

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO NERVO
CIÁTICO E DESEMPENHO MOTOR DE RATOS
APÓS CRIOTERAPIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO**

FREDERICO SAUERESSIG

Porto Alegre, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

FREDERICO SAUERESSIG

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO NERVO CIÁTICO E DESEMPENHO
MOTOR DE RATOS APÓS CRIOTERAPIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO**

**Porto Alegre
2009**

FREDERICO SAUERESSIG

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO NERVO CIÁTICO E DESEMPENHO
MOTOR DE RATOS APÓS CRIOTERAPIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia, Área de
Concentração em Estomatologia Clínica, da
Faculdade de Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Dra. Karen Cherubini

Co-orientador: Dr. Jaderson Costa da Costa

Porto Alegre

2009



PUCRS

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Leomar Saueressig** e **Maria Regina Saueressig**, pelo amor, confiança, paciência, dedicação e ajuda na conquista de mais uma etapa. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim. Amo muito vocês.

À minha avó **Elna**, a única dos idosos ainda entre nós. Espero que sigas por um bom tempo em nosso convívio familiar.

À minha irmã **Silvia** e seu esposo **Ricardo**, exemplos de dedicação profissional e familiar.

À minha noiva e futura esposa **Pâmela**, pela companhia, incentivo e amor incondicional. Te amo muito.

Ao meu sogro, **Tenente Tavares**, e à minha sogra, **Dona Alveni**, companheiros de várias jornadas nessa caminhada.

A todos os **familiares e amigos** que, de uma maneira ou de outra, fizeram parte desse trabalho, incentivando, escutando ou pelo simples fato de estarem por perto.

À **Profa. Dra. Karen Cherubini**, agradeço os ensinamentos proporcionados, o apoio, a disponibilidade e a preocupação demonstrados.



PUCRS

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Joaquim Clotet** que viabilizou esse Curso.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, pela infra-estrutura concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Coordenador **Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo**, símbolo de profissionalismo e dedicação.

À **Profa. Dra. Karen Cherubini**, pela sua dedicação, disponibilidade e competência na orientação desta tese. Agradeço seu acolhimento e a oportunidade de aprendizado. És uma professora admirável, tanto pelo aspecto profissional, quanto humano.

Às Professoras do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, **Dra. Liliane Yurgel, Dra. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo, Dra. Karen Cherubini e Dra. Fernanda Salum**, pelos constantes ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, pelos ensinamentos no campo da crioterapia e pelo empréstimo do criocautério empregado nessa pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Irênio Gomes**, pela incansável ajuda e dedicação na análise eletroneurofisiológica e estatística.

Ao **Prof. Dr. Léder Xavier** e suas bolsistas, pela importante ajuda na análise histomorfométrica.

Ao **Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa**, brilhante médico e pesquisador, por ter-me norteado durante a execução deste trabalho e me disponibilizado a excelente infra-estrutura de seu laboratório de pesquisa.

À bolsista de Iniciação Científica do CNPq **Luciana Giacometti**, pela incansável ajuda durante a parte experimental do trabalho.

Aos **Pacientes** do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo aprendizado proporcionado.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia, **Ana, Davenir, Marcos e Carlos** pela paciência e disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

Aos funcionários do Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas, **Simone, Ricardo, Daniela e Zuzete**.

Aos meus **colegas de turma** e demais contemporâneos da Pós-graduação com quem tive a oportunidade de conviver. Aprendemos, uns com os outros, a ser melhores como pessoas e profissionais.

Ao **CNPq**, por viabilizar a realização deste Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia.

Finalmente, agradeço a **Deus**, Ser Superior, por ter-me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas em meu caminho.



PUCRS

RESUMO

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo investigar a regeneração do nervo ciático de ratos após crioterapia com nitrogênio líquido. Para isso, foram empregados 54 ratos da linhagem *Wistar*, machos, adultos jovens. A amostra foi distribuída, aleatoriamente, em nove grupos de seis animais, submetidos a acesso cirúrgico do nervo ciático, seguido de crioterapia, lesão de esmagamento ou ausência de manipulação do nervo (grupo-controle). Análises da marcha, eletroneuromiográfica e histomorfométrica foram realizadas nos períodos de 15, 30 e 70 dias de pós-operatório. Houve alteração morfofuncional significativa nos grupos esmagamento e crioterapia nos primeiros 15 dias. Aos 30 dias, melhora da marcha foi observada, mas a perda funcional ainda se mostrou significativa. No tempo de 70 dias, não foi mais observada diferença significativa da análise da marcha entre os grupos controle, esmagamento e crioterapia. Na eletroneuromiografia, a amplitude do potencial de ação teve valores próximos de zero no grupo esmagamento aos 15 e 30 dias, e valores nulos para o grupo crioterapia nos mesmos períodos. No grupo crioterapia, a mensuração da latência do potencial de ação não foi possível aos 15 e 30 dias, o que sugere valores muito elevados. Já aos 70 dias, foram observados valores significativamente superiores aos dos grupos controle e esmagamento. Na histomorfometria, os grupos submetidos às lesões de esmagamento e congelamento apresentaram número total e densidade de fibras mielinizadas significativamente maiores, cujos valores foram mais elevados aos 30 dias, sendo os do grupo crioterapia significativamente superiores aos dos grupos esmagamento e controle. Os grupos esmagamento e crioterapia exibiram aumento do diâmetro axonal e da espessura da bainha de mielina com o passar do tempo, porém esses não alcançaram os valores do grupo-controle. Os resultados obtidos permitem concluir que a lesão causada pela aplicação direta da crioterapia com nitrogênio líquido sobre o nervo ciático de ratos caracteriza-se como axoniotmese, cujo dano é reversível.

Palavras-chave: Regeneração Nervosa. Crioterapia. Eletromiografia. Amplitude. Recuperação de Função Fisiológica. Contagem de Células. Nervo Ciático. Ratos.



PUCRS

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate sciatic nerve regeneration after cryotherapy with liquid nitrogen. Fifty-four young adult male Wistar rats were randomly distributed into nine groups of six. The animals were submitted to surgical access of the sciatic nerve and subsequent cryotherapy, crush lesion or no manipulation (control). Walking track, electroneuromyographic and histomorphometric analyses were performed at 15, 30 and 70 days postoperative. At 15 days, the crush group and cryotherapy group showed significant morphofunctional alteration in the three methods of evaluation. At 30 days, improvement in the walking track was observed, but functional loss was still significant. At 70 days, there were no significant differences among the cryotherapy, crush and control groups. The electroneuromyographic amplitude was near zero for the crush group at 15 and 30 days, and zero for the cryotherapy group. At 15 and 30 days, it was not possible to measure latency in the cryotherapy group, suggesting the values were too elevated, and at 70 days, significantly higher levels were observed compared to the crush and control groups. In the histomorphometric analysis, the crush and cryotherapy groups showed higher total number and density of myelinated fibers, where the highest values were obtained at 30 days, with the cryotherapy group showing the highest values for all three groups. Crush and cryotherapy groups showed higher axonal diameter and width of the myelin sheath with time, but these values were lower than those of control group. These results lead us to conclude that the lesion caused by direct application of liquid nitrogen on the sciatic nerve of rats is classified as axonotmesis, which is reversible.

Key words: Nerve Regeneration; Cryotherapy; Electromyography; Amplitude; Recovery of Function; Cell Count; Sciatic Nerve; Rats.



PUCRS

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incisão cutânea	52
Figura 2	Dissecção entre os músculos isquiotibiais e glúteo maior	52
Figura 3	Nervo exposto até sua bifurcação distal, manipulado com o fio de nylon	53
Figura 4	Dispositivo de isopor posicionado entre o nervo ciático e a musculatura dissecada	53
Figura 5	Padronização do sítio de manipulação do nervo ciático	54
Figura 6	(A) Criocautério CRY-AC- 3. (B) Extensor reto modelo 106	55
Figura 7	Aplicação do nitrogênio líquido protegendo-se os tecidos adjacentes com compressa de gaze	55
Figura 8	Formação da bola de gelo sobre o nervo após a aplicação do nitrogênio líquido	56
Figura 9	Fixação do cilindro de PVC para padronização da distância de aplicação do nitrogênio líquido	56
Figura 10	Compressão do nervo ciático com pinça de Halsted curva	57
Figura 11	Diminuição do calibre do nervo ciático após a compressão pela pinça	57
Figura 12	Sutura com fio de nylon 4-0	58
Figura 13	Análise da marcha: animal no corredor de madeira	59
Figura 14	Análise da marcha: marcas das patas traseiras	60
Figura 15	Marcas das patas (direita e esquerda) empregadas na análise da marcha	60
Figura 16	(A) e (B) Medidas aplicadas na análise da marcha	60
Figura 17	Eletroneuromiografia: etapa da neurocondução motora. Eletrodos e estimulador bipolar posicionados	62
Figura 18	Eletroneuromiografia: etapa da eletromiografia. Eletrodo e agulha concêntrica posicionados	62

Figura 19	Digitalização em objetiva de 5 X para mensuração da área total do nervo.....	66
Figura 20	Quantificação das fibras mielinizadas: foram analisadas cinco regiões em cada imagem	66
Figura 21	Mensuração da espessura da bainha de mielina: foram avaliadas dez fibras por lâmina	67
Figura 22	Objetiva de 100 X para mensuração da área axonal. Foram utilizadas dez fibras por lâmina e contados os pontos no interior de cada axônio	67
Figura 23	Zoom ótico para facilitar as mensurações da espessura da bainha de mielina	68
Figura 24	Zoom ótico para facilitar a contagem do número de pontos no interior de cada axônio	68
Figura 25	Índice funcional ciático (SFI) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias	73
Figura 26	Amplitude do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias	74
Figura 27	Latência do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias	75
Figura 28	Densidade de fibras mielinizadas (número/mm ²) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias	78
Figura 29	Número total de fibras mielinizadas nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30e 70 dias	79
Figura 30	Diâmetro axonal (µm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias	81
Figura 31	Espessura da bainha de mielina (µm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias	82

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Distribuição da amostra nos diferentes grupos	51
Quadro 2	Classificação das variáveis desnervação, recrutamento e reinervação	70
Tabela 1	Índice funcional ciático (SFI) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	72
Tabela 2	Amplitude do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	74
Tabela 3	Latência do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	75
Tabela 4	Resultados da análise eletromiográfica nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	77
Tabela 5	Densidade de fibras mielinizadas (número/mm ²) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	78
Tabela 6	Número total de fibras mielinizadas nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	79
Tabela 7	Diâmetro axonal (µm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	80
Tabela 8	Espessura da bainha de mielina (µm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
°C	Graus Celsius
CTM	Células-tronco da medula óssea
g	Grama
h	Hora
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
kg	Quilograma
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
ms	Milissegundo
n°	Número
<i>P</i>	Significância estatística de um teste
pH	Potencial de hidrogênio
PRP	Plasma rico em plaquetas
PVC	Policloreto de vinila
PVPI	Polivinil pirrolidona iodo
μm	Micrômetro
μm ²	Micrômetro quadrado
®	Marca registrada
s	Segundo
SFI	Sciatic Functional Index
%	Por cento



PUCRS

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 CRIOTERAPIA	23
2.1.1 Histórico	23
2.1.2 Aparelhagem	24
2.1.3 Mecanismo de Ação	24
2.1.4 Pesquisas Clínicas	26
2.1.5 Pesquisas em Modelos Animais	31
2.2 NERVO PERIFÉRICO	33
2.2.1 Anatomia do Nervo Periférico	33
2.2.2 Classificação das Lesões do Nervo Periférico	34
2.2.3 Reparo do Nervo Periférico	35
2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO REPARO DO NERVO PERIFÉRICO	36
2.3.1 Análise Eletromiográfica	36
2.3.2 Análise Microscópica	38
2.3.3 Análise da Marcha	41
3 OBJETIVOS	46
3.1 GERAL	46
3.2 ESPECÍFICOS	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48
4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA	48
4.3 HIPÓTESE	49
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	49
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	51
4.6 PROCEDIMENTOS	51
4.6.1 Manipulação do Nervo Ciático	51
4.6.1.1 Acesso Cirúrgico	51
4.6.1.2 Isolamento da Área	53
4.6.1.3 Padronização do Sítio de Manipulação	54
4.6.1.4 Crioterapia	54

4.6.1.5 Esmagamento	56
4.6.1.6 Sutura.....	57
4.6.2 Análise da Marcha	58
4.6.3 Análise Eletroneuromiográfica	61
4.6.4 Obtenção dos Espécimes e Eutanásia dos Animais.....	62
4.6.5 Processamento dos Espécimes.....	63
4.6.6 Captura das Imagens Microscópicas e Análise Histomorfométrica	64
4.6.6.1 Área Total do Nervo	64
4.6.6.2 Quantificação das Fibras Mielinizadas	65
4.6.6.3 Espessura da Bainha de Mielina, Área e Diâmetro Axonais	65
4.7 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5 RESULTADOS.....	72
5.1 ANÁLISE DA MARCHA.....	72
5.2 ANÁLISE ELETRONEUROMIOGRÁFICA	73
5.2.1 Neurocondução	73
5.2.1.1 Amplitude do Potencial de Ação do Nervo Ciático	73
5.2.1.2 Latência do Potencial de Ação do Nervo Ciático.....	75
5.2.2 Eletromiografia - Análise Descritiva	76
5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA	77
5.3.1 Quantificação das Fibras Mielinizadas	77
5.3.1.1 Densidade de Fibras Mielinizadas.....	77
5.3.1.2 Número Total de Fibras Mielinizadas	79
5.3.2 Diâmetro Axonal	80
5.3.3 Espessura da Bainha de Mielina	81
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS	104



PUCRS

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O complexo maxilomandibular pode sediar uma variedade de lesões benignas de comportamento biológico localmente agressivo e com potencial para recidivas. Entre elas incluem-se o ameloblastoma, o tumor odontogênico ceratocístico, o mixoma odontogênico e o granuloma central de células gigantes. As recidivas podem estar associadas a células tumorais remanescentes, cistos satélites ou restos teciduais da lesão nas margens ósseas (POGREL, 1993). Para minimizar a possibilidade de recidivas, o tratamento convencional de tais lesões consiste em cirurgia com margem de segurança ou ressecção, o que leva a mutilações de difícil reabilitação estética e funcional.

A abordagem terapêutica de tais lesões recidivantes poderia ser realizada de forma conservadora, por enucleação ou curetagem cirúrgica, se essas fossem complementadas pelo tratamento da cavidade óssea residual com algum agente que eliminasse os remanescentes celulares das lesões. O procedimento deveria, ainda, manter o arcabouço ósseo intacto para permitir a osteocondução (SCHMIDT; POGREL, 2001). A crioterapia, que consiste na aplicação de baixas temperaturas com o objetivo de provocarem-se modificações do meio celular (LEOPARD, 1975; WHITTAKER, 1984), tem sido indicada para esse fim. Uma das modalidades de crioterapia é a criocirurgia, situação em que se utilizam baixas temperaturas para provocar dano tecidual que resulte em morte celular. Para que isso ocorra, é necessário que seja promovido congelamento rápido e que a temperatura nos tecidos seja inferior a 20 °C negativos (GONGLOFF; GAGE, 1983; LEOPARD, 1975). A morte celular ocorre por dano direto, representado pela formação de cristais de gelo intra e extracelulares, assim como por distúrbios osmótico e eletrolítico (POGREL; YEN; TAYLOR, 1996).

A crioterapia é um método eficaz de destruição tecidual por congelamento que, por ser capaz de produzir necrose celular do tecido ósseo ao mesmo tempo em que mantém seu arcabouço inorgânico, vem sendo empregado como terapia complementar em lesões localmente agressivas (POGREL; YEN; TAYLOR, 1996). O procedimento é capaz de proporcionar margem de segurança sem causar dano

estético-funcional (POGREL, 1993), sendo que a principal vantagem do seu emprego como técnica complementar à cirurgia convencional é a possibilidade de um tratamento cirúrgico conservador, capaz de preservar estruturas anatômicas importantes, como os nervos alveolar inferior e infraorbital. Entretanto, em alguns casos, principalmente de lesões extensas, o congelamento tecidual atua também sobre os ramos nervosos, o que resulta em lesão física do tecido nervoso periférico (SCHMIDT; POGREL, 2004).

Alguns estudos clínicos sugerem que as alterações neurosensoriais provocadas pela crioterapia, quando aplicada próximo ou diretamente no tecido nervoso periférico, são reversíveis (SCHMIDT; POGREL, 2001, 2004). Entretanto, há controvérsia sobre o tema, já que as pesquisas existentes consistem em avaliações clínicas, não existindo, na literatura, relatos de estudos experimentais que comprovem tal afirmação. O presente estudo investigou a regeneração do nervo ciático de ratos após crioterapia com nitrogênio líquido por meio das análises da marcha, eletroneuromiográfica e microscópica.



PUCRS

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CRIOTERAPIA

2.1.1 Histórico

Em 1851, James Arnott relatou o uso pioneiro de baixas temperaturas como opção terapêutica para lesões malignas. Era empregada uma mistura de sal e gelo para provocar necrose tecidual em neoplasias de mama (BELTRÃO, 2003; GAGE; BAUST, 1998; LEOPARD, 1975; WHITTAKER, 1984). Em 1892, James Dewar desenvolveu um recipiente a vácuo que permitia o armazenamento de gases liquefeitos. Nesse período, a expressão *agentes criogênicos* passou a ser empregada. Porém, o uso de tais agentes só se popularizou após a Segunda Guerra Mundial, quando o nitrogênio líquido tornou-se comercialmente disponível (GAGE; BAUST, 1998). Na Odontologia, os primeiros relatos sobre a criocirurgia datam da década de 60, quando foi empregada para o tratamento de lesões intra-ósseas em maxila e mandíbula e de lesões da mucosa oral (LEOPARD, 1975).

Criógenos ou agentes criogênicos são gases aplicados com fins medicinais para conservação ou destruição de tecidos ou, ainda, para preservar substâncias biológicas e alimentos. Os criógenos mais empregados em Medicina são: (1) o nitrogênio líquido, cuja temperatura potencial é de 196°C negativos, representa um criógeno inodoro, não inflamável, com poucos efeitos adversos e de fácil transporte; (2) o óxido nitroso, cujo potencial de frio é de 89°C negativos, empregado principalmente em ginecologia e otorrinolaringologia; e (3) o dióxido de carbono, cuja temperatura chega a 78°C negativos, é inodoro, ligeiramente ácido e não inflamável (TURJANSKY; STOLAR, 1992).

Com o surgimento de aparelhagem apropriada que permite o congelamento *in situ* e otimiza o uso do nitrogênio líquido por meio de pontas de aplicação e comandos de controle para a regulação da temperatura desejada

nessas pontas, a criocirurgia desenvolveu-se como recurso terapêutico (GAGE; BAUST, 1998).

2.1.2 Aparelhagem

Os sistemas disponíveis para aplicação da crioterapia podem ser classificados em abertos ou fechados. Os primeiros envolvem a aplicação direta do criógeno na superfície da lesão, por meio de hastes de algodão ou *spray*. Esses sistemas são mais aplicáveis em lesões proliferativas espessas e invasivas, em que o controle da profundidade de destruição tecidual é de importância secundária, bem como no tratamento de lesões ósseas. No sistema fechado, o criógeno é aplicado por meio de uma sonda que entra em contato com o tecido e provoca seu congelamento. Tal sistema oferece maior controle, sendo a profundidade do congelamento e a temperatura menores do que no sistema aberto (BORGES, 2005; READE, 1979).

A aplicação da crioterapia foi facilitada pelo surgimento de aparelhos versáteis e de fácil manuseio. Bernat, em 1993, relatou o emprego do CRY-AC,[®]- 3 (Brymill, Ellington, Connecticut, USA) um aparelho pequeno, de baixo custo, que tem diversas pontas aplicadoras com angulações variáveis. Atualmente, o aparato tem sido empregado em Odontologia e Dermatologia, tanto em pesquisas quanto na rotina clínica (BELTRÃO, 2003; BORGES, 2005, 2007; CERQUEIRA; SANT'ANA FILHO, 2001; CHIARELLO, 2000; KUWAHARA; CRAIG; AMONETTE, 2001; SCORTEGAGNA, 2004).

2.1.3 Mecanismo de Ação

A maioria dos tecidos vitais congela a temperaturas próximas de 2,2°C negativos. Contudo, para que a morte celular ocorra, a temperatura deve ser inferior a 20°C negativos (BELTRÃO, 2003; TAL, 1982, 1992; TAL; RIFKIN, 1986). A

aplicação do agente criogênico promove uma área branca, congelada, de superfície circular, como uma bola de gelo, que cresce durante aproximadamente um minuto e, em seguida, estabiliza. Neste momento, um equilíbrio de temperatura é alcançado. Após a interrupção da aplicação do agente criogênico, a bola de gelo começa a descongelar, e o tecido reaquece (BELTRÃO, 2003; GONGLOFF; GAGE, 1983; TAL, 1982).

Pogrel, Yen e Taylor (1996) avaliaram, ao exame histológico e por meio de termografia infravermelha, o efeito da aplicação de nitrogênio líquido em abdômen de ratos após três etapas de congelamento de um minuto, seguidas, cada uma delas, de intervalo de descongelamento de 2,5 min. Neste estudo, os autores concluíram que a área isotérmica de 20 °C negativos ocupa 70% da área formada pela bola de gelo produzida. Observaram também que, em profundidade, a necrose formada é semicircular e corresponde a 50% do diâmetro da bola de gelo inicial.

O tamanho e a natureza da criolesão são determinados principalmente pela profundidade, pela condutividade térmica, pela osmolaridade, pela composição celular e pela vascularização do tecido a ser congelado (BELTRÃO, 2003; TAL, 1992). Os efeitos deletérios do congelamento podem ser divididos em diretos e indiretos. Os diretos incluem desidratação e distúrbio eletrolítico da célula, alteração de pH, inibição enzimática, desnaturação de proteínas e ruptura da membrana celular. Os indiretos compreendem efeitos vasculares e imunológicos (BORGES, 2005; GONGLOFF; GAGE, 1983).

A morte celular resulta da combinação entre a ação mecânica de cristais de gelo no interior da célula, que rompem as membranas celulares, e o desequilíbrio osmótico e hidroeletrolítico causado pela retenção de líquido dos cristais de gelo (WHITTAKER, 1984). As células mais próximas à ponta aplicadora do aparelho de crioterapia congelam rapidamente, e as células mais distantes o fazem lentamente por estarem próximas a fontes de calor como vasos sanguíneos (TAL, 1982).

Com a queda da temperatura tecidual, a água é cristalizada, sendo que a formação de cristais de gelo ocorre antes no meio extracelular. Conforme os cristais

aumentam de tamanho, mais água é incorporada aos mesmos, o que diminui o volume de solvente e aumenta a concentração de eletrólitos no meio extracelular. Isso cria um ambiente hiperosmótico e resulta na osmose da água para fora das células. Há, então, aumento da concentração de eletrólitos intracelulares, com alteração de pH e desnaturação dos complexos lipoprotéicos das células. Um novo resfriamento faz com que haja formação de cristais de gelo no meio intracelular, que ocorre, provavelmente, em função do rápido congelamento, que não permite a saída de água para fora das células. Uma vez formados, os cristais intracelulares causam a ruptura de organelas citoplasmáticas, como resultado de diferentes coeficientes de contração térmica (BORGES, 2005; GAGE; BAUST, 1998).

A repetição de ciclos produz mais destruição tecidual, porque as células são submetidas a alterações químicas adicionais ao passarem novamente por condições térmicas danosas. Em cada ciclo sucessivo, o resfriamento tecidual é mais rápido, e o volume de tecido congelado e necrosado é maior (BORGES, 2005; GAGE; BAUST, 1998; WHITTAKER, 1984).

2.1.4 Pesquisas Clínicas

Gongloff e Gage (1983) publicaram os resultados do emprego da crioterapia no tratamento de 14 lesões orais, com acompanhamento pós-operatório de dois anos. As lesões incluíam mucocelos, hemangiomas, hiperplasias fibroepiteliais e leucoplasias. O protocolo e o sistema de aplicação variavam de acordo com o tamanho, a localização e o tipo de lesão. Os autores concluíram que os dois sistemas de aplicação, aberto e fechado, podem ser úteis para o tratamento de lesões orais. A sonda é mais apropriada para regiões de difícil acesso e pouco extensas, enquanto o *spray* está mais indicado para áreas cuja visualização direta é possível, bem como para lesões superficiais e difusas. Observaram, também, que, ao aplicar-se o *spray*, devem ser tomadas precauções para evitar o congelamento dos tecidos adjacentes.

Turjansky e Stolar (1992) relatam a aplicação da crioterapia no tratamento de 158 casos de enfermidades orais. O método foi empregado nos sistemas aberto e fechado, em 42 lesões benignas (hemangiomas, linfangiomas, granulomas piogênicos e papilomas), 51 lesões cancerizáveis (leucoplasias e eritroplasias) e 65 lesões malignas (carcinomas *in situ* e carcinomas espinocelulares). Os autores ressaltam como vantagens da técnica: simplicidade; ausência de riscos e efeitos indesejáveis; mínima dor trans e pós-operatória; boa cicatrização e baixo custo. Ainda, sugerem seu emprego em grande escala em serviços especializados para que comparações dos resultados possam ser realizadas em longo prazo.

Pogrel (1993) avaliou 37 pacientes com lesões mandibulares localmente agressivas: 25 tumores odontogênicos ceratocísticos, oito ameloblastomas, dois granulomas de células gigantes e dois mixomas. As lesões foram tratadas por enucleação seguida de crioterapia com *spray* de nitrogênio líquido. Em oito lesões, foi feito enxerto de osso esponjoso de íliaco. O período de avaliação estendeu-se de 1983 a 1990. Foram diagnosticados três casos de deiscência da ferida e exposição óssea; um de recidiva de ameloblastoma com fratura patológica; 19 de parestesia no pós-operatório, que foi atribuída ao tratamento criocirúrgico envolvendo o nervo alveolar inferior, com resolução espontânea. Segundo o autor, a crioterapia com nitrogênio líquido representa um método singular de desvitalização óssea *in situ*, que mantém a estrutura inorgânica e permite a substituição gradativa do osso necrótico por tecido ósseo vital. O autor alerta, ainda, que uma das limitações desse recurso terapêutico é a impossibilidade de monitorização precisa da extensão da necrose tecidual.

Salmassy e Pogrel (1995) investigaram se enxertos ósseos em lojas cirúrgicas de lesões mandibulares agressivas tratadas por enucleação e crioterapia poderiam acelerar a cicatrização e reduzir os índices de complicações. Foram avaliados 20 pacientes, distribuídos em dois grupos de dez indivíduos, sendo que um grupo recebeu enxerto ósseo medular proveniente de íliaco simultaneamente ao tratamento cirúrgico, e o outro, não. Nenhum dos pacientes submetidos ao enxerto associado a enucleação e crioterapia desenvolveu complicações. No grupo submetido a enucleação e crioterapia, sem enxerto ósseo, dois pacientes desenvolveram fratura patológica, e um apresentou deiscência da ferida. Segundo

os autores, pacientes portadores de lesões localmente agressivas, com tamanho aproximado de 4 cm no seu maior diâmetro, tratadas com enucleação, crioterapia e enxerto ósseo medular, exibem menor risco de complicações, bem como maior altura de osso remanescente, o que amplia a chance de colocação de implantes dentários.

Curi, Dib e Pinto (1997) analisaram os resultados pós-operatórios da curetagem seguida de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de ameloblastomas sólidos dos maxilares. Trinta e seis casos de ameloblastoma foram submetidos a exame clínico-radiográfico, sendo 34 localizados na mandíbula e dois, na maxila. A técnica de crioterapia empregada consistiu no uso do *spray*, com ciclos de três aplicações de um minuto cada e intervalo de cinco minutos entre elas. Os autores verificaram recidiva em 11 pacientes, fratura patológica em quatro, deiscência da ferida em 13 e parestesia do nervo alveolar inferior em dois. Segundo os autores, o tratamento dos ameloblastomas sólidos dos maxilares com curetagem seguida de crioterapia pode diminuir tanto a taxa de recidiva, quanto a indicação inicial de ressecção óssea com grande perda tecidual.

Ishida e Ramos-e-Silva (1998) aplicaram a criocirurgia, tanto pela técnica aberta (*spray*) como pela fechada (sonda), no tratamento de diversas lesões orais tais como granuloma piogênico, queilite actínica, fibroma, líquen plano hipertrófico, leucoplasia, eritroplasia, carcinoma verrucoso e hiperplasia papilomatosa. A crioterapia foi considerada um procedimento seguro e de baixo custo, cuja desvantagem consiste na indução de maior edema. Para compensar esse efeito, os autores sugerem a administração de corticoesteróides por ocasião do emprego da técnica em regiões como língua e assoalho bucal.

Schmidt e Pogrel (1999) realizaram estudo retrospectivo para avaliar o emprego de enucleação associada à crioterapia com nitrogênio líquido no manejo de lesões localmente agressivas dos maxilares. Foram avaliadas, por exame clínico e radiográfico, 30 lesões, sendo 26 tumores odontogênicos ceratocísticos, três mixomas e um granuloma de células gigantes. Vinte e quatro desses pacientes já haviam sido tratados anteriormente por enucleação. Foi observada recorrência em três casos (10%) de tumor odontogênico ceratocístico. As complicações

corresponderam a quatro casos de deiscência da ferida (15%) e um de fratura patológica da mandíbula. Os autores afirmam que a combinação de enucleação e crioterapia com nitrogênio líquido pode constituir uma melhor opção terapêutica para lesões localmente agressivas dos maxilares.

Yeh (2000) aplicou a crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de 102 lesões orais, entre elas: mucoccele, leucoplasia, hemangioma, fibroma e hiperplasia. Foi empregado o sistema aberto, sendo as hastes de algodão aplicadas com pressão manual durante 30 a 70 segundos, conforme o tipo de lesão. Hiperemia e edema ocorreram imediatamente após o tratamento, aumentando entre um e dois dias. As lesões tornaram-se necróticas entre três e cinco dias, e a epitelização completou-se entre uma e quatro semanas, conforme o tamanho da lesão. Foi constatado que a técnica envolve baixo custo, é de rápida execução, exhibe pouco sangramento e, na maioria dos casos, não requer anestesia ou sutura.

Cerqueira e Sant'Ana Filho (2001) empregaram a técnica de enucleação seguida de crioterapia com nitrogênio líquido sob a forma de *spray* no tratamento de um mixoma odontogênico de mandíbula em um paciente de 15 anos de idade. Os autores afirmam que a crioterapia associada à curetagem oferece índice de recidiva significativamente menor quando comparada ao tratamento conservador isolado; e pouca ou nenhuma seqüela estético-funcional, se comparada ao tratamento radical. Por fim, sugerem estudos adicionais sobre o aporte sangüíneo à área abordada e, também, sobre a realização de enxertos imediatos associados à técnica.

Schmidt e Pogrel (2001) investigaram, em estudo retrospectivo com 26 pacientes, o emprego de enucleação e criocirurgia combinadas no tratamento de tumores odontogênicos ceratocísticos. Ressaltam que 22 dos 26 pacientes já tinham recebido tratamento prévio por meio de enucleação. Todos os pacientes foram tratados pelo mesmo cirurgião, que aplicou *spray* de nitrogênio líquido na cavidade óssea em dois tempos de um minuto, com intervalo de cinco minutos entre eles. Os autores observaram que 23 (88,5%) dos 26 pacientes não tiveram evidência clínica ou radiográfica de recidiva após dez anos de acompanhamento. Quando presente, a recidiva foi observada entre o primeiro e o segundo anos de pós-operatório. A complicação mais freqüente foi deiscência de sutura (15%), e um paciente com pós-

operatório de seis semanas teve fratura patológica subcondilar da mandíbula. Segundo os autores, a combinação de enucleação e crioterapia com nitrogênio líquido pode oferecer vantagens, como a manutenção da arquitetura óssea, no tratamento de tumores odontogênicos ceratocísticos.

Schmidt e Pogrel (2004) avaliaram as alterações neurossensoriais após crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de lesões mandibulares próximas ao nervo alveolar inferior. Dezesseis pacientes com lesões em região posterior da mandíbula (15 tumores odontogênicos ceratocísticos e um fibromixoma) foram tratados com técnica padronizada de enucleação e crioterapia. A avaliação pós-operatória incluiu o relato dos sintomas dos pacientes e um questionário de avaliação neurossensorial. Todos os pacientes apresentaram alterações neurossensoriais na distribuição do nervo alveolar inferior imediatamente após a crioterapia; dois pacientes tiveram anestesia; e os outros 14, parestesia. A média de tempo de retorno ou melhora neurossensorial foi de 91 dias e variou de seis a 235 dias. Para os autores, a combinação de enucleação e crioterapia com nitrogênio líquido produz alterações mínimas da função do nervo alveolar inferior, já que o epineuro e os axônios seriam resistentes ao congelamento, estando a lesão confinada à bainha de mielina, o que caracteriza a neurapraxia.

Borges (2005) investigou o uso da crioterapia no tratamento de hiperplasia fibroepitelial associada ao uso de prótese mal-adaptada. Foi avaliada a dor trans e pós-operatória durante o tratamento, bem como o tempo de duração dos procedimentos criocirúrgicos. Os 12 pacientes selecionados foram submetidos à crioterapia com nitrogênio líquido pelo sistema fechado, em duas aplicações de 60 segundos com intervalo de 3 minutos entre elas. Dos 12 pacientes tratados, seis apresentaram resolução completa do quadro; três apresentaram diminuição do tamanho da lesão; e três não retornaram para acompanhamento. A crioterapia mostrou-se um método eficiente para o tratamento de lesões hiperplásicas pediculadas com até 12 mm de comprimento; não apresentou bons resultados em hiperplasias sésseis com mais de 9 mm; e constitui procedimento de rápida execução, que pode ser considerado indolor tanto no trans como no pós-operatório.

2.1.5 Pesquisas em Modelos Animais

Pogrel et al. (2002) investigaram o efeito da crioterapia em modelos animais. Os autores empregaram nove *minipigs* sendo que oito deles foram submetidos à confecção de defeitos ósseos artificiais de 3 cm na mandíbula e tratados com *spray* de nitrogênio líquido em dois ciclos de um minuto de congelamento. Um animal serviu como controle, sem nenhum tipo de tratamento do defeito ósseo. Quatro defeitos receberam enxerto ósseo autógeno proveniente do mento, e os outros quatro foram suturados primariamente sem receber enxerto. Dois animais foram mortos aos três dias de pós-operatório para a mensuração histológica da extensão da necrose óssea, e os demais foram mortos aos três meses para avaliação histológica da área de neoformação óssea. O defeito ósseo considerado isoladamente teve média de profundidade de 0,09 mm de necrose óssea, ao passo que o nitrogênio líquido alcançou a profundidade média de 0,82 mm (entre 0,51 e 1,52 mm). Os defeitos sem enxerto ósseo exibiram taxa de 50% de deiscência da ferida e formação de seqüestros. Os defeitos com enxerto não apresentaram maior quantidade de neoformação óssea. O nitrogênio líquido desvitalizou a área circundante do defeito ósseo, e a cicatrização teve melhor qualidade com a aplicação do enxerto ósseo autógeno.

Santos (2002) investigou o efeito de diferentes protocolos de aplicação do nitrogênio líquido em mucosa de dorso de língua de ratos. Foram realizadas duas aplicações de 20 segundos com intervalos de cinco minutos entre elas, empregando-se os sistemas fechado (sonda) e aberto (*spray* e hastes de algodão). A morte dos animais foi realizada decorridas seis horas da criocirurgia, e as variáveis edema, hemorragia, úlcera e necrose foram avaliadas ao exame histológico. A aplicação do nitrogênio líquido com sonda e hastes de algodão induziu dano tecidual mais localizado do que o resultante do *spray*. A autora não é favorável ao uso do nitrogênio líquido em *spray* no tratamento de lesões da mucosa oral.

Beltrão (2003) analisou os efeitos clínicos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábio e mucosa do palato de coelhos. Foram realizadas duas aplicações de um minuto cada com intervalo de cinco minutos entre elas. As

lesões provocadas pelo frio foram acompanhadas até seu reparo final nos tempos de observação de um, dois, cinco, sete, dez e 14 dias. Em cada período, foi medido o comprimento da lesão nos sentidos ântero-posterior e transversal. Os resultados obtidos revelaram que o edema comportou-se de maneira semelhante nos dois sítios de aplicação. O protocolo empregado produziu necrose tecidual cujo padrão de destruição manteve-se similar nos dois sítios anatômicos, sendo que o processo de cicatrização ocorreu em 14 dias.

Popken et al. (2003) investigaram a aplicabilidade de minissondas com 3,2 mm de diâmetro na crioterapia de ossos longos. O congelamento foi realizado em fêmur e tíbia de dez carneiros mantidos sob anestesia geral. Uma cavidade de 3,5 mm de diâmetro foi confeccionada no tecido ósseo dos animais, espaço em que eram colocados a sonda e um termômetro para mensurar a temperatura local durante a crioterapia. Foram aplicados dois protocolos: (1) duas aplicações de 15 minutos com intervalo de sete minutos entre elas; (2) três aplicações de 15 min também com intervalos de sete minutos. Uma semana após as cirurgias, os animais foram mortos, e os ossos tratados foram dissecados, removidos e processados para análise histológica, que revelou necrose de osso compacto e medular em toda a extensão transversal do tecido. Os dois protocolos de aplicação tiveram resultados similares. Os autores afirmam que as minissondas aplicadas promovem congelamento adequado em ossos longos e podem constituir terapia complementar à enucleação cirúrgica em doenças neoplásicas do osso.

Silva (2003) investigou o efeito do *spray* de nitrogênio líquido em mandíbula de coelho. Quinze animais foram submetidos à ostectomia bilateral na base mandibular, cujo resultado foi um defeito ósseo de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, o que simulou uma técnica de ressecção em bloco. As hemimandíbulas direitas compuseram o grupo-teste, em que foi empregado o nitrogênio líquido em duas aplicações de dez segundos cada, com intervalo de 2,5 minutos entre elas. As hemimandíbulas esquerdas compuseram o grupo-controle, em que foram confeccionados os defeitos ósseos, sem aplicação subsequente da crioterapia. Grupos de cinco animais foram submetidos à eutanásia nos períodos pós-operatórios de dois, 15 e 60 dias. As variáveis histológicas investigadas foram: necrose na margem óssea, tecido de granulação, seqüestros ósseos e tecido ósseo

neoformado. Segundo o autor, a aplicação de nitrogênio líquido induziu necrose nas margens ósseas, mas não interferiu na cronologia e nas características microscópicas do processo de regeneração óssea. Além disso, microseqüestros participam do processo de reparo, sem interferir na regeneração do tecido ósseo. O método empregado garante a previsão da extensão da necrose do tecido ósseo.

Scortegagna (2004) investigou o grau de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos produzidos em mandíbula de coelhos submetidos à aplicação de nitrogênio líquido e subsequente inserção de enxerto ósseo autógeno. Para isso, foram empregados 15 coelhos, distribuídos em três grupos de cinco animais, que foram avaliados nos períodos de dois, 15 e 60 dias de pós-operatório. Foram realizados defeitos ósseos na hemimandíbula direita de cada animal, que foram tratados com aplicação de *spray* de nitrogênio líquido seguindo o protocolo de duas aplicações de dez segundos, com um intervalo de 2,5 minutos. Após a crioterapia, o defeito serviu como leito receptor para o enxerto proveniente da hemimandíbula contralateral. Os defeitos ósseos das hemimandíbulas do lado esquerdo não foram submetidos à crioterapia, no entanto, receberam enxerto proveniente do lado direito e constituíram o controle. Ao exame microscópico, foi observada área de necrose óssea significativamente maior nos períodos de dois a 15 dias de pós-operatório, quando comparados com seus controles. Os dados obtidos permitiram concluir que a crioterapia com nitrogênio líquido retarda, porém não inviabiliza o processo de integração enxerto-leito receptor, podendo ser empregada previamente à realização dos enxertos.

2.2 NERVO PERIFÉRICO

2.2.1 Anatomia do Nervo Periférico

Os nervos periféricos são extensões do sistema nervoso central que integram as funções sensitiva e motora das extremidades corpóreas. A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio, constituído por um corpo celular,

localizado na medula ou no gânglio espinhal e por sua extensão, a fibra nervosa. Esta é formada pelo axônio e por seu envoltório de bainha conjuntiva, o endoneuro, que é elástico, resistente e protege as fibras de traumas mecânicos. Existem neurônios envoltos por uma camada de mielina, produzida pelas células de Schwann, e neurônios não-mielinizados. Os mielinizados exibem estreitamentos denominados nódulos de Ranvier, sítios em que ocorrem as trocas iônicas durante a condução saltatória do estímulo nervoso (FIGOLS, 2000).

O nervo periférico consiste em um feixe ou feixes de fibras nervosas. As fibras motoras originam-se da coluna anterior da medula espinhal, e as sensitivas, da coluna e do gânglio posterior. Várias fibras nervosas, de diferentes tamanhos, agrupam-se para formar os fascículos, e cada fascículo é envolto por um tecido conjuntivo denso e resistente que o protege de traumas e compressões externas, o perineuro. Circundando externamente o perineuro, encontra-se um tecido conjuntivo formado por fibras colágenas e elásticas, também com função protetora, chamado epineuro (KUMAR, 2008).

2.2.2 Classificação das Lesões do Nervo Periférico

A disfunção dos nervos periféricos decorre de lesão do axônio, das células de Schwann ou da bainha de mielina. Tais lesões foram classificadas, primeiramente por Seddon, em três tipos: neurapraxia (tipo I), axoniotmese (tipo II) e neurotmese (tipo III) (BURNETT; ZAGER, 2004).

A neurapraxia é a lesão mais leve do tecido nervoso periférico, em que a bainha de mielina é afetada, enquanto a estrutura do nervo, epineuro e axônio, permanece intacta. Ocorre bloqueio reversível da condução nervosa com perda funcional transitória, sendo que esse tipo de lesão pode ser provocado por trauma contuso ou isquemia local do nervo. Já a axoniotmese ocorre quando a continuidade do axônio é rompida, mas a bainha epineural continua intacta. Surge a degeneração Walleriana que causa perda de função nervosa, mas a recuperação pode ser de bom prognóstico, com tempo variável de acordo com o grau da lesão. Esse tipo de

lesão pode ser provocado por um forte trauma fechado, esmagamento ou extrema tração do nervo. A neurotmele corresponde à lesão periférica mais grave. Envolve perda completa de continuidade do nervo e da integridade do epineuro, bem como perda de função com prognóstico ruim. Pode ser provocada por fraturas ósseas com deslocamento, rompimento por projéteis de arma de fogo ou transecção iatrogênica (HUPP, 2005; MINAMOTO, 2007).

2.2.3 Reparo do Nervo Periférico

O nervo periférico é suscetível aos mesmos tipos de trauma que afetam outros tecidos: contusão, compressão, esmagamento, estiramento, avulsão e laceração. Assim, a interrupção da continuidade da estrutura do nervo por um trauma resulta em parada de transmissão do impulso nervoso e desorganização de sua atividade funcional (FIGOLS, 2000).

O reparo normal do nervo periférico tem duas fases: degeneração e regeneração. A degeneração classifica-se em desmielinização segmentar e degeneração Walleriana. Na primeira, ocorre dissolução da bainha de mielina em segmentos isolados. Essa desmielinização parcial causa diminuição da velocidade de condução e pode evitar a transmissão de alguns impulsos nervosos. Os sintomas incluem parestesia, disestesia e hiperestesia. A desmielinização segmentar ocorre após lesões de neurapraxia. Na degeneração Walleriana, o axônio e a bainha de mielina do nervo distal ao local do segmento nervoso interrompido desintegram-se totalmente. Esse tipo de degeneração bloqueia toda a condução entre o nervo distal e o coto axonal proximal e ocorre após lesões de axoniotmele e neurotmele (HUPP, 2005).

A regeneração de um nervo periférico pode iniciar imediatamente após a lesão. O coto do nervo proximal forma um grupo de novas fibras, denominadas cone de crescimento, que crescem em direção ao canal remanescente de células de Schwann. O crescimento progride, em média, 0,5 mm por dia e continua até que o coto distal seja alcançado ou o crescimento bloqueado por fibras de tecido

conjuntivo ou osso. Durante a regeneração, novas bainhas de mielina podem-se formar, e o axônio pode aumentar de diâmetro. Ao serem gerados estímulos funcionais, o paciente terá sensações alteradas com sintomas de parestesia ou disestesia (HUPP, 2005; KUMAR, 2008).

2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO REPARO DO NERVO PERIFÉRICO

A eletroneuromiografia e a histomorfometria são métodos consagrados de avaliação da recuperação de nervos periféricos após lesões de natureza mecânica, química ou térmica. Entretanto, bons resultados nesses dois métodos, não indicam, necessariamente, o retorno da função motora ou sensitiva (AL-BISHRI et al., 2005; BOZKURT et al., 2008).

De Medinaceli, Freed e Wyatt (1982) desenvolveram um método quantitativo para avaliação funcional do nervo ciático de ratos denominado *índice funcional ciático*, que se baseia nas medidas das pegadas dos animais. Esse método foi posteriormente aprimorado (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989; BOZKURT et al., 2008) e tem sido considerado o padrão-ouro para avaliação da recuperação funcional após lesão do nervo ciático (AL-BISHRI et al., 2005). A principal limitação do método decorre do fato de que, muitas vezes, a impressão das pegadas é dificultada por contraturas musculares, autotomias e borramento causado pelo movimento desordenado da cauda do animal (DEFRIN; ZEITOUN; URCA, 1996; KAUPPILA, 1998; MUNRO et al., 1998; WEBER et al., 1993). Segundo Varejão et al. (2004), o *índice funcional ciático* é o método mais confiável para análise da recuperação funcional, pois permite a integração entre os sistemas sensitivo e motor.

2.3.1 Análise Eletroneuromiográfica

A análise eletroneuromiográfica baseia-se na interpretação da atividade bioelétrica do músculo e do nervo em resposta à estimulação elétrica. A mesma divide-se em duas etapas: (1) estudo da neurocondução motora, que visa examinar

a habilidade do nervo periférico de propagar os potenciais de ação; e (2) eletromiografia, que compara a atividade elétrica das fibras musculoesqueléticas em repouso e durante a ativação voluntária do músculo (ROBINSON; KELLOGG, 2001).

Martins et al. (2006) empregaram testes eletroneurofisiológicos para avaliar o reparo do nervo ciático de ratos após transecção e tratamento com três diferentes técnicas. Trinta ratos foram distribuídos em três grupos de dez animais conforme a técnica de tratamento aplicada. No grupo A os nervos seccionados foram tratados com sutura, no B foi empregada cola de fibrina para auxiliar o reparo e no C, uma combinação das duas técnicas. Amplitude, latência e velocidade de condução foram mensuradas antes e após 24 semanas da secção do nervo. Quando consideradas a latência e a velocidade de condução, os animais do grupo B exibiram resultados significativamente superiores aos do grupo A. Os animais do grupo C apresentaram resultados eletroneurofisiológicos superiores, porém sem diferença significativa quando comparados aos do grupo A. Os autores concluíram que o reparo dos nervos com aplicação da cola de fibrina exibiu melhor resultado do que com a sutura.

Özay et al. (2007) testaram, em ratos, o efeito da citicolina sobre o reparo de células nervosas periféricas. Setenta animais tiveram seus nervos ciáticos seccionados e suturados e foram distribuídos em dois grupos de 35 ratos. No primeiro grupo, os nervos, antes do fechamento tecidual, receberam aplicação tópica de 0,4 mL de solução salina e constituíram o grupo-controle. No segundo grupo, foi aplicada a mesma quantidade de citicolina. Os dois grupos foram avaliados, na quarta e na décima segunda semanas de pós-operatório, por meio de eletroneurofisiologia. Não foi observada diferença significativa entre ambos no período pós-operatório de quatro semanas. Já no período de observação mais longo (12 semanas), a amplitude do grupo tratado com citocolina foi significativamente maior que a do grupo tratado com solução salina. Os autores concluíram que a citicolina melhora a regeneração de nervos periféricos lesados. Ressaltam, ainda, que outros estudos são necessários para definir mecanismos de ação e dose ideal da citicolina para o tratamento de nervos periféricos lesados em modelo animal e em humanos.

Wu et al. (2008) avaliaram, por meio de estudo eletroneurofisiológico, o efeito da terapia com ondas de impacto em nervo ciático de rato. Foram empregados 36 ratos distribuídos em cinco grupos: grupo I, sete ratos submetidos a acesso cirúrgico do ciático e a ondas de impacto de intensidade alta; grupo II, sete ratos submetidos a acesso cirúrgico do ciático e ondas de impacto de intensidade moderada; grupo III, sete ratos submetidos a acesso cirúrgico do ciático e a ondas de impacto de intensidade leve; grupo IV (*sham*), 12 ratos submetidos somente a acesso cirúrgico do nervo ciático; grupo V, três ratos sem acesso cirúrgico e sem terapia de ondas de impacto. As variáveis eletroneurofisiológicas avaliadas foram a velocidade de condução e a amplitude do impulso nervoso mensuradas no dia 0, antes e imediatamente após a aplicação das ondas, e nos dias 1, 4, 7 e 14. A velocidade de condução e a amplitude diminuíram em todos os grupos em que as ondas de choque foram aplicadas, sendo essa redução mais pronunciada (60% do nível basal) e persistente (até o dia 7) no grupo que recebeu ondas de intensidade alta. Já no grupo que recebeu ondas de intensidade baixa, os valores da velocidade de condução e amplitude retornaram ao nível basal após o dia 1. Os achados sugerem que a intensidade das ondas de choque influencia o dano ao nervo periférico e que o emprego dessa terapia implica baixo risco de complicações em longo prazo.

2.3.2 Análise Microscópica

Kerns et al. (1991) compararam, por meio de histomorfometria, a regeneração do nervo ciático de ratos após lesões de congelamento e esmagamento. Os animais foram distribuídos conforme o tipo de lesão, em dois grupos de nove animais cada. As lesões de esmagamento foram realizadas com pinça de joalheiro, e as de congelamento, com sonda, ambas em dois ciclos de 30 segundos. Os nervos ciáticos contralaterais de ambos os grupos foram acessados cirurgicamente sem serem lesados e constituíram o controle. As variáveis histomorfométricas área transversal do nervo, número de fibras mielinizadas, diâmetro das fibras mielinizadas e espessura da bainha de mielina foram comparadas aos 70 dias de pós-operatório. A análise histomorfométrica indicou

redução significativa da área transversal e do número de fibras mielinizadas nos dois grupos experimentais. O diâmetro das fibras e a espessura da bainha de mielina não retornaram ao normal em ambos os grupos e tiveram redução significativa no grupo congelamento. Os autores concluíram que os dois tipos de lesão exibiram padrão de regeneração semelhante.

Bridge et al. (1994) avaliaram a regeneração do tecido nervoso após diferentes lesões de esmagamento. Cento e cinco ratos foram distribuídos em sete grupos de 15 animais, de acordo com o tipo de lesão: grupo I, lesões únicas de esmagamento realizadas por pinça de joalheiro número 5 aplicada durante 15 segundos; grupo II, lesões de esmagamento duplas (realizadas duas vezes) induzidas por aplicação da pinça durante 15 segundos; grupo III, mesma lesão do grupo I com tempo de aplicação da pinça de 30 segundos; grupo IV, mesma lesão do grupo II com tempo de aplicação da pinça de 30 segundos; grupo V, mesma lesão dos grupos I e III com tempo de aplicação da pinça de 60 segundos; grupo VI, lesão única de esmagamento realizada por uma pinça hemostática com dente aplicada durante 15 segundos; grupo VII, *sham*, sem lesão do nervo. Foi realizada análise histomorfométrica dos nervos lesados aos dois meses de pós-operatório. A diminuição do diâmetro das fibras mielinizadas foi significativa nos grupos I, II, III, IV, V e VI quando comparados ao grupo VII. Os autores concluíram que as lesões de esmagamento induzidas nos seis grupos estudados são similares e oferecem um modelo confiável de lesão do tipo axoniotmese.

De Medinaceli (1995) avaliou o reparo do nervo ciático após lesões de transecção e esmagamento. As lesões de esmagamento foram feitas em 20 ratos Wistar por meio de pressão com pinça hemostática durante 30 segundos. Já as transecções foram feitas em 13 animais com lâmina de bisturi número 15 e tratadas com microssuturas. Os animais foram mortos após três meses para análise histomorfométrica. As variáveis avaliadas foram: número de fibras mielinizadas por área de nervo; diâmetro médio de cada fibra; espessura da bainha de mielina e área de tecido conjuntivo. As variáveis tiveram resultados semelhantes nos dois tipos de lesão. Foi observada correlação negativa entre o número de fibras e suas dimensões - quanto maior o número, mais finas e menos mielinizadas eram as fibras. Não foi verificada correlação entre número de fibras e área de tecido conjuntivo. Os autores

afirmam que, sob o ponto de vista histomorfométrico, não há diferença entre os dois grupos de lesões e que a histomorfometria não é capaz de mensurar um importante fator funcional da reparação do tecido nervoso que é a proporção de fibras regeneradas que atingem o alvo periférico adequadamente.

Monte-Raso et al. (2005) investigaram a influência da aplicação do ultra-som terapêutico na regeneração do nervo ciático de ratos submetidos a lesões de esmagamento. Foram empregados 20 ratos Wistar distribuídos em dois grupos de dez animais cada, sendo em um grupo aplicado ultra-som nos dez primeiros dias subseqüentes à lesão de esmagamento. O nervo ciático lesado (lado direito) de cada animal foi dividido em três segmentos de 5 mm, sendo um distal, um proximal e um intermediário que incluía a lesão de esmagamento. Os segmentos foram submetidos à análise histomorfométrica, considerando-se como controle o nervo ciático do lado esquerdo. Na histomorfometria, foram mensurados o número de núcleos de células de Schwann, o número de fibras mielinizadas e a espessura da bainha de mielina. A porção proximal do ciático exibiu, nos dois grupos, número de fibras mielinizadas e espessura da bainha de mielina normais. O segmento intermediário (sítio da lesão) teve fibras nervosas com menor diâmetro e menor espessura da bainha de mielina em ambos os grupos. Já na porção distal do nervo, houve predominância de fibras nervosas com diâmetro e espessura de mielina menores e degeneração Walleriana, porém foram visualizadas algumas fibras de maior diâmetro com mielina mais espessa. Nessa porção do nervo, principalmente no grupo em que foi aplicado o ultra-som, foi observado, também, maior número de núcleos de células de Schwann. Segundo os autores, os achados demonstram que a porção distal do nervo é mais adequada para esse tipo de análise, e a aplicação do ultra-som auxilia a regeneração neural. Entretanto, são necessários novos estudos que estabeleçam a dosimetria ideal para humanos.

Luís et al. (2007) avaliaram, por meio de histomorfometria, a regeneração do nervo ciático de ratos após lesão de esmagamento. Foram empregados 12 animais, seis deles compuseram o grupo-controle, sem lesão; e outros seis, o grupo-teste, em que foram induzidas lesões de esmagamento por meio de um *clamp* não serrilhado. Os animais foram mortos aos três meses de pós-operatório, e o número

de fibras mielinizadas, a área axonal, o diâmetro da fibra e a espessura da bainha de mielina foram avaliados. Os nervos lesados exibiram número de fibras mielinizadas significativamente maior do que o do grupo-controle, assim como diâmetro das fibras e espessura da bainha de mielina menores. Os autores afirmam que o emprego do *clamp* é confiável como modelo de lesão por esmagamento, e o tempo de observação ideal deveria ser estendido até três meses de pós-operatório.

2.3.3 Análise da Marcha

Kerns et al. (1991) compararam, por meio da análise da marcha, a recuperação funcional do nervo ciático de ratos após lesões de congelamento e esmagamento. Os animais foram distribuídos, conforme o tipo de lesão, em dois grupos de nove animais cada. As lesões de esmagamento foram realizadas com pinça de joalheiro e as de congelamento, com sonda, ambas com duas aplicações de 30 segundos. O nervo ciático contralateral foi acessado cirurgicamente em ambos os grupos e, sem ser lesado, constituiu o controle. A análise da marcha foi realizada semanalmente até o período de 70 dias de pós-operatório. Os autores observaram completa perda de função nos grupos esmagamento e congelamento nos primeiros 15 dias. Os valores da marcha de ambos os grupos foram semelhantes durante todos os períodos avaliados, retornando a valores próximos aos do grupo-controle ao final de 40 dias. Os autores concluíram que as lesões de congelamento e esmagamento exibem padrão de recuperação funcional semelhante.

Lago Júnior et al. (2005) avaliaram o reparo do nervo ciático de ratos após transecção e tratamento com diferentes técnicas. Após transecção do ciático, 30 ratos foram distribuídos em três grupos de dez animais, conforme o tratamento aplicado: grupo 1, uso de sutura; grupo 2, sutura e cola de fibrina; e grupo 3, cola de fibrina. A avaliação funcional foi realizada por meio da análise da marcha na quarta, décima segunda e décima sexta semanas pós-operatórias. Nesse teste, o animal era colocado em um corredor de madeira com acesso a um ambiente escuro. Sobre o corredor era colocada uma tira de papel, estando o rato a ser testado com suas patas traseiras marcadas com tinta. Foram mensuradas nas tiras de papel as

seguintes variáveis: comprimento, largura total e largura intermediária das pegadas. A seguir, as medidas foram inseridas na fórmula de Bain, e o índice funcional ciático, calculado. A sutura epineural associada à cola de fibrina mostrou melhor resultado que o emprego da sutura ou da cola de fibrina isoladamente no reparo da transecção aguda do nervo ciático.

Monte-Raso, Barbieri e Mazzer (2006) investigaram a reprodutibilidade interexaminadores do método da análise da marcha, medido por um *software* desenvolvido para este fim. Foram empregados 20 ratos, cujo nervo ciático foi esmagado com uma pinça mosquito, e as impressões das pegadas dos animais foram obtidas na fase pré-operatória e, após a cirurgia, semanalmente até a oitava semana, em uma pista de marcha. As impressões foram digitalizadas, armazenadas e avaliadas por quatro examinadores, que mensuraram comprimento, largura e largura intermediária das pegadas. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística que mostrou forte correlação entre os examinadores na avaliação pré-operatória e nas terceira, quarta, quinta, sexta, sétima e oitava semanas. Na primeira e na segunda semanas, o índice de correlação foi próximo de zero, mostrando a pouca reprodutibilidade do método nesse período. Os autores concluíram que o método da análise da marcha em ratos é plenamente reprodutível e confiável quando aplicado a partir da segunda semana da indução da lesão de esmagamento do nervo.

Silva et al. (2006) investigaram o efeito das células-tronco da medula óssea (CTM) e do plasma rico em plaquetas (PRP) na regeneração do nervo ciático de ratos. Um defeito de 10 mm foi realizado no nervo ciático de 48 ratos e reconstruído com diferentes materiais. No grupo 1 (grupo-controle), foi empregado um tubo de silicone vazio para unir as margens do nervo; no 2, o tubo foi preenchido com células tronco da medula óssea; no 3, com plasma rico em plaquetas; no 4, com CTM e PRP; e no 5, foi aplicado um auto-enxerto, ou seja, o próprio fragmento de nervo removido foi suturado. O índice funcional ciático foi obtido para cada animal após dez semanas do procedimento cirúrgico. A análise quantitativa dos índices sugeriu melhor recuperação funcional no grupo CTM, seguido pelos grupos PRP e CTM+PRP, os quais tiveram resultados semelhantes. O grupo-controle apresentou resultados inferiores aos dos demais grupos. Os autores

concluíram que o uso de células-tronco da medula óssea de ratos, associado à técnica de tubulização, promove boa recuperação da função motora em lesões de ressecção de nervo periférico. O mecanismo exato responsável por esse efeito não é completamente compreendido, sendo necessárias pesquisas adicionais para elucidação do fato.

Santos e André (2007) investigaram a recuperação funcional de ratos submetidos a lesão de esmagamento do nervo ciático produzida por compressão com pinça hemostática durante 30 segundos e aplicação de estímulo elétrico. Trinta ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de dez animais (G1, G2, G3), cada um com cinco animais no grupo experimental e cinco no grupo-controle. Os três grupos diferiam somente pelo período em que foram submetidos ao estímulo elétrico sobre a região operada: o G1, do primeiro ao sétimo dia; o G2, do oitavo ao décimo quarto; e o G3, do décimo quinto ao vigésimo primeiro dia após a lesão de esmagamento. Os animais do grupo-controle foram submetidos a todos os procedimentos empregados no grupo experimental, entretanto, o aparelho de estimulação elétrica encontrava-se desligado. A análise funcional foi realizada por meio da análise da marcha que mensurou comprimento, largura e largura intermediária das pegadas. Para obtenção desses valores, os animais foram colocados sobre uma pista, estimulados a caminhar e filmados durante a caminhada. As filmagens foram realizadas 24 horas, sete, 14 e 21 dias após a lesão neural. A estimulação elétrica prejudicou a regeneração do nervo ciático dos animais tratados durante a segunda e a terceira semanas após a lesão. Já nos ratos tratados na primeira semana, a evolução funcional foi semelhante à do grupo-controle. Os autores concluíram que os efeitos do estímulo elétrico sobre a regeneração neural dependem do momento da sua aplicação. Quando aplicado tardiamente (após sete dias), o estímulo foi prejudicial à regeneração do nervo ciático, mas, quando aplicado precocemente (24 h após a lesão), embora não tivesse provocado efeitos negativos, a evolução não foi diferente da demonstrada pelos animais do grupo-controle.

Ilha et al. (2008) avaliaram os efeitos de dois testes físicos na recuperação da função motora do nervo ciático de ratos. Trinta e sete ratos foram distribuídos, aleatoriamente, em cinco grupos: (grupo 1, controle) oito ratos sem lesão do nervo ciático e sem realização de exercício físico; (grupo 2) sete ratos com lesão de

esmagamento do ciático sem atividade física; (grupo 3) sete ratos com lesão de esmagamento e treinamento aeróbico de corrida; (grupo 4) sete ratos com lesão de esmagamento e exercícios repetidos de força muscular (escalada); e (grupo 5) oito ratos com lesão de esmagamento e associação de treinamento aeróbico e exercícios de força muscular. Os dois testes físicos foram realizados uma vez ao dia, do décimo quarto dia até a quinta semana pós-operatória. A recuperação funcional do nervo foi avaliada por meio da análise da marcha. Esta foi realizada na semana do término dos testes físicos e na segunda, terceira, quarta e quinta semanas pós-testes. Os melhores resultados da marcha dos animais que sofreram lesão de esmagamento do ciático foram encontrados no grupo que recebeu treinamento aeróbico após a lesão traumática. Os autores concluíram que o treinamento aeróbico melhora a recuperação funcional após uma lesão traumática de nervo periférico. Por outro lado, exercícios de força muscular, isoladamente ou combinados com exercício aeróbico, podem atrasar a recuperação funcional do nervo periférico.



PUCRS

3OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a regeneração do nervo ciático de ratos após crioterapia com nitrogênio líquido.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Analisar, por meio de eletroneurofisiologia e histomorfometria as características morfofuncionais do nervo ciático de ratos submetidos à crioterapia com nitrogênio líquido;
- b) Avaliar, por meio da análise da marcha, o desempenho motor de ratos submetidos à crioterapia do nervo ciático com nitrogênio líquido;
- c) Classificar a lesão do nervo ciático de ratos, após a aplicação direta da crioterapia com nitrogênio líquido, em neurapraxia, axoniotmese ou neurotmese.



PUCRS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa foi desenvolvida de acordo com os princípios éticos de experimentação animal postulados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (GOLDIM, 1995), bem como com as normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais previstas no capítulo XIX, arts. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e do Conselho Nacional de Saúde-Resolução nº 1, de 13 de junho de 1988, e em observância à Lei 6638 de 08 de maio de 1979. O protocolo da pesquisa foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Anexo A) e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Anexo B).

4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo enquadra-se no paradigma tradicional quantitativo e classifica-se como um estudo quase-experimental (CAMPBELL; STANLEY, 1979), que apresenta o seguinte desenho:

AX n|O₁.....O₃
 AC l|eO₁.....O₃
 AC O₁.....O₃

A- Animal
 C- Controle
 X- Grupo Experimental
 O- Observação

nl- crioterapia com nitrogênio líquido

le- lesão de esmagamento

4.3 HIPÓTESE

A crioterapia com spray de nitrogênio líquido aplicada diretamente sobre o tecido nervoso periférico causa alterações reversíveis.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra da presente pesquisa foi composta por 54 ratos, da espécie *Rattus norvegicus*, ordem *Rodentia*, da linhagem Wistar, machos, adultos jovens, clinicamente sadios com peso variando de 250 g a 346 g (peso médio de 272 g) e provenientes do biotério central da Universidade Federal de Pelotas, RS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de tamanho apropriado para sua criação (60 cm de comprimento por 50 cm de largura por 22 cm de altura com no máximo cinco ratos por caixa), dispostas em estante ventilada¹, com temperatura controlada (23°C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h; luzes apagadas às 19 h). Ração e água foram oferecidas *ad libitum*, e a limpeza das caixas foi realizada três vezes por semana, por pessoal treinado em bioterismo. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital São Lucas da PUCRS.

A amostra foi distribuída, aleatoriamente, em nove grupos de seis animais, e os grupos, classificados conforme o tipo de lesão ao nervo periférico e tempo decorrido para realização das análises e eutanásia (Quadro 1):

¹ Alesco, Monte Mor, SP, Brasil

- a) Grupo-controle, *sham*, 15 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico sem indução de lesão no nervo ciático, que foram mortos aos 15 dias de pós-operatório;
- b) Grupo esmagamento, 15 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico e lesão de esmagamento do nervo ciático, que foram mortos aos 15 dias de pós-operatório;
- c) Grupo crioterapia, 15 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico e lesão do nervo ciático por congelamento com nitrogênio líquido, que foram mortos aos 15 dias de pós-operatório;
- d) Grupo-controle, *sham*, 30 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico sem que fosse realizada lesão no nervo ciático, que foram mortos aos 30 dias de pós-operatório;
- e) Grupo esmagamento 30 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico e lesão de esmagamento do nervo ciático, que foram mortos aos 30 dias de pós-operatório;
- f) Grupo crioterapia, 30 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico e lesão do nervo ciático por congelamento com nitrogênio líquido, que foram mortos aos 30 dias de pós-operatório;
- g) Grupo-controle, *sham*, 70 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico sem que fosse induzida lesão do nervo ciático, mortos aos 70 dias de pós-operatório;
- h) Grupo esmagamento, 70 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico e lesão de esmagamento do nervo ciático, que foram mortos aos 70 dias de pós-operatório;
- i) Grupo crioterapia, 70 dias: seis animais submetidos a acesso cirúrgico e lesão do nervo ciático por congelamento com nitrogênio líquido, que foram mortos aos 70 dias de pós-operatório.

Os animais, em cada grupo, foram identificados com números de 1 a 6 registrados na cauda. O grupo esmagamento foi empregado como controle-positivo.

Tempo de morte dos animais	Grupo-controle	Grupo esmagamento	Grupo crioterapia
15 dias	6 animais	6 animais	6 animais
30 dias	6 animais	6 animais	6 animais
70 dias	6 animais	6 animais	6 animais

Quadro 1 - Distribuição da amostra nos diferentes grupos

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos da amostra os animais que exibiram complicações pós-operatórias como infecção, necrose ou autotomia das patas operadas.

4.6 PROCEDIMENTOS

4.6.1 Manipulação do Nervo Ciático

4.6.1.1 Acesso Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Sinalização Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS, empregando-se instrumental padronizado e esterilizado em autoclave.

Após pesagem, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de solução composta por quetamina 5%² na dosagem de 90 mg/kg e xilazina 2%³ na dosagem de 15 mg/kg. Cada animal foi identificado, e o membro inferior direito preparado para o procedimento, respeitando-se a rotina cirúrgica que incluiu

² Dopalen®, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil

³ Anasedan®, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil

tricotomia com máquina de tosa elétrica⁴ e aplicação de solução anti-séptica de PVPI⁵. O animal foi posicionado em decúbito ventral, e o nervo ciático abordado por incisão cutânea lateral retilínea com 3 cm de comprimento realizada com lâmina de bisturi⁶ n° 15 montada em cabo n° 3 tipo Bard Parker (Figura 1). A incisão estendia-se do tubérculo maior do fêmur até o côndilo femoral lateral, seguida de dissecção romba com tesoura Metzembraum entre os músculos isquiotibiais e glúteo maior (Figura 2), deixando-se o nervo exposto desde a sua emergência até a bifurcação distal (Figura 3). Para facilitar a manipulação, o nervo foi laçado com um fio de nylon n° 5-0⁷ (Figura 3), e os tecidos foram afastados com afastadores tipo Senn-Mueller.



Figura 1 - Incisão cutânea



Figura 2 - Dissecção entre os músculos isquiotibiais e glúteo maior

⁴ Aparador Elétrico de Barba e Bigode. Panasonic, Manaus, AM, Brasil

⁵ Povidine®, MERCK AS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁶ BD Lâmina®, Curitiba, PR, Brasil

⁷ Mononylon®, São José dos Campos, SP, Brasil

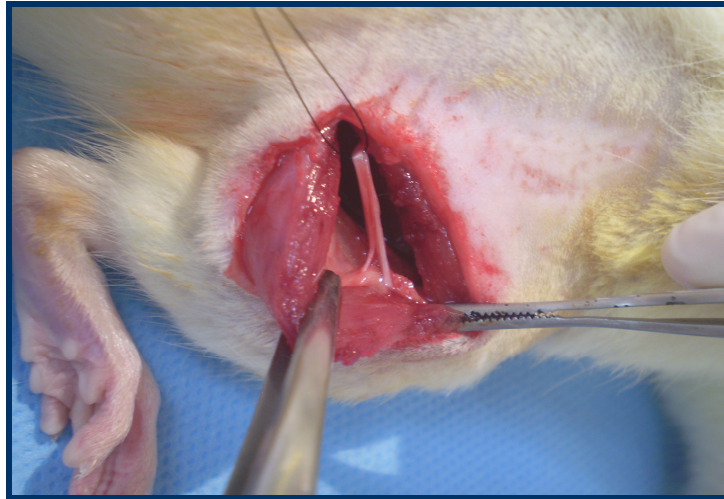


Figura 3 - Nervo exposto até sua bifurcação distal, manipulado com o fio de nylon

4.6.1.2 Isolamento da Área

O passo seguinte consistiu na colocação de um dispositivo de isopor entre o nervo ciático e a musculatura dissecada (Figura 4) com a finalidade de isolar a área de atuação da crioterapia. Esse dispositivo foi mantido em posição durante 2 min e 50 s, o que correspondia ao tempo total de aplicação do nitrogênio líquido.



Figura 4 - Dispositivo de isopor posicionado entre o nervo ciático e a musculatura dissecada

4.6.1.3 Padronização do Sítio de Manipulação

O sítio de manipulação do nervo ciático foi padronizado em todos os animais a 1 cm proximal da bifurcação do nervo, nos ramos tibial e peroneal (Figura 5). Nos grupos experimentais, o nervo ciático foi submetido à crioterapia ou à lesão mecânica por esmagamento. Os grupos-controle (*sham*) foram submetidos ao acesso cirúrgico e ao isolamento da área, sem, no entanto, ser induzida qualquer lesão do nervo ciático.

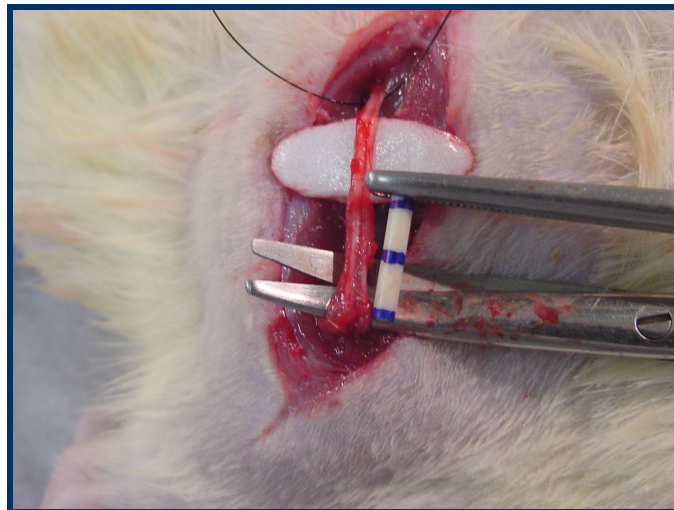


Figura 5 - Padronização do sítio de manipulação do nervo ciático

4.6.1.4 Crioterapia

Para aplicação do nitrogênio líquido, empregou-se o criocautério B-700⁸ com capacidade para armazenar 500 mL de nitrogênio líquido (Figura 6A). O aparelho dispõe de pontas do tipo borrifadoras e do tipo sondas fechadas, adaptáveis e cambiáveis, que podem ser selecionadas conforme o volume de nitrogênio que se deseja aplicar. Para o procedimento em questão foi empregado o extensor reto, modelo 106, com a ponta borrifadora (Figura 6B). O nitrogênio líquido

⁸ CRY-AC® BRYMILL, Ellington, Connecticut, USA

armazenado em cilindros próprios foi transferido para o criocautério aproximadamente 1 h antes do procedimento.

A crioterapia com *spray* de nitrogênio líquido consistiu em duas aplicações de 10 s com intervalo de 2,5 min entre elas (Figura 7). O procedimento proporcionava a formação de uma bola de gelo sobre o nervo (Figura 8). Alguns cuidados foram tomados com o intuito de minimizarem-se danos teciduais adicionais que pudessem comprometer os resultados do experimento. Ao lado da ponta borrifadora do *spray* foi fixado um cilindro de PVC para que a distância de aplicação do nitrogênio fosse padronizada (Figura 9). No momento da aplicação do *spray*, os tecidos adjacentes foram protegidos com gaze (Figura 7) que, assim como o dispositivo de isopor, só foi removida após o descongelamento do nervo.

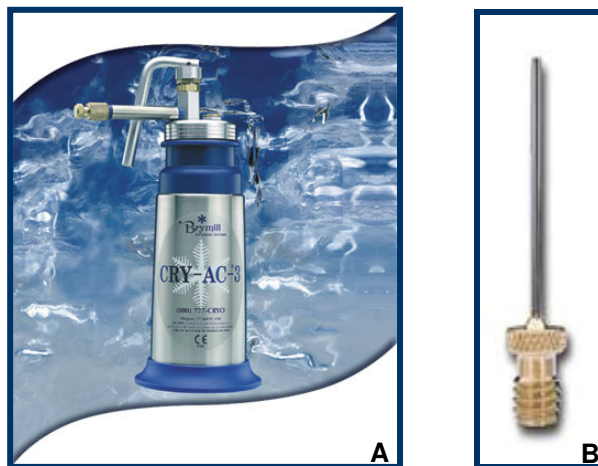


Figura 6 - (A) Criocautério CRY-AC- 3. (B) Extensor reto modelo 106

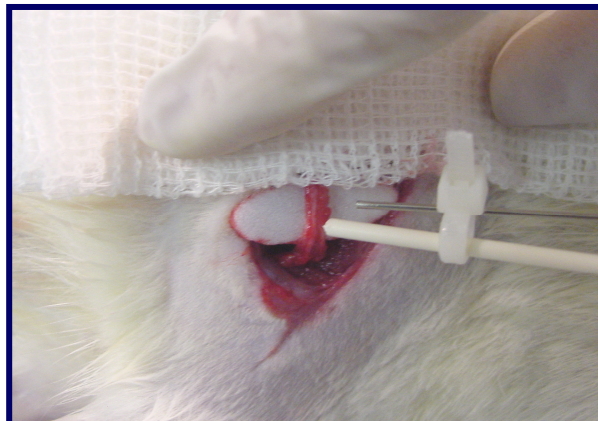


Figura 7 - Aplicação do nitrogênio líquido protegendo-se os tecidos adjacentes com compressa de gaze



Figura 8 - Formação da bola de gelo sobre o nervo após a aplicação do nitrogênio líquido



Figura 9 - Fixação do cilindro de PVC para padronização da distância de aplicação do nitrogênio líquido

4.6.1.5 Esmagamento

Nos grupos esmagamento, o nervo ciático foi submetido à compressão com pinça de Halsted curva⁹ calibrada (Anexo C). A pinça foi fechada até o segundo dente da cremalheira em duas aplicações de 10 s com intervalo de 2,5 min entre elas (Figura 10). A compressão gerava diminuição transitória do calibre do nervo ciático (Figura 11).

⁹ Quinelato®, Rio Claro, SP, Brasil

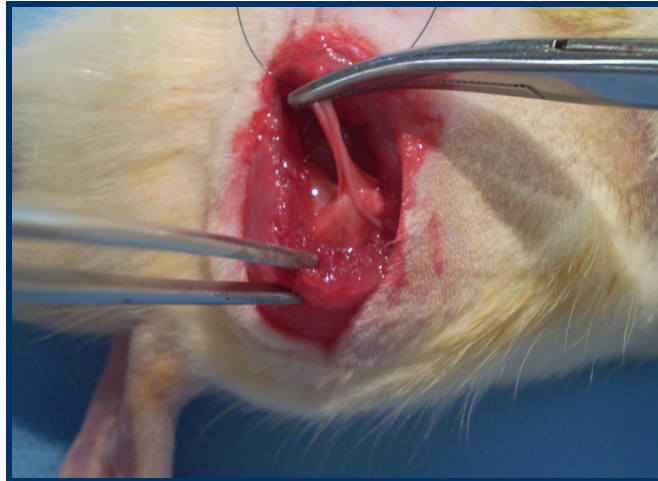


Figura 10 - Compressão do nervo ciático com pinça de Halsted curva

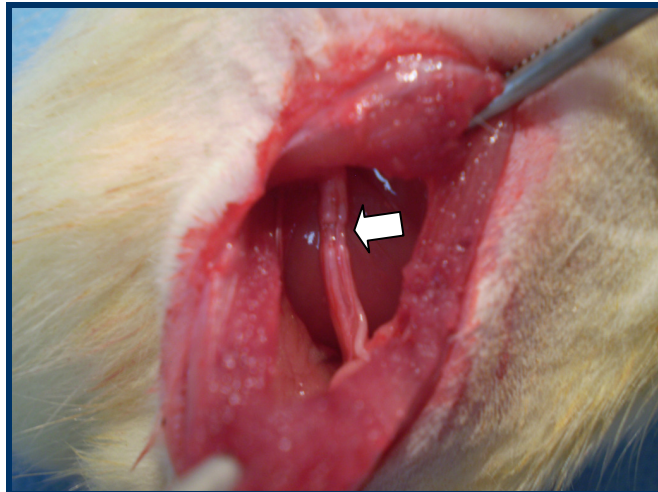


Figura 11 - Diminuição do calibre do nervo ciático após a compressão pela pinça

4.6.1.6 Sutura

A sutura foi realizada por planos (Figura 12), com fio de nylon 4-0, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e secção triangular¹⁰. Para auxiliar a preensão dos tecidos, foi utilizada uma pinça tipo Adson¹¹. A ferida cirúrgica foi lavada com solução anti-séptica de PVPI, e os animais colocados em caixas individuais nas quais foram mantidos durante os cinco

¹⁰ Mononylon®, São José dos Campos, SP, Brasil

¹¹ Quinelato®, Rio Claro, SP, Brasil

primeiros dias pós-operatórios. Os animais receberam, durante esse período, paracetamol, solução oral gotas – 200 mg/mL,¹² na dosagem de 7 gotas em cada 40 mL de água.



Figura 12 - Sutura com fio de nylon 4-0

4.6.2 Análise da Marcha

A função do nervo ciático dos ratos foi avaliada por meio da análise da marcha (DE MEDINACELI; FREED; WYATT, 1982), que se baseia na análise quantitativa das pegadas impressas de cada animal. Nesse teste, o animal foi colocado em um corredor de madeira de 43 cm de comprimento por 9 cm de largura e 7 cm de altura, com uma casinhola escura no final, que lhe servia de abrigo. Sobre o corredor foi colocada uma tira de papel- sulfite tamanho A3¹³ de igual largura e comprimento (Figura 13). O rato a ser testado teve suas patas traseiras pintadas com tinta Nanquim preta profissional¹⁴. A seguir, o animal foi solto no início do corredor, por onde caminhava em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as marcas de suas patas traseiras (Figura 14). Para avaliação dos resultados, foi utilizada uma marca de cada pata traseira (Figura 15).

¹² Tylenol®, Janssen Cilag, São Paulo, SP, Brasil

¹³ Ripax®, Limeira, São Paulo, SP, Brasil

¹⁴ Trident®, Itapuí, São Paulo, Brasil

Os ratos foram primeiramente treinados no corredor com duas ou três passagens, o que proporcionou sua adaptação e exploração do local. O teste foi realizado aos 15, 30 e 70 dias de pós-operatório. Por meio de paquímetro digital,¹⁵ foram mensuradas, nas folhas de papel, as seguintes medidas de cada pata: (1) largura intermediária dos dedos (*intermediate toes spread-ITS*); (2) largura total dos dedos (*toe spread-TS*); (3) comprimento da pegada (*print length-PL*) (Figura 16A e 16B). A seguir, os dados foram lançados em uma planilha confeccionada no programa Excel para Windows¹⁶, e o índice funcional ciático (SFI) foi calculado pela fórmula matemática de Bain, Mackinnin e Hunter (1989):

$$SFI = -38,3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109,5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13,3 \frac{(EITS-NITS)}{NTS} - 8,8$$

As medidas representadas pela letra E na fórmula referem-se à pata experimental, e pela letra N, à pata normal, não operada. Na interpretação dos resultados, os valores de SFI entre +10 e -10 são considerados normais (ausência de lesão), e valores próximos a -100 indicam perda completa da função neural. A análise da marcha foi realizada pelo próprio pesquisador de forma cegada, isto é, sem ter conhecimento sobre a que grupo os ratos avaliados pertenciam.

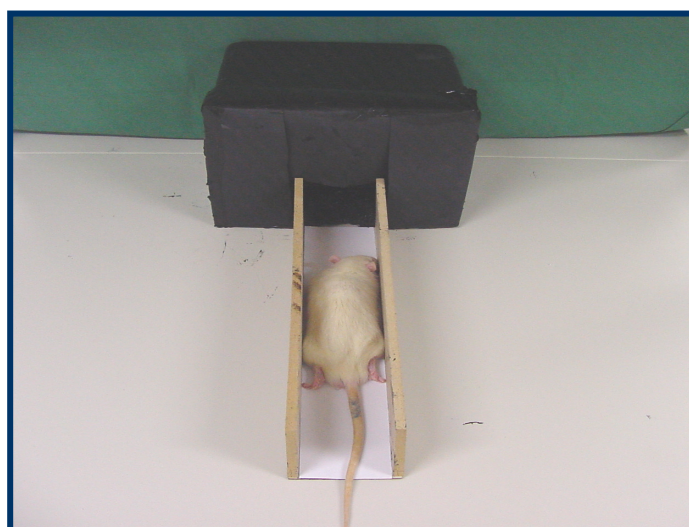


Figura 13 – Análise da marcha: animal no corredor de madeira

¹⁵ Mitutoyo®, Suzano, São Paulo, Brasil

¹⁶ Microsoft Corporation., Washington, Columbia, USA

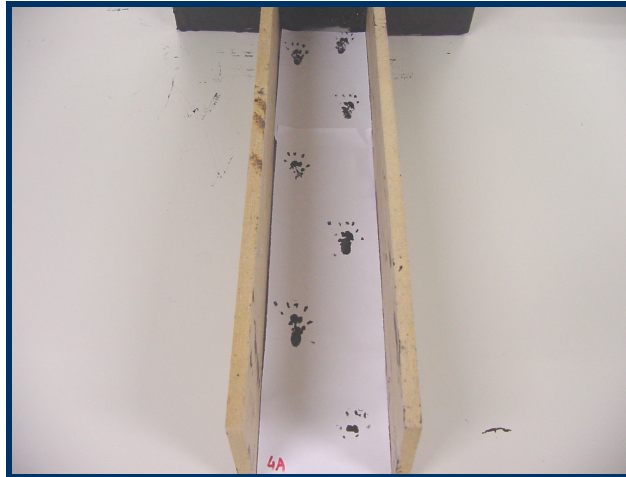


Figura 14 - Análise da marcha: marcas das patas traseiras



Figura 15 – Marcas das patas (direita e esquerda) empregadas na análise da marcha

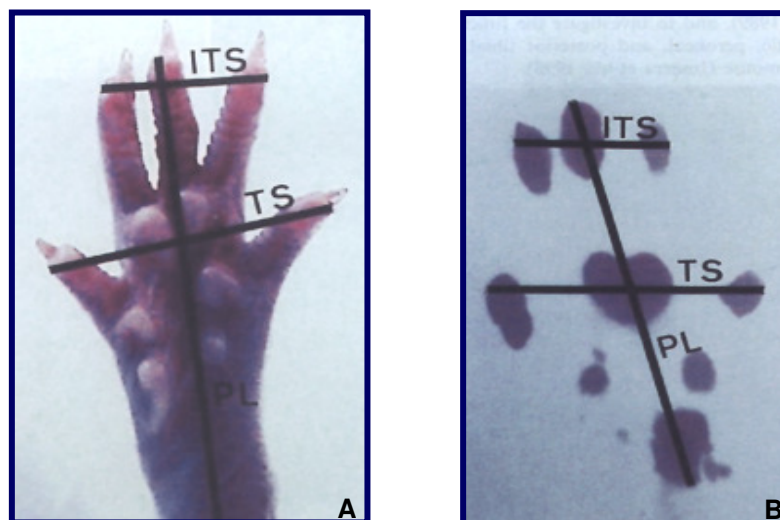


Figura 16 - (A) e (B) Medidas aplicadas na análise da marcha

4.6.3 Análise Eletroneuromiográfica

Após a análise da marcha, os animais foram submetidos à análise eletroneuromiográfica. Essa compreendeu duas etapas: (1) estudo da neurocondução motora e (2) eletromiografia. As análises foram feitas por meio de eletroneuromiógrafo¹⁷ nas dependências da Unidade de Neurofisiologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS.

Os animais foram contidos manualmente para a realização das duas etapas. Na avaliação da neurocondução motora, um estímulo elétrico de 0,2 ms e 30 mA foi aplicado na região proximal do nervo ciático, e registrado o potencial de ação da musculatura plantar da pata traseira do animal. Para isso, foram empregados um estimulador bipolar posicionado perpendicularmente ao longo eixo do nervo ciático (região femoral) e dois eletrodos de superfície para registro, fixados com fita adesiva, um na face dorsal e outro na face ventral da pata traseira de cada animal. Um eletrodo de superfície fixado na cauda atuou como eletrodo-terra (Figura 17). Foram mensuradas as variáveis amplitude e latência do potencial de ação dos lados direito (manipulado) e esquerdo (não manipulado). A mensuração do membro não manipulado visava à obtenção do valor de referência normal de cada animal.

Na eletromiografia, o eletrodo-terra foi mantido na cauda, e um eletrodo de agulha concêntrica foi inserido no músculo gastrocnêmio (Figura 18). A eletromiografia foi realizada somente no membro direito (manipulado) dos animais e permitiu a avaliação do recrutamento, da desnervação e da reinervação.

A análise eletroneuromiográfica foi realizada por um observador padrão-ouro que classificou e quantificou as variáveis. O observador não tinha conhecimento sobre a que grupo os ratos examinados pertenciam.

¹⁷ Medelec Synergy®, São Francisco, Califórnia, Brasil



Figura 17 - Eletroneuromiografia: etapa da neurocondução motora. Eletrodos (▲) e estimulador bipolar (▲) posicionados

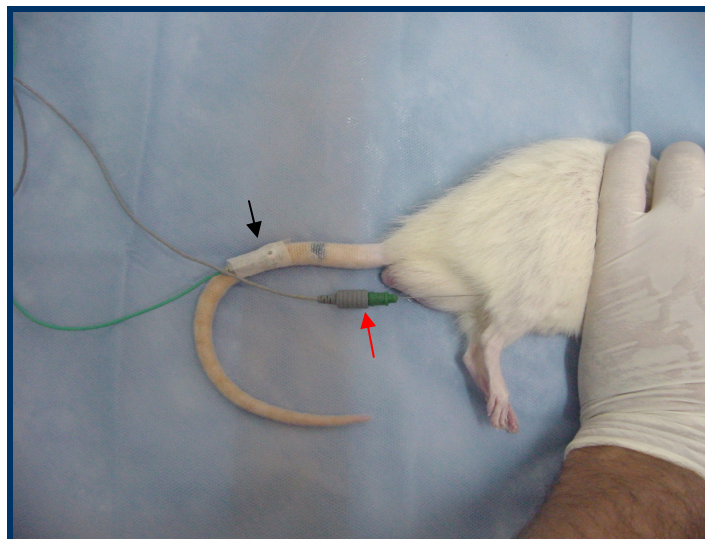


Figura 18 - Eletroneuromiografia: etapa da eletromiografia. Eletrodo (▲) e agulha concêntrica (▲) posicionados

4.6.4 Obtenção dos Espécimes e Eutanásia dos Animais

Após as análises da marcha e eletroneurofisiológica nos diferentes tempos de observação, os animais foram pesados e anestesiados com solução de quetamina 5% (90 mg/kg) e xilazina 2% (15 mg/kg) aplicada por via intraperitoneal. O nervo ciático direito de cada animal foi dissecado, e um segmento de 4 cm, a partir de sua bifurcação em direção à extremidade proximal, foi removido. Após, os

animais foram mortos com aplicação intraperitoneal de tiopental sódico¹⁸ na dose de 120 mg/kg.

4.6.5 Processamento dos Espécimes

Após removido, o segmento de nervo medindo 4 cm foi disposto em uma placa de Petry e, com o auxílio de uma lâmina de barbear,¹⁹ foi novamente seccionado em um segmento menor, com 1,0 cm, que compreendia a área de aplicação da crioterapia. Após, os segmentos foram fixados durante 24 h em solução de Karnovsky modificada, composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5% e tampão cacodilato de sódio em pH 7,2, a 0,1 M. Após a fixação, iniciou-se o processamento histológico, que foi realizado no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Luterana do Brasil (Canoas, Rio Grande do Sul). Os espécimes foram submetidos a três lavagens com cacodilato de sódio 0,05 M, com duração de 10 min cada e pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% (OsO₄) durante 2 h. Logo após, o material foi desidratado com acetona seguindo a série crescente de concentrações: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Após a desidratação, foi incluído em resina araldite, considerando-se como superfície de corte a região situada, distalmente, a 0,5 cm da área submetida à crioterapia, e polimerizado à temperatura de 60 °C.

A seguir, foram obtidos cortes transversais semifinos de 1 µm em ultramicrotomo²⁰. Os cortes foram corados com azul de toluidina a 1% em solução aquosa de bórax 1% e analisados em microscópio²¹ ótico. As lâminas foram codificadas de modo que o observador não tivesse conhecimento do grupo a que as mesmas pertenciam.

¹⁸ Tiopentax®, Itapira, São Paulo, Brasil

¹⁹ Gillette®, Manaus, Amazonas, Brasil

²⁰ RMC MT 6000-XL®, Tucson, Arizona, USA

²¹ Imager A1-Zeiss®, Thornwood, New York, USA

4.6.6 Captura das Imagens Microscópicas e Análise Histomorfométrica

As imagens histológicas foram capturadas por uma câmera de vídeo²² acoplada ao microscópio e a um computador²³, nas objetivas de 5 X e 100 X e transferidas ao software Image Pro Plus, versão 4.1²⁴. A análise histomorfométrica foi realizada pelo pesquisador, após calibração com observador padrão-ouro. As lâminas foram codificadas de modo que o pesquisador não tivesse conhecimento sobre o grupo a que pertenciam. As etapas foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Faculdade de Biociências da PUCRS.

4.6.6.1 Área Total do Nervo

Para cálculo da área total do nervo, foram empregados cinco cortes, sendo a imagem de cada corte capturada na objetiva de 5 X. Para a estimativa da área total da secção do nervo, foi empregado o método estereológico de contagem de pontos. Neste, era sobreposta, nas imagens das secções nervosas, uma grade de pontos (cruzes) eqüidistantes, cuja área/ponto correspondia a 0,01126 mm². As cruzes delimitavam quatro quadrantes (superior direito e esquerdo, inferior direito e esquerdo), elegendo-se o quadrante superior direito como referencial de contagem. Se este quadrante atingisse a imagem da secção do nervo, este ponto era contado. O somatório dos pontos contados multiplicado pela área/ponto resulta na área total do nervo, que pode ser apreciada pela fórmula, $A = \sum p \cdot a/p$, em que A=área total do nervo; $\sum p$ = somatório dos pontos; a/p= área/ponto (Figura 19).

²² Axiocam- Zeiss®, Chester, Virginia, USA

²³ Compaq, Pentium 4, sistema operacional Microsoft Windows XP Professional, versão 2002

²⁴ Media Cybernetics, Bethesda, Maryland, USA

4.6.6.2 Quantificação das Fibras Mielinizadas

As imagens foram capturadas na objetiva de 100 X, a partir de um corte histológico em cada lâmina. Em cada corte, foi selecionado, aleatoriamente, um campo para análise (o primeiro a entrar no foco do microscópio). Uma vez capturada a imagem, cinco áreas com $192 \mu\text{m}^2$ foram selecionadas de forma padronizada (quatro nas margens e uma no centro) (Figura 20). Em cada área foram contadas as fibras mielinizadas, e sua densidade, calculada (n° de fibras/área). A partir da área total de cada nervo e da densidade de fibras, foi calculado o número total de fibras mielinizadas, de acordo com a fórmula *densidade de fibras mielinizadas* = n° de fibras/área total do nervo.

4.6.6.3 Espessura da Bainha de Mielina, Área e Diâmetro Axonais

Para mensuração da espessura da bainha de mielina, uma área quadrangular medindo $195 \mu\text{m}^2$ foi selecionada na porção central da imagem, e dez fibras contempladas pela mesma foram avaliadas (Figura 21). Nas fibras selecionadas foi mensurada a espessura da bainha de mielina, em ângulo reto e direção vertical, por meio de ferramenta específica devidamente calibrada (Image Pro Plus 4.1). A área axonal, por sua vez, foi obtida por meio da técnica da contagem de pontos, previamente descrita, com área ponto de $4 \mu\text{m}^2$. O número de pontos no interior de cada axônio foi calculado em dez fibras delimitadas pela mesma área quadrangular citada anteriormente (Figura 22). Para facilitar a mensuração dessas variáveis, foi aplicado o zoom ótico (50%) do programa (Figuras 23 e 24). O diâmetro axonal foi obtido a partir da área axonal, aplicando-se a fórmula área do círculo = $\pi \times r^2$.

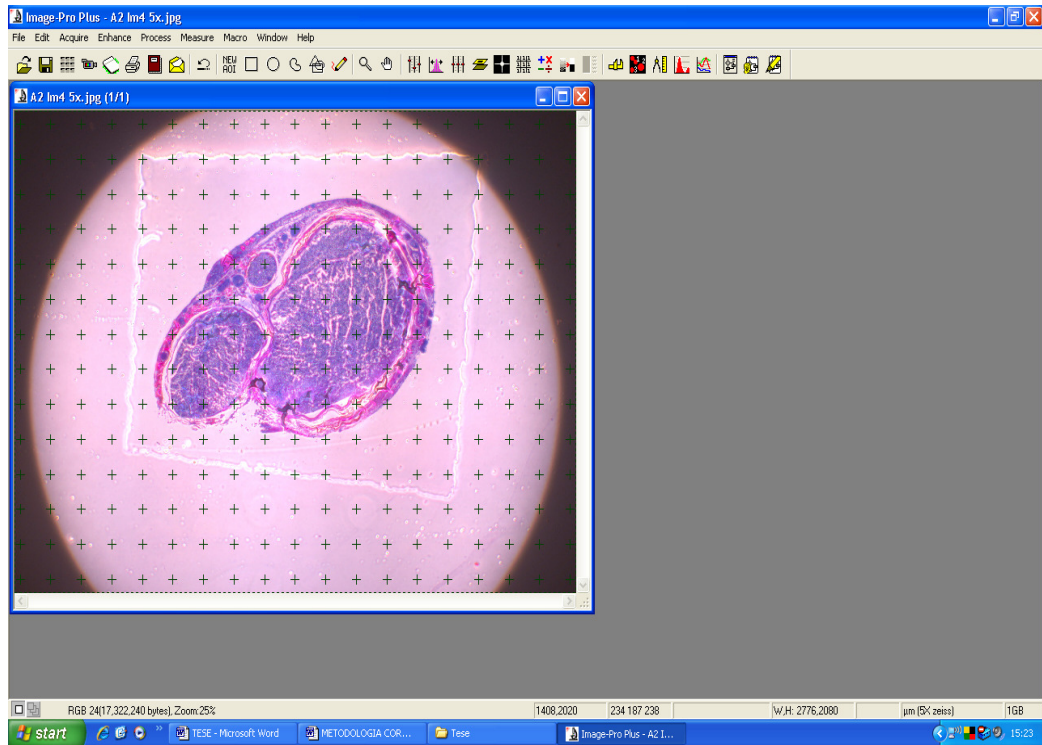


Figura 19 - Digitalização em objetiva de 5 X para mensuração da área total do nervo

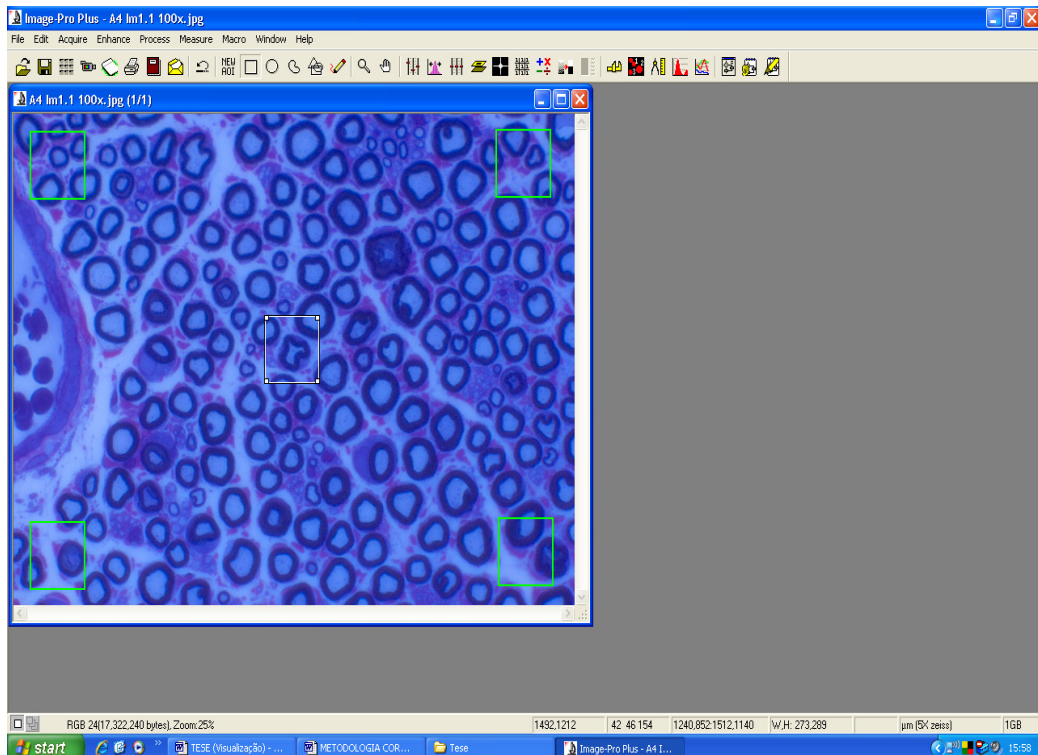


Figura 20 - Quantificação das fibras mielinizadas: foram analisadas cinco regiões em cada imagem

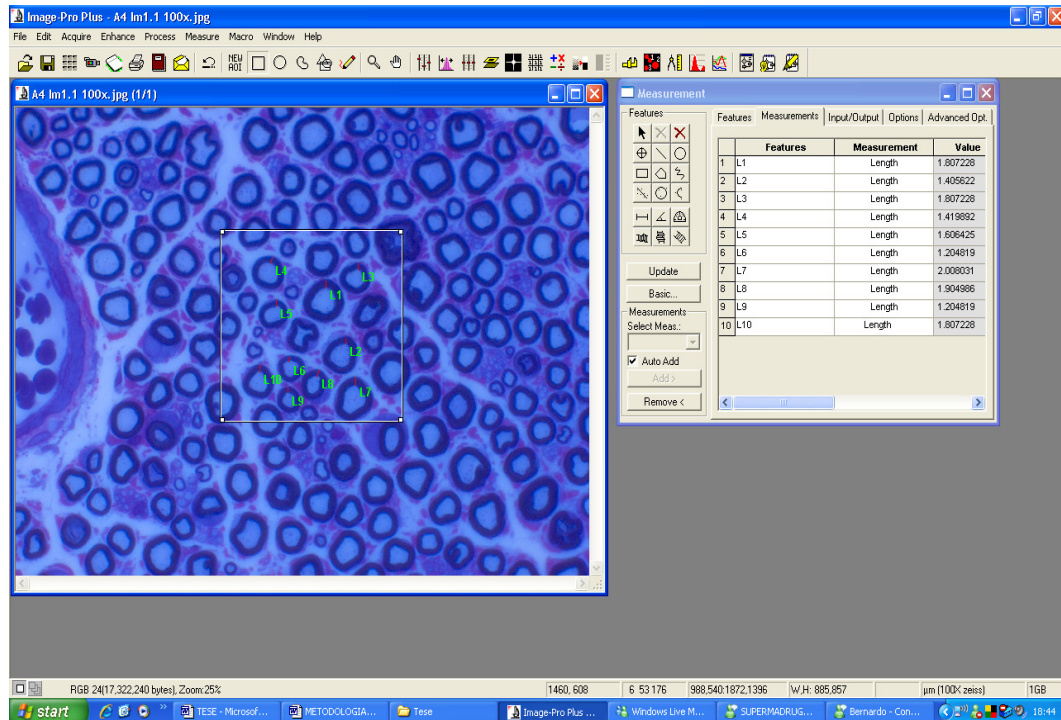


Figura 21 - Mensuração da espessura da bainha de mielina: foram avaliadas dez fibras por lâmina

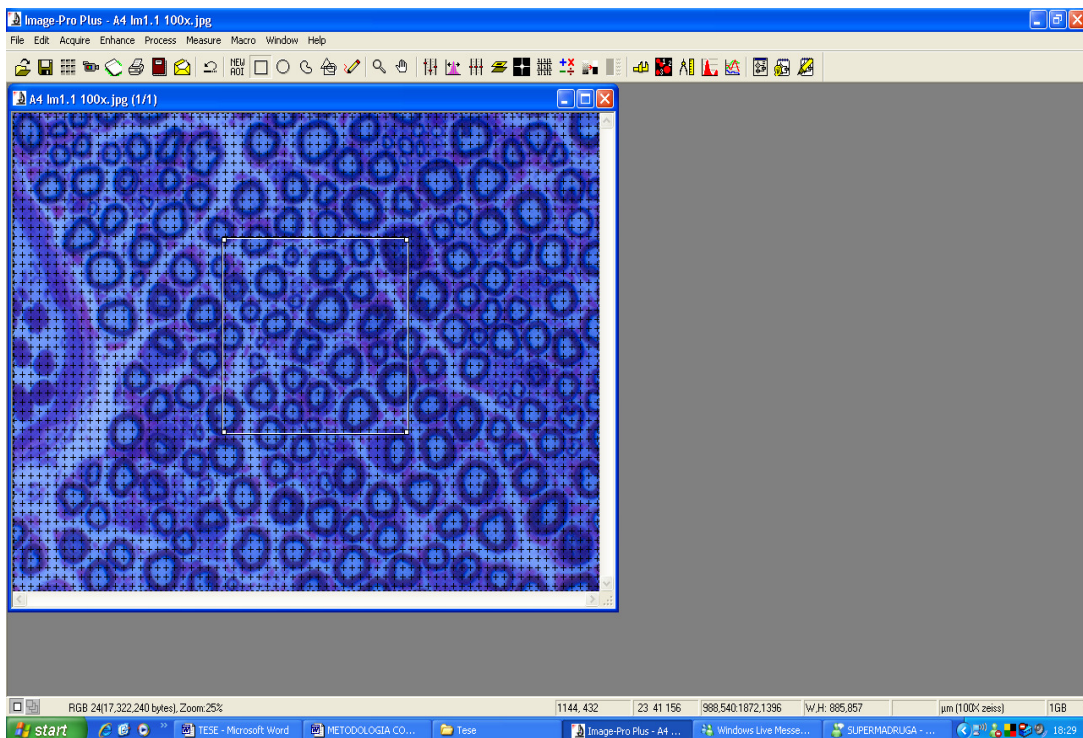


Figura 22 - Objetiva de 100 X para mensuração da área axonal. Foram utilizadas dez fibras por lâmina e contados os pontos no interior de cada axônio

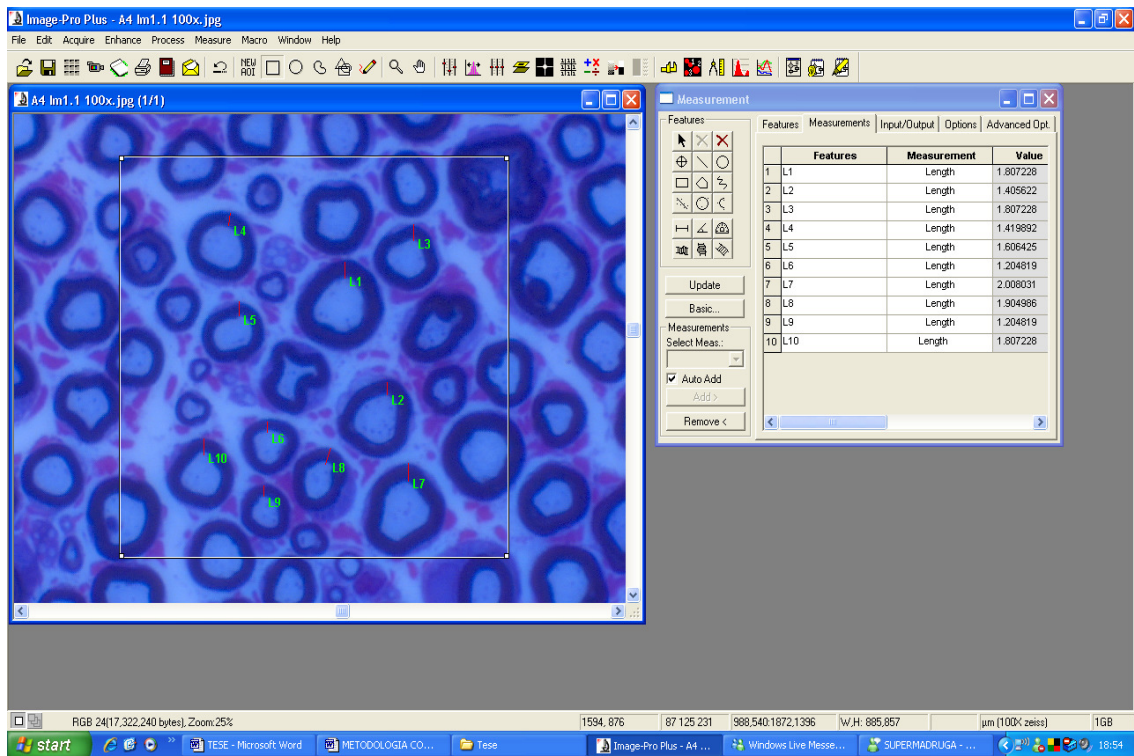


Figura 23 - Zoom óptico para facilitar as mensurações da bainha de mielina

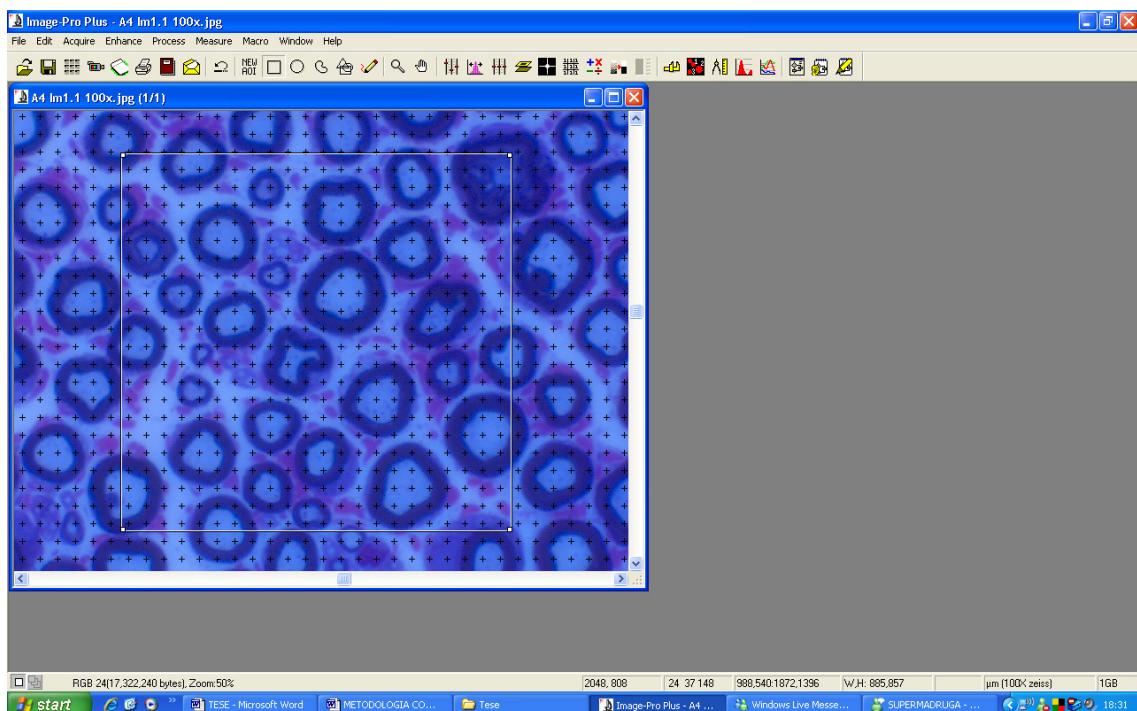


Figura 24 - Zoom óptico para facilitar a contagem do número de pontos no interior de cada axônio

4.7 CLASSIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis índice funcional ciático (SFI), amplitude e latência do potencial de ação do nervo ciático, densidade de fibras mielinizadas, número total de fibras mielinizadas, diâmetro do axônio e espessura da bainha de mielina foram classificadas como variáveis quantitativas. Desnervação e recrutamento foram classificadas como qualitativas ordinais, e a variável reinervação, como qualitativa nominal, sendo estas categorizadas conforme disposto no quadro 2.

A análise estatística comparou os resultados obtidos entre os grupos controle, esmagamento e crioterapia nos diferentes tempos avaliados. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva e dos testes Kruskal-Wallis (complementado por seu Teste de Comparações Múltiplas) e Anova *one-way* (complementado pelo Teste de Tukey), considerando-se o nível de significância de 5%. O teste Anova *one-way*, seguido do teste de Tukey, foi aplicado na comparação das variáveis quantitativas que tiveram distribuição normal, e o teste de Kruskal-Wallis, para as que não tiveram distribuição normal. O processamento foi realizado por meio do software SPSS versão 10.0²⁵.

As variáveis desnervação, recrutamento e reinervação destinaram-se à interpretação da eletromiografia e foram submetidas à análise descritiva.

²⁵ Statistical Package for Social Science, Chicago, USA

Desnervação		Recrutamento		Reinervação	
Categoria	Símbolo	Categoria	Símbolo	Categoria	Símbolo
Ausente	A	Ausente	A	Ausente	A
Fraca	+	Pobre	↓↓↓	Fraca	+
Moderada	++	Intermediário	↓↓	Moderada	++
Forte	+++	Rico	↓	Forte	+++
Intensa	++++			-	-

Quadro 2 – Classificação das variáveis desnervação, recrutamento e reinervação



PUCRS

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA MARCHA

A tabela 1 e a figura 25 exibem os resultados da análise da marcha para os grupos avaliados. Por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado por seu Teste de Comparações Múltiplas, verificou-se diferença significativa do índice funcional ciático entre os grupos aos 15 e 30 dias. Aos 15 dias, os três grupos, crioterapia, esmagamento e controle, diferiram entre si ($P=0,002$), sendo que o grupo crioterapia exibiu os menores valores, seguido do grupo esmagamento e do controle. Aos 30 dias, os grupos crioterapia e esmagamento tiveram valores significativamente inferiores aos do controle ($P=0,038$). Já aos 70 dias, não foi verificada diferença significativa entre os três grupos avaliados ($P=0,593$).

Tabela 1 - Índice funcional ciático (SFI) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Índice Funcional Ciático (SFI)								
	15 dias			30 dias			70 dias		
	M	DP	RM	M	DP	RM	M	DP	RM
Controle	-12,07	7,82	15,33 ^A	-8,39	8,77	14,00 ^A	-7,11	19,90	10,67
Esmagamento	-45,85	15,17	8,83 ^B	-22,00	10,66	7,83 ^B	-14,75	11,04	7,83
Crioterapia	-66,42	15,49	4,33 ^C	-22,91	6,35	6,67 ^B	-11,21	3,30	8,40
<i>P</i> *	0,002			0,038			0,593		

*Kruskal-Wallis, Teste de Comparações Múltiplas ($\alpha=0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão; RM= *rank* médio

Ranks seguidos de letras distintas diferem significativamente

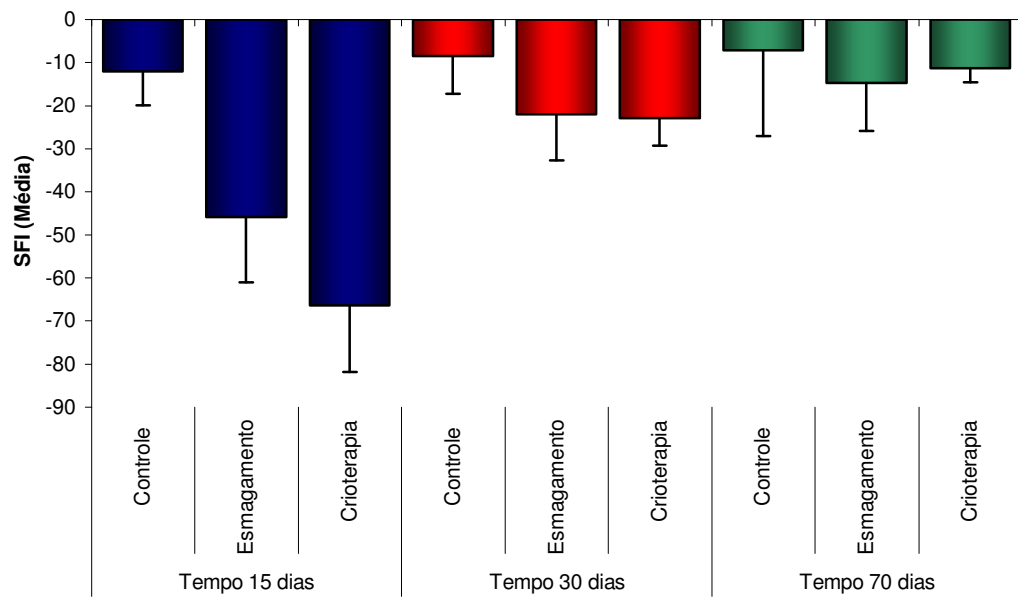


Figura 25 - Índice funcional ciático (SFI) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

5.2 ANÁLISE ELETRONEUROMIOGRÁFICA

5.2.1 Neurocondução

5.2.1.1 Amplitude do Potencial de Ação do Nervo Ciático

A tabela 2 e a figura 26 exibem os valores da amplitude do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia. Por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado por seu Teste de Comparações Múltiplas, foi verificada diferença significativa dessa variável aos 15 e 30 dias, sendo que os grupos esmagamento e crioterapia não diferiram entre si, mas ambos tiveram valores significativamente inferiores aos do grupo-controle ($P=0,001$). Aos 70 dias, não houve diferença significativa dessa variável entre os três grupos avaliados ($P=0,209$).

Tabela 2 - Amplitude do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Amplitude do potencial de ação								
	15 dias			30 dias			70 dias		
	M	DP	RM	M	DP	RM	M	DP	RM
Controle	6,02	2,01	15,50 ^A	8,12	2,69	15,50 ^A	4,58	1,10	12,33
Esmagamento	0,20	0,28	8,00 ^B	0,25	0,36	8,00 ^B	3,83	0,19	9,25
Crioterapia	0,00	0,00	5,00 ^B	0,00	0,00	5,00 ^B	3,50	1,27	6,92
<i>P</i> *	0,001			0,001			0,209		

*Kruskal-Wallis, Teste de Comparações Múltiplas ($\alpha=0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão; RM= *rank* médio

Ranks seguidos de letras distintas diferem significativamente

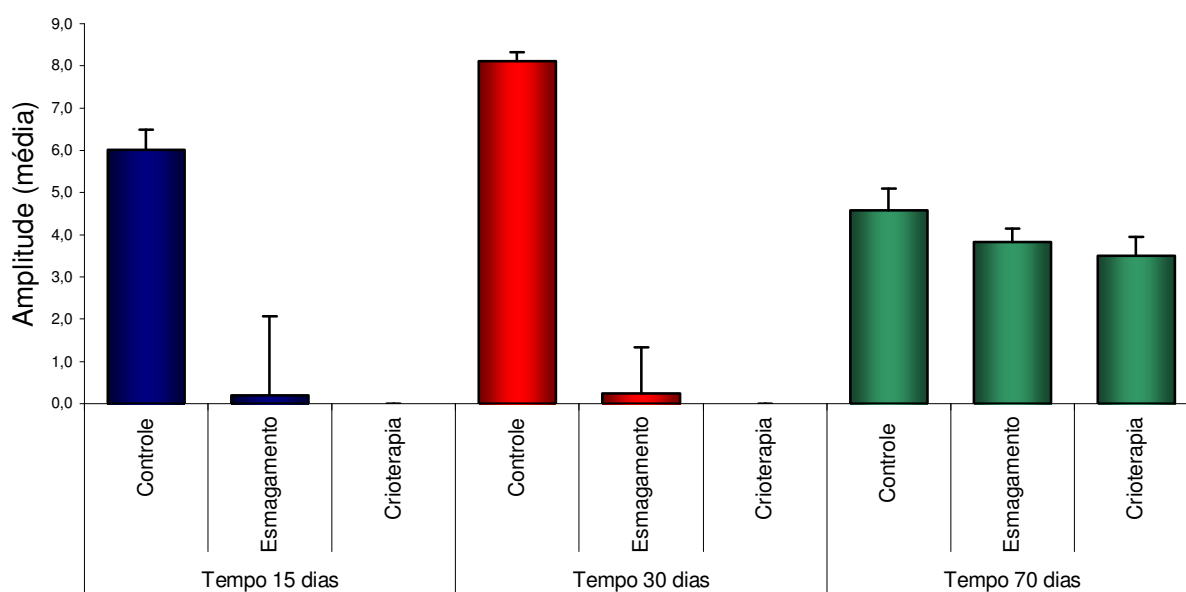


Figura 26 - Amplitude do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

5.2.1.2 Latência do Potencial de Ação do Nervo Ciático

A tabela 3 e a figura 27 exibem os valores obtidos para latência do potencial de ação do nervo ciático. Por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado por seu Teste de Comparações Múltiplas, foi verificada diferença significativa para essa variável, entre os três grupos avaliados, aos 70 dias ($P=0,001$), sendo que o controle exibiu os menores valores, seguido do grupo esmagamento e do grupo crioterapia, que exibiu os maiores.

Tabela 3 - Latência do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Latência do potencial de ação								
	15 dias			30 dias			70 dias		
	M	DP	RM	M	DP	RM	M	DP	RM
Controle	2,16	0,48	13,50	1,98	0,21	14,17	1,83	0,51	3,83 ^A
Esmagamento	3,11	1,21	10,00	1,95	1,07	8,83	2,82	0,31	9,50 ^B
Crioterapia	--	--	--	--	--	--	3,54	0,46	15,17 ^C
<i>P</i> *	0,125			0,472			0,001		

*Kruskal-Wallis, Teste de Comparações Múltiplas ($\alpha=0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão; RM= *rank* médio

Ranks seguidos de letras distintas diferem significativamente

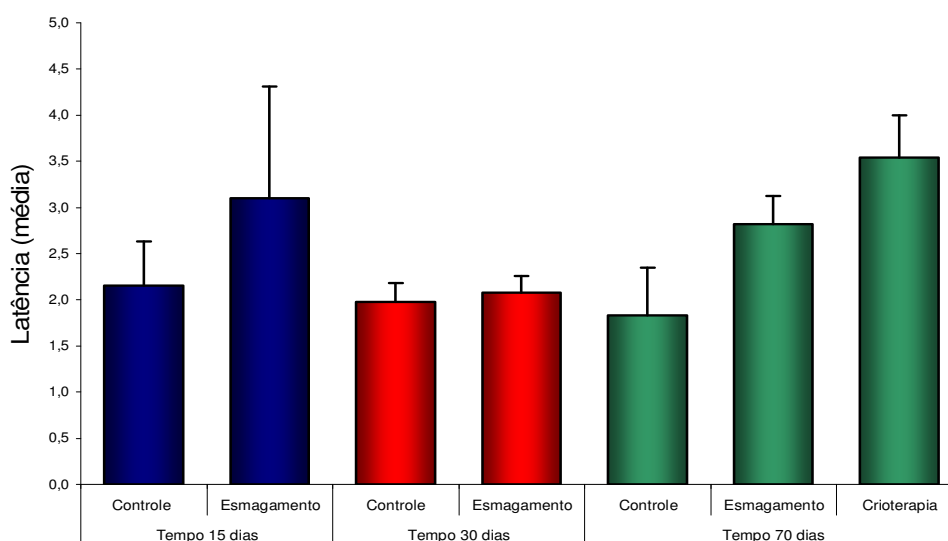


Figura 27 - Latência do potencial de ação do nervo ciático nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

5.2.2 Eletromiografia - Análise Descritiva

A tabela 4 exhibe os resultados da análise eletromiográfica. Aos 15 dias, o grupo-controle teve sinais de lesão discreta, com recrutamento, desnervação e reinervação fracas. O grupo esmagamento, neste período, exibiu sinais de lesão intensa, com desnervação forte, recrutamento pobre e reinervação fraca. Já o grupo crioterapia, teve sinais de lesão total aguda, com desnervação intensa e ausência de reinervação e de recrutamento motor. Os achados dos grupos esmagamento e crioterapia, nesse período, indicam lesão axonal definitiva ou bloqueio de condução temporário.

Aos 30 dias, o grupo-controle não exibiu qualquer alteração eletromiográfica. O grupo esmagamento teve sinais de lesão aguda intensa, com sinais de reinervação e desnervação fracas e recrutamento rico. O grupo crioterapia teve sinais de lesão aguda intensa, com sinais de reinervação forte, desnervação moderada e recrutamento pobre. Os achados dos grupos esmagamento e crioterapia, nesse período, também indicam lesão axonal definitiva ou bloqueio de condução temporário.

Aos 70 dias, o grupo-controle exibiu reinervação forte, desnervação fraca e recrutamento rico, o que indica baixa perda axonal do nervo. O grupo esmagamento teve sinais de lesão desmielinizante parcial moderada, com reinervação fraca, desnervação ausente e recrutamento rico. No grupo crioterapia, foram observados sinais de lesão parcial de predomínio axonal com desmielinização moderada a intensa, bem como reinervação forte, desnervação ausente e recrutamento intermediário.

Tabela 4 – Resultados da análise eletromiográfica nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Variáveis	Controle Tempo (dias)			Esmagamento Tempo (dias)			Crioterapia Tempo (dias)		
	15	30	70	15	30	70	15	30	70
Recrutamento	↓	↓	↓	↓↓↓	↓	↓	A	↓↓↓	↓↓
Desnervação	+	A	+	+++	+	A	++++	++	A
Reinervação	+	A	+++	+	+	+	A	+++	+++

A=ausente;

+= fraca; ++= moderada; +++= forte; ++++= intensa;

↓= rico; ↓↓= intermediário; ↓↓↓= pobre

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.3.1 Quantificação das Fibras Mielinizadas

5.3.1.1 Densidade de Fibras Mielinizadas

A tabela 5 e a figura 28 exibem os resultados obtidos para densidade de fibras mielinizadas (número de fibras/área). Por meio do teste ANOVA *one-way* complementado pelo teste de Tukey, verificou-se diferença significativa dessa variável entre os grupos nos tempos 30 e 70 dias, sendo que, em ambos, o grupo crioterapia teve valores significativamente superiores aos dos grupos controle e esmagamento ($P<0,001$).

Tabela 5 - Densidade de fibras mielinizadas (número/mm²) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Densidade de fibras mielinizadas (número/mm ²)					
	15 dias		30 dias		70 dias	
	M	DP	M	DP	M	DP
Controle	12326	784	11806 ^A	4303	10764 ^A	2345
Esmagamento	10417	3294	12500 ^A	4370	11979 ^A	2696
Crioterapia	9259	2740	20139 ^B	3402	18750 ^B	1976
<i>P</i> *	0,350		0,001		0,001	

*ANOVA *one-way*, Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente

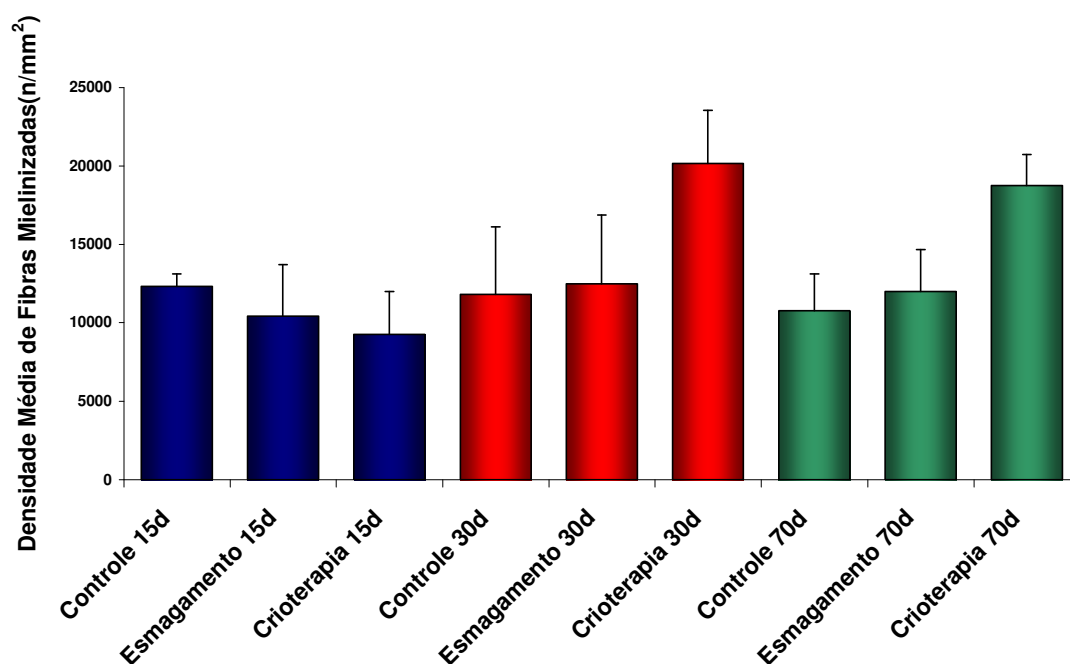


Figura 28 - Densidade de fibras mielinizadas (número/mm²) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

5.3.1.2 Número Total de Fibras Mielinizadas

A tabela 6 e a figura 29 exibem os valores do número total de fibras mielinizadas. Houve diferença significativa para essa variável entre os grupos aos 30 dias, sendo que o grupo crioterapia teve valores significativamente superiores aos dos grupos controle e esmagamento (ANOVA *one-way*, Tukey, $\alpha=0,05$). Nos demais períodos avaliados, não houve diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$).

Tabela 6 - Número total de fibras mielinizadas nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Número total de fibras mielinizadas					
	15 dias		30 dias		70 dias	
	M	DP	M	DP	M	DP
Controle	4447	622	4350 ^A	1704	3146	1885
Esmagamento	4349	1075	5472 ^A	2489	4529	1280
Crioterapia	5726	1757	9885 ^B	2285	6207	936
<i>P</i> *	0,350		0,001		0,450	

*ANOVA *one-way*, Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente

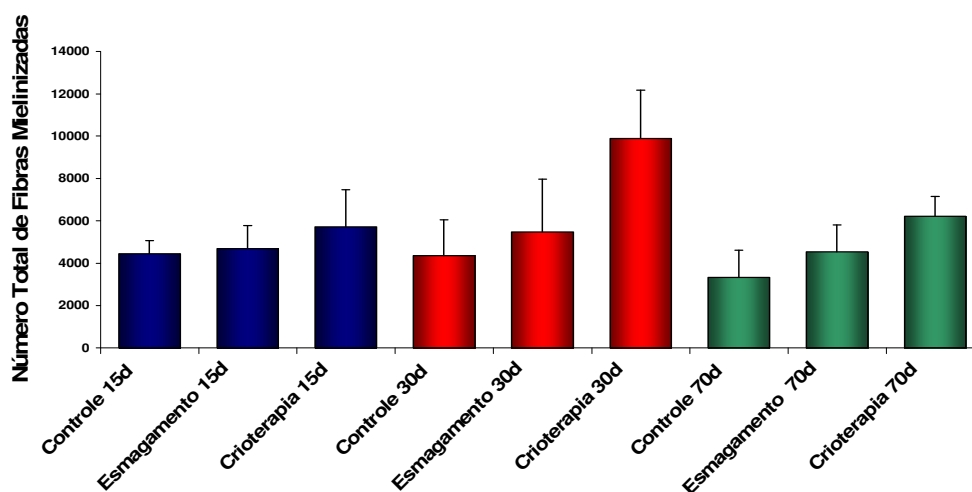


Figura 29 - Número total de fibras mielinizadas nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

5.3.2 Diâmetro Axonal

Na tabela 7 e na figura 30, são exibidos os valores do diâmetro axonal obtidos para os grupos avaliados. Aos 15 dias, houve diferença significativa dessa variável entre o grupo-controle e os grupos crioterapia e esmagamento ($P=0,001$), sem haver, entretanto, diferença entre estes dois. Aos 30 dias, o grupo crioterapia teve valores significativamente inferiores aos dos grupos controle e esmagamento ($P=0,01$) sem que estes últimos diferissem entre si ($P>0,05$). Aos 70 dias, os valores do grupo-controle diferiram significativamente dos verificados para os grupos crioterapia e esmagamento ($P=0,05$), enquanto estes dois não diferiram significativamente entre si (ANOVA *one-way*, Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabela 7 - Diâmetro axonal (μm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Diâmetro axonal (μm)					
	15 dias		30 dias		70 dias	
	M	DP	M	DP	M	DP
Controle	3,84 ^A	0,69	3,50 ^A	0,49	4,75 ^A	0,53
Esmagamento	1,74 ^B	0,31	2,90 ^A	0,84	3,65 ^B	0,47
Crioterapia	2,11 ^B	0,33	2,25 ^B	0,10	3,19 ^B	0,37
<i>P</i> *	0,001		0,01		0,05	

*ANOVA *one-way*, Teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente

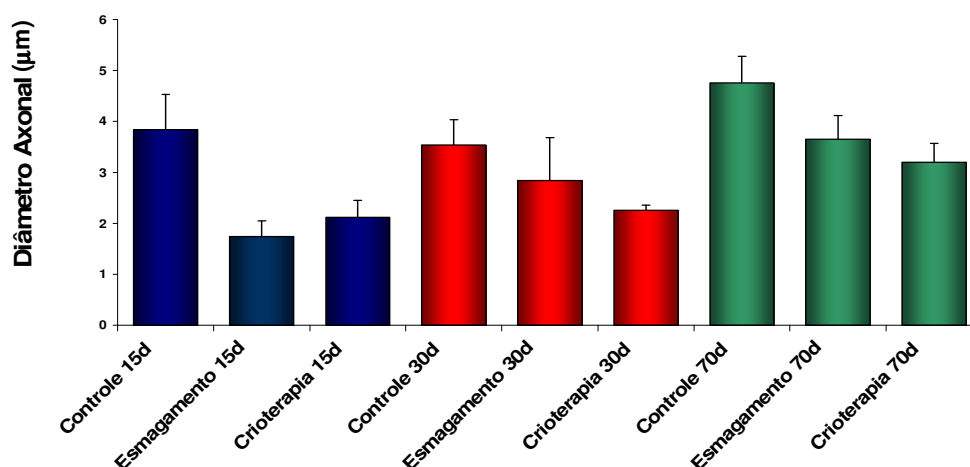


Figura 30 - Diâmetro axonal (µm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

5.3.3 Espessura da Bainha de Mielina

Na tabela 8 e na figura 31, são apresentados os valores obtidos para espessura da bainha de mielina nos grupos avaliados. Aos 15, 30 e 70 dias, os grupos crioterapia e esmagamento exibiram valores significativamente inferiores aos do grupo-controle ($P < 0,001$), mas não diferiram significativamente entre si (ANOVA *one-way*, Tukey, $\alpha = 0,05$).

Tabela 8 - Espessura da bainha de mielina (µm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009

Grupo	Espessura da bainha de mielina (µm)					
	15 dias		30 dias		70 dias	
	M	DP	M	DP	M	DP
Controle	1,62 ^A	0,20	1,43 ^A	0,09	1,65 ^A	0,17
Esmagamento	0,57 ^B	0,06	0,88 ^B	0,28	1,15 ^B	0,11
Crioterapia	0,46 ^B	0,05	0,68 ^B	0,07	0,93 ^B	0,10
<i>P</i> *	0,001		0,001		0,001	

*ANOVA *one-way*, Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

M= média; DP= desvio-padrão

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente

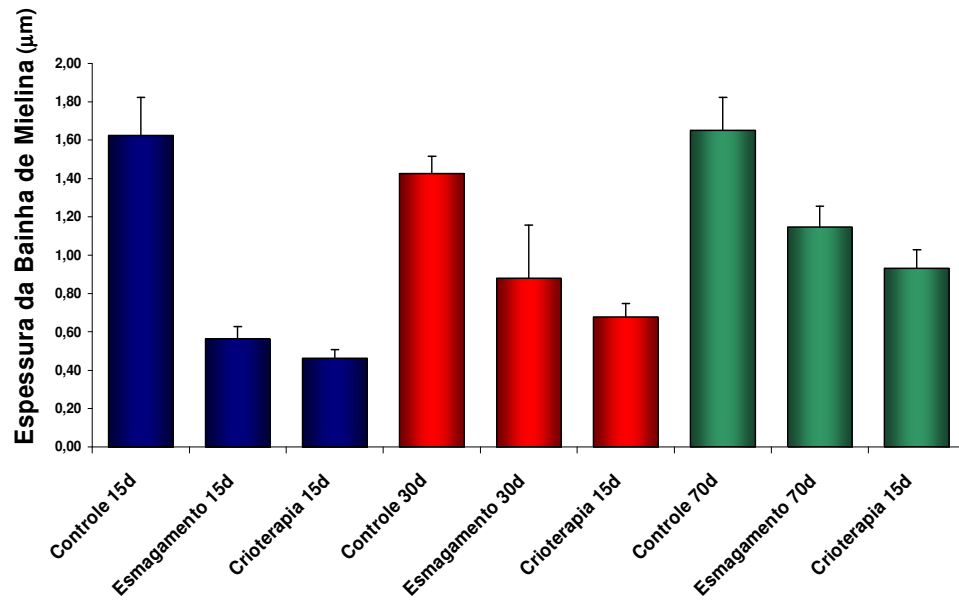


Figura 31 - Espessura da bainha de mielina (μm) nos grupos controle, esmagamento e crioterapia aos 15, 30 e 70 dias. Porto Alegre, 2009



PUCRS

6 DISCUSSÃO

Os resultados da análise da marcha indicaram significativo déficit funcional nos grupos esmagamento e crioterapia aos 15 dias. Aos 30 dias, já foi observada melhora da marcha em ambos, mas a perda funcional ainda se mostrou significativa. No tempo de 70 dias, não foi mais observada diferença significativa entre os grupos controle, esmagamento e crioterapia. A perda funcional observada reflete diminuição ou ausência das terminações nervosas que inervam a musculatura envolvida (KANAYA; FIRRELL; BREIDENBACH, 1996). Tal achado corrobora os resultados de outras pesquisas (HARE et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2001; VAREJÃO et al., 2004), segundo as quais a recuperação funcional de lesões de esmagamento só inicia a partir do trigésimo dia após as lesões. No entanto, outros autores relatam completa recuperação durante a terceira e a quarta semanas (ILHA et al., 2008; KERNS et al., 1991; SANTOS; ANDRÉ, 2007). A variação do tempo de recuperação funcional entre as diferentes pesquisas pode estar associada à falta de padronização do método, especialmente da força aplicada nas lesões de esmagamento.

Ao comparar-se a análise da marcha entre os grupos esmagamento e crioterapia, observou-se, aos 15 dias, índice funcional ciático significativamente menor neste último. Aos 30 e 70 dias, os dois grupos já apresentavam valores próximos, sem diferença significativa. Esses dados demonstram que a lesão de congelamento é, sob o ponto de vista funcional, mais grave nos primeiros 15 dias, e que as lesões de esmagamento e congelamento têm recuperação funcional semelhante no período de 30 dias, fato já relatado por Kerns et al. (1991).

No presente estudo, um animal do grupo crioterapia foi excluído da análise da marcha por ter sofrido autotomia de dois dedos da pata do membro operado. O achado é citado por alguns autores (DEFRIN; ZEITOUN; URCA, 1996; KAUPPILA, 1998) que associam tal comportamento à dor neuropática decorrente de lesões de maior magnitude em nervos periféricos, como as neurotmeses após transecção do nervo. Já autores como DeLeo et al. (1994) e Wagner et al. (1995) observaram esse comportamento em ratos submetidos à crioneurólise, cujo protocolo emprega tempo de congelamento (duas aplicações de 30 segundos) superior ao do presente estudo.

Segundo Beazley, Bagley e Ketcham (1974) e Myers, Heckman e Poewll (1996), a lesão resultante do congelamento interrompe a integridade axonal, o que bloqueia a transmissão da dor. Entretanto, outros autores são contrários ao emprego da técnica, alegando que a crioterapia do tecido nervoso periférico pode ocasionar nevralgias importantes (CONACHER; LOCKE; HILTON, 1986; ORR; KEENAN; DUNDEE, 1981). Assim, não fica descartada a possibilidade de a crioterapia determinar, em alguns pacientes, alterações neurossensoriais como hiperestesia, alodinia e nevralgia durante o período pós-operatório.

Maiores valores de amplitude significam maior número de axônios funcionais, o que representa, de forma indireta, o número de fibras nervosas motoras regeneradas (ÖZAY et al., 2007). Na presente pesquisa, os valores da amplitude foram próximos de zero no grupo esmagamento aos 15 e aos 30 dias, e nulos para o grupo crioterapia. Aos 70 dias, esses valores não tiveram diferença significativa entre os três grupos. Kerns et al. (1991) também avaliaram lesões de congelamento e esmagamento e obtiveram valores de amplitude semelhantes aos da presente pesquisa nos primeiros 15 dias. No entanto, os autores verificaram valores próximos aos do grupo-controle já no período de 30 dias. Essa diferença pode ser resultado da indução de lesões de menor intensidade por parte daqueles autores que, para a lesão de esmagamento, empregaram uma pinça de joalheiro e, para o congelamento, o método indireto por meio de sonda. Neste, a temperatura do nitrogênio líquido, ao atingir o sítio de aplicação, é maior do que no método de *spray* (SANTOS, 2002). Wolthers et al. (2005) empregaram a mesma técnica de mensuração eletroneurofisiológica, bem como instrumental e tempo de aplicação similares aos do presente estudo na lesão de esmagamento. Os autores avaliaram a amplitude do potencial de ação do nervo ciático dos ratos submetidos à lesão nos períodos pós-operatórios de 100 e 150 dias. Os valores de amplitude indicaram recuperação parcial (85%) aos 100 dias e retorno aos valores normais aos 150 dias.

No presente estudo, a mensuração da latência não foi possível no grupo crioterapia aos 15 e 30 dias, o que sugere valores muito elevados para essa variável e, por conseguinte, importante déficit funcional do nervo envolvido. A mensuração tornou-se possível aos 70 dias, momento em que foram observados valores significativamente superiores aos dos grupos controle e esmagamento. Tal achado

corroborar o estudo de Wolthers et al. (2005) em que houve aumento da latência após lesões de esmagamento com até 150 dias de pós-operatório.

Os grupos esmagamento e crioterapia apresentaram número total de fibras mielinizadas maior do que o do grupo-controle aos 30 e 70 dias. Isso se deve ao fato de que cada axônio lesado pode emitir, durante o processo regenerativo, de dois a três prolongamentos axonais que avançam em direção ao músculo para restabelecer a conexão e a função (OLIVEIRA et al., 2008; TAKEDA et al., 2008). A diferença foi mais acentuada aos 30 dias, período em que o grupo crioterapia teve número total de fibras mielinizadas significativamente superior ao dos grupos esmagamento e controle. No período de 70 dias, o número de fibras mielinizadas dos grupos crioterapia e esmagamento já se mostrava inferior ao dos 30 dias. Tal achado está de acordo com o relato de Gorio et al. (1983) de que, em lesões de axoniotmese do nervo ciático de ratos, o número de fibras permanece elevado até o vigésimo sexto dia pós-operatório, momento em que inicia o processo de eliminação sináptica, com diminuição das fibras no segmento distal à lesão.

A densidade de fibras mielinizadas expressa o número destas por área de nervo. Na presente pesquisa, essa variável teve resultados semelhantes aos obtidos para número total de fibras mielinizadas. Aos 15 dias, ambas as variáveis não diferiram significativamente entre os três grupos, embora o grupo crioterapia tivesse exibido menores valores de densidade, seguido pelo grupo esmagamento. Este achado é compatível com a presença de maior número de vasos sanguíneos e de edema intersticial determinados pelas lesões, o que gera aumento da área de secção transversa do nervo e conseqüente interpretação de que o que aconteceu, de fato, foi a distribuição de um número similar de fibras em uma área maior (MONTE-RASO et al., 2005).

A maturação das fibras axonais regeneradas pode ser analisada, ao exame microscópico, por meio do diâmetro axonal e da espessura da bainha de mielina (BURNETT; ZAGER, 2004). Parece haver consenso de que a diminuição do calibre do axônio no nervo lesado é acompanhada da diminuição da espessura da bainha de mielina (CARMIGNOTO et al., 1983; FRAHER; DOCKERY, 1998; GORIO et al., 1983). Esse fato também foi observado neste estudo, sendo a espessura da

bainha de mielina dos grupos esmagamento e crioterapia significativamente menor que a do grupo-controle em todos os tempos avaliados. O diâmetro axonal comportou-se da mesma forma, embora não tenha diferido significativamente entre os grupos esmagamento e controle no período de 30 dias. Os grupos esmagamento e crioterapia exibiram aumento do diâmetro axonal e da espessura da bainha de mielina com o passar do tempo; porém esses não alcançaram os valores apresentados pelos grupos-controle, o que evidencia maturação incompleta do nervo durante o processo de regeneração nesses dois grupos. Talvez, os valores se apresentassem normais, se as variáveis fossem analisadas em um período de tempo maior. No entanto, Verdú et al. (2000) demonstraram que, mesmo em períodos de avaliação mais longos, o diâmetro axonal e a espessura da bainha de mielina não alcançaram valores normais após lesões de esmagamento. Segundo esses autores, alterações dimensionais discretas dessas variáveis histológicas não implicariam alterações funcionais.

Embora na maioria das vezes sem significância estatística, em todas as variáveis estudadas, com exceção da análise da marcha, foi observada, aos 70 dias, maior perda morfofuncional no grupo crioterapia. Tal fato poderia indicar lesão neural de maior gravidade nesse grupo quando comparado ao grupo esmagamento. A maior intensidade da lesão estaria associada à ação simultânea de dois agentes físicos lesivos: a baixa temperatura, que proporcionaria lesão isquêmica local do nervo, e o trauma contuso gerado pela pressão da aplicação do *spray* de nitrogênio. Outro fator associado é a maior extensão de tecido neural atingido nas lesões de congelamento (área da bola de gelo), fato também observado por Kerns et al. (1991).

Entretanto, sob o ponto de vista estatístico, os grupos crioterapia e esmagamento tiveram resultados semelhantes. Considerando-se que a lesão de esmagamento é, classicamente, uma lesão de axoniotmese, pode-se inferir que esta também seja a classificação para o grupo crioterapia. E, sendo a axoniotmese reversível, pode-se deduzir que a lesão de congelamento seja reversível. O método de classificação empregado na presente pesquisa, portanto, teve por parâmetro a lesão de esmagamento. O termo axoniotmese, por sua vez, refere-se à interrupção da continuidade do axônio com a manutenção da bainha epineural intacta (HUPP, 2005; MINAMOTO, 2007), característica que, para ser visualizada, requer análise de

microscopia eletrônica de varredura. Essa técnica poderia evidenciar, ainda, a degeneração Walleriana, característica histológica inerente a esse tipo de lesão de nervo periférico (KUMAR, 2008).

Os resultados permitem afirmar que a lesão de nervo periférico induzida pela aplicação de *spray* de nitrogênio líquido diretamente sobre a estrutura neural não está confinada à bainha de mielina, o que discorda de Schmidt e Pogrel (2004), que a classificam como neurapraxia. Uma possível explicação para tal discordância é o fato de que esses autores conduziram pesquisas clínicas em que a avaliação dos pacientes foi realizada por meio de testes e questionários de alterações neurossensoriais, cuja subjetividade pode ser considerada um viés importante. Cabe ressaltar ainda que, no referido estudo, os pacientes foram avaliados em tempos pós-operatórios distintos, e o critério definidor de aplicação da crioterapia sobre o nervo foi a distância de 0 mm entre este e a lesão, verificada à radiografia panorâmica pré-operatória. Tal método não assegura que a aplicação tenha ocorrido sobre o nervo, já que a padronização da espessura de osso sobre o nervo alveolar inferior não é possível na radiografia panorâmica e só seria garantida por meio de tomografias computadorizadas ou pelo diagnóstico *in vivo* trans-operatório da exposição dessa estrutura. Schmidt e Pogrel, além de classificarem a lesão decorrente da crioterapia como neurapraxia, também afirmam que seu tempo médio de regeneração, em pacientes, seja de 90 dias. Entretanto, os resultados do presente estudo indicam que a lesão caracteriza-se como axoniotmese, situação em que, segundo Ferreira (1999), o prazo de 90 dias é insuficiente para a completa recuperação neurossensorial.

Vários animais têm sido empregados em pesquisas que avaliam a regeneração de nervos periféricos. O rato permanece como modelo experimental de escolha para vários neurocientistas por ser considerado uma alternativa menos onerosa, de fácil manipulação e cujo comportamento biológico assemelha-se ao de outros mamíferos (AL-BISHRI et al., 2005; BOZKURT et al., 2008; DIJKSTRA et al., 2000; IOHOM et al., 2005; KOKA; HADLOCK, 2001; MONTE-RASO et al., 2008; VAREJÃO et al., 2001, 2003; WACHTER et al., 2002; WOLTHERS et al., 2005). O nervo ciático do rato exhibe características celulares e capacidade regenerativa semelhantes às dos primatas, sendo amplamente aplicado na avaliação da função

sensitiva e motora de nervos periféricos após lesões traumáticas e técnicas de reparo cirúrgico (AL-BISHRI et al., 2005; VAREJÃO et al., 2001).

O congelamento percutâneo de nervos periféricos (crioneurólise) para obtenção de analgesia prolongada tem sido aplicado no pós-operatório de pacientes oncológicos, em toracotomias e em dores neuropáticas (DELEO et al., 1994). Todas as técnicas relatadas na literatura para esse fim usam o sistema fechado de aplicação do nitrogênio líquido, por meio de sonda (BEAZLEY; BAGLEY; KETCHAM, 1974; MYERS; HECKAMN; POWELL, 1996). O presente estudo foi pioneiro no emprego da técnica aberta de aplicação do nitrogênio líquido (*spray*) como tentativa de reproduzir, em modelo animal, a lesão neural periférica decorrente do uso do nitrogênio líquido como terapia complementar ao tratamento cirúrgico de lesões ósseas.

Há divergência sobre os protocolos crioterápicos, sobretudo no que diz respeito ao número de ciclos de congelamento e ao tempo de aplicação do agente criogênico no tecido ósseo. Diferentes protocolos são apresentados na literatura (CURI; DIB; PINTO, 1997; POPKEN et al., 2003; SCHMIDT; POGREL, 2001; SCORTEGAGNA, 2004; SILVA, 2003). Neste estudo, foi adotado o protocolo de duas aplicações de dez segundos cada, com intervalo de 2,5 minutos, já empregado por Silva (2003) e por Scortegagna (2004). Segundo os autores, esse protocolo foi eficaz em promover necrose de 0,5 mm das margens ósseas, o que reforça a indicação da crioterapia como recurso complementar no tratamento cirúrgico de lesões maxilares localmente invasivas.

A lesão de esmagamento é um modelo experimental consagrado em estudos de regeneração de nervo periférico (BRIDGE et al., 1994; DE MEDINACELLI, 1996; ILHA et al., 2008; KERNS et al., 1991; LUÍS et al., 2007; MAZZER et al., 2006; MONTE-RASO et al., 2005), sendo que diferentes métodos e tempos de aplicação podem ser empregados para induzi-la. O pinçamento do nervo ciático do rato com pinça hemostática durante 20 segundos é efetivo em fornecer um modelo de axoniotmese (BRIDGE et al., 1994). Considerando-se o acima exposto e com o objetivo de padronizar o tempo de aplicação dos mecanismos indutores de lesão neural nos grupos esmagamento e crioterapia, uma pinça hemostática curva

foi utilizada, com o mesmo tempo de aplicação do nitrogênio líquido, para induzir a lesão de esmagamento, que constituiu o controle-positivo da pesquisa.

A maioria das pesquisas sobre regeneração do nervo ciático em ratos submetidos a lesões de axoniotmese utiliza período de avaliação pós-operatória entre quatro e oito semanas. Após esse período de oito semanas, a recuperação funcional já estaria completa (GUDEMEZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2001). Com base nesses estudos e considerando-se que a lesão de congelamento seria do tipo neurapraxia, que é menos grave (SCHMIDT; POGREL, 2004), optou-se, na presente pesquisa, por períodos de observação de 15, 30 e 70 dias.

O presente estudo sugere que o emprego da crioterapia com nitrogênio líquido como terapia complementar de lesões localmente agressivas do complexo maxilomandibular requer cautela. O dano causado pela crioterapia ao tecido nervoso parece ser mais grave do que aquele apontado por estudos clínicos. A orientação pós-operatória do paciente, portanto, deve considerar prazos de recuperação neurosensorial superiores aos previstos na literatura. Novos estudos clínicos, respaldados por metodologia padronizada e confiável, são necessários para precisar-se o tempo demandado na recuperação neurosensorial de tais lesões. Dispositivos confeccionados com material isolante térmico para proteção trans-operatória do nervo devem ser desenvolvidos. Tais dispositivos seriam uma alternativa viável para minimizar-se o dano ao tecido nervoso. Ainda, no caso de eventuais lesões irreversíveis, o emprego de células-tronco poderia viabilizar mecanismos aceleradores da recuperação funcional. Por outro lado, ao considerar-se a relação risco/benefício, a crioterapia associada à enucleação cirúrgica de lesões ósseas extensas parece estar bem indicada. O procedimento viabiliza cirurgias menos mutiladoras, enquanto o dano sobre a estrutura nervosa tem comportamento reversível.



PUCRS

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- a) O dano causado pela aplicação direta da crioterapia com *spray* de nitrogênio líquido sobre o nervo ciático de ratos caracteriza uma lesão de axoniotmese.
- b) A crioterapia com *spray* de nitrogênio líquido aplicada diretamente sobre o nervo periférico causa alterações neurais reversíveis.
- c) A lesão de congelamento exibe evolução do processo regenerativo semelhante à observada para a lesão de esmagamento.



PUCRS

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-BISHRI, A. et al. Systemic betamethasone accelerates functional recovery after a crush injury to rat sciatic nerve. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 7, p. 973-977, Jul. 2005.

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. 129-138, Jan. 1989.

BEAZLEY, R. M.; BAGLEY, D. H.; KETCHAM, A. S. The effect of cryosurgery on peripheral nerves. **Journal of Surgery Research**, v. 16, n. 3, p. 231-234, Mar. 1974.

BELTRÃO, R. G. **Análise clínica dos efeitos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábio e palato de coelhos**. 2003. 131 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2003.

BERNAT, J. F. Criocirurgia: avances recientes. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 37, n. 2, p. 96-98, 1993.

BORGES, H. O. I. **Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal**. 2005. 81 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial), PUCRS, Porto Alegre, 2005.

_____. **Uso de crioterapia em dentes inoculados com enterococcus faecalis: um estudo in vitro**. 2007. 68p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2007.

BOZKURT, A. et al. Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI--a novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). **Journal of Neuroscience Methods**, v. 170, n. 1, p. 117-122, May. 2008.

BRIDGE, P. M. et al. Nerve crush injuries: a model for axonotmesis. **Experimental Neurology**, v. 127, n. 2, p. 284-290, Jun. 1994.

BURNETT, M. G; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical Focus**, Charlottesville, v. 16, n. 5, p. 132-135, May. 2004.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: EDUSP, 1979. 138 p.

CARMIGNOTO, G. et al. Muscle reinnervation: I. Restoration of transmitter release mechanisms. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 393-401, Mar. 1983.

CERQUEIRA, A.; SANT'ANA FILHO, M. S. Margem de segurança com crioterapia após curetagem de lesões recidivantes maxilomandibulares: relato de caso. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, v. 8, n. 31, p. 193-196, jul./set. 2001.

CHIARELLO, S. E. Cryopeeling (extensive cryosurgery) for treatment of actinic keratoses: an update and comparison. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 8, p. 728-732, Aug. 2000.

CONACHER, I. D.; LOCKE, T.; HILTON, C. Neuralgia after cryoanalgesia for thoracotomy. **Lancet**, v. 1, n. 8475, p. 277, Feb. 1986.

CURI, M. M.; DIB, L. L.; PINTO, D. S. Management of solid ameloblastoma of the jaws with liquid nitrogen spray cryosurgery. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 84, n. 4, p. 339-344, Oct. 1997.

DE MEDINACELI, L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 58, n. 1-2, p. 29-37, May. 1995.

_____. Statistical analyses and reliability of the sciatic functional index. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 741, Jun. 1996.

DE MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, v. 77, n. 3, p. 634-643, Sep. 1982.

DEFRIN, R.; ZEITOUN, I.; URCA, G. Strain differences in autotomy levels in mice: relation to spinal excitability. **Brain Research**, v. 711, n. 1-2, p. 241-244, Mar. 1996.

DELEO, J. A. et al. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. **Pain**, v. 56, n. 1, p. 9-16, Jan. 1994.

DIJKSTRA, J. R. et al. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 96, n. 2, p. 89-96, Mar. 2000.

FERREIRA, A. S. Fisiopatologia das lesões nervosas periféricas. In: FERREIRA, A. S. **Lesões Nervosas periféricas- diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Santos, 1999. p. 1-10.

FIGOLS, J. Estructura del nervio periférico normal y lesiones elementares. In: SANCHES, F. F. C. **Neuropathologia: diagnóstico y clínica**. Madri: Edimsa, 2000. p. 687-701.

FRAHER, J.; DOCKERY, P. A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. **Journal of Anatomy**, v. 193, n. 2, p. 195-201, Aug. 1998.

GAGE, A. A.; BAUST, J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology**, v. 37, n. 3, p. 171-186, Nov. 1998.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1995. 85 p.

GONGLOFF, R. K.; GAGE, A. A. Cryosurgical treatment of oral lesions: report of cases. **Journal of American Dental Association**, v. 106, n. 1, p. 47-51, Jan. 1983.

GORIO, A. et al. Muscle reinnervation: II. Sprouting, synapse formation and repression. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 403-416, Mar. 1983.

GUDEMEZ, E. et al. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. **Microsurgery**, v. 22, n. 6, p. 234-241, 2002.

HARE, G. M. et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 89, n. 2, p. 251-258, Feb. 1992.

HUPP, J. R. Reparação das feridas. In: PETERSON, L, J. et al. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 53-67.

ILHA, J. et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 22, n. 4, p. 355-366, Jul./Aug. 2008.

IOHOM, G. et al. Long-term evaluation of motor function following intraneural injection of ropivacaine using walking track analysis in rats. **British Journal of Anaesthesia**, v. 94, n. 4, p. 524-529, Apr. 2005.

ISHIDA, C. E.; RAMOS-E-SILVA, M. Cryosurgery in oral lesions. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 283-285, Apr. 1998.

KANAYA, F.; FIRRELL, J. C.; BREIDENBACH, W. C. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 98, n. 7, p. 1264-1271, Dec. 1996.

KAUPPILA, T. Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 1, p. 111-129, 1998.

KERNS, J. M. et al. A comparison of cryoprobe and crush lesions in the rat sciatic nerve. **Pain**, v. 47, n. 1, p. 31-39, Oct. 1991.

KOKA, R.; HADLOCK, T. A. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. **Experimental Neurology**, v. 168, n. 1, p. 192-195, Mar. 2001.

KUMAR, V. O sistema nervoso. In: KUMAR, V. et al. **Robbins patologia básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 937-984.

KUWAHARA, R. T.; CRAIG, S. R.; AMONETTE, R. A. Forceps and cotton applicator method of freezing benign lesions. **Dermatologic Surgery**, v. 27, n. 2, p. 183-184, Feb. 2001.

LAGO JÚNIOR, O. et al. Avaliação Funcional e Histológica do Reparo de Nervo Ciático utilizando Cola de Fibrina e Sutura em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 40, n. 1, p. 69-78, 2005.

LEOPARD, P. J. Cryosurgery, and its application to oral surgery. **British Journal of Oral Surgery**, v. 13, n. 2, p. 128-152, Nov. 1975.

LUÍS, A. L. et al. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 163, n. 1, p. 92-104, Jun. 2007.

MARTINS, R. S. et al. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 3B, p. 750-756, set. 2006.

MAZZER, P. Y. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 220-225, maio. 2006.

MINAMOTO, V. B. Efeitos da desnervação no músculo esquelético:uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 20, n. 3, p. 63-69, jul./set. 2007.

MONTE-RASO, V. V.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos.Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 133-136, fev. 2006.

MONTE-RASO, V. V. et al. Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? **Journal of Neuroscience Methods**, v. 142, n. 2, p. 185-192, Mar. 2005.

MONTE-RASO, V. V. et al. Is the sciatic functional Index always reliable and reproducible? **Journal of Neuroscience Methods**, v. 170, n. 2, p. 255-261, May. 2008.

MUNRO, C. A. et al. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. **Muscle Nerve**, v. 21, n. 8, p. 1095-1097, Aug. 1998.

MYERS, R. R.; HECKMAN, H. M.; POWELL, H. C. Axonal viability and the persistence of thermal hyperalgesia after partial freeze lesions of nerve. **Journal of the Neurological Science**, v. 139, n. 1, p. 28-38, Jul. 1996.

OLIVEIRA, E. F. et al. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 17, n. 1, p. 69-75, Jan. 2001.

OLIVEIRA, L. S. et al. Estimulación eléctrica y natación en la fase aguda de la axonotmesis: influencia sobre la regeneración nerviosa y la recuperación funcional. **Revista de Neurología**, v. 47, n. 1, p. 11-15, abr. 2008.

ORR, I. A.; KEENAN, D. J.; DUNDEE, J. W. Improved pain relief after thoracotomy: use of cryoprobe and morphine infusion. **British Medical Journal**, v. 283, n. 6297, p. 945-948, Oct. 1981.

ÖZAY, R. et al. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. **Surgical Neurology**, v. 68, n. 6, p. 615-622, Dec. 2007.

POGREL, M. A. The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 3, p. 269-273, Mar. 1993.

POGREL, M. A.; YEN, C. K.; TAYLOR, R. A study of infrared thermographic assessment of liquid nitrogen cryotherapy. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 81, n. 4, p. 396-401, Apr. 1996.

POGREL, M. A. et al. Effects of liquid nitrogen cryotherapy and bone grafting on artificial bone defects in minipigs: a preliminary study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 3, p. 296-302, Jun. 2002.

POPKEN, F. et al. Cryosurgery in long bones with new miniature cryoprobe: an experimental in vivo study of the cryosurgical temperature field in sheep. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 29, n. 6, p. 542-547, Aug. 2003.

READE, P. C. Cryosurgery in clinical dental practice. **International Dental Journal**, v. 29, n. 1, p. 1-11, Mar. 1979.

ROBINSON, A. J.; KELLOGG, R. Estudo clínico eletrofisiológico. In: ROBINSON, A. J.; MACKLER, L. S. **Eletrofisiologia clínica**: eletroterapia e teste eletrofisiológico. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 319-381.

SALMASSY, D. A.; POGREL, M. A. Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, n. 7, p. 784-790, Jul. 1995.

SANTOS, A. B. **Análise morfológica do efeito de diferentes protocolos de**

nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. 2002. 132 p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2002.

SANTOS, T. S.; ANDRÉ, E. S. Avaliação funcional da marcha do rato após estimulação elétrica do músculo gastrocnêmico desnervado. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 2, p. 120-124, maio. 2007.

SCHMIDT, B. L.; POGREL, M. A. The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of jaw lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 28, n. 1, p. 35-36, 1999.

_____. The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 59, n. 7, p. 720-725, discussion 726-727, Jul. 2001.

_____. Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 10, p. 1183-1187, Oct. 2004.

SCORTEGAGNA, A. **Análise microscópica de enxerto ósseo autólogo em mandíbula de coelhos submetida à crioterapia com nitrogênio líquido.** 2004. 108 p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2004.

SILVA, F. M. **Estudo das características histológicas do processo de reparo após aplicação de nitrogênio líquido em tecido ósseo em mandíbulas de coelhos.** 2003. 59 p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, 2003.

SILVA, J. et al. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 5, p. 273-275, jul. 2006.

TAKEDA, S. Y. et al. Regeneración nerviosa periférica en ratones expuestos a un ambiente enriquecido. **Revista de Neurología**, v. 47, n. 4, p. 185-190, jun. 2008.

TAL, H. The rationale and technique of cryotherapy of superficial oral lesions. **The Journal of Dental Association of South Africa**, v. 37, n. 5, p. 335-340, May. 1982.

_____. Cryosurgical treatment of hemangiomas of the lip. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 73, n. 6, p. 650-654, 1992.

TAL, H.; RIFKIN, B. Cryosurgical treatment of a gingival lichen planus: report of case. **Journal of American Dental Association**, v. 113, n. 4, p. 629-631, Oct. 1986.

TURJANSKY, E.; STOLAR, E. Criocirugia en lesiones de boca. **Revista de la Asociación Medica Argentina**, v. 105, n. 5, p. 22-25, 1992.

VAREJÃO, A. S. et al. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 2, p. 695-699, Oct. 2003.

_____. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 11, p. 1652-1670, Nov. 2004.

_____. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 108, n. 1, p. 1-9, Jul. 2001.

VERDÚ, E. et al. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. **Journal of Peripheral Nerve System**, v. 5, n. 4, p. 191-208, Dec. 2000.

WACHTER, B. G. et al. Silver nitrate injury in the rat sciatic nerve: a model of facial nerve injury. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 127, n. 1, p. 48-54, Jul. 2002.

WAGNER, R. et al. Gender differences in autotomy following sciatic cryoneurolysis in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 58, n. 1, p. 37-41, Jul. 1995.

WEBER, R. A. et al. Autotomy and the sciatic functional index. **Microsurgery**, v. 14, n. 5, p. 323-237, 1993.

WHITTAKER, D. K. Mechanisms of tissue destruction following cryosurgery. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 66, n. 5, p. 313-318, 1984.

WOLTERS, M. et al. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. **Microsurgery**, v. 25, n. 6, p. 508-519, 2005.

WU, Y. H. et al. Electrophysiological and functional effects of shock waves on the sciatic nerve of rats. **Ultrasound and Medicine and Biology**, v. 34, n. 10, p. 1688-1696, Oct. 2008.

YEH, C. J. Simple cryosurgical treatment for oral lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 29, n. 3, p. 212-216, Jun. 2000.



PUCRS

ANEXOS

ANEXO A

*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 03 de dezembro de 2007

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0086/07
Intitulado: Atividade neurosensorial do nervo ciático de ratos após crioterapia com nitrogênio líquido. Análises eletroneurofisiológica, microscópica e funcional da marcha
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Karen Cherubini
Pesquisadores Associados: Frederico Sauressig; Jaderson Costa da Costa e Jefferson Braga Silva
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 30 de novembro de 2007.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS

04 12 07
Frederico Sauressig

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 029/08-CEUA

Porto Alegre, 07 de maio de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou em 13 de março de 2008 seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00008, intitulado: **"Atividade neurosensorial do nervo ciático de ratos após crioterapia com nitrogênio líquido. Análises eletroneurofisiológica, microscópica e funcional da marcha"**.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Anamaria Feijó
COORDENADORA DO CEUA-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Prof Dr. Karen Cherubini
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C

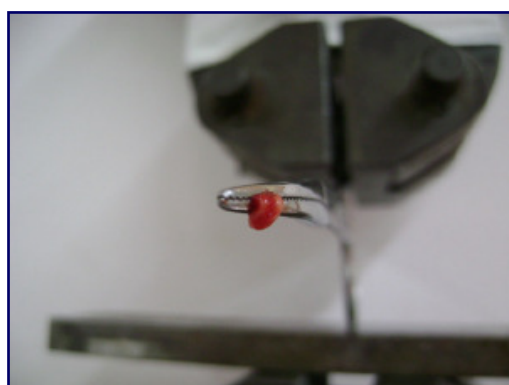
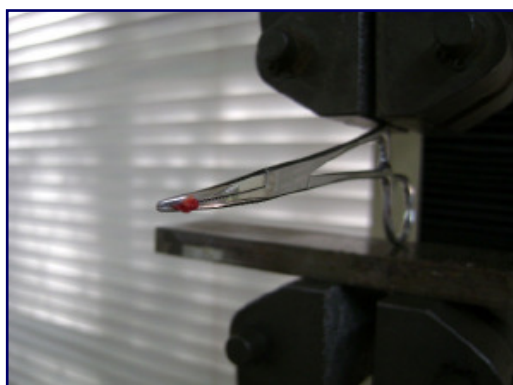
CENTRO TECNOLÓGICO DE MECÂNICA DE PRECISÃO - SENAI
LABORATÓRIO INDUSTRIAL CETEMP - LABORATÓRIO DE ENSAIOS FÍSICO-MECÂNICOS

REGISTRO DE MEDIÇÃO ENSAIO DE COMPRESSÃO

DADOS DO OBJETO ENSAIADO		DEMAIS INFORMAÇÕES		
Objeto ensaiado:	Nervo de rato	Cliente:	Frederico Saueressig	PSE 51015 20/06/2008
Nº de mangueira:	Um (01)	Endereço:	Rua Cabral, 1390 - Apto 301	
Formato:		Cidade:	Porto Alegre - RS	
Fabricante tubo:		Nota fiscal:	258/08	Data da N.F. 27/08/2008
Fabricante terminais:		Rastreabilidade		
Nº fabricação / lote:		Máquina de Ensaios, marca Pantec, modelo Versat 500, com certificado de calibração RBC número 1412/2008 emitido pelo CETEMP, válido até 03/2009. Paquímetro universal marca Tesa número 31-1680, com certificado de calibração RBC número 4691/2007 emitido pelo CETEMP, válido até 11/2008. Termo-higrômetro marca Minipa com certificado de calibração RBC T2202 emitido pelo PUC/LABELO, válido até		
		Velocidade de ensaio:	5 mm/minuto	
Temperatura ambiente:	20,0°C	Procedimento de ensaio:	DSQCS 012-3 de setembro de 2007 revisão 3	
Umidade relativa do ar:	63%	Norma de referência:		
Relatório :	52380-1/2008	Observador:	Laercio Rigodanzo	
Data do ensaio:	08/09/2008	Signatário autorizado:	Laercio Rigodanzo	
Data de emissão:	29/09/2008			

CP	Identificação	Material	Bitola (mm)	Fm estalo 2 (N)	Fm estalo 3 (N)	Incerteza de Medição (N)	
1/2	Nervo 1	----	----	16,7	30,8	0,8	
2/2	Nervo 2	----	----	17,2	31		

Fotos do ensaio:



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)