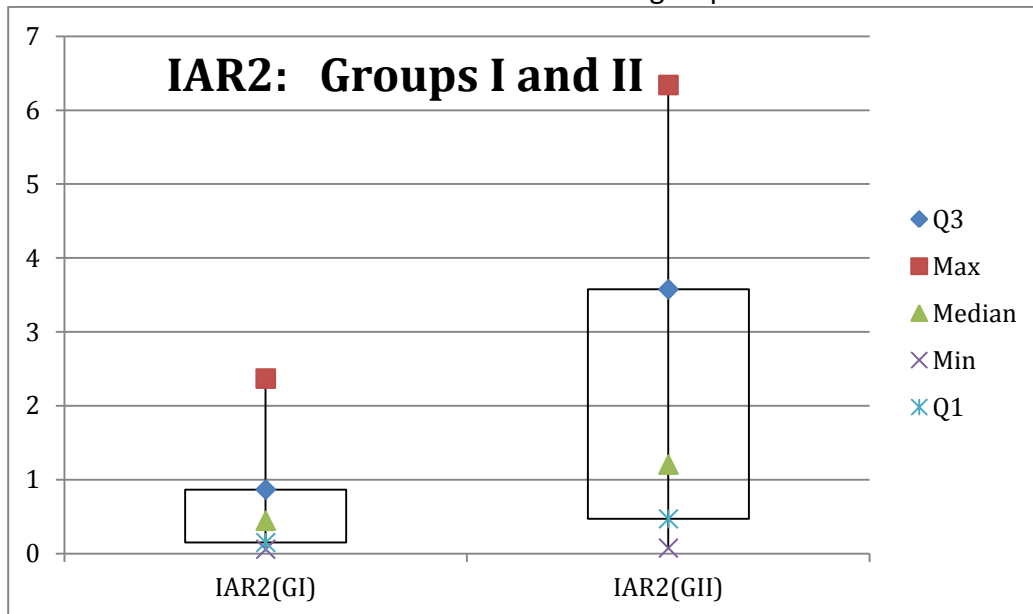
Graphic 1: Box Plot with distribution of IAR for groups I and II



Q3= 3rd quartile of distribution; Q1= 1st Quartile of distribution

The box means the interquartile extent containing the median and 50% of the points of distribution (interval between 3rd and 1st quartile of distribution)

Gráfico 2: Box Plot with distributions of IAR2 for groups I e II



Q3= 3rd quartile of distribution; Q1= 1st Quartile of distribution

The box means the interquartile extent containing the median and 50% of the points of distribution (interval between 3rd and 1st quartile of distribution)

4. DISCUSSÃO

Após a lesão de um nervo periférico, acontece uma série de eventos celulares e moleculares que impedem a completa restauração das funções sensitivas e motoras do paciente, apesar da melhor abordagem microcirúrgica realizada. O fator mais importante para esta recuperação incompleta é a intensa morte celular do tecido neuronal, uma vez que o pré-requisito neurobiológico fundamental para que haja uma boa regeneração é que os neurônios estejam viáveis. A morte neuronal traduz-se clinicamente pela perda das funções motoras finas e em relação à sensibilidade há um comprometimento da função discriminatória e uma redução do controle proprioceptivo (LUNDBORG, 2000, 2013).

A técnica microcirúrgica realizada por suturas completamente livres de tensão e com as extremidades dos cotos dos nervos preparadas com dissecação interfascicular para que haja um adequado aposicionamento dos fascículos entre as extremidades lesadas ainda permanece como padrão ouro no tratamento das lesões dos nervos periféricos, no entanto, o novo paradigma no tratamento dessas lesões é a utilização de agentes farmacológicos que possam ajudar na regeneração axonal (MILLES, 1982, 1985, 2013).

Apenas mais recentemente está havendo um consenso sobre o significado da perda neuronal e seu impacto na regeneração (HALL, 2005)(REPICI; MARIANI; BORSELLO, 2007).

Foi demonstrado em estudos de nervo ciático do rato submetido a lesão axonal a relação entre o tempo de lesão e a quantidade de morte celular neuronal sensitiva. A morte celular inicia-se após 24 horas da transecção do nervo. Com uma semana, há 15% de perda, atinge um pico em duas semanas com 21% de morte neuronal e um platô é alcançado em dois meses após a lesão, com 35 a 45% de morte dos neurônios. Os neurônios primários sensitivos são mais vulneráveis que

os motores e também os de menor diâmetro são mais susceptíveis a degeneração do que neurônios maiores e com axônios mielinizados (MCKAY HART et al., 2002).

Com esse entendimento do processo de morte neuronal em padrões comuns de lesão nervosa periférica, abre-se uma janela clínica de oportunidade neuroprotetora (HART; TERENCE; WIBERG, 2008)(REID et al., 2009). Na nova abordagem ao tratamento dos nervos periféricos a intervenção cirúrgica deve levar em conta a morte axonal induzida pela axonotomia, visto que estudos experimentais mostram que a reparação nervosa epineural imediata reduz a morte neuronal em duas semanas de 21% para 5% e quando o reparo cirúrgico é retardado por uma semana a morte neuronal já é de 12%. O mecanismo dessa neuroproteção talvez seja pela liberação de fatores neurotróficos pelas células de Schwann regenerativas do coto distal para guiar o crescimento dos cones (MCKAY HART et al., 2002).

A microneurorrafia nos dois grupos tratados deste experimento foi realizada imediatamente após a axonotomia, procurando-se com isso estabelecer a primeira estratégia de neuroproteção. E para a neuroproteção farmacológica utilizou-se o monossialogangliosídeo que é um agente antineurotóxico, antiinflamatório, essencial na excitabilidade neuronal de fibras mielinizadas e não mielinizadas. Apesar de não ser consenso na literatura, tem sido usado em vários estudos clínicos de pacientes com lesão medular e sua segurança tem sido confirmada, com poucas complicações e resultados promissores na melhora da recuperação motora (DE SOUZA et al., 2013).

O GM1 tem efeito estimulatório sobre o crescimento dos neuritos, evita a degeneração das células neuronais do sistema nervoso central e, além disso, mimetiza ou tem sinergia com fatores neurotróficos, potencializando suas ações. Ensaios experimentais em ratos mostram que o GM1 protege as células

ganglionares da retina da morte celular após axotomia do nervo óptico. A morte celular, nesse caso, ocorre pela privação de neurotrofinas. A afinidade do GM1 tem sido demonstrada principalmente pelo fator de crescimento de nervos (NGF) e seu mecanismo de ação está ligado à ativação de proteínas que promovem a expressão da *bcl-2*, que tem ação anti-apoptótica. O GM1 ainda promove a sobrevivência da célula neuronal por ativarem a família de receptores *Trk* que são os receptores dos fatores neurotróficos (CHOI; KIM; JOO, 2003).

O fator de crescimento de nervo (NGF) liga-se aos gangliosídeos, preferencialmente ao GM1 e induz o brotamento dos gânglios da raiz dorsal em estudos feitos em embriões de galinha. Quando se adiciona anticorpo anti-GM1 há uma inibição dessa ação. Os gangliosídeos são moléculas associadas à membrana celular, agem sinergicamente com o fator de crescimento de nervo e têm um importante papel em vários eventos celulares como diferenciação, crescimento e regeneração, sendo importantes na sobrevivência e maturação dos neurônios (SCHWARTZ; SPIRMAN, 1982) (HUANG et al., 2010).

A via de administração do GM1 foi intraperitoneal, que, além de ter melhor difusão pelo organismo, é mais fácil de realizar e oferece menor risco ao pesquisador (CONSTANTINI, SHLOMO, 1994). Esta via de administração tem sido mais utilizada para pesquisa em traumatizados raque-medulares e não tem sido observado trabalhos com o uso do GM1 intraperitoneal para pesquisa com nervos periféricos. Não foram observados reações adversas ao nível do nervo, fato relatado em aplicações locais do GM1 com uso de condutores. Nem tampouco houve complicações referentes à via de administração, não tendo sido vistos casos de peritonite o que acontece em estudos do uso do GM1 para animais com traumatismo raque-medular. Em todos os animais operados, a cicatrização tanto

da ferida cirúrgica, como do nervo mediano ocorreu satisfatoriamente, não havendo fibrose no sítio da neurorrafia.

Neste trabalho, em que se obedeceu rigorosamente as normas para a pesquisa biomédica, foram utilizados ratos da linhagem Wistar, que se caracterizam por serem de pequeno porte, homogêneos, de fácil manejo, terem ciclo reprodutivo curto e serem as espécies mais empregadas para a pesquisa de regeneração nervosa (URABE et al., 1995)(REID et al., 2009)(CARVALHO; BARROS FILHO; TEBET, 2008)(DE MEDINACELI, 1995)(ANGIUS et al., 2012). A avaliação da recuperação das lesões nervosas em condições experimentais é feita principalmente através de técnicas de morfometria, histologia e eletro-fisiologia, sendo bastante difícil, por razões óbvias, a realização de testes funcionais em animais (DE MEDINACELI, 1995)(BERTELLI; MIRA, 1995).

A maioria dos trabalhos experimentais que avaliam a regeneração de nervos periféricos utilizam o nervo ciático do rato para se criar um modelo de lesão e empregam para a avaliação funcional a metodologia de De Medinaceli que analisa o padrão das pegadas do animal e cria o Índice de Função Ciática, possibilitando avaliar a recuperação do nervo do rato em função do tempo (GOETTL, VIRGINIA M., NORTON H. NEFF, 2003)(ANGIUS et al., 2012) e também permitindo uma avaliação quantitativa precisa sobre a recuperação funcional do nervo ciático desses animais quando submetidos a diferentes tratamentos, podendo correlacionar os resultados obtidos com os estudos histomorfométricos. O método de avaliação funcional de De Medinaceli, apesar de ser confiável e reprodutível apresenta dificuldades na marcação de parâmetros predeterminados nas impressões das pegadas, principalmente as obtidas nas primeiras duas semanas (MONTE-RASO et al., 2008), apresentando limitações na avaliação precisa da recuperação dos animais (VAREJÃO et al., 2001). Com a utilização do nervo ciático do rato, a pata fica

anestesiada, levando o animal a morder e causar feridas e amputações de dedos e até de toda a pata (BERTELLI; MIRA, 1995).

Neste experimento, optou-se pelo uso do nervo mediano, que além da sua lesão causar menos mutilação e não provocar contraturas ao animal, permite a avaliação motora e funcional, apresenta uma pequena distância para os órgãos alvos e, assim, demanda um menor tempo para a recuperação funcional do que quando se utiliza as patas posteriores (BERTELLI; MIRA, 1995). O nervo mediano do rato é responsável pela função de preensão dos dedos, sendo o único nervo responsável pela inervação dos músculos flexores dos dedos (BERTELLI et al., 1995). Anteriormente achava-se que o nervo ulnar também contribuía para a flexão dos dedos no rato (GREENE, 1935). Outra vantagem da utilização do nervo mediano é que o acesso cirúrgico é mais fácil, localizando-se logo abaixo da pele e não é necessário qualquer secção muscular para atingi-lo, além disso, apresenta cerca de 1 mm de diâmetro, o que possibilita uma adequada manipulação do mesmo. Uma vez que o nervo mediano do rato é o responsável sozinho pela flexão dos dedos, ele pode ser facilmente abordado pelo teste de preensão, permitindo o estudo da motricidade normal, da recuperação funcional após lesão e também avaliar efeitos de medicamentos utilizados para melhorar a recuperação das lesões dos nervos periféricos. O teste de preensão para avaliar a função do nervo mediano é um procedimento de fácil realização, não invasivo, e indica com precisão o dia em que os animais começam a recuperação e sua melhora com o passar do tempo (BERTELLI; MIRA, 1995; BERTELLI et al., 1995)(PAPALIA et al., 2003). É um método factível e reprodutível, podendo-se obter resultados fidedignos do estudo da regeneração nervosa. Independe de aparatos complicados ou caros para sua realização, podendo ser realizado em qualquer biotério ou laboratório com poucos recursos.

Após os animais deste estudo terem sido submetidos semanalmente, durante seis semanas, ao teste de preensão, observou-se que nenhum rato do grupo I, em que foi realizada ressecção de 5 mm e não teve tratamento, recuperou a função de preensão durante o período observado. Isso reafirma que apenas o nervo mediano é responsável pela flexão dos dedos, visto que em todos os animais da pesquisa o nervo ulnar foi preservado (BERTELLI et al., 1995). No trabalho de Bertelli & Mira (1995) os ratos que foram submetidos a ressecção do nervo mediano não recuperaram a flexão ativa; os que tiveram lesão por esmagamento começaram a recuperar a flexão com oito dias, e na quarta semana já atingiam valores de flexão dos dedos próximos do normal.

Neste experimento os grupos que receberam tratamento, grupo II (microneurorrafia convencional) e grupo III (microneurorrafia e aplicação de GM1) recuperaram a função do nervo ao longo das seis semanas em que foram observados. Pela avaliação estatística, não se pôde garantir a normalidade das distribuições das forças, nem rejeitar a igualdade das variâncias. Com os testes não paramétricos, porém, foram constatadas diferenças entre os grupos, onde os valores de força média aplicada pelo grupo III foi superior ao grupo II, mostrando que a regeneração nervosa do grupo que usou o GM1 foi mais efetiva, apresentando resultados mais próximos do grupo controle, não operado (grupo 0). A maioria dos animais do grupo III iniciou a preensão dos dedos com a pata operada mais precocemente que os do grupo II e, além disso, mostrou uma força de preensão média maior.

A pesquisa continua aberta, mas ficou claro que a utilização do GM1 influenciou positivamente na regeneração do nervo mediano dos ratos, dessa forma, pode-se afirmar com erro menor que 5%, que o grupo III (microneurorrafia

e aplicação de GM1) teve um melhor desempenho quanto à recuperação funcional que o apresentado pelo grupo II (microneurografia convencional).

Após a eutanásia, observou-se que em todos os animais houve a cicatrização adequada do nervo mediano e não houve casos de autofagia do membro operado. Os segmentos retirados para avaliação histológica foram fixados com tetróxido de ósmio a 2% e a coloração das lâminas foi feita com azul de toluidina a 1%, que permite melhor avaliação da regeneração mielínica (MATSUMOTO et al., 2000) (GEUNA et al., 2009).

Em 40% dos ratos do grupo II (microneurografia convencional) e em 50% dos do grupo III (microneurografia e aplicação de GM1) foi observado um maior número de axônios no segmento distal que no proximal (Tabela 1; Trabalho II). Fenômeno este também relatado em outros estudos (GORIO et al., 1983; LUNDBORG, 1987)(LUNDBORG, 1987) e se dá pelo fato de que um número excessivo de brotos nervosos invadem as colunas de Schwann, as colunas de Bungner, no segmento distal e por isso o número de fibras nervosas detectadas no coto distal ultrapassa o número de fibras do segmento proximal. Mais tarde, porém, somente os ramos axonais que alcançarem o órgão alvo apropriado vão sobreviver e vão à fase de maturação, enquanto os outros que não alcançarem os órgãos alvos serão podados, o que é conhecido como repressão sináptica (GEUNA et al., 2009)(GLAUS; JOHNSON; MACKINNON, 2011). Um maior número de fibras no segmento distal do que no proximal após um reparo nervoso é considerado um sinal favorável, porém não há correlação com o nível de recuperação motora (DE MEDINACELI, 1995). A melhor condução do impulso nervoso no coto distal está mais relacionada com o diâmetro dos neuritos e com a espessura da sua camada de mielina. A mielinização ocorre somente em axônios maiores que 1,5 μm de diâmetro e a espessura da camada de mielina é proporcional ao tamanho do

axônio e à velocidade de condução da fibra nervosa . Assim, as condições histológicas dos neuritos devem estar adequadas para a transmissão dos impulsos nervosos e a morfometria é uma importante ferramenta para essa avaliação (DE MEDINACELI, 1995).

A maioria dos trabalhos que avalia a regeneração de nervos periféricos utiliza como modelo o nervo ciático e para a avaliação morfométrica são feitas fotografias com objetivas para magnificação adequada de campos aleatórios dos cotos proximais e distais, além da ampliação dada pela ocular do microscópio (ANGIUS et al., 2012). A partir das fotos obtidas, utilizam-se softwares que fazem a contagem dos axônios em ambos os segmentos. De posse dos números de axônios, calcula-se o índice de regeneração que é dado pela razão entre o número de axônios no segmento distal pelo número de axônios no segmento proximal.

Considerando que na análise da regeneração axonal é importante tanto o número de axônios regenerados quanto o diâmetro dos mesmos, foi criado neste trabalho um indicador que leva em conta as duas variáveis de número e diâmetro dos axônios (IRA2).

Inicialmente foram analisados os resultados, mostrados nas tabelas, através do Índice de Regeneração Axonal (IRA) que leva em conta a relação entre o número de axônios regenerados do segmento distal e o número de axônios presente no segmento proximal. Após a aplicação do Teste de Wilcoxon para a avaliação deste índice, obteve-se um resultado que não permite rejeitar a hipótese nula de que as medianas do IRA do Grupo II e Grupo III sejam iguais. Da mesma forma em relação aos Box Plots com as distribuições dos grupos II e III para o Índice de Regeneração Axonal (IRA) e (IRA 2) foi constatado que, embora haja uma diferença entre as medianas com resultados melhores para o grupo III, não é possível rejeitar a

hipótese nula uma vez que as medianas de cada um dos grupos está contida no intervalo interquartilico obtido para a mediana do outro grupo.

Neste trabalho a análise histológica após seis semanas de lesão evidenciou um padrão diferente entre os Grupos avaliados. No Grupo III (microneurorrafia e aplicação de GM1) havia um maior número de axônios regenerados (28%), mais organizados e homogêneos que o Grupo II (microneurorrafia convencional) e apresentando bainha de mielina um pouco mais espessa, inclusive com diferença significativa ($p=0,0056$) no diâmetro médio dos axônios do segmento distal, sendo maior para o Grupo III. A cirurgia neste estudo foi realizada imediatamente após a axotomia utilizando-se técnica microcirúrgica adequada, o que é considerado um fator também de neuroproteção quando comparado às cirurgias feitas tardiamente, em que observa-se uma maior quantidade de morte neuronal (MCKAY HART et al., 2002). Na sexta semana de pós-operatório constatou-se que no Grupo II a perda neuronal foi de 20,8%, enquanto que no grupo III foi de 8,9%.

Pelo Índice (IRA2) o valor obtido de p no teste de Wilcoxon foi de 5,36%, o que permite afirmar que há um forte indício que os resultados do Grupo III não são iguais aos do Grupo II. Isso reforça a ideia de que o uso do GM1 no tratamento das lesões dos nervos periféricos em ratos contribui para a melhor regeneração axônica, podendo ser observado também na avaliação histológica.

5. CONCLUSÕES

Pode-se afirmar, com erro menor que 5%, que os grupos II (apenas microneurorrafia) e III (microneurorrafia e GM1) apresentaram diferenças em relação à recuperação funcional, tendo o grupo III reagido melhor ao teste de preensão.

O padrão histológico do grupo III apresentou um maior grau de mielinização, tendo-se observado um maior diâmetro médio nos axônios dos cotos distais ($p=0,0056$).

Há um significativo indício ($p=0,0536$) de que a utilização do GM1 nas cirurgias dos nervos periféricos melhora o padrão de regeneração axonal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; CAVALLI, V. Nerve injury signalling. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 18, n. 3, p. 276–283, 2009.

ALOE, L. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. **Archives italiennes de biologie**, v. 149, p. 175–181, 2011.

ANGIUS, D. et al. **A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds****Biomaterials**, 2012.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 1, p. 137–138, jan. 1989.

BERTELLI, J. A. et al. The rat brachial plexus and its terminal branches: an experimental model for the study of peripheral nerve regeneration. **Microsurgery**, v. 16, n. 2, p. 77–85, jan. 1995.

BERTELLI, J. A.; GHIZONI, M. F. **Concepts of nerve regeneration and repair applied to brachial plexus reconstruction**.**Microsurgery**, 2006.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, p. 151–155, 1995.

BONTIOTI, E. N.; KANJE, M.; DAHLIN, L. B. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. **Journal of the peripheral nervous system : JPNS**, v. 8, p. 159–168, 2003.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical focus**, v. 16, n. 5, p. E1, 15 maio 2004.

CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951–65, set. 2008.

CAMPBELL, W. W. European Journal of Pain Supplements Evaluation of peripheral nerve injury q. **European Journal of Pain Supplements**, v. 3, n. 2, p. 37–40, 2009.

CARVALHO, M. O. P.; BARROS FILHO, T. E. P. DE; TEBET, M. A. Effects of methylprednisolone and ganglioside GM-1 on a spinal lesion: a functional analysis. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 63, n. 3, p. 375–380, 2008.

CHEN, Z.-L.; YU, W.-M.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 30, p. 209–33, jan. 2007.

CHENTANEZ, V. et al. Ganglioside GM1 (porcine) ameliorates paclitaxel-induced neuropathy in rats. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet**, v. 92, p. 50–57, 2009.

CHOI, J.-S.; KIM, J.-A.; JOO, C.-K. Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 44, p. 1747–1752, 2003.

CLOSE, B. et al. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación. Parte 2. **Laboratory Animals**, v. 31, p. 1–32, 1997.

COLOMÉ, L. M. et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2529–2534, 2008.

CONSTANTINI, SHLOMO, AND W. Y. " 97-111. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. **Journal of neurosurgery**, v. 80, n. 1, p. 97–111, 1994.

COSTA, MP; CUNHA, AS; DA SILVA, CF; DE BARROS FILHO, TE; COSTA, HJZRC; FERREIRA, M. Tubo de Ácido Poliglicólico e GM1 na Regeneração de Nervos Periféricos. **Acta Ortop Bras**, v. 17, p. 286–290, 2009.

DA GAMA, S. A. et al. Estudo experimental comparativo da ação das neuroquinas cardiotrofina-1 e oncostatina-m na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortop Bras**, v. 8, p. 55–69, 2000.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of neuroscience methods**, v. 58, p. 29–37, 1995.

DE SOUZA, F. I. et al. Transdermal monosialoganglioside with laser in the treatment of spinal cord lesion in rats. **Acta ortopedica brasileira**, v. 21, n. 2, p. 87–91, jan. 2013.

FH, G.; FC, D.; WP, C. GM1 gangliosides in the treatment of spinal cord injury: report of preliminary data analysis. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 50, p. 515–521, 1990.

FIRAT, T. L. Changes at the Target Level after Nerve Injury. In: DAHLIN, L. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 62–69.

FREDERICKS, C. Disorders of the peripheral nervous system: the peripheral neuropathies. In: FREDERICKS, C.; SALADIM, L. (Eds.). **Pathophysiology of the**

motor system: principles and clinical resentations. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1996. p. 346–372.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. **Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury** *Journal of Neuroinflammation*, 2011.

GEISLER, F. H.; DORSEY, F. C.; COLEMAN, W. P. Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. **The New England journal of medicine**, v. 324, n. 26, p. 1829–38, 27 jun. 1991.

GEUNA, S. et al. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. **International review of neurobiology**, v. 87, p. 27–46, jan. 2009.

GEUNA, STEFANO; HAASTERT-TALINI, KIRSTEN; NAVARRO, X. The Nerve Trunk in Injury and During Regeneration. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 51–61.

GIGER, R. J.; HOLLIS, E. R.; TUSZYNSKI, M. H. Guidance molecules in axon regeneration. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 7, p. a001867, jul. 2010.

GILLESPIE, L. N. Regulation of axonal growth and guidance by the neurotrophin family of neurotrophic factors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 10, p. 724–733, out. 2003.

GLAUS, S. W.; JOHNSON, P. J.; MACKINNON, S. E. **Clinical Strategies to Enhance Nerve Regeneration in Composite Tissue Allotransplantation** *Hand Clinics*, 2011.

GOETTL, VIRGINIA M., NORTON H. NEFF, AND M. H. Sciatic nerve axotomy in aged rats: response of motoneurons and the effect of GM1 ganglioside treatment. **Brain Research** **968.1** (: ., v. 968, n. 1, p. 44–53, 2003.

GOHRITZ, ANDREAS; LEE DELLON, A. History of Peripheral Nerve Surgery. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 20–39.

GORIO, A. et al. Muscle reinnervation—II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 403–IN1, mar. 1983.

GREENE, E. C. **Anatomy of the rat**. [s.l.] American Philosophical Society, 1935. p. 47–50

GUTIERREZ, A.; ENGLAND, J. D. Peripheral nerve injury. In: GUTIERREZ, A.; ENGLAND, J. D. (Eds.). **Neuromuscular Disorders in Clinical Practice**. 2nd. ed. New York: Springer, 2014. p. 863–869.

HADJICONSTANTINO, M.; NEFF, N. H. GM1 Ganglioside: In Vivo and In Vitro Trophic Actions on Central Neurotransmitter Systems. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 4, p. 1335–1345, 14 nov. 2002.

HALL, S. The response to injury in the peripheral nervous system. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 87, n. 10, p. 1309–19, out. 2005.

HART, A. M.; TERENCE, G.; WIBERG, M. Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. **Neurol Res**, v. 30, p. 999–1011, 2008.

HUANG, F. et al. GM1 and nerve growth factor modulate mitochondrial membrane potential and neurofilament light mRNA expression in cultured dorsal root ganglion

and spinal cord neurons during excitotoxic glutamate exposure. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 495–500, 2010.

JOHNSON, E. O.; ZOUBOS, A. B.; SOUCACOS, P. N. Regeneration and repair of peripheral nerves. **Injury**, v. 36, 2005.

KAKINOKI, B. et al. Orally active neurotrophin-enhancing agent protects against dysfunctions of the peripheral nerves in hyperglycemic animals. **Diabetes**, v. 55, p. 616–621, 2006.

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. A review. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 58, p. 145–169, 1987.

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **The Journal of hand surgery**, v. 25, n. 3, p. 391–414, maio 2000.

LUNDBORG, G. Nerve injury and repair - a challenge to the plastic brain. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, p. 209–226, 2003.

LUNDBORG, G. Nerve Injury and repair; regeneration, reconstruction and cortical remodeling. In: **Nerve Injury and repair**. Philadelphia, PA: Elsevier, 2005.

LUNDBORG, G. Preface. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 17–19.

LUNDBORG, G.; LONGO, F. M.; VARON, S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. **Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 157–161, jan. 1982.

MARCON, R. M. et al. Potentializing the effects of GM1 by hyperbaric oxygen therapy in acute experimental spinal cord lesion in rats. **Spinal cord**, v. 48, p. 808–13, 2010.

MATSUMOTO, K. et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)–collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. **Brain Research**, v. 868, n. 2, p. 315–328, jun. 2000.

MATTAR JÚNIOR, R. Lesões dos Nervos Periféricos. In: PARDINI, ARLINDO; FREITAS, A. (Ed.). **Traumatismos da Mão**. 4 Edição ed. Rio de Janeiro - RJ: MEDBOOK - Editora Científica Ltda., 2008. p. 361–376.

MCKAY HART, A. et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. **Experimental brain research**, v. 142, n. 3, p. 308–18, mar. 2002.

MILLES, H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve grafting. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery. Supplementum**, v. 19, p. 25–37, 1982.

MILLES, H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 2, p. 21–31, 1985.

MILLES, H. Peripheral Nerve Surgery Past, Present, and Future. In: DAHLIN, L. B. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. First ed. Zurich, Schweiz: Palme Publications, 2013. p. 40–50.

MONTE-RASO, V. V. et al. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? **Journal of neuroscience methods**, v. 170, p. 255–261, 2008.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRÉ, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in neurobiology**, v. 82, n. 4, p. 163–201, jul. 2007.

PAPALIA, I. et al. On the use of the grasping test in the rat median nerve model: a re-appraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 127, n. 1, p. 43–47, jul. 2003.

QIAO, G.-F. et al. GM1 ganglioside contributes to retain the neuronal conduction and neuronal excitability in visceral and baroreceptor afferents. **Journal of neurochemistry**, v. 106, p. 1637–1645, 2008.

RAIVICH, G. Transcribing the path to neurological recovery-From early signals through transcription factors to downstream effectors of successful regeneration. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 193, n. 4, p. 248–58, jul. 2011.

RAIVICH, G.; MAKWANA, M. The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. **Brain research reviews**, v. 53, n. 2, p. 287–311, fev. 2007.

REID, A. J. et al. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. **Neuroscience research**, v. 65, p. 148–155, 2009.

REID, AJ; TERENGUI, G; WIBERG, M; HART, A. Pharmacological Treatment as an Adjunct to Surgical Procedures in Nerve Injury. In: DAHLIN, LB; LEBLEBICIOGLU, G. (Ed.). **Current Treatment of Nerve Injuries and Disorders**. 1. ed. Zurich: Palme Publications, 2013. p. 70–80.

REPICI, M.; MARIANI, J.; BORSELLO, T. Neuronal death and neuroprotection: a review. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 399, p. 1–14, 2007.

RODRIGUEZ, F. J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. **Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury** *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2004.

ROSBERG, H. E. et al. Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm - Analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. **Journal of Hand Surgery**, v. 30, p. 35–39, 2005.

SCHWARTZ, M.; SPIRMAN, N. Sprouting from chicken embryo dorsal root ganglia induced by nerve growth factor is specifically inhibited by affinity-purified antiganglioside antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 6080–6083, 1982.

SEBBEN, ALESSANDRA DEISE, ET AL. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, p. 81–89, 2011.

SEDDON, H. J.; MEDAWAR, P. B.; SMITH, H. RATE OF REGENERATION OF PERIPHERAL NERVES IN MAN. **J. Physiol.**, v. 102, p. 191–215, 1943.

SMITH, W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Laboratory animals**, v. 27, p. 30–39, 1993.

SOKOLOVA, T. V et al. Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. **Neurochemical research**, v. 32, n. 8, p. 1302–13, ago. 2007.

URABE, T. et al. Effects of delayed nerve repair on regeneration of rat sciatic nerve. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 9, p. 1–5, 1995.

VAREJÃO, A. S. et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of neuroscience methods**, v. 108, p. 1–9, 2001.

WIXSON, S. K. et al. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. **Laboratory animal science**, v. 37, p. 736–742, 1987.

YEGYANTS, S. et al. Traumatic peripheral nerve injury: a wartime review. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 21, p. 998–1001, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL:



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

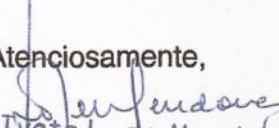
Teresina, 10 de dezembro de 2012.

Ao (A)

Prof (a): Dr. William Dias Belangero
Departamento: Ortopedia e Traumatologia/UNICAMP
Sr. (a) Pesquisador (a),

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado: **“Estudo comparativo entre a microneurorrafia primária pela técnica convencional X técnica convencional associado a fator monossialogangliosídeo sódico – GM1”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO sob o nº. 093/12**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.

Atenciosamente,


Profª. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO 2
PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP 64049-550

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO:

1.1. Título ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A MICRONEURORRAFIA PRIMÁRIA PELA TÉCNICA CONVENCIONAL X TÉCNICA CONVENCIONAL ASSOCIADO A FATOR MONOSSIALOGANGLIOSÍDEO SÓDICO – GM1 .

1.2. Finalidade: (x) Pesquisa () Ensino () Treinamento

1.3. Previsão para execução: Início: XX/XX/XXXX Término: 31/07/2014

1.4. Responsável: **OSVALDO MENDES DE OLIVEIRA FILHO**
(professor)

1.5. Qualificação: **Doutorado.**

1.6. Instituição/Unidade/Departamento:. UNICAMP/DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA

1.7. Endereço para contato: Av. Mal. Castelo Branco, 611, Torre II, Apto. 402

Bairro: Cabral..... Cidade:.Teresina - PI..... Telefone: 086.8805.1000

e-mail: omof@uol.com.br Fax: **086.3222.5853**

1.8. Colaboradores: **Prof. Dr. William Dias Belangero**
(belangerowd@gmail.com)

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior (CRMV 0754 - PI)
(airtoncondejr@uol.com.br)

2. INFORMAÇÕES SOBRE O PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

2.1. Animais experimentais:

Espécie: *Rattus norvegicus*... Raças: Wistar... Linhagem:

Sexo: (☒) Masc. (☐) Fem. Idade: 2 a 6 (☐) Dias (☐) Meses (☐) Anos

Nº de grupos experimentais: três. Animais por grupo: 10 Total: 30.

Acomodação: tipo (gaiola, caixa, etc.), material, dimensões (C X L X A) e nº de animais.

Tipo	Material (madeira, plástico, etc.)	Dimensões (X)cm ()m	Nº de animais
Gaiolas de para ratos	Plásticotransparente, com tampa de arame galvanizado	25X50cm	3 a 5

- a) Se houver necessidade de utilização de mais de um tipo de acomodação, repetir mais uma linha do quadro acima;
- b) Se houver necessidade de utilização de mais de uma espécie experimental, repetir todo o item 2.1.

Houve planejamento estatístico para determinar o tamanho da amostra?

(☒) Sim. Qual:

(☐) Não. Justificativa:

Método estatístico a ser aplicado para análise dos resultados, quando for o caso: Realizaremos a estatística descritiva das grandezas segundo os grupos. A homogeneidade das distribuições (parametricidade) será avaliada pela prova de Kolmogorov-Smirnov e pelo coeficiente de variação de Pearson (CVP). No caso de distribuições paramétricas, as diferenças entre os 3 grupos serão avaliadas pela Análise de Variância (ANOVA) e caso seja significativa será discriminada pelo teste estatístico de Tukey. No caso de distribuições consideradas não paramétricas, utilizaremos a prova de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas modificado por Dunn, respectivamente. Consideraremos significativos valores de p menores que 0,05.

2.2. Local de execução do Projeto:

O local de execução será exclusivo para este experimento/aula/treinamento?

(X) Sim. Qual: Centro de cirurgia experimental, no Biotério de Experimentação CCA da UFPI.

() Não. Justificativa:

2.3. Condições ambientais do local:

Descrição sumarizada: O experimento será realizado nas instalações do biotério de experimentação do CCA-UFPI.

Controle de temperatura? (X) Sim. () Não

Controle de ventilação? (X) Sim. () Não

Controle do ciclo da luz? (X) Sim. () Não.

Acondicionamento e descarte adequado dos dejetos? (X) Sim. () Não.

Especificar: Os dejetos serão acondicionados em sacos plásticos especiais para lixo e recolhidos pela empresa de coleta de lixo urbano.

Limpeza e desinfecção das instalações/compartimentos? (X) Sim. () Não.

Especificar: Será feita a troca de maravalha e lavagem das gaiolas três vezes por semana.

2.4. Manejo dos animais:

Os animais ficarão acomodados em gaiolas adequadas e distribuídas em estantes, no biotério do CCA da UFPI. Haverá controle adequado do ciclo claro/escuro de 12h para que não se altere o metabolismo dos animais. A temperatura será controlada entre 21°C a 26°C e a umidade entre 45% e 55%. Exaustores e/ou ar condicionado serão utilizados para evitar que a temperatura ambiente não prejudique os animais. Os animais serão mantidos durante os períodos experimentais com ração padrão e água ad libitum e serão observados periodicamente para verificar se ocorrem anormalidades comportamentais locais e sistêmicas.

Água (origem e tratamento): A água para consumo dos animais provém de poço tubular, filtrada e de boa qualidade.

Especificar: - Maravalha e ração contaminadas serão acondicionadas em sacos plásticos especiais para autoclavagem, e autoclavadas antes de serem descartadas no lixo;

- Luvas, algodão e papel utilizados em experimentos com animais serão descartados em saco de lixo especiais com identificação de risco biológico;
- Perfurocortantes serão descartados em caixas de papelão específicas para este uso;
- Material contendo sangue e/ou órgãos de animais será previamente autoclavado antes de ser descartado no lixo;

- Carcaças de animais serão acondicionadas em saco plástico apropriado, com identificação de risco biológico e encaminhadas à destinação adequada pelo pessoal responsável do biotério.

Limpeza e desinfecção das instalações/compartimentos?(X) Sim. () Não.

Especificar: - Piso, paredes, estantes: utilizará pano de chão e/ou rodo. Limpará primeiramente com água e sabão neutro, e em seguida aplicará o detergente enzimático, Virkon a 1%.

- Gaiolas e garrafas: procederá a troca das garrafas e limpeza das gaiolas três vezes por semana. Retirá a maravalha e a ração sujas com pá apropriada, e depositar em saco plástico apropriado para autoclavação. Jogará fora a água das garrafas. Deixará as gaiolas e garrafas de molho no Extran, e em seguida serão lavadas utilizando o mesmo detergente. As gaiolas e garrafas serão colocadas para secar.

Outros tipo de hidratação: Não _____

Alimentação:

Tipos de ração: Ração balanceada para ratos, de marca comercial. Suplemento alimentar: Não

Outros: _____

Restrição alimentar? () Sim. (X) Não.

Restrição hídrica? () Sim. (X) Não.

Tempo de duração?.Variável com a metodologia, de 30 a 120 dias.Justificativa:..A duração depende do tipo do experimento. No nosso estudo, será observada a recuperação nervosa por 06 semanas sem restrição alimentar no período.

Tipo de contenção:

(X) Manual. () Farmacológica. () Uso de instrumentos. () Outro

Especificar: - Manual: para administração de vermífugo e analgésicos. Para a contenção do animal, a manobra inicial consiste em sua retirada da gaiola, suspendendo o animal pela base da cauda, e a seguir, deve-se, rapidamente apóia-lo em uma superfície na qual ele possa se agarrar. Devemos pressioná-lo levemente sobre ela, segurando, primeiramente a pele da região dorso-cervical, entre os dedos indicador e polegar. Em seguida devemos fixar sua cauda entre os outros dedos e a palma da mão, para a limitação total de seus movimentos.

- Farmacológica: anestesia para o procedimento cirúrgico e eutanásia. Os animais serão anestesiados com uma associação de xilazina (0,5 mg/kg) e ketamina (80mg/kg) preparados na mesma seringa e administrados por via intramuscular profunda. E para eutanásia, serão pré-medicados com tramadol (6mg/kg), por via intramuscular profunda e eutanasiados com superdose de tiopental sódico por via intraperitoneal.

3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E DE ANESTESIA:

Haverá algum procedimento cirúrgico? (X) Sim. () Não

3.1. Qual? Após jejum de 12h, será realizada anestesia geral, com posterior antisepsia da área cirúrgica e cirurgia para se provocar lesão do nervo mediano do rato e ao mesmo tempo, reparação nervosa utilizando-se microneurorrafia primária pela técnica convencional, a microneurorrafia primária associado ao fator monossialogangliosídeo sódico – GM1. Em outro grupo será realizada a ressecção de um segmento de 5 mm do nervo mediano, que será o grupo controle.

3.2. MICRONEURORRAFIA PRIMÁRIA PELA TÉCNICA CONVENCIONAL X TÉCNICA CONVENCIONAL ASSOCIADO A FATOR MONOSSIALOGANGLIOSÍDEO SÓDICO – GM1.

Um quarto grupo, controle, não será feita a neurorrafia.

Nos procedimentos (cirúrgicos ou não) serão utilizadas drogas anestésicas?

(X) Sim. () Não. Qual(is):.

Os animais serão anestesiados com uma associação de xilazina (0,5 mg/kg) e ketamina (80mg/kg) preparados na mesma seringa e administrados por via intramuscular profunda.

OBS.: Veterinário Responsável: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior (CRMV 0754)

Haverá acompanhamento do período pós-operatório? (X) Sim. () Não.
Justificativa: Será promovida analgesia, após o procedimento cirúrgico, a cada seis horas, será feito terapia analgésica com tramadol (6,0mg/kg) por via intramuscular profunda, durante 24h, além de acompanhamento para evitar infecções oportunistas. O período pós-operatório será acompanhado diariamente para observação da cicatrização e do estado de saúde dos animais. Será feita profilaxia antibiótica e analgesia com Pensivet Plus (Penicilina Benzatina, P. Procaina, P. Potássica, Eritromicina e Diclofenaco Sódico)

Por quanto tempo o animal será mantido em experimentação após a cirurgia? 45 dias.
Período em se espera a regeneração do segmento de nervo lesado (2mm/dia).

O procedimento impedirá o animal de se alimentar? () Sim. (X) Não.
O experimento envolverá intencionalmente dor, estresse, restrição alimentar ou outro tipo de sofrimento? () Sim. (X) Não.

Em caso afirmativo, justifique a finalidade do experimento: _____

4. USO DE AGENTES BIOLÓGICOS, QUÍMICOS, FÍSICOS E OUTROS.

Haverá administração/inoculação de toxinas, microorganismos, parasitas, agentes químicos tóxicos, células tumorais, exposição a agentes físicos, traumas mecânicos, indução de alterações metabólicas graves ou de processos degenerativos crônicos?

() Sim. (X) Não.

Em caso afirmativo, descreva o agente e os principais efeitos esperados no animal.

Haverá administração e/ou exposição a material radioativo? () Sim. (X) Não.
Características do elemento radioativo que sejam importantes para a avaliação de sua segurança. Informações sobre os procedimentos de descarte dos animais, dos dejetos e do material utilizado:

5. PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA. Sim (X) Não ()

Método de eutanásia: Serão pré-medicados com tramadol (6mg/kg), por via intramuscular profunda e eutanasiados com superdose de tiopental sódico por via intraperitoneal.

Justificativa para o procedimento de eutanásia proposto: O procedimento de eutanásia proposto segue a resolução 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que institui normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais.

Em que momento será realizada a eutanásia? Após 06 semanas.

Destino a ser dado aos animais após a eutanásia? Após eutanásia, os animais serão novamente abordados cirurgicamente para se colher material (o nervo mediano lesado de todos os grupos), sob anestesia com a mesma dosagem descrita anteriormente, com a finalidade de estudar-se a morfologia, bioquímica e fisiologia do microambiente entre os cotos nervosos lesados. Depois disso, os animais serão acondicionados em sacos plásticos especiais, armazenados em freezer e posteriormente destinados ao lixo hospitalar da UFPI.

Qual o destino dos animais não submetidos a eutanásia? Todos serão submetidos à eutanásia, exceto os que eventualmente forem a óbito durante o experimento. Estes serão também acondicionados em sacos plásticos especiais, congelados e destinados ao lixo hospitalar..

6. REFERENCIA AOS PROCEDIMENTOS DO PRESENTE FORMULÁRIO

(X) Sem referência em projetos aprovados pelo CEEA

() Foram aprovados pelo CEEA em outro projeto. Protocolo nº _____

7. TERMO DE RESPONSABILIDADE

Asseguro ao CEEA/UFPI que li os “Princípios Éticos da Experimentação Animal” adotados pelo CEEA/UFPI e acato plenamente suas recomendações durante a pesquisa/aula/treinamento, que tem mérito científico e a equipe que participa foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos. O não cumprimento dessas recomendações é de minha total responsabilidade e arcarei com as punições previstas na legislação em vigor, a exemplo do que contêm as leis 6.638, de 08.05.79 e 9.605, de 12.02.98. Tudo que foi declarado neste protocolo é a absoluta expressão da verdade.

Nome: Prof. Ms. Osvaldo Mendes de Oliveira Filho

Orientador UNICAMP.: **Prof. Dr. William Dias Belangero**

Assinatura: _____.

Local e data: Teresina, 09/07/2012

8. APROVAÇÃO DO CEEA

Protocolo nº _____.

Data da Reunião: ____/____/____

Assinatura do Presidente: