

Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o Fluoro-Gold® como marcador neuronal.

A study on nerve regeneration in tibial nerves of Wistar rats, using Fluoro-Gold® as a neuronal tracer

MARCO AURÉLIO SERTÓRIO GRECCO¹, VILNEI MATTIOLI LEITE², WALTER MANNA ALBERTONI³,
JOÃO BAPTISTA GOMES DOS SANTOS⁴, CELSO KIYOSHI HIRAKAWA⁵, FLÁVIO FALOPPA⁶, SANDRA GOMES VALENTE⁷.

RESUMO

Os autores estudaram em ratos a regeneração nervosa no enxerto nervoso tradicional, comparando-os com grupo controle, através da contagem no nível da medula espinhal, entre L3 e S1, de motoneurônios marcados por meio de exposição do nervo tibial ao Fluoro-Gold® (FG). No grupo controle, ambos os nervos tibiais foram expostos ao FG®, e em 48 horas, após a perfusão, os motoneurônios foram contados. No grupo experimental, foi ressecado um segmento de 8mm do nervo tibial criando uma falha segmentar. O segmento de nervo de um foi usado para reparar o lado contralateral, utilizando sutura epineural. Após quatro meses, o nervo tibial direito foi exposto ao FG após o enxerto nervoso e, o esquerdo, antes do enxerto. Os motoneurônios foram contados após a perfusão. Ambas as medulas foram cortadas em segmentos de 40µm. Para a análise estatística foram utilizados testes de Wilcoxon e Student. O grupo controle apresentou um significativo aumento de motoneurônios quando comparado ao experimental. No grupo experimental, o número de motoneurônios foi significativamente maior, quando a exposição do nervo tibial ao FG® era feita distalmente ao enxerto nervoso. O enxerto nervoso funciona como um bloqueio parcial para a migração dos axônios em regeneração.

Descritores: Transplante autólogo; Regeneração nervosa; Nervos periféricos; Ratos wistar; Corantes fluorescentes.

INTRODUÇÃO

As lesões do sistema nervoso periférico têm sido alvo de inúmeros estudos para compreensão e entendimento do pro-

SUMMARY

The authors studied, in rats, of nerve regeneration in nerve grafts comparing with control group using Fluoro-Gold® (FG) labeled motor neurons count in spinal cord. In control group both tibial nerves were exposed to FG® and motor neurons counted in spinal cord in 48 hours, after perfusion, in a medular segment from L3 to S1. In experimental group, resecting 8 mm, a gap was created in both tibial nerves and nerve segment of one nerve was used to repair contralateral side in a traditional nerve graft suture. After four months, right tibial nerve was exposed to FG® distal to graft and left tibial nerve exposed to FG proximal to graft. In 48 hours, after perfusion, motoneurons were counted in a medular segment from L3 to S1. In both groups medular segment was cut in 40 µm slices and all labeled cells counted. Wilcoxon and Student tests were used for statistical analysis. Control group presented a significative increased number of motoneurons when compared to experimental group. In experimental group number of motoneurons was significantly decreased when tibial nerve was exposed to FG® distal to nerve graft. Nerve graft promoted a partial block to axon migration after four months of surgery.

Key words: Transplantation autologous; Nerve regeneration; Peripheral nerves; Wistar rats; Dyes fluorescentes.

INTRODUCTION

Peripheral nervous system injuries have been the subject of a number of studies undertaken to understand the process of nerve repair, since they can promote disturbances that are relevant to the functions of upper and lower limbs.

Trabalho realizado no Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do Departamento de Ortopedia e Traumatologia e nos Laboratórios da Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Unifesp-EPM.

1. Médico; Mestre em Ortopedia e Traumatologia
2. Professor Livre-Docente; Chefe da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior
3. Professor Titular; Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia
4. Médico assistente da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior; Mestre em Ortopedia e Traumatologia
5. Professor Livre-Docente, coordenador do Curso de Pós-graduação
6. Doutor em Medicina, Chefe de Clínica na Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP/EPM
7. Bióloga; Mestre em Neurociências.

Endereço para correspondência: Rua Borges Lagoa, 786 - Cep 04038-002 - São Paulo, SP E-mail: marcoasgrecco@metalnet.com.br

Work performed at the Laboratory of Microsurgery, Discipline of Hand and Upper Limb Surgery, Department of Orthopedics and Traumatology, and at the Laboratories of the Discipline of Experimental Neurology, Department of Neurology and Neurosurgery, Unifesp - EPM. Abstract of Master's Thesis within the Post-Graduation Program in Orthopedics and Traumatology, Unifesp - EPM

1. Doctor; Master's degree in Orthopedics and Traumatology
2. Full Professor; Head, Discipline of Hand and Upper Limb Surgery
3. Chairman Professor; Head, Department of Orthopedics and Traumatology
4. Assistant Doctor, Discipline of Hand and Upper Limb Surgery; Master's degree in Orthopedics and Traumatology
5. Full Professor; Coordinator, Post Graduation Course
6. PhD of Medicine; Discipline of Hand and Upper Limb Surgery, Department of Orthopedics and Traumatology, UNIFESP/EPM
7. Biologist; Master's degree in Neuroscience.

Address: Rua Borges Lagoa, 786 - São Paulo, SP 04038-002 - Brasil. E-mail: marcoasgrecco@metalnet.com.br

cesso de reparação nervosa, pois podem ocasionar transtornos importantes à função dos membros superiores e inferiores.

O método de sutura epineural foi descrito por Hueter (1873) e o primeiro enxerto nervoso experimental por Philipeau, Vulpi-an (1886)⁽¹⁰⁾.

Graças à implantação de técnicas e materiais microcirúrgicos, ocorreu um aperfeiçoamento na reconstrução das estruturas lesadas, com melhora da recuperação funcional do nervo⁽¹⁴⁾

O enxerto nervoso foi apresentado como uma das formas de tratamento de lesões nervosas com falha segmentar e suturas epineurais sob tensão^(10,11,12) e a sua utilização tem melhora do significativamente com o emprego de técnicas microcirúrgicas⁽⁶⁾. Entretanto, outros autores⁽¹³⁾, não acreditam nos resultados do emprego de tais técnicas.

Como vimos, o enxerto nervoso é empregado desde o final do século XIX. Por esse motivo, resolvemos estudar a regeneração nervosa através da contagem de motoneurônios marcados pelo FG[®] por meio de: comparação entre o número de motoneurônios marcados em animais do grupo controle e o número de motoneurônios em animais do grupo experimental, onde foi feito o enxerto nervoso; comparação entre o número de motoneurônios marcados através da exposição ao FG[®], realizada proximal e distalmente ao enxerto nervoso nos animais do grupo experimental, e avaliação para verificar se há bloqueio da regeneração nervosa através do enxerto nervoso

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos 28 ratos da raça Wistar, machos, como grupo controle. Foram usados 14 animais adultos com peso médio de 298g e com idade média de cinco meses e 14 ratos com peso médio de 155g, e com idade média de um mês, como grupo experimental.

Cada animal recebeu anestesia intraperitoneal com solução anestésica composta por hidrato de cloral (4,25g), sulfato de magnésio (2,25g), propilenoglicol (4,28ml), álcool etílico absoluto (11,5ml) e água destilada (45,7ml). (Figura 1).

Fez-se uma incisão póstero-lateral em ambas as coxas de cada pata. Utilizou-se microscópio e instrumental microcirúrgico para dissecar o nervo ciático e suas ramificações sural, peroneiro e tibial. (Figura 1). No grupo controle, operamos os dois membros inferiores, expondo o nervo tibial de cada perna, seccionando-os e expondo-os imediatamente ao marcador neuronal FG[®] a 3%, por um período de uma hora e 30 minutos. No grupo experimental, operamos os dois membros inferiores, expondo

The epineural suture method was described by Hueter in 1873, and the first experimental nerve grafting was performed by Vulpi-an Philipeau in 1886⁽¹⁰⁾.

Thanks to the implementation of microsurgical techniques and materials, the reconstruction of injured structures could be improved, and nerve functions could be recovered⁽¹⁴⁾.

Nerve graft was introduced as one of ways of managing nerve injuries with segment defect and epineural sutures under stress^(10,11,12) and its use has significantly improved using microsurgical techniques⁽⁶⁾. However, other authors⁽¹³⁾ do not believe in the results of such techniques.

As mentioned before, nerve grafting has been employed since the end of 19th century. This is the reason why we decided to investigate nerve regeneration by count FG[®]-labeled motoneurons and comparing the number of labeled motoneurons in animals of the control group and the experimental group that subjected to nerve grafting; also, a comparison was made between the number of labeled motoneurons through exposure to FG[®] performed proximally and distally to the nerve graft in the animals of the experimental group, and also an evaluation to see whether the nerve regeneration was blocked by the nerve graft.

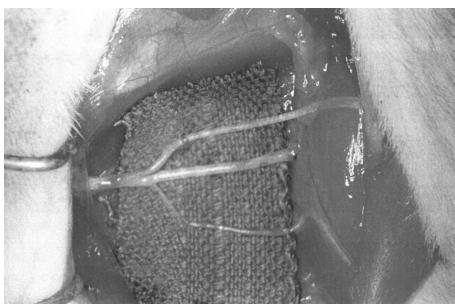


Figura 1 – Nervo ciático com seus ramos sural, peroneiro e tibial.

Figure 1 - Sciatic nerve showing its sural, peroneal and tibial ramifications.



Figura 2 – Sutura do enxerto de nervo com ampliação de 25x ao microscópio cirúrgico.

Figure 2 - Nerve graft suture (surgical microscope, 25x).

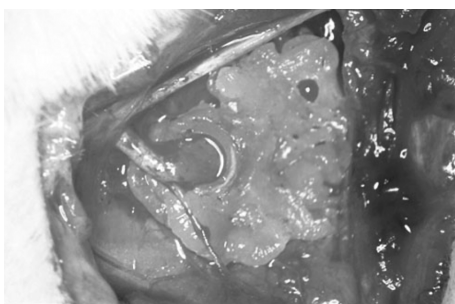


Figura 3 – Nervo tibial exposto ao FG[®].

Observa-se isolamento de vaselina com calha de polietileno ao centro e com a extremidade do nervo mergulhado em FG[®].

Figure 3 - FG[®]-exposed tibial nerve. Vaseline was isolated using a polyethylene trough in the center, with the nerve end immersed in FG[®].

MATERIAL AND METHODS

Twenty-eight male Wistar rats were used as a control group. The experimental group consisted of 14 adult animals weighing on average 298 g, with mean age of five months, plus 14 rats weighing on average 155 g, with mean age of one month.

Each animal was intraperitoneally anesthetized with an anaesthetic solution formed by 4.25 g chloral hydrate, 2.25 g magnesium sulfate, 4.28 ml propylenglycol, 11.5 ml ethyl alcohol, anhydrous, and 45.7 ml distilled water (Figure 1).

Posterolateral incisions were performed, one in each thigh of the rats. To dissect the sciatic nerve and its sural, peroneal and tibial ramifications, a microscope and surgical instrumentation were used (Figure 1). We operated both lower limbs of each rat in the control group, exposing the tibial nerve of each hind leg, sectioning and immediately exposing them to a 3% solution of neuronal tracer FG[®] for one hour and thirty minutes. In the experimental group we operated the rats' lower limbs, exposing the tibial nerve of both sides and resecting an 8-mm long segment of the nerve, while simulating the loss of substance and the obtainment of the nerve allograft. The nerve segment of one side was used to repair the contralateral side, with the aid of epineural

o nervo tibial de cada lado e ressecando um segmento de 8mm do nervo, simulando, ao mesmo tempo, a perda de substância e a obtenção do enxerto nervoso autólogo. O segmento de nervo de um foi usado para reparar o lado contralateral, utilizando-se sutura epineural (Figura 2). Após quatro meses, os animais foram submetidos à nova cirurgia para exposição dos nervos tibiais ao marcador neuronal FG[®] (Figura 3). O nervo tibial direito foi corado após o enxerto nervoso e o esquerdo antes do enxerto. Após 48 horas os animais de ambos os grupos foram novamente anestesiados e perfundidos com 50ml de solução salina isotônica intra-cardíaca para limpeza do sistema vascular, 200ml de "solução de perfusão" (4% paraformaldeído/"buffer" fosfato) rapidamente em 8 a 10 minutos, 300ml de "solução de perfusão", lentamente, em 20 minutos, 200ml de "buffer" sacarose a 10%, rapidamente, em oito a 10 minutos, 300ml de "buffer" sacarose a 10%, lentamente, em 20 minutos.

Ao término desse procedimento, com o animal em decúbito ventral, realizou-se a laminectomia dorsal e lombar. Após a exposição da medula espinhal, ressecou-se o segmento correspondente de L3 a S1. Marcouse, então, um sulco na região dorsal deste segmento para indicar o lado direito.

A peça foi colocada em micrótomo e fatiada em cortes de 40 mm, montadas em lâminas, deixadas secando na geladeira por 24 horas. As lâminas prontas foram examinadas em microscópio ZEISS-AXIOLAB com luz fluorescente para evidenciar o FG[®]. Examinou-se todos os cortes em ampliações de 100 e 400 vezes e contou-se os neurônios motores marcados (Figura 4).

Realizou-se a análise estatística aplicando-se os testes não-paramétrico de Wilcoxon sinalizado, e o teste paramétrico t-Student. O nível de significância considerado para os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

O número de motoneurônios, marcados com FG[®], nos animais do grupo controle é maior que no grupo experimental submetido ao enxerto nervoso, tanto proximal como distal. Não há diferença no número de motoneurônios marcados, entre os lados direito e esquerdo, nos animais do grupo controle (Tabela 2). O número de motoneurônios, nos animais do grupo experimental, é maior quando a marcação com FG[®] é feita proximal ao enxerto nervoso (Tabela 1).

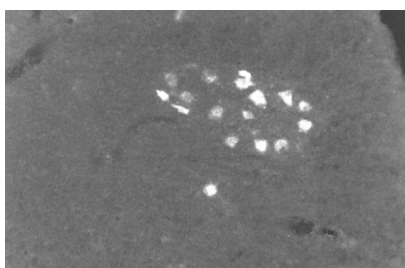


Figura 4 – Secção de medula com ampliação de 25X ao microscópio. Observam-se células marcadas pelo FG[®].

Figure 4 - Medullary section under the microscope (25x). FG-labeled cells can be seen.

Ratos	Lado Direito	Lado Esquerdo
1	342	371
2	916	1046
3	532	622
4	471	651
5	973	1101
6	684	827
7	916	1105
8	931	1078
9	891	1034
10	865	1036
11	553	631
12	416	437
13	376	451
14	333	404
Total	9199	10784
Média	657,07	771

$p < 0,001$ há diferença estatística entre eles, sendo que o lado esquerdo é maior. Fonte: DOT-UNIFESP/EPM

Tabela 1 – Número de células absolutas contadas no lado direito e esquerdo; valores totais e média; em animais do grupo experimental

Table 1 - Absolute number of cells counted on the right and left sides of animals in the experimental group; total values and average value

Ratos	Lado Direito	Lado Esquerdo
1	913	963
2	875	967
3	1165	1033
4	1169	1194
5	882	889
6	1175	1206
7	813	848
8	1135	1094
9	913	943
10	877	922
11	1085	940
12	790	830
13	857	872
14	980	973
Total	13629	13574
Média	973,5	969,6

$p < 0,490$, portanto não existe diferença estatística entre os lados. Fonte: DOT-UNIFESP/EPM

Tabela 2 – Número de células absolutas contadas no lado direito e esquerdo; valores totais e média; em animais do grupo controle

Table 2 - Absolute number of cells counted on the right and left sides of animals in the control group; total and average values

suture (Figure 2). Four months later, the animals underwent another surgery in order to have their tibial nerves exposed to neuronal tracer FG[®] (Figure 3). The right tibial nerve was stained after the nerve grafting, while the left tibial nerve was stained before the nerve grafting. 48 hours later the animals of both groups were anesthetized again and received a quick (8 to 10-minute) perfusion of a mixture of 50 ml of intracardiac isotonic saline solution (to clean their vascular systems) and 200 ml of "perfusion solution" (4% paraformaldehyde/phosphate buffer); a slow (20-minute) perfusion of 300 ml of "perfusion solution"; a quick (8 to 10-minute) perfusion of 200 ml of 10% saccharin buffer; and a slow (20-minute) perfusion of 300 ml of 10% saccharin buffer solution.

After this procedure, dorsal and lumbar laminectomies were performed with the animal in the ventral decubitus position. After exposing the spinal cord, the segment corresponding to L3-S1 was resected. A groove was inscribed in the dorsal region of this segment, to indicate the right side.

The specimen was placed in a microtome and sliced into 40-mm sections that were mounted and left for 24 hours in the refrigerator to dry. A Zeiss Axiolab fluorescence biological microscope was used to examine the sections in order to microscopically evidence the FG. All sections were magnified 100x and 400x, and the count of labeled motoneurons was performed (Figure 4).

The statistical analysis included the signalized non-parametric Wilcoxon test and the Student's t parametric test. The significance level considered for the tests was of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

The number of FG[®]-labeled motoneurons in the animals of the control group is higher as compared with the experimental group that underwent nerve graftings, both proximal and distal. The animals in the control group showed no difference in the number of labeled motoneurons between the left and right sides (Table 2). The number of motoneurons in the experimental group animals is higher when FG[®] labeling is performed proximal to the nerve graft (Table 1).

DISCUSSÃO

Comumente, em reparo nervoso de lesões de nervos periféricos, a neurorrafia término-terminal é a ideal e a que apresenta melhores resultados, com o que praticamente todos os autores, citados em nosso trabalho, concordam. Entretanto, no que tange à lesão nervosa com perda de substância e à sutura sob tensão, vários tipos de enxertos, biológicos e não biológicos, podem ser empregados. Dentre esses, o enxerto nervoso autógeno é o mais utilizado desde o final do século XIX, considerado assim o "Gold Standard"⁽⁸⁾.

A despeito da sua ampla utilização, os resultados funcionais têm sido inferiores aos da sutura término-terminal^(10,11,12), mesmo com o desenvolvimento e emprego de técnicas microcirúrgicas⁽¹⁴⁾.

Foram usados ratos da raça Wistar, por serem conhecidos biologicamente e estudados há muito tempo pela comunidade científica⁽⁴⁾.

Fatores resultantes da lesão do nervo ciático, tais como, úlceras de pele⁽⁷⁾, autofagia das partes insensíveis⁽⁶⁾ e a dificuldade do rato em manter-se em pé para a alimentação e por se tratar de nervo puramente motor, nos levaram à utilização do nervo tibial. Utilizou-se enxerto nervoso de 8mm de comprimento, respeitando-se o limite de 10mm da regeneração em tubos para ratos^(6,9).

O método utilizado para estudar a regeneração nervosa foi através da marcação neuronal retrógrada com FG[®], na concentração de 3%. Este marcador é fluorescente e permite sua observação direta ao microscópio sob uso de filtros⁽⁶⁾.

Ao analisarmos os resultados (Tabela 3), constatamos diferenças nas contagens celulares em todos os animais, porém, evidenciamos proporções semelhantes, coincidindo com os achados da literatura^(1,6,9), com alguns autores concordando que a individualidade de cada animal influencia a contagem^(1,6).

Utilizaram-se dois métodos estatísticos para definir se havia diferença significativa entre as técnicas empregadas. Os testes empregados foram t-Student e Wilcoxon sinalizado.

Na contagem neuronal dos animais do grupo de experiência, averiguamos que o lado esquerdo apresentou média de 771 motoneurônios (máximo de 1078 e mínimo de 371) e o direito 657,07 (máximo de 931 e mínimo de 342), ou seja, o lado direito apresentou, em média, 14,78% menos motoneurônios que o esquerdo (Tabela 3).

De acordo com estudo realizado por Sweet et al.⁽¹⁵⁾, o número de motoneurônios do nervo tibial foi de 982 ± 36 , utilizando coloração retrógrada com HRP, o que está de acordo com o observado no grupo controle (Tabela 1).

Encontramos, em média, 20%, menos motoneurônios marcados do nervo tibial do lado esquerdo dos animais do grupo experimental (com a marcação neuronal realizada proximal ao enxerto nervoso), quando comparamos com o número do grupo controle.

Isso significa que houve uma diminuição no número de células, em decorrência de uma lesão nervosa isolada, na qual não incidiu interferência técnica do cirurgião, mostrando uma possível morte celular. Portanto, este nervo não será igual ao lado não lesado (nervo tibial normal), havendo uma dificuldade para o retorno à função normal do nervo após uma neurorrafia. Altissimi et al.⁽²⁾ analisaram a recuperação da sensibilidade em

DISCUSSION

Usually, as regards nerve repair of peripheral nerves, a termino-terminal neurorrhaphy is the ideal process, presenting the best results, a fact agreed by most authors quoted in this study. However, as regards nerve injuries with loss of substance and suture under stress, various types of grafts may be used, either biological or non-biological. Among these, since the end of nineteenth century the most frequently used is the nerve allograft, which is then considered the gold standard⁽⁸⁾.

Although these grafts are widely employed, their functional results have shown to be inferior to those achieved with termino-terminal suture^(10,11,12), even after the development and use of microsurgical techniques⁽¹⁴⁾.

We used Wistar rats because they are biologically known and studied for a long time by the scientific community⁽⁴⁾.

Factors resulting from the sciatic nerve injury such as skin ulcers⁽⁷⁾, autophagia of the non-sensible parts⁽⁶⁾ and the difficulty in standing up on their hind legs in order to eat, besides the fact that this is a purely motor nerve, led us to employ the tibial nerve. An 8-mm long nerve graft was used, in accordance to the limit of 10 mm for tubular regeneration in rats^(6,9).

The method employed to study nerve regeneration consisted of retrograde labeling of neurons with a 3% FG[®] solution. Since this is a fluorescent tracer, it may be directly observed at the microscope through filters⁽⁶⁾.

Although the analysis of results (Table 3) showed certain differences in the cell counts in all animals, similar proportions were evidenced that agreed with results found in literature^(1,6,9), where some authors agree that the individuality of the animals will influence the count^(1,6).

Two statistical methods were used to define whether a significant difference would be found between the techniques employed. Such tests were: Student's t test and the signalized Wilcoxon test.

The neuronal count performed in the experimental group animals showed an average of 771 motoneurons (maximum 1,078, minimum 371) on the left side, and an average of 657.07 (maximum 931, minimum 342) on the right side; this means that, on the average, the right side presented 14.78% less motoneurons as compared with the left side (Table 3).

According to Sweet et al (1986), who used the retrograde HRP (horseradish peroxidase) staining method, the tibial nerve presented 982 ± 36 motoneurons, in agreement with the number observed in the control group (Table 1).

On the average, we found 20% less tibial nerve labeled motoneurons on the left side of the animals of the experimental group (in which neuronal labeling was performed proximal to the nerve graft) as compared with the control group.

This means that the number of cells had decreased due to an isolated nerve injury, with no technical interference on the part of the surgeon, showing a possible cell death. Therefore, this nerve will not be equal to that on the non-injured side (which is a normal tibial nerve), so after a neurorrhaphy the nerve will hardly recover its normal function. Altissimi et al⁽²⁾ analyzed the recovery of sensibility in digital nerves, when only 13% of patients returned to normal.

As regards the count of normal tibial nerve motoneurons (left arm of the control animal), a loss of approximately 35% was found

nervos digitais e apenas 13% dos pacientes chegaram ao normal.

No que se refere à contagem de motoneurônios do nervo tibial normal (perna esquerda do controle), comparada com a contagem realizada após o enxerto (perna esquerda do animal de experiência), observamos uma perda aproximada de 35%. Esta perda seria decorrente de 14,78% do próprio enxerto, somado à possível morte de motoneurônios (20%) ocasionada pela própria lesão.

Isso denota uma perspectiva ruim de regeneração nervosa após a utilização do enxerto nervoso. Mediante esses resultados por nós obtidos, parece-nos que o "Gold Standard" ainda não é ideal.

Fatores como tensão no sítio de sutura, tecido cicatricial e dois sítios de suturas podem ter influenciado o resultado da reparação nervosa^(10,11,12).

Talvez, o mais importante deste trabalho diz respeito aos 20% de morte neuronal observada após quatro meses da lesão, quando comparamos a contagem de neurônios marcados proximais ao enxerto com os neurônios marcados no grupo controle. Essa redução de número de neurônios associada às alterações topográficas de reinervação devem ser os responsáveis pelos maus resultados das neurorrafias, o que nos leva a propor a utilização de substâncias neurotróficas e neurotrópicas, com o objetivo de minimizar essa perda celular e reorientar os axônios.

CONCLUSÕES

Observou-se maior número de motoneurônios marcados em nervos tibiais, não submetidos a enxerto nervoso, expostos ao FG[®], quando comparados àqueles submetidos ao enxerto nervoso. Notou-se menor número de motoneurônios na medula espinhal, quando a exposição do nervo tibial ao FG[®] era feita distalmente ao enxerto nervoso. Essa diminuição de motoneurônios, quando a exposição do nervo tibial ao FG[®] era feita distalmente ao enxerto nervoso, mostra que o enxerto nervoso funciona como um bloqueio parcial para a migração dos axônios em regeneração.

as compared with the post-grafting count (left arm of the experimental animal). Such loss might be due to 14.78% of the graft, added to the possible death of motoneurons (20%) caused by the injury itself.

This indicates a poor perspective of nerve regeneration after the use of a nerve graft. Based on our findings, it seems to us that the gold standard is not yet the optimum standard.

Factors such as stress at the suture site, cicatricial tissue, and two suture sites may have influenced the result of the nerve repair^(10,11,12).

Maybe the most important aspect of this study is the percentage of neuronal death (20%) observed four months after the injury, if we make a comparison between the count of labeled neurons proximal to the graft and the labeled neurons in the control group. This reduction in the number of neurons, plus the topographical alterations in reinnervation must account for the poor neurographic results obtained, which led us to propose the use of neurotrophic and neurotropic substances, with the purpose of minimizing such cell loss and redirect the axons.

CONCLUSIONS

The number of tibial nerve labeled motoneurons that did not receive nerve grafts and were exposed to Fluoro-Gold[®] was higher as compared to those that did receive nerve grafts. The spinal cord showed less motoneurons when the tibial nerve was exposed to Fluoro-Gold[®] distal to the nerve graft. This reduction in the number of motoneurons, when the exposure of the tibial nerve to Fluoro-Gold[®] was performed distally to the nerve graft shows that the nerve graft acts like a partial blocking for the migration of regenerating axons.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldskogius H, Thomander L. Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles after facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain Res* 375:126-134, 1986.
2. Altissimi M, Mancini GB, Azzarà A. Results of primary repair of digital nerves. *J Hand Surg Br* 16:546-547, 1991.
3. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol* 33:87-134, 1989.
4. Greene EC. Anatomy of the rat. New York: Hafner, 1963. p. 370.
5. Kalomiri DE, Soucacos PN, Beris AE. Nerve grafting in peripheral nerve microsurgery of upper extremity. *Microsurgery* 15:506-511, 1994.
6. Leite VM. Estudo do comportamento das lesões altas do nervo ciático através da utilização de Fluoro-Gold e Horseradish Peroxidase como marcadores neuronais. [Livre Docência]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.
7. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 35:266-271, 1995.
8. Mackinnon SE, Dellon AL. Comparison of nerve regeneration across a sural nerve graft and a vascularized pseudosheath. *J Hand Surg Am* 13:935-942, 1988.
9. Madorsky SJ, Swett JE, Crumley RL. Motor versus sensory neuron regeneration through collagen tubules. *Plast Reconstr Surg* 102:430-436, 1998.
10. Millesi H. The interfascicular nerve grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am* 54:727-748, 1972.
11. Millesi H. Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar and radial nerves. *J Bone Joint Surg Am* 58:209-218, 1976.
12. Millesi, H. Forty-two years of peripheral nerve surgery. *Microsurgery* 14:228-233, 1993.
13. Omer GE. Injuries to nerves of the upper extremity. *J Bone Joint Surg Am* 56:1615-1624, 1974.
14. Smith JW. Microsurgery of nerves peripheral. *Plast Reconstr Surg* 33:317-329, 1964.
15. Sweet JE, Wikholm RP, Blanks RHI, Sweet A, Conley L. Motoneurons of rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 93:227-252, 1986.