

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

Rodrigo Fragoso de Andrade

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA EM ANIMAIS DESNUTRIDOS PRECOCEMENTE**

Recife, 2009

Rodrigo Fragoso de Andrade

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO NERVOSA
PERIFÉRICA EM ANIMAIS DESNUTRIDOS PRECOCEMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, área de concentração em Neurociências, pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Arruda de Moraes

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Recife, 2009

Andrade, Rodrigo Fragoso de
Avaliação morfométrica da regeneração nervosa
periférica em animais desnutridos precocemente /
Rodrigo Fragoso de Andrade. – Recife : O Autor, 2009.
64 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição protéica. 2. Regeneração nervosa
periférica. 3. Nervo ciático. I. Título.

616.8
616.8

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-067

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DO MESTRANDO RODRIGO FRAGOSO DE ANDRADE**

No dia 17 de fevereiro de 2009, às 9h, no Auditório do 2º andar do Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os Professores: Paloma Lys de Medeiros, Doutora Professora do Departamento de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco; Célia Maria Machado Barbosa de Castro, Doutora Professora do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco e Marcelo Moraes Valença, Doutor Professor do Departamento de Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram ao Mestrando RODRIGO FRAGOSO DE ANDRADE, sobre a sua Dissertação intitulada "**AValiação MORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO NERVOsa PERIFÉRICA EM ANIMAIS DESNUTRIDOS PRECOCEMENTE**". Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do Mostrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros

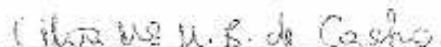
Profª. Drª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Aprovado
Aprovado
Aprovado


Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença
Presidente da Banca Examinadora


Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros


Profª. Drª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
REITOR**

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

COORDENADOR

Prof. Dr. Everton Botelho Sougey

CORPO DOCENTE

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Prof. Dr. Everton Botelho Sougey

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de oliveira

Prof. Dr. Luis Ataíde júnior

Profa. Dra. Maria Carolina Martins de Lima

Profa. Dra. Maria Lúcia Bustamantes Simas

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença

Prof. Dr. Murilo Duarte da Costa Lima

Prof. Dr. Othon Coelho Bastos Filho

Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Profa. Dra. Sheva Maria da Nóbrega

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

Prof. Dr. Wilson Farias da Silva

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos àqueles que me apoiaram e que me mostraram que as dificuldades aparecem para serem superadas, em especial aos meus pais Manoel Darcy e Lúcia Fragoso, e a minha noiva Carla Maciel, com muito carinho.

Agradecimentos Especiais

✍ À Deus pela vida e pela oportunidade de nascer e crescer em uma família tão especial e edificadora, além de todas as possibilidades que me permitirão amadurecer pessoal e profissionalmente;

✍ Aos meus queridos pais Manoel Darcy e Maria Lúcia Fragoso pro serem meus maiores exemplos de honestidade, companheirismo, responsabilidade, dedicação e amor. Agradeço também por todo apoio e incentivo em minha vida profissional, e por me ensinarem a acreditar e ter fé em nosso Deus grandioso;

✍ À minha noiva, amiga, confidente, incentivadora e amada Carla Maciel. Meu muito obrigado por todo apoio para a realização deste e de tantos outros trabalhos. Você foi e sempre será fundamental para meu crescimento. Te amo!

✍ Aos meus irmãos Lucian Fragoso e George Fragoso e suas respectivas esposas Fabiana Melo e Bárbara Lima, por todo incentivo, aprendizado e exemplo de garra e determinação;

✍ Aos meus queridos sobrinhos Lucian Filho e Maria Lúcia por toda alegria e amor sinceros de seus sorrisos e abraços;

✍ À minha orientadora Silvia Moraes, a quem carinhosamente chamamos de “mãe científica” por toda dedicação, profissionalismo e aprendizado, a quem tive o prazer e a oportunidade de iniciar na vida acadêmica. Você é um grande exemplo de profissional e de ser humano para todos nós;

✍ À minha co-orientadora Célia Castro por todo aprendizado, ensinamento, companheirismo e dedicação. Agradeço por me permitir e apresentar o maravilhoso mundo da pesquisa científica, onde a honestidade e a responsabilidade devem prevalecer sempre;

✍ Às minhas queridas amigas Ana Paula Regueira e Alice Bezerra. Vocês foram pessoas de extrema importância para a realização deste trabalho e grande exemplo de dedicação, respeito, amizade, simplicidade e profissionalismo. Aprendi muito com vocês. Meu muito obrigado por me ajudarem a superar as dificuldades encontradas ao longo destes dois anos;

✍ Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e de Microscopia Eletrônica do LIKA – UFPE por todo aprendizado e incentivo nas horas mais difíceis e pelas risadas nos momentos de alegria. Cada um de vocês tem uma contribuição em mais esta etapa vencida;

✍ Ao professor Marcelo Valença por todos os conhecimentos e técnicas ensinadas que foram essenciais para a concretização deste estudo;

✍ Aos amigos do Anexo de Anatomia. A amizade de vocês me fortaleceu para superar as dificuldades. Tenham certeza que vocês tiveram uma participação especial nesta etapa vencida;

✍ Aos veterinários Dr. França (Departamento de Nutrição – UFPE) e Dra. Adriana (Departamento de Cirurgia Experimental – UFPE) pelos conhecimentos prestados e pela ajuda concedida na realização deste estudo;

"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos;
Há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam.
Mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em nossa vida...
E que marcam para sempre..."

Cecília Meireles

Resumo

Avaliou-se a regeneração nervosa periférica, em animais adultos que foram submetidos à desnutrição protéica durante o período conhecido por janela crítica de desenvolvimento. Utilizamos 20 ratos machos, adultos, da linhagem *Wistar*. Durante o período de aleitamento, partes das mães receberam dieta hipoproteica (caseína 8%) formando o grupo de filhotes desnutridos (10 animais), enquanto outra parte recebeu dieta normoproteica (caseína 17%), formando o grupo de filhotes normonutridos (10 animais). Após este período, os animais foram alimentados com dieta padrão de biotério até o término do experimento, sem restrições de água e comida. A evolução ponderal foi registrada diariamente durante 21 dias de vida, e após este período registrada aos 30, 60, 90 e 210 dias. Aos 90 dias de vida, os animais (05 por grupo) foram pré-anestesiados com Atropina e anestesiados com solução de Cloridato de ketamina (50 mg) e de Xilasina a 2% (20 mg) (0,2 mL/100g). O nervo ciático foi seccionado aproximadamente 1 cm anteriormente à bifurcação dos nervos tibial posterior e fibular comum. Após a lesão, os fragmentos nervosos foram suturados, a um tubo de polietileno (10 mm) preenchido com solução salina e matrigel. De acordo com a presença ou não da lesão nervosa, os animais foram divididos nos grupos Nutrido Sem Lesão (GNSL), Nutrido Lesão (GNL), Desnutrido Sem Lesão (GDSL) e Desnutrido Lesão (GDL). Cento e vinte dias após a lesão nervosa foi coletado o tecido nervoso neoformado, fixado em solução Karnowsky por 24h a 4°C, pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio e processados para obtenção de cortes semi-finos (0,5µm), corados com azul de toluidina. Foram avaliadas a área de secção transversa do nervo ciático, a quantidade, densidade e o tipo de fibras nervosas mielínicas e o número total de vasos sanguíneos. A análise estatística foi realizada utilizando a média dos valores $\pm$ desvio-padrão e o teste T *Student* para dados paramétricos, e valores da mediana $\pm$ erro-padrão e teste Teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos, sendo $p < 0,05$. O peso corporal manteve-se reduzido a partir do 3º dia de vida e por todo o experimento no grupo desnutrido. Não foram observadas diferenças dos parâmetros analisados entre os grupos GNSL e GDSL. Observou-se um aumento na quantidade de vasos no GDL ($p = 0,0022$) em relação ao GNL. O grupo GNSL em relação ao GNL apresentou uma maior área de secção transversa ($p = 0,0002$), maior quantidade de fibras mielínicas ($p = 0,004$), menor densidade de fibras ($p=0,009$) e maior proporção de fibras de tamanho intermediário ($p < 0,05$), entretanto houve uma menor quantidade de vasos sanguíneos ($p = 0,01$). O GDL apresentou padrão regenerativo semelhante em relação ao GNL. Diante destes resultados, pode-se concluir que nos animais adultos, submetidos a desnutrição protéica durante o período de aleitamento, com posterior período de reposição nutricional, não houve alterações na estrutura do tecido nervoso periférico, assim como na resposta regenerativa diante da injúria deste tecido, após 120 dias de lesão.

Palavras-chave: Desnutrição protéica, nervo ciático, regeneração nervosa periférica.

Abstract

The study evaluated the peripheral nerve regeneration in adult animals that were submitted to protein malnutrition during the period known as the critical window of development. We used 20 male rats, adult, Wistar line. During the period of lactation, parts of the mothers received diet hypoproteic (casein 8%) forming the group of malnourished pups (10 animals), while another part has received normal diet (casein 17%), forming the group of nourished pups (10 animals) . After this period, the animals were fed with standard diet until the end of the experiment, without restrictions of water and food. The evolution of weight was recorded daily for 21 days, and after this period registered at 30, 60, 90 and 210 days. At 90 days, the animals (05 per group) were pre-anesthetized with atropine and anesthetized with a solution of chloride of ketamine (50 mg) and Xilasina to 2% (20 mg) (0.2 mL/100g). The sciatic nerve was cut about 1 cm above the bifurcation of the posterior tibial nerve and common fibular. After the injury, nerve fragments were sutured to a tube of polyethylene (10 mm) filled with saline and matrigel. According to the presence or absence of nerve injury, the animals were divided into groups Nourished Without Injury (GNSL), Nourishing Injuriated (GNL), Undernourished Without Injury (GDSL) and Undernourished injuriated (GDL). One hundred and twenty days after the nerve injury was collected the neoformed nervous tissue, fixed at Karnowsky solution for 24h at 4 ° C, post-fixed with solution of osmium tetroxide and processed to obtain semi-thin slices (0.5 nm), stained with toluidine blue,. We evaluated the cross-sectional area of the sciatic nerve, the quantity, type and density of nerve fibers myelin and the total number of blood vessels. Statistical analysis was performed using the average of the values $\pm$ standard deviation and Student T test for parametric data, and the median value $\pm$ standard error test and U test Mann-Whitney for non parametric data, and 0.05. Body weight remained low from the 3rd day of life and throughout the experiment in group malnourished. There were no differences of the parameters analyzed between groups GNSL and GDSL. There was an increase in the number of vessels in the GDL ($p = 0.0022$) compared to GNL. The group GNSL on the GNL showed greater cross-sectional area ($p = 0.0002$), increased amount of myelin fibers ($p = 0.0004$), lower fiber density ($p = 0.0009$) and greater proportion of fibers with intermediate size ($p < 0.05$), however there was a smaller amount of blood vessels ($p = 0.01$). The GDL showed regenerative similar pattern in relation to GNL. In light of these results, we can conclude that in adult animals subjected to protein malnutrition during the lactation, with subsequent period of nutritional replacement, no changes in the structure of the peripheral nervous tissue, and regenerative response in the face of this tissue injury, after 120 days of injury.

Keywords: Protein malnutrition, sciatic nerve, peripheral nerve regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Esquema dos principais eventos que ocorrem após a lesão nervosa total.	21
Figura 02. Procedimento cirúrgico para secção e reparo do nervo ciático.	28
Figura 03. Fotomicrografia da secção transversa do nervo ciático.	30
Figura 04. Evolução ponderal dos animais durante o período de aleitamento.	31
Figura 05. Evolução ponderal dos animais aos 30, 60, 90 e 210 dias de vida.	32
Figura 06. Número total de fibras nervosas mielínicas.	33
Figura 07. Área de secção transversa do nervo ciático.	34
Figura 08. Densidade de fibras nervosas mielínicas.	35
Figura 09. Fotomicrografia de fibras mielínicas do nervo ciático dos grupos experimentais.	35
Figura 10. Número total de vasos sanguíneos.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das fibras presentes no nervo ciático,
de acordo com seus diâmetros

36

LISTA DE SIGLAS

GN – Grupo Nutrido

GNSL – Grupo Nutrido Sem Lesão

GNL – Grupo Nutrido Lesão

GD – Grupo Desnutrido

GDSL – Grupo desnutrido Sem Lesão

GDL – Grupo Desnutrido Lesão

NGF – Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento Neural)

BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator de Crescimento Derivado do Cérebro)

NT-3 – Neurotrophina – 3 (Neurotrofina – 3)

CNF – Ciliary Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Ciliar)

GDNF – Glial Derived Neurotrophic Factor (Fator de Crescimento Derivado da Glia)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

VEGF – Vascular Growth Endothelial Factor (Fator Endotelial de Crescimento Vascular)

IGF – Insulin – like Growth Factor (Fator de Crescimento associado à Insulina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. HIPÓTESE	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.2 Específicos	18
4. REVISÃO DA LITERATURA	19
4.1 Lesão nervosa periférica	19
4.2 Processo regenerativo após injúria nervosa periférica	20
4.3 Técnica de tubulização	22
4.4 Interação desnutrição <i>versus</i> tecido nervoso periférico	23
5. METODOLOGIA	26
5.1 Animais	26
5.2 Manipulação nutricional	27
5.3 Procedimento Cirúrgico	28
5.4 Coleta do Material e Processamento Histológico	28
5.5 Análise histomorfométrica	29
5.6 Aspectos Éticos	30
5.7 Análise estatística	30
6. RESULTADOS	31
6.1 Evolução ponderal	31
6.2 Número total de fibras nervosas mielínicas	32
6.3 Área de secção transversa do nervo ciático	33
6.4 Densidade de fibras nervosas mielinizadas	34
6.5 Classificação das fibras mielínicas	36
6.6 Quantificação dos vasos sanguíneos	36
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÕES	50
9. PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	52
FONTES CONSULTADAS	52
ANEXOS	
Anexo A – Composição da dieta dos animais	62
Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa animal	63

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos uma atenção especial tem sido dada na tentativa de se reverter ou minimizar as consequências morfofuncionais provocadas pelas lesões do nervo periférico. Estas lesões em geral, são decorrentes de algum trauma físico ou processo degenerativo que acomete a estrutura do nervo (MEEK, DIJKSTRA, DEN DUNNEN *et al.*, 1999; ÖGÜN, ÖZDEMİR, SENARAN *et al.*, 2003; DE SÁ, MAZZER, BARBIERI *et al.*, 2004; KINGHAM e TERENCEHI, 2006; LUNDBORG e ROSE, 2007) e dependendo do grau de acometimento que o nervo seja exposto, a recuperação apresenta maior probabilidade de falhar (MAGGI, LOWE e MACKINNON, 2003).

Após a injúria nervosa periférica, uma série de eventos fundamentais para o processo regenerativo se inicia no corpo celular, no axônio proximal e no axônio distal. No corpo celular há a cromatólise além do processo denominado reação neuronal enquanto que no coto proximal, células de Schwann juntamente com macrófagos promovem a degradação axonal próxima à lesão. No segmento distal, há um processo degenerativo conhecido por Degeneração Walleriana, onde células de Schwann fagocitam fragmentos axonais e de bainha de mielina, além de liberar fatores quimiotáticos para atração de células inflamatórias, em especial o macrófago (PEARSE, PEREIRA, MARCILLO *et al.*, 2002; BURNET e ZAGER, 2004).

O processo regenerativo se inicia logo após a ocorrência da lesão. No corpo celular, enzimas regenerativas são liberadas em direção ao sítio da lesão, ao passo que as células de Schwann, no axônio, além de promover um suporte estrutural para a regeneração, liberam fatores que vão auxiliar o crescimento axonal em direção ao coto distal, conhecidas por fatores neurotróficos (ABERNETHY, RUDE e THOMAS, 1992; BARBACID, 1995; CHEN, COHEN e HALLETT, 2002).

Visando uma recuperação de forma mais eficaz, várias tecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de auxiliar o sistema nervoso periférico neste processo de regeneração. Dentre elas a técnica de tubulização, onde o coto proximal e o distal encontram-se unidos por um tubo guia, tem demonstrado benefícios para pacientes com lesão nervosa periférica (SCHMIDT e LEACH, 2003; GAMA, MATTAR JR, DA SILVA *et al.*, 2000).

Entretanto, alguns fatores interferem neste processo regenerativo, dentre eles a idade do indivíduo, a proximidade do local da lesão em relação ao corpo celular, o micro-ambiente no qual o nervo esteja inserido, além da ação eficaz dos mecanismos regenerativos (VERDÚ, BUTI e NAVARRO, 1995; HESS, BRENNER, MYCKATYN *et al.*, 2006).

Alguns fatores podem afetar drasticamente a composição das estruturas orgânicas. Dentre eles se destaca a desnutrição a qual se caracteriza por um estado de deficiência nutricional relacionada à falta de vários componentes como proteínas, carboidratos e vitaminas. Esta falta de nutrientes provoca severas conseqüências para a formação e o desenvolvimento de órgãos e sistemas, dentre eles o sistema nervoso (NUNES, BATISTA, MICHELI *et al.*, 2002; PALMER, PRINTZ, BYUTLER, *et al.*, 2004; ALMEIDA, SILVEIRAM, GUEDES *et al.*, 2005; BARROS, MANHÃES-DE-CASTRO, DE-SOUZA, 2006; TATLIA, GUZELA, KIZILB *et al.*, 2007).

No sistema nervoso periférico, em humanos, o período no qual ocorre a maior quantidade de eventos celulares responsáveis pela formação, principalmente mielinização, ocorre durante os primeiros anos pós-natais. Esta fase é conhecida por janela crítica de desenvolvimento. Em animais, mais especificamente em ratos – modelo experimental mais utilizado – este período compreende aos primeiros 21 dias de vidas pós-natais, correspondentes ao período de aleitamento (BARROS, MANHÃES-DE-CASTRO, DE-SOUZA, 2006; MORGANE, MILLER, KEMPER *et al.*, 1978).

Estudos têm demonstrado danos ao tecido nervoso periférico quando submetido a um processo de desnutrição protéica e protéico-calórica em fases precoces do desenvolvimento do organismo. Além de alterações estruturais como diminuição na espessura e na organização da bainha de mielina das fibras nervosas (DELANEY, SAMORAJSKI, FULLER *et al.*, 1981; OLDFORS e PERSSON, 1982; CORNBLATH e BROWN, 1988; ALMEIDA, SILVEIRAM, GUEDES *et al.*, 2005), podem ser identificadas também alterações na velocidade de condução nervosa (OLDFORS e ULLMAN, 1980; OLDFORS e PERSSON, 1982; DA-SILVA, COSTA F, COSTA J *et al.*, 1987; RANA, CHOPRA, MEHTA *et al.*, 1991; VARGAS V, VARGAS R, MARQUEZ *et al.*, 2000; SEGURA, GUADARRAMA, PRATZ *et al.*, 2004).

O modo pelo qual o processo de regeneração nervosa periférica ocorre após uma lesão no sistema nervoso periférico, em indivíduos que sofreram desnutrição precoce e posterior reposição nutricional ainda não foi esclarecido, tornando-se pertinente a investigação desse tema.

Sendo a desnutrição ainda uma morbidade bastante presente nos países em desenvolvimento, esses estudos poderão fornecer informações importantes acerca da ação do processo regenerativo sobre o tecido nervoso periférico injuriado por deficiência nutricional durante seu desenvolvimento, além de produzir resultados proveitosos que sem dúvida contribuirão para estratégias de reabilitação nervosa morfofuncional.

2. Hipótese

A capacidade de regeneração nervosa em animais que sofreram desnutrição protéica durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso periférico e, posteriormente, foram submetidos à lesão total do nervo ciático na fase adulta, poderia estar comprometida, não permitindo uma reestruturação morfológica do tecido nervoso periférico regenerado semelhante à estruturação nervosa dos ratos eutróficos.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a capacidade de regeneração do tecido nervoso periférico, em animais adultos que foram submetidos à desnutrição protéica (com caseína 8%) durante o período conhecido por janela crítica de desenvolvimento.

3.2 Específicos

- Determinar o número e a densidade de fibras mielínicas do nervo ciático;
- Quantificar o número de vasos sanguíneos presentes no nervo ciático;
- Determinar a área de secção transversa do nervo ciático;
- Classificar as fibras mielínicas quanto ao diâmetro.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Lesão nervosa periférica

Lesões Nervosas Periféricas afetam a capacidade de transmissão do estímulo pelos nervos periféricos, causando prejuízos motores, sensitivos e autonômicos, os quais podem estar associados a déficits funcionais transitórios ou permanentes (BELKAS, SHOICHET e MIDHA 2004). Estas lesões podem ser causadas por um estiramento excessivo, onde a força de tração supera a extensibilidade do nervo; por compressão ou por isquemia, nas quais há alteração reversível na condução nervosa; e por laceração, onde se encontra lesão total ou parcial do nervo (BURNETT e ZAGER, 2004).

Estas injúrias, de acordo com sua severidade, podem ser classificadas de modo geral, em: neuropraxia (é a mais leve de todas, não envolvendo perda da continuidade nervosa, porém com alteração funcional transitória); axonotmese (quando há completa interrupção do axônio e mielina circundante, porém com epineuro e perineuro preservados); e neurotmese (ocorre ruptura total do nervo, com completa perda funcional) (BURNETT e ZAGER, 2004).

Em consequência da injúria nervosa periférica, uma complexa e finamente regulada sequência de eventos começa a ocorrer no tecido lesado. Este processo inclui alterações no corpo celular, no axônio proximal e no axônio distal, modificações estas que dão suporte para o desenvolvimento do processo regenerativo (MAGGI, LOWE e MACKINNON, 2003; FLORES, LAVERNIA e OWENS, 2000).

As alterações que ocorrem no corpo celular e na fibra nervosa proximal dependem da severidade da injúria, bem como da proximidade do segmento injuriado do corpo celular, onde quanto mais próximo do corpo celular for à injúria, maiores serão os danos. No segmento proximal, células de Schwann degradam o axônio e a mielina próximos à área da lesão, os quais se tornam reduzidos em tamanho. Esta degradação proximal pode ser mínima ou atingir todo o axônio em direção ao corpo celular (BURNETT e ZAGER, 2004). No corpo celular há uma série de eventos conhecidos por reação neuronal onde ocorre o deslocamento do núcleo em direção a periferia do corpo celular e a retração dos dendritos, além da

cromatólise neural que compreende a liberação de polirribossomos e ribonucleotídeos no citoplasma, os quais se encontravam aderidos ao retículo endoplasmático rugoso (NAVARRO, VIVÓ e VALERO-CABRÉ, 2007). Um aumento no volume celular pode estar presente em decorrência do aumento na produção de RNA e de enzimas regenerativas, que se iniciam, de maneira geral, quatro dias após a injúria (DUCKER e KAUFFMAN, 1977).

No fragmento nervoso distal à lesão, ocorre um processo conhecido como degeneração Walleriana. Neste processo há a degradação do citoesqueleto, seguida da dissolução da membrana celular e degradação da mielina (SCHMIDT e LEACH, 2003). Esses eventos permitem a retirada de fatores inibitórios da regeneração associados à mielina, principalmente glicoproteínas associadas à mesma (GUERTIN, ZHANG, MAK *et al.*, 2005). As células de Schwann desnervadas sofrem alterações fenotípicas e são capazes de fagocitar fragmentos de axônio e de mielina, porém esta capacidade é limitada, sendo necessária a liberação de fatores, como citocinas, que irão atrair os principais agentes fagocitários - macrófagos - para o local da lesão. Se um processo de regeneração não ocorrer, este coto terminal pode tornar-se uma massa edemaciada composta de células de Schwann, capilares, fibroblastos, macrófagos e fibras de colágeno (TOFARIS, PATTERSON, JESSEN, *et al.*, 2002).

4.2 Processo regenerativo após injúria nervosa periférica

Após as alterações em decorrência da lesão no nervo periférico, um complexo processo regenerativo se inicia no local da lesão, podendo durar de meses a anos para acontecer por completo (BURNET e ZAGER, 2004). O início da regeneração neural ocorre a partir da degeneração Walleriana que cria um microambiente favorável ao crescimento axonal, onde as células de Schwann alinham-se dentro do tubo neural para formar uma estrutura denominada banda de Büngner que promove o suporte para o alongamento axonal (NAVARRO, VIVÓ E VALERO-CABRÉ, 2007) (Fig. 01).

Fibras mielinizadas e não mielinizadas brotam espontaneamente a partir dos Nodos de Ranvier do axônio proximal a lesão, em direção ao axônio distal

formando a unidade regenerativa que é rodeada por lâmina basal comum (MORRIS, HUDSON e WEDDEL, 1972).

De acordo com Makwana e Raivich (2005), o crescimento axonal requer uma quantidade adequada de fatores tópicos (locais) e tróficos, liberados pela célula de Schwann reativa e pela matrix extracelular dentro do coto distal degenerado. Como importantes moléculas presentes no local da lesão destacam-se as proteínas da matriz extracelular (principalmente colágeno, laminina e fibronectina) e moléculas de adesão celular (molécula de adesão da célula neural) (SECKEL, 1990).

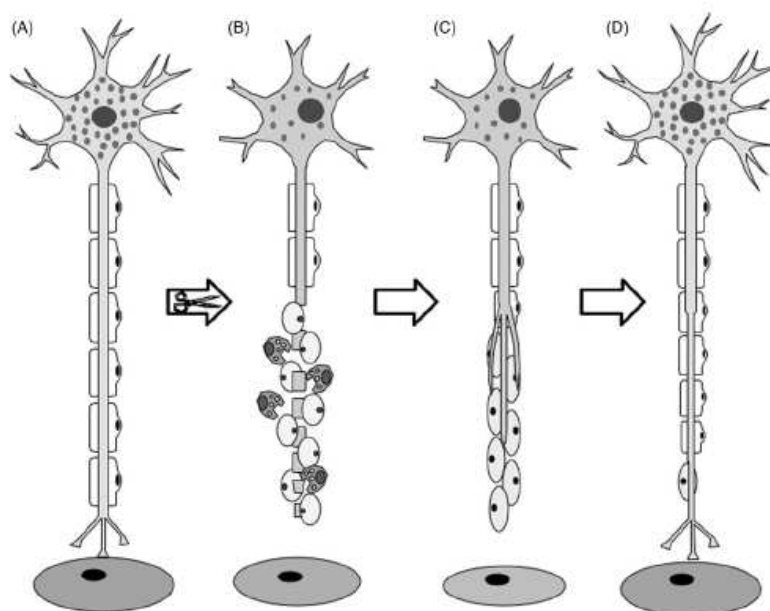


Figura 1. Esquematização dos principais eventos que ocorrem após a lesão nervosa total. (A) Fibra nervosa normal em contato com seu órgão alvo. (B) Reações neurais decorrentes de lesão nervosa total, onde no axônio pode ser identificada a degeneração Walleriana, através da presença de macrófagos e células de Schwann e no corpo celular há a cromatólise e a reação neural. (C) Início do processo regenerativo, onde células de Schwann podem ser identificadas dando suporte ao crescimento axonal – bandas de Büngner. (D) Reconexão do axônio com seu órgão alvo e maturação da fibra nervosa. Fonte: NAVARRO, VIVÓ e VALERO-CABRÉ, 2007.

Estudos destacam a ação de fatores neurotróficos na manutenção e sobrevivência dos neurônios e na promoção da regeneração axonal após lesão nervosa, já que quando se unem com receptores específicos, ativam importante sinalização e ativação intracelular (TERENGUI, 1999, MARKUS, PATEL e SNIDER, 2002; BELKAS, SHOICHET e MIDHA, 2004). Após a lesão neural, estes fatores são liberados de forma autócrina ou parácrina, e os principais

envolvidos na regeneração axonal são: Fator de Crescimento Neural (Nerve Growth Factor - NGF), Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF), Neurotrofina 3 (NT-3), Fator Neurotrófico Ciliar (Ciliary Neurotrophic Factor – CNF), Fator de Crescimento de Fibroblasto (Fibroblast Growth Factor – FGF) e o Fator Neurotrófico derivado de Células da Glia (Glial cell line-derived Neurotrophic Factor – GDNF) (NAVARRO, VIVÓ e VALERO-CABRÉ, 2007).

4.3 Técnica de tubulização

Uma especial atenção tem sido dada para o estudo de meios que proporcionem um auxílio na capacidade regenerativa do tecido nervoso, principalmente em situações em que este processo apresenta grandes chances de falhar. Segundo Hall (1989), a reparação tem mais chance de ocorrer quando a lesão se dá por esmagamento ou por secção nervosa quando existe um curto espaço (até 0,5 cm) entre as extremidades dos cotos, e mais facilmente de fracassar quando o espaço entre os cotos torna-se maior que 1 cm.

Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido propostas para se tentar reverter a lesão, podendo ser classificadas em duas categorias: as que incluem as neurorrafias término-terminais; e as que incluem os autoenxertos e as técnicas de tubulização (SANDERS, 1942; BRAGA-SILVA, GEHLEN, ROMAN *et al.*, 2006; CHEN, OU, LIAO *et al.*, 2007). A utilização das neurorrafias término-terminais, além de favorecer um tracionamento no local da sutura, pode não promover uma exata aproximação do tubo endoneural do coto proximal com o coto distal, alterando a recuperação funcional da lesão (SCHMIDT e LEACH, 2003).

O uso do auto-enxerto apresenta a vantagem do fragmento a ser enxertado conter células de Schwann e lâmina basal do tubo endoneural, que favorece a liberação de fatores neurotróficos, auxiliando na regeneração axonal, além de ser um material natural, com menores possibilidades de rejeição (BELKAS, SHOICHET e MIDHA, 2004). Porém algumas desvantagens existem no uso do autoenxerto, dentre elas assim como na neurorafia término-terminal, a dificuldade em promover um correto alinhamento dos tubos endoneurais; a obtenção de um nervo doador promove uma nova lesão nervosa em outro local, tendo como

conseqüência a formação de tecido cicatricial e dor neuropática; além da necessidade de ajustar o comprimento e o diâmetro do nervo doador com o receptor (MACKINNON e HUDSON, 1992).

Estratégias de bioengenharia para o Sistema Nervoso Periférico têm focado o desenvolvimento de tratamentos alternativos para o enxerto nervoso (exemplo, canais de orientação nervosa ou técnica de tubulização), especialmente para maiores lesões, com o objetivo de promover um aumento na recuperação e nos resultados funcionais (SCHMIDT e LEACH, 2003). O uso de canais de tubo guia, suturados entre os cotos neurais proximal e distal tem sido bastante utilizado por não haver a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para coleta de material, além de obter melhores resultados regenerativos (SECKEL, 1990). Outros benefícios atribuídos a técnica de tubulização é que os tubos utilizados orientam os axônios em crescimento em direção ao coto distal, além de minimizar a infiltração de tecido cicatricial fibroso, que poderia atrapalhar no processo regenerativo, ao passo que pode maximizar o acúmulo de fatores neurotróficos produzidos pelos cotos neurais, importantes no processo regenerativo (LUNDBORG, 1988).

Mesmo diante de esse avanço tecnológico, a resposta regenerativa eficaz vai depender de vários fatores, entre eles a idade, o tempo decorrido da lesão, a proximidade da lesão em relação ao corpo celular, a técnica de reparo, além da presença de um microambiente adequado (VERDÚ, BUTÍ e NAVARRO, 1995; BELKAS, SHOICHET e MIDHA, 2004; NAVARRO, VIVÓ e VALERO-CABRÉ, 2007).

4.4 Interação desnutrição e tecido nervoso periférico

Uma das possíveis formas de alterar a composição deste microambiente é através da agressão nutricional (OLDFORS, 1981). A desnutrição é um processo caracterizado por um desequilíbrio e/ou uma deficiência de nutrientes no organismo, freqüentemente produzida pela deficiência relativa de proteínas, carboidratos e gorduras como fontes de energia e micronutrientes, sendo reconhecidamente um grave problema mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Quando incide em crianças, ela constitui um problema de saúde pública, ocorrendo isoladamente ou associada a outros fatores que aumentam a

morbidade e a mortalidade (DUNCAN, BROOKS-GUNN e KLEBANOS, 1994). Essas deficiências são seguidas de alterações fisiopatológicas que primeiro traduzem-se em prejuízo funcional e, posteriormente, em danos bioquímicos e físicos (GURMINI, CECÍLIO, SCHULER *et al.*, 2005).

De acordo com Morgane, Miller, Kemper *et al.*, (1978), a má-nutrição é um fator não-genético que interfere no processo de desenvolvimento. No que se refere ao sistema nervoso central, a deficiência nutricional no início da vida é mais grave, principalmente porque nesta fase o crescimento e o desenvolvimento desse sistema estão ocorrendo com grande intensidade, através dos processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização. Durante este período, a rápida velocidade de eventos celulares induz a um aumento na vulnerabilidade do sistema nervoso (NOBACK, EISEMANN 1981). O aumento na vulnerabilidade do sistema nervoso neste período recente, e a possibilidade de repercussões permanentes na função do SN originadas destas adversidades, dão a este período o nome de período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso (BARROS, MANHÃES-DE-CASTRO, DE-SOUZA *et al.*, 2006).

De acordo com Dobbing (1971) este período crítico de desenvolvimento ocorre nos homens poucos meses antes (último trimestre de gestação) e após o nascimento (3 a 4 anos), da mesma forma que a mielinização do nervo periférico ocorre pré e pós-natal. Porém, nos ratos, que são os animais comumente utilizados em estudos experimentais, o rápido crescimento cerebral e a rápida mielinização do nervo periférico ocorrem nos primeiros 21 dias de vida, correspondendo à fase de aleitamento (DOBBING; SANDS, 1971; MORGANE, MILLER, KEMPER *et al.*, 1978).

Segundo Silva e Almeida (2006) uma série de alterações somáticas e neurais ocorre devido a uma deprivação alimentar, principalmente protéica, em períodos precoces da vida. Entre as alterações estruturais, as principais se referem à redução do peso corpóreo, menor número e tamanho de células cerebrais, assim como alterações na ramificação dendrítica e na camada de mielina dos neurônios (MORGANE, MILLER, KEMPER *et al.*, 1978). Do ponto de vista funcional, a desnutrição influencia aspectos como a emoção, a motivação e a ansiedade, além de alterar processos envolvidos na memória, na linguagem e na aprendizagem (LEVITSKY e STRUPP, 1995). Quanto às alterações neuroquímicas, ocorre

alteração no nível de neurotransmissores e de receptores serotoninérgico, dopaminérgico, gabaérgico e colinérgico, além de prejuízos na plasticidade sináptica (ALMEIDA, TONKISS e GALLER, 1996). Uma das possíveis explicações para este acometimento é que a síntese de proteínas estruturais, o crescimento, a organização funcional e a produção de neurotransmissores cerebrais dependem da disponibilidade de aminoácidos essenciais contidos nas proteínas da dieta (MORGANE, MILLER, KEMPER *et al.*, 1978)

Semelhantemente ao sistema nervoso central, alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais estão presentes no sistema nervoso periférico (SNP) em decorrência da desnutrição no período crítico de desenvolvimento promovendo desmielinização segmental, degeneração axonal, além da redução na quantidade de lipídeos na síntese da mielina. Estudos experimentais com ratos submetidos a processo de desnutrição precoce e posteriormente reabilitados do ponto de vista nutricional demonstraram resultados controversos quanto à ocorrência de recuperação de estruturas do SNC e SNP previamente danificadas (NUNES, BATISTA, MICHELI *et al.*, 2002). Oldfors e Sourander (1977) observaram que o comportamento do sistema nervoso diante de uma recuperação nutricional não ocorreu de forma homogênea, já que o calibre das fibras do cordão espinhal, assim como das fibras motoras do trato piramidal foi recuperado, porém, esta recuperação não se mostrou tão evidente nas fibras do nervo óptico. Por outro lado, Oldfors (1981) verificou que a velocidade de condução nervosa, que frequentemente torna-se reduzida em quase 50% nos ratos desnutridos, atingiu a normalidade ou quase normalidade após algumas semanas de reposição nutricional.

Essas divergências de dados da literatura a respeito das características agressoras da desnutrição precoce em relação às estruturas do tecido nervoso central e periférico podem ser decorrentes de diferentes tipos de dietas e épocas de análise das possíveis consequências.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados 20 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério de origem em gaiolas plásticas de propileno (49x34x16cm), com temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro, com luzes acesas no período das 6 às 18 h, e água e ração *ad libitum*.

5.2 Manipulação nutricional

Para formação dos grupos experimentais, durante o período de aleitamento (21 primeiros dias de vida), partes das mães receberam dieta hipoproteica (caseína 8% Roshter ®-Brasil) formando o grupo de filhotes desnutridos (10 animais), enquanto outra parte recebeu dieta normoproteica (caseína 17% Roshter ®-Brasil), formando o grupo de filhotes nutridos (10 animais) (Anexo B). Após este período, os animais foram separados de suas mães e alimentados com dieta padrão de biotério (Labina-Purina do Brasil S/A) durante todo o prosseguimento do estudo (Anexo B). Durante o período de aleitamento, foi padronizado o número de seis filhotes/mãe, já que de acordo com Passos, Ramos, Teixeira *et al.*, (2001), esta proporção promove uma maior performance lactacional. Após este período, este número passou a ser de três animais por gaiola.

Para a obtenção da evolução ponderal, o peso corporal dos animais foi registrado diariamente nos primeiros 21 dias de vida, sendo após este período registrado aos 30, 60, 90 (sendo esta última a data de realização do procedimento cirúrgico inicial) e 210 dias (data de coleta do material biológico em estudo). Para tal análise foi utilizada balança digital (FILIZOLA, modelo MS-3, com capacidade para 3 Kg e sensibilidade de 0,5g).

5.3 Procedimento Cirúrgico

Inicialmente os animais (5 por grupo nutricional) foram pré-anestesiados com Atropina (0,044 mg/Kg de peso) diluída em água para injeção, fazendo uma dose de 0,16 mL/100g do peso corporal do rato, por via intramuscular 10 minutos antes da administração do anestésico. Em seguida foram anestesiados com uma mistura de 1 mL de Cloridato de ketamina (50 mg) e 1 mL de Xilasina a 2% (20 mg), dessa mistura obtendo-se uma dose de 0,2 mL/100g de peso corpóreo dos animais injetados por via intramuscular (MASSONE, 1988). Após a anestesia, foi realizada tricotomia e assepsia com solução digermante das regiões glútea e posterior da pata direita (figura 2-A). De acordo com a metodologia sugerida por Braga-Silva, Gehlen, Roman *et al.*, (2006), foi realizada a incisão na região acima referida, tomando por referência a crista ilíaca direita. Após a incisão, os músculos glúteos e isquiotibiais foram disjuncionados, expondo o nervo ciático (Figura 2-B). O nervo ciático foi seccionado aproximadamente 1 cm anteriormente à bifurcação dos nervos tibial posterior e fibular comum (Figura 2-C). Após a lesão, os fragmentos nervosos foram suturados, com fio de sutura 7-0, a um tubo estéril e flexível de poliestireno, com comprimento de 10 mm, preenchido com solução salina e matrigel (MatrigelTM BD Bioscience), que serviu como ponte entre os dois fragmentos, formando um espaço de suporte para o crescimento do tecido nervoso regenerado (Figura 1-D). Em seguida foi realizada a sutura da camada muscular e da pele.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam doses de analgésico (dipirona sódica – 0,1 mL/100g de peso) e de antibiótico (cefalotina sódica - 0,1 mL/100g de peso), ambos por via intra-muscular e foram mantidos em número de 3 animais por gaiola, até completados 120 dias após a cirurgia – data de coleta do material a ser analisado.

De acordo com a presença ou não da lesão nervosa, os animais foram divididos nos seguintes subgrupos: Grupo Nutrido Sem Lesão (GNSL), Grupo Nutrido Lesão (GNL), Grupo Desnutrido Sem Lesão (GDSDL) e Grupo Desnutrido Lesão (GDL). Todos os grupos contendo 5 animais cada.

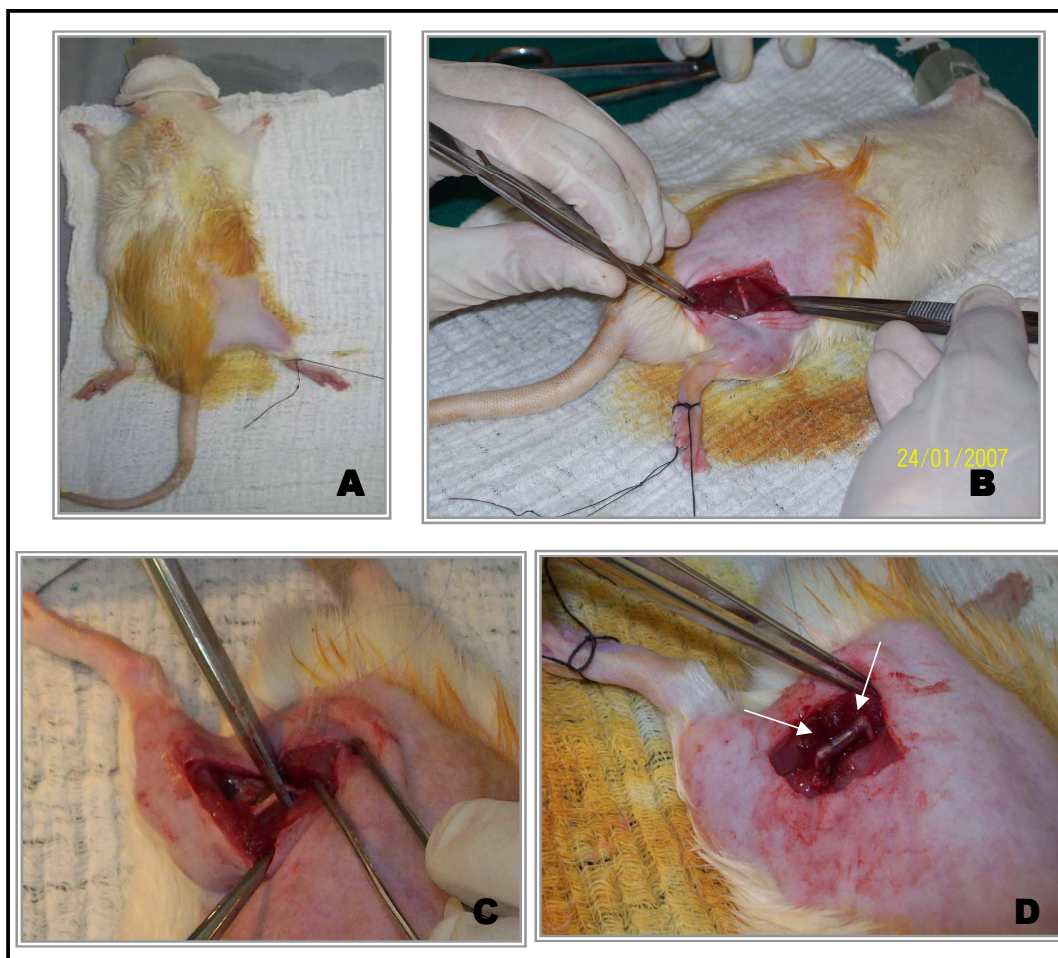


Figura 02. Procedimento cirúrgico para secção e reparo do nervo ciático. Tricotomia e assepsia local (A); Exposição do nervo ciático (B); Secção do nervo (C); e Colocação do tubo de poliestireno unindo os fragmentos nervosos (*setas*) (D).

5.4 Coleta do Material e Processamento Histológico

Quatro meses após a lesão nervosa inicial e posterior implante do tubo de poliestileno, um novo procedimento cirúrgico foi realizado, seguindo as mesmas orientações para pré-anestesia e anestesia que o primeiro procedimento.

Após a exposição do nervo ciático, uma pré-fixação foi realizada com solução Karnowsky (solução de 2,5% de glutaldeído, 4% de paraformaldeído e 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH=7,4), através de gotejamento de 1 mL desta solução no nervo ciático *in situ*. O tecido nervoso neoformado presente na região central do tubo foi coletado e encaminhado para processamento histológico. Após a coleta do material, os animais foram eutanasiados com injeção intracardíaca de cloreto de potássio (1 mL/animal).

Para o processamento histológico dos cortes semi-finos, foi utilizada a técnica sugerida por Chen, Ou, Liao *et al.*, (2007). Os fragmentos nervosos foram fixados em solução Karnowsky por 24h a 4°C. Após este procedimento, os fragmentos foram lavados com solução aquosa de tampão cacodilato de sódio e pós-fixados com solução contendo 1% tetróxido de ósmio por 1 hora e 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado em concentrações crescentes de solução aquosa de acetona, (50%, 70%, 90% e 100%), sendo embebido em resina Epon 812 (Polysciences®). Para a realização dos cortes semi-finos nos fragmentos de nervo ciático emblocados, foi utilizado o ultramicrotomo (ULTRACUP, LEICA), onde foram realizados cortes transversais com espessura de 0,5 µm. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina (1%), corante específico para estruturas ricas em lipídios, como a bainha de mielina.

5.5 Análise Histomorfométrica

Para quantificação das fibras nervosas mielínicas e dos vasos sanguíneos, utilizou-se o microscópio óptico (Olympus – BX50), objetiva de 40x – aumento de 400X, conectado a uma vídeo-câmera (Samsung – SHC-410 NAD) e o software TV Tuner Application. Através das imagens capturadas (figura 03), foi possível realizar a quantificação total dos vasos sanguíneos por varredura total do campo microscópico na própria tela do computador, enquanto que para a quantificação do número de fibras mielínicas foi utilizado o programa Mesurim Pro 08 (disponível gratuitamente na internet). Para as duas análises, utilizou-se todos os campos microscópicos obtidos a partir do corte semi-fino do fragmento de nervo ciático.

Para análise do diâmetro das fibras nervosas mielinizadas e da área total ocupada pelas fibras, utilizou-se o programa Scion Image for Windows (Beta 4.0.2). As fibras pequenas apresentavam diâmetro entre 1-5 µm, as fibras intermediárias diâmetro entre 6-9 µm e as fibras grandes diâmetro superior a 10 µm de acordo com a metodologia estabelecida por CHOPRA, DHAND, MEHTA *et al.*, (1986). Para o cálculo da densidade das fibras utilizou-se a relação entre o número de fibras mielinizadas e a área total ocupada pelas fibras (mm²) (ENDO, 2002). Para a análise dos diâmetros das fibras nervosas mielínicas, foram escolhidas

randomicamente, 5 imagens de campos histológicos por cada animal, onde todas as fibras presentes nestas imagens foram analisadas.

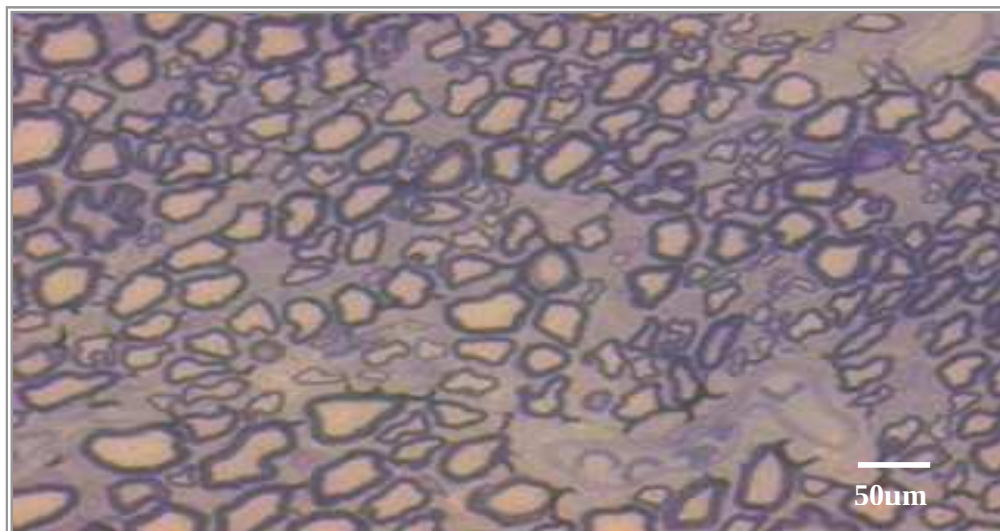


Figura 03. Fotomicrografia da secção transversa do nervo ciático. Utilizada para a análise histomorfométrica, onde o corte semi-fino (0.5µm) foi corado com azul de toluidina.

5.6. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo 004721/2007-95), estando de acordo com as normas internacionais estabelecida pelo National Intitute of Health Guide for care and use of Laboratory Animals (Anexo B).

5.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados encontrados, utilizou-se o programa Bioestat 5.0 (disponível gratuitamente na internet), onde o Teste-t Student foi usado para os valores paramétricos, enquanto que, para os valores não paramétricos, foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney. Os Resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão (paramétricos) e em mediana $\pm$ erro-padrão (não-paramétricos), utilizando 95% como nível de significância.

6. RESULTADOS

6.1 Evolução ponderal

A análise do peso corporal foi utilizada como parâmetro para identificação do estado nutricional dos animais. O registro diário do peso corpóreo dos animais demonstrou que nos primeiros dois dias de nascido, não houve diferença entre o peso dos grupos nutricionais. Porém, a partir do terceiro dia pós-natal, os animais nutridos (GN) apresentaram valores médios de peso corpóreo maior que o grupo de animais desnutridos (GD) ($9,15 \pm 1,39$ e $8,15 \pm 0,62$ respectivamente, sendo $p < 0,02$), perdurando por todo período de aleitamento, ou seja, até o 21º dia de vida ($GD = 34,7 \pm 4,6$ e $GN = 58,05 \pm 4,02$, com $p < 0,0001$) (Figura 04).

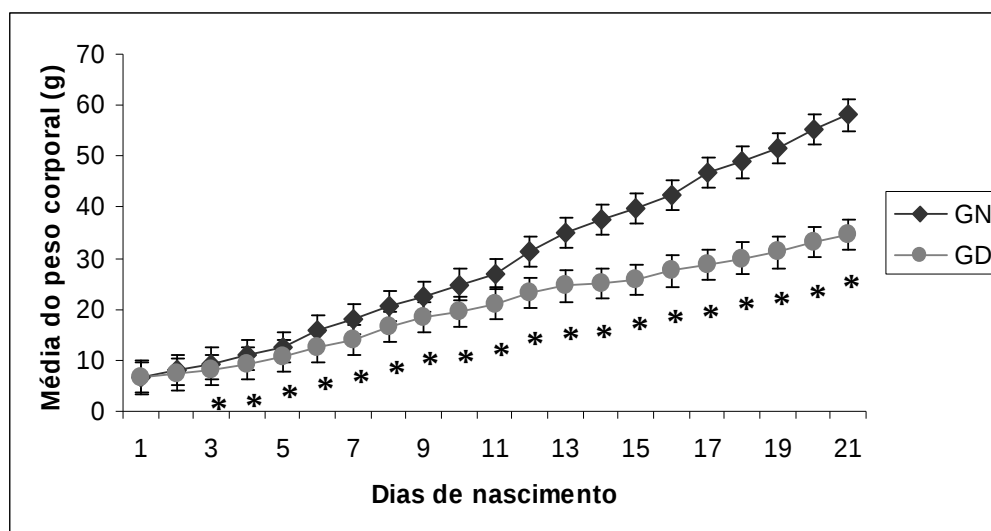


Figura 04. Evolução ponderal dos animais durante o período de aleitamento. Expressa em valores médios $\pm$ desvio-padrão, sendo GN – Grupo Nutrido e GD – Grupo Desnutrido * $p \leq 0,02$ (Teste T-Student).

Após o desmame, o peso corporal dos animais desnutridos se manteve menor aos 30 ($GN = 102,35 \pm 10,2$ e $GD = 79,7 \pm 7,77$), 60 ($GN = 291,35 \pm 27,2$ e $GD = 240 \pm 18,7$), 90 ($GN = 385,6 \pm 11,45$ e $GD = 308,7 \pm 21,7$) e 210 dias ($GN = 510,1 \pm 21,87$ e $GD = 415,2 \pm 18,12$), ($p \leq 0,0001$), (Figura 05).

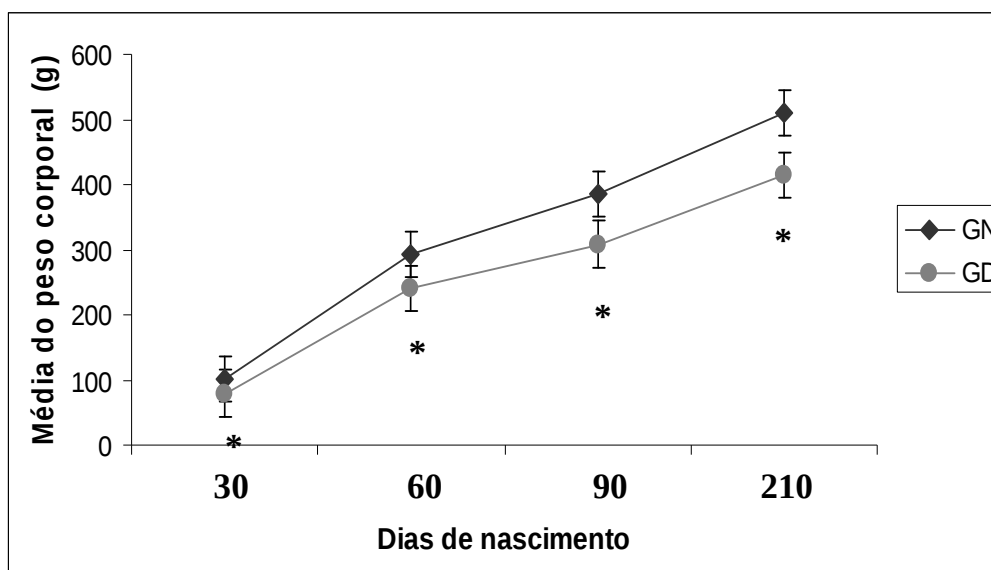


Figura 05. Evolução ponderal dos animais aos 30, 60 90 e 210 dias de vida, sendo este último o período de coleta dos fragmentos nervoso para obtenção dos cortes semi-finos. Valores médios $\pm$ desvio-padrão, sendo GN – Grupo Nutrido e GD – Grupo Desnutrido. * $p \leq 0,0001$ (Teste T-Student).

6.2 Número total de fibras nervosas mielínicas

Não houve diferença do número total de fibras mielínicas entre os grupos nutridos e desnutridos sem lesão ($\text{GNSL} = 6,8 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^2$ e $\text{GDSL} = 6,9 \times 10^3 \pm 6,4 \times 10^2$ sendo $p = 0,91$, valores expressos em mediana), da mesma forma que não foi encontrada diferença ($p = 0,44$) nos valores médios da quantidade total de fibras entre o grupo nutrido lesão e desnutrido lesão ($4,3 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^2$ e $5,1 \times 10^3 \pm 9 \times 10^2$, respectivamente), (Figura 06).

No grupo de animais normonutridos, valor médio do número total de fibras mielínicas foi maior ($p = 0,004$) nos animais sem lesão ($6,9 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^2$) quando comparados aos que sofreram lesão nervosa ($4,3 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^2$).

Nos animais desnutridos durante o período de lactação, com posterior reposição nutricional, os dados apresentaram comportamento semelhante ao do grupo nutrido, onde o grupo não lesionado ($6,9 \times 10^3 \pm 6,2 \times 10^2$) apresentou um valor médio de fibras maior ($p = 0,006$) que o grupo lesionado ($5,1 \times 10^3 \pm 9 \times 10^2$).

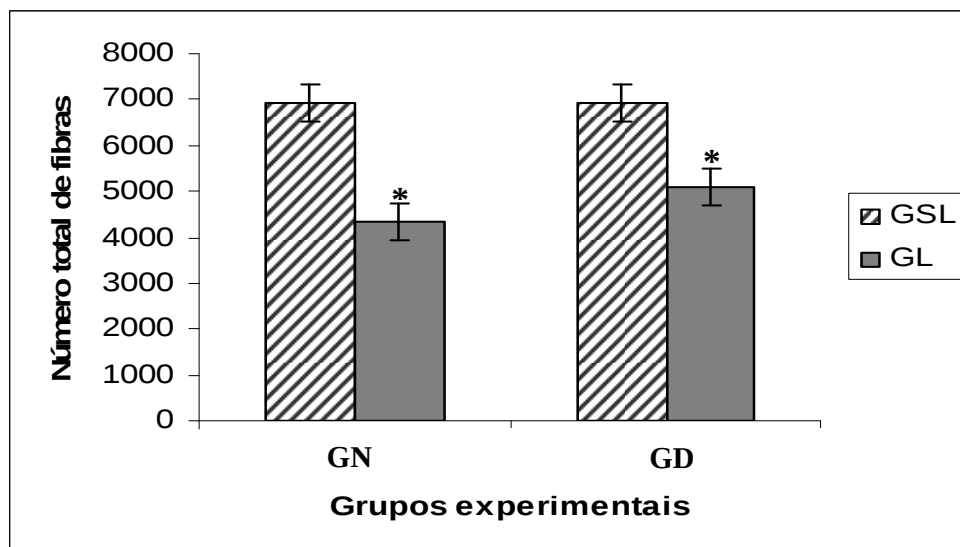


Figura 06- Número total de fibras nervosas mielínicas. Relação entre o Grupo Sem Lesão (GSL) e o Grupo Lesão (GL), nos animais nutridos e desnutridos. Para dados paramétricos, valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão, utilizando Teste T-Student e para os não paramétricos, mediana $\pm$ erro-padrão, utilizando o teste U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,001$.

6.3 Área de secção transversa do nervo ciático

Comparando-se os grupos nutridos e desnutridos, não foi observada diferença dos valores da área de secção transversa do ciático entre grupos GSL ($p = 0,561$), assim como entre os animais dos grupos GL ($p = 0,93$).

Nos animais do grupo nutrido a área de secção transversa do nervo ciático foi menor no grupo lesão, em comparação ao grupo sem lesão ($GNSL = 16,8 \pm 1,84 \text{ mm}^2$ e $GNL = 6,4 \pm 2,8 \text{ mm}^2$, $p = 0,0002$), (Figura 08). Da mesma forma, nos animais que foram desnutridos precocemente, o grupo sem lesão apresentou uma área nervosa de secção transversa, maior ($p < 0,0001$) que o grupo que foi submetido a lesão nervosa ($GDSL = 16,2 \pm 0,76 \text{ mm}^2$ e $GDL = 6,63 \pm 1,52 \text{ mm}^2$), (Figura 7).

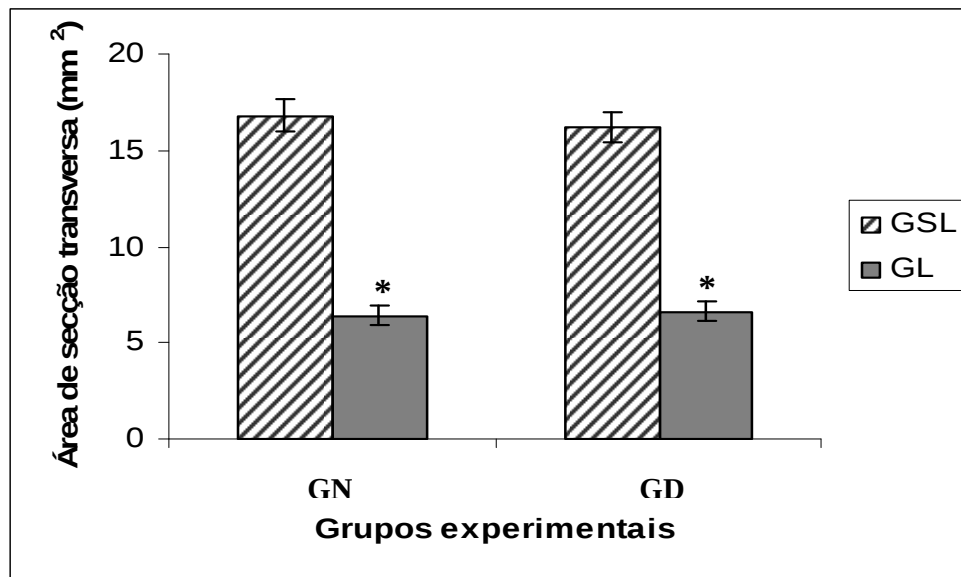


Figura 07. Área de secção transversa do nervo ciático dos animais do Grupo Nutrido (GN) e do Grupo Desnutrido (GD), sendo o Grupo sem Lesão e o Grupo Lesão representados, respectivamente por (GSL) e (GL). Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão. * $p \leq 0,0002$ (Teste T-Student).

6.4 Densidade de fibras nervosas mielinizadas

Não houve diferença na densidade de fibras mielínicas entre os grupos nutrido e desnutrido sem ($p = 0,25$) e com a lesão ($p = 0,46$) nervosa no ciático

Os animais nutridos do grupo GNL apresentaram densidade de fibras maior que os do grupo GNSL ($7,6 \times 10^2 \pm 3,5 \times 10^2$ e $4,6 \times 10^2 \pm 5,5 \times 10$, respectivamente, sendo $p = 0,009$). Da mesma forma, o grupo desnutrido sem lesão (GDSL) apresentou uma densidade menor ($4,4 \times 10^2 \pm 1,7 \times 10$, $p = 0,009$) que o grupo GDL (7×10^2 x $1,32 \times 10^2$) (Figuras 08 e 09).

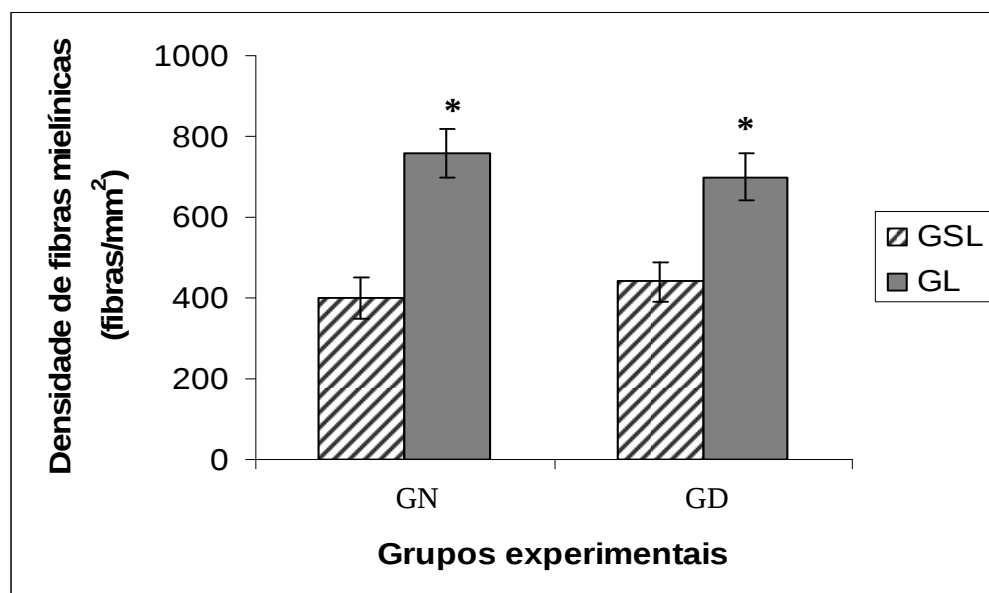


Figura 08. Densidade de fibras mielínica por mm^2 de área de secção transversa do nervo ciático, nos Grupos Nutrido (GN) e Desnutrido (GD). Valores expressos em mediana $\pm$ erro-padrão, sendo GSL – Grupo Sem Lesão e GL – Grupo Lesão. * $p = 0,009$ (Teste Mann-Whitney).

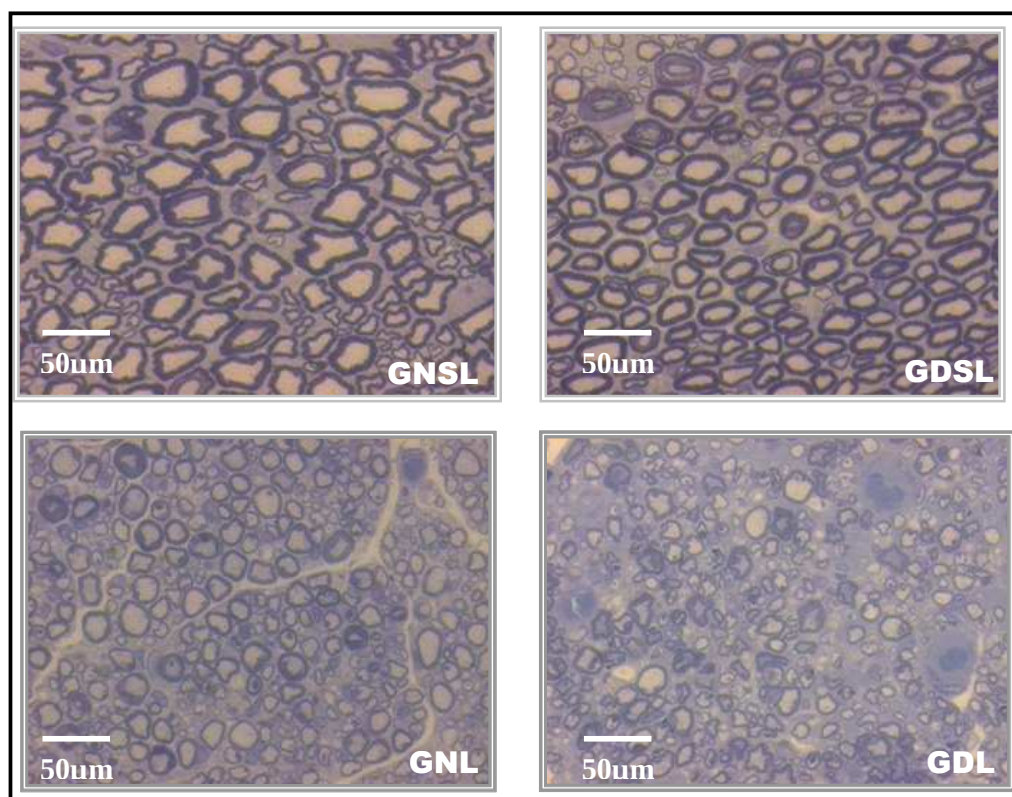


Figura 09. Fotomicrografia de fibras mielínicas do nervo ciático dos grupos experimentais: GNSL (Grupo Nutrido Sem Lesão), GNL (Grupo Nutrido com Lesão), GDSL (Grupo Desnutrido Sem Lesão) e GDL (Grupo Desnutrido com Lesão). Cortes semi-finos ($0,5 \mu\text{m}$) - Azul de Toluidina.

6.5 Classificação das fibras mielínicas

O diâmetro das fibras mielínicas presentes no nervo ciático dos animais adultos não lesionados, em ambos os grupos normonutridos e desnutridos precocemente, apresentou aspecto semelhante, onde a maior parte eram fibras pequenas e intermediárias. Já nos animais que foram submetidos à lesão do nervo ciático, houve uma predominância de fibras de pequeno diâmetro, em relação aos demais, tanto nos animais normonutridos quanto naqueles que sofreram desnutrição no período de aleitamento. A comparação entre os grupos lesionados mostrou aspecto semelhante quanto à classificação das fibras nervosas mielínicas (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das fibras mielínicas presentes no nervo ciático, de acordo com seu diâmetro, em Fibras Pequenas (FP), Fibras Intermédiárias (FI) e Fibras Grandes (FG), presentes nos grupos Nutrido Sem Lesão (GNSL), Nutrido com Lesão (GNL), Desnutrido Sem Lesão (GDSL) e Desnutrido com Lesão (GDL). As letras ^{a,c,e} correspondem a análise entre os grupos GNSL e GNL e ^{b,d,f} entre os grupos GDSL e GDL Teste-t Student, com valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão, com $p < 0,05$.

Tipos de Fibras	Grupos				P
	GNSL	GNL	GDSL	GDL	
FP	263 $\pm$ 76.7	699 $\pm$ 101.6 ^a	299 $\pm$ 64.1	586 $\pm$ 61.33 ^b	^a <0,0001 ^b <0,0001
FI	220 $\pm$ 40.7	96 $\pm$ 13.4 ^c	212 $\pm$ 7.79	95 $\pm$ 16.08 ^d	^c <0,0001 ^d <0,0001
FG	26 $\pm$ 10.1	2 $\pm$ 1.48 ^e	39 $\pm$ 21	5 $\pm$ 1.92 ^f	^e <0,009 ^f <0,009

6.6 Quantificação dos vasos sanguíneos

A quantidade de vasos sanguíneos presentes nos cortes semi-finos de animais normonutridos, quando comparada com a de animais desnutridos precocemente, não mostrou diferença entre os grupos (GNSL = 62.4 $\pm$ 5.94 e GDSL = 67,8 $\pm$ 14,7).

Em relação aos animais que foram submetidos à secção total do ciático, a quantidade de vasos foi maior no grupo nutrido, assim como no grupo desnutrido, quando comparados com seus respectivos grupos de animais que não sofreram lesão (GNL = 83 ± 12.4 e GNSL = 62.4 ± 5.94 , $p = 0,01$; GDL = $109 \pm 15,7$ e GDNL $67,8 \pm 14,7$, $p = 0,0022$).

Diante da comparação do número total de vasos presentes nos segmentos de nervo ciático regenerados, o grupo GDL ($109 \pm 15,7$) apresentou uma maior quantidade de vasos, $p = 0,003$, em relação ao grupo GNL (83 ± 12.4), (Fig. 10).

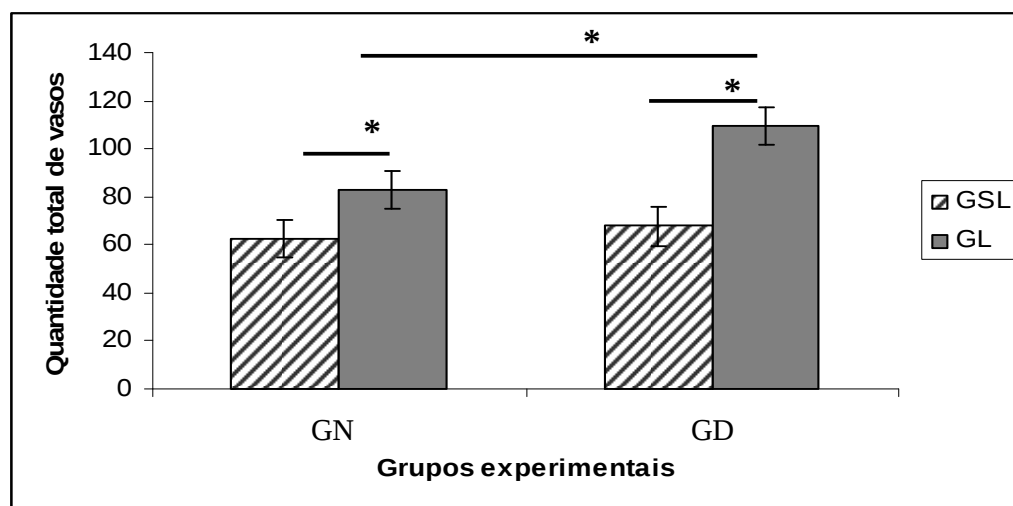


Figura 10. Número total de vasos sanguíneos presentes nos cortes semi-finos de fragmento de nervo ciático, sendo GN (Grupo Nutrido), GD (Grupo Desnutrido), GSL (Grupo Sem Lesão) e GL (Grupo Lesão). Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão. * $p \leq 0,01$. (Teste T-Student).

7 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, avaliamos histomorfometricamente o processo de regeneração nervosa periférica em animais que foram desnutridos precocemente, com posterior reposição nutricional.

Diversos modelos de manipulação nutricional têm sido utilizados para promover a desnutrição em animais, podendo ocorrer pela manipulação da dieta das ratas pró-genitoras durante a gestação e/ou aleitamento, assim como pela manipulação da dieta nos próprios filhotes após o período de desmame (OLDFORS, 1981; DA-SILVA, COSTA F, COSTA J *et al.*, 1987; PASSOS, RAMOS e MOURA, 2000; NUNES, BATISTA, MICHELI *et al.*, 2002; ALIPPI, META, OLIVERA *et al.*, 2002; BARROS, MANHÃES-DE-CASTRO, DE-SOUZA *et al.*, 2006; SILVA, BARROS, CUNHA *et al.*, 2006; MIÑANA-SOLIS e ESCOBAR, 2008).

No presente estudo foi utilizado o modelo de indução de desnutrição, através da oferta de uma dieta hipoproteica (caseína 8%) a ratas durante o período de aleitamento dos filhotes, que se mostrou eficiente para reproduzir o modelo de desnutrição necessário ao estudo. Para confirmação do estado nutricional, utilizamos a evolução do peso corpóreo do animal como sugerido por Da-Silva, Costa F, Costa J *et al.*, (1987). A avaliação do peso corpóreo é preconizada como um dos parâmetros para identificação do estado nutricional (MILLER e GERMAN, 1999; ALLIPI *et al.*, 2002; NUNES, BATISTA, MICHELI *et al.*, 2002; BARROS, MANHÃES-DE-CASTRO, DE-SOUZA *et al.*, 2006; MIÑANA-SOLIS e ESCOBAR, 2008.).

A partir do 3º dia pós-natal os animais desnutridos apresentaram redução do peso corporal em relação ao grupo normonutrido, que perdurou por todo o período de aleitamento (21 primeiros dias de vida). Esses resultados confirmam os de Ramos, Lima, Teixeira *et al.* (1987) e Passos, Ramos e Moura (2000) que observaram, através do uso do mesmo modelo de manipulação nutricional, redução no peso dos filhotes durante o período inicial da fase de aleitamento, permanecendo até o término da mesma.

Após a reposição nutricional, a redução do peso corporal persistiu no grupo de animais desnutridos precocemente por todo o período de estudo (210 dias de vida pós-natais). Esse resultado também está de acordo com estudos anteriores, os quais demonstraram que a introdução de um longo período de reposição nutricional não foi suficiente para corrigir as alterações permanentes no estado nutricional dos filhotes de mães submetidas à restrição protéica durante a lactação, levando a acreditar que este período pode ser uma fase crítica que determina o estado nutricional futuro desses animais (RAMOS, LIMA, TEIXEIRA *et al.*, 1997; PASSOS, RAMOS E MOURA, 2000; PASSOS, RAMOS, TEIXEIRA *et al.*, 2001, BARROS, MANHÃES-DE-CASTRO, DE-SOUZA *et al.*, 2006; SILVA e ALMEIDA, 2006).

Algumas teorias foram postuladas na tentativa de explicar os mecanismos pelos quais a desnutrição protéica ou protéico-calórica promoveria a redução do peso corpóreo nos filhotes. Dentre elas destacam-se alteração na qualidade do leite materno, proveniente da redução na quantidade de aminoácidos e na atividade enzimática de proteínas presentes no leite (STURMAN, DEVINE, RESNICK *et al.*, 1986), assim como, alterações prejudiciais no metabolismo de nutrientes, além da possibilidade de alterações danosas em estruturas intestinais dos filhotes, promovendo assim má absorção e perda de nutrientes (SAWAYA, 2006).

Alguns estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar as alterações estruturais e funcionais no Sistema Nervoso Periférico (SNP) em organismos desnutridos durante seu desenvolvimento. Essas alterações podem ser avaliadas a curto-prazo, ou seja, logo após ou durante o período de indução da desnutrição (HEDLEY-WHYTE e MEUSER, 1971; REDDY, DAS, SASTRY 1979; CORNBLATH e BROWN, 1988; VARGAS V, VARGAS R, MARQUEZ *et al.*, 2000), ou após períodos de reposição nutricional (SIMA e SOURANDER, 1978; DA-SILVA, COSTA F, COSTA J *et al.*, 1987, RANA, CHOPRA, MEHTA *et al.*, 1991; ALMEIDA, SILVEIRAM, GUEDES *et al.*, 2005).

Chopra, Dhand, Mehta *et al.*, (1986) estudando o nervo ciático de crianças submetidas à desnutrição protéico-calórica, com idade entre 07 e 62 meses, verificaram redução no número de fibras nervosas e na velocidade de condução motora no nervo tibial e sensitiva no nervo ulnar. Assim como, Oldfors e Person (1982), analisando, logo após o término do período de indução da desnutrição aos

filhotes, a ultra-estrutura de nervos da cauda de ratos adultos submetidos à dieta hipoproteica a partir da 6^a até a 15^a semana de vida, encontraram acúmulo de filamentos em axônios distendidos com bainha de mielina desintegrada, com algumas fibras mostrando agregação anormal de organelas e bainha de mielina destruída, sinais estes sugestivos de desmielinização axonal e prejuízos funcionais. Esses dados demonstram a ação agressiva da desnutrição no sistema nervoso periférico, em animais que não foram submetidos à reposição nutricional.

No presente estudo, não foi realizada uma análise estrutural do nervo ciático logo após o término da indução da desnutrição, assim como durante as fases de crescimento dos animais em virtude da necessidade de reproduzir o modelo experimental de regeneração na fase adulta do animal. Dessa forma, não foi possível verificar a existência de quaisquer alterações na estrutura do nervo nas fases precoces do seu desenvolvimento.

Na análise a longo-prazo, observamos que após a indução da desnutrição protéica em períodos precoces de vida pós-natal, seguido por período de reposição nutricional, a restrição protéica não provocou alterações histomorfométricas no desenvolvimento do nervo ciático dos animais adultos, dados estes que puderam ser confirmados através da mensuração da área, do número, da densidade e do tipo das fibras mielínicas. Corroborando com nossos resultados, um estudo recente utilizando dieta hipoproteica a base de caseína durante o período de gestação e aleitamento, também não observou diferenças no perímetro do nervo ciático, no número, na prevalência de fibras de maior ou menor tamanho e na densidade de fibras mielínicas em animais normonutridos e desnutridos, quando adultos, após a reposição nutricional (QUEIROZ, 2008).

Estes dados também estão de acordo com os achados de Sima e Sourander (1978) que utilizando animais desnutridos, durante o período gestacional e de aleitamento, por restrição na quantidade de alimento, posteriormente submetidos a 180 dias de reposição nutricional, encontraram correspondência na mensuração da circunferência axonal e no crescimento axonal de fibras mielinizadas no sistema nervoso central. Ainda de acordo com nossos resultados, Almeida, Silveira, Guedes *et al.*, (2005) analisando cortes semi-finos de nervo óptico de animais jovens (60 dias) que foram submetidos à desnutrição proteico-calórica durante o período de aleitamento e posterior reposição nutricional, verificaram não haver

alterações na citoarquitura e no calibre do nervo entre os grupos de animais normotridos e desnutridos.

A ausência de alterações morfológicas no tecido nervoso periférico associada ao permanente déficit de peso corporal nos animais desnutridos precocemente nos leva a inferir que, durante o período de reposição nutricional, (180 dias), deve ter havido um maior gasto energético do organismo na tentativa de poupar estruturas nobres como os componentes do sistema nervoso. Essa idéia se respalda nos achados de Bennis-Taleb, Remacle, Hoet *et al.*, (1999), que verificaram a recuperação do peso da massa cerebral, em detrimento de outros órgãos, após 90 dias de reposição nutricional, em ratos gerados por mães que foram alimentadas com dieta hipoproteica no período gestacional.

A hipótese do isolamento funcional, descrito inicialmente por Levitsky e Barnes (1972) nos ajuda a entender os eventos ocorridos após o período de desnutrição. Esses autores consideravam que taxas diminuídas no crescimento corpóreo dos animais seriam decorrentes da adaptação do organismo à desnutrição precoce. Além disso, essa adaptação poderia estar envolvida com a conservação de energia, de forma que o indivíduo pudesse utilizar a energia na manutenção de funções vitais do organismo.

Além dessa resposta adaptativa, o período de reposição nutricional pode ter promovido um aumento nos níveis de substâncias importantes na síntese da mielina. Reddy, Das e Sastry (1979) analisando a composição da bainha de mielina em animais que foram desnutridos durante o período de aleitamento, encontraram uma recuperação nos níveis da enzima 2',3'- nucleotídeo ciclase 3'- fosfohidrolase e de proteolipídeos naqueles animais submetidos a reposição nutricional. Essas substâncias têm sido utilizadas como um marcador para a mielina presente no SNC e no SNP (OULTON e MEZEI, 1976; REDDY, DAS, SASTRY 1979; EGWIN, CHO e KUMMEROW 1986).

Outro fator que pode ser sugerido para explicar a permanência nos padrões estruturais no nervo ciático dos animais adultos, entre os grupos normonutridos e desnutridos precocemente, seria a ausência de alterações na função das células de Schwann, já que as mesmas são responsáveis pelo processo de mielinização das fibras nervosas do sistema nervoso periférico, e dessa forma, influenciando no calibre axonal, assim como na área de secção transversa do nervo periférico

(FLORES, LAVERNIA e OWENS, 2000; NAVARRO, VERDÚ, RODRIGUEZ *et al*, 2001; NAVARRO, VIVÓ, e VALERO-CABRÉ, 2007). No entanto, em nosso estudo não analisamos a função das células de Schwann na mielinização do nervo ciático dos animais adultos normonutridos e nos desnutridos precocemente.

Outros estudos, entretanto, demonstraram a permanência de alterações morfológicas e funcionais nos animais adultos, após o período de reposição nutricional. Segura, Guadarrama, Pratz *et al.*, (2004) observaram que, em animais gerados por ratas que foram submetidas à restrição alimentar do tipo quantitativa (50% da quantidade de comida oferecida ao grupo controle) por um período pré-gestacional, gestacional e pós-natal, mesmo após longo período de reposição nutricional, apresentaram redução no diâmetro do nervo sural, no diâmetro axonal, na espessura da mielina e na área do potencial de ação muscular, porém, foi observada equivalência no número de axônios entre os grupos avaliados. De acordo com os mesmo autores, esses resultados indicam que uma grande proporção de fibras que formam o nervo sural de animais desnutridos perde sua habilidade de gerar e ou propagar potencial de ação, enquanto que um pequeno número de fibras mantém habilidade de evocar e transmitir o potencial de ação muscular na deprivação protéico-calórica perinatal.

Ainda de acordo com a mesma idéia, Sima e Sourander (1974), verificaram que, em animais adultos (180 dias de vida), que as mães foram submetidas à desnutrição por restrição na quantidade de alimentos disponíveis e posteriormente reabilitados nutricionalmente a partir do nascimento, o calibre das fibras do nervo óptico era menor nos animais desnutridos.

No presente estudo, não houve alterações morfológicas no tecido nervoso periférico de animais adultos normonutridos e também aqueles que foram submetidos à desnutrição exclusivamente protéica no aleitamento, com posterior reposição nutricional.

Confrontando os dados deste trabalho com os acima citados, percebe-se que a restrição da quantidade de alimentos as mães durante o período gestacional e/ou lactação induziria nos filhotes um estado de desnutrição protéico-calórica (BOXWELL, AYSON e RAMENOFISKY, 1993; NUNES, BATISTA, MICHELI *et al.*, 2002; SILVA e ALMEIDA, 2006). Dessa forma, esse modelo de desnutrição

(protéico-calórica) ocorrendo em períodos precoces de vida poderia promover alterações morfológicas e funcionais irreversíveis na fibra nervosa.

Essas divergências nos achados podem ser decorrentes dos diferentes modelos experimentais utilizados no que concerne aos métodos de indução à desnutrição durante diferentes períodos precoces da vida e ao tempo de duração da reposição nutricional à qual os animais foram impostos.

Além dos dados referentes à morfologia da fibra nervosa, também foi avaliada a quantidade de vasos sanguíneos presentes no interior do nervo ciático. Não foi observada diferença na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos normonutridos e desnutridos, após o período de reposição nutricional. Apesar da escassez de dados na literatura relacionados ao estudo da vascularização na regeneração nervosa periférica em animais desnutridos precocemente, vale destacar resultados semelhantes encontrados em outras estruturas demonstrados em estudos que relacionaram a desnutrição precoce com a vascularização tecidual.

Bennis-Taleb, Remacle, Hoet *et al.*, (1999), observaram redução na vascularização de ilhotas pancreáticas, do duodeno e do córtex cerebral no primeiro dia de vida pós-natal, em animais gerados de mães alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação. No entanto, Boujendar, Arany, Hill *et al.*, (2003) e Khorram O, Khorram N, Momeni *et al.*, (2007) perceberam em seus estudos que animais submetidos à reposição nutricional, demonstraram restauração na quantidade de vasos sanguíneos no pâncreas e duodeno. Segundo aqueles autores, esta recuperação pode estar relacionada com o aumento na expressão de fatores que estimulam a angiogênese e o crescimento dos vasos, como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vascular Growth Endothelial Factor – VEGF) e pelo Fator de Crescimento tipo – Insulina (Insulin – like Growth Factor – IGF), fatores estes que se encontravam reduzidos nos animais desnutridos logo após o término da indução da desnutrição

A técnica de tubulização vem sendo bastante utilizada na regeneração de nervos periféricos. De acordo com Oliveira, Pierucci e Pereira (2004) o material usado na confecção do tubo deve ser biocompatível, orientar a migração celular assim como o crescimento axonal, e permitir a vascularização e o acúmulo de fatores neurotróficos entre os cotos neurais.

Foi constatado neste estudo, a presença do processo regenerativo eficaz após 04 meses de lesão nervosa em ambos os grupos de animais normonutridos e desnutridos. Dessa forma, o uso do tubo de polietileno mostrou-se bastante adequado para a regeneração do nervo periférico, já que se apresentou imunocompatível, auxiliar no crescimento axonal e na prevenção de neuromas, além de evitar a invasão de tecido conjuntivo no local da lesão, tecido este que poderia prejudicar o crescimento axonal (SCHMIDT e LEACH, 2003). Vários outros estudos também demonstraram a eficácia do uso do material sintético como um tubo guia no processo regenerativo no nervo periférico (TANTUWAYA, BAILEY, SCHMIDT *et al.*, 1997; CHEN, HSIEH, TSAI *et al.*, 2000; IKEGUCHI, KAKINOKI, MATSUMOTO *et al.*, 2003; BRAGA-SILVA, GEHLEN, ROMAN *et al.*, 2006; SILVA e ALMEIDA, 2006; CHEN, OU, LIAO *et al.*, 2007).

Além da utilização da prótese tubular, outro fator que pode ter contribuído para o sucesso do processo regenerativo foi o uso do matrigel, que é uma substância viscosa composta de elementos presentes na matrix extracelular, dentre eles o colágeno e a laminina. Esses componentes encontram-se bastante envolvidos no processo regenerativo: a laminina é produzida pelas células de Schwann e o colágeno está presente em toda matrix extracelular (CHEN, HSIEH, TSAI *et al.*, 2000). Ambas formam um tecido de suporte facilitando o crescimento axonal. Fato este que foi observado por Chen, Hsieh, Tsai *et al.*, (2000), utilizando tubo preenchido com colágeno, laminina e fibronectina. Esses autores observaram que após seis semanas da lesão no nervo ciático, houve um aumento na quantidade de fibras mielínicas no segmento nervoso neoformado, assim como na quantidade de vasos em relação aos animais que utilizaram o tubo sem preenchimentos dos componentes de matrix extracelular. Da mesma forma, Delistoianov, Pereira, Filippo *et al.*, (2008) a partir da comparação da resposta regenerativa de nervos periféricos em eqüinos com o uso de tubo de silicone associado ou não ao colágeno, obtiveram uma regeneração nervosa mais organizada e mais eficaz nos fragmentos de nervo com tubo e colágeno.

No presente estudo, quando realizada a avaliação da estrutura nervosa neoformada entre os cotos neurais do nervo ciático dos animais normonutridos, após 120 dias da lesão, observou-se uma menor área de secção transversa do nervo ciático, uma menor quantidade e menor densidade de fibras mielínicas, assim como

uma maior proporção de fibras de pequeno calibre. Em relação aos vasos sanguíneos, os animais submetidos à lesão do nervo ciático apresentaram uma maior quantidade de vasos que o grupo sem lesão.

A presença, em maior quantidade, de fibras pequenas, em relação às fibras intermediárias e grandes, no tecido nervoso neoformado no local da injúria nervosa tem sido reportado em períodos de análise morfológica anteriores, semelhantes e posteriores ao utilizado neste estudo.

Hashimoto, Suzuki, Kitada *et al.*, (2002) estudando a resposta regenerativa em ratos, 08 semanas após a secção do nervo ciático e posterior reparo através da tubulização, verificou maior quantidade de fibras com diâmetro entre 0-2 μm . Em uma análise morfométrica pós-lesão, semelhante ao utilizado neste trabalho, Yamano (1981) observaram que havia maior proporção de fibras com diâmetro entre 1-5 μm , no nervo ciático de coelhos, após lesão nervosa total e tubulização.

Da mesma forma que Fields e Ellisman (1986), em estudos com camundongos que sofreram lesão no nervo ciático, 10 meses após a lesão e tubulização, constataram uma maior quantidade de fibras de pequeno calibre nos nervos regenerados. Diante de todos esses resultados, é possível perceber que o diâmetro dos axônios regenerados permanece menor por um período mais longo, após a injúria nervosa e posterior reparo, do processo regenerativo.

No presente estudo, após 120 dias de secção total do nervo ciático e posterior reparo por tubulização e uso de matrigel, observou-se uma menor quantidade de fibras nervosas mielínicas no tecido nervoso neoformado, sendo esta correspondente a, aproximadamente, 63 % da quantidade de fibras encontradas nos animais sem lesão. Dados estes que coincide com os achados de Chen, Cohen e Hallett (2002), que através da análise morfológica do nervo ciático regenerado de ratos adultos, encontrou valores médios da quantidade de fibras mielínicas, 6 semanas após a lesão, menores que dos animais controles. Da mesma forma, Hashimoto, Suzuki, Kitada *et al.*, (2002) encontraram uma quantidade de fibras correspondente a 55,8% da quantidade presente nos animais controles oito semanas após lesão nervosa total do nervo ciático de ratos adultos.

A redução da quantidade de fibras mielínicas durante os primeiros 04 meses pós-lesão poderia ser explicada por uma menor taxa de crescimento neuronal neste período. Isso pode ter ocorrido, segundo Lauders e Altenburg (2003), pelo fato do

processo de coleta de fragmentos de mielina e restos axonais só se completar três meses após o início da degeneração Walleriana. Durante este período, macrófagos e células de Schwann estariam responsáveis pela fagocitose desses débris de axônio e mielina ao mesmo tempo em que estão liberando fatores neurotróficos. Após este tempo, o acúmulo destes fatores estariam envolvidos no desenvolvimento e maturação das fibras nervosas neoformadas, onde, a longo prazo, a quantidade de fibras mielínicas no tecido regenerado poderia se igualar com a quantidade presente nos animais controles. Isto foi observado por Hashimoto, Suzuki, Kitada *et al.*, (2002), no tecido nervoso neoformado, em ratos adultos com 21 meses após a lesão nervosa que apresentou uma quantidade de fibras mielínicas semelhante aos animais não lesionados.

Outro parâmetro analisado na regeneração nervosa foi a vascularização, onde foi possível observar um maior número de vasos sanguíneos no tecido nervoso neoformado. Dado este que corrobora com os achados de Conpolat e colaboradores (1999) que, da mesma forma, durante o processo regenerativo, encontrou uma maior quantidade de vasos sanguíneos nos animais que haviam sofrido lesão do nervo.

É bem conhecido que durante o processo de degeneração Walleriana os macrófagos endoneurais e de origem sanguínea liberam uma série de citocinas que estão envolvidas no processo regenerativo, dentre elas, destaca-se o Fator de Crescimento associado à Insulina (IGF – Insulin-like Growth Factor), que está relacionado com a angiogênese (TOFARIS, PATTERSON, JESSEN *et al.*, 2002; MAKWANA e RAIVICH, 2005) Dessa forma, sugere-se que o aumento no número de vasos observado no grupo de animais que sofreram lesão do nervo ciático, tenha ocorrido tanto por uma maior necessidade de suporte de nutrientes que o processo regenerativo requer, bem como pela ação de IGF liberada pelos macrófagos.

Diante de todos estes achados é de se esperar que com a duração do processo regenerativo, ocorra o aumento da área do nervo ciático, assim como do número, do tamanho e da densidade das fibras mielínicas. Este mecanismo poderá ser bastante importante no processo de recuperação da funcionalidade do nervo ciático.

Os mesmos parâmetros do processo regenerativo foram utilizados para avaliação da regeneração nos animais que foram submetidos à desnutrição protéica durante a janela crítica de desenvolvimento do sistema nervoso periférico, com posterior recuperação nutricional. Constatou-se que a resposta regenerativa, diante da lesão do nervo ciático, dos animais desnutridos precocemente, mostrou-se bastante semelhante àquela encontrada nos animais nutridos.

Foi observado que o nervo ciático dos animais desnutridos sem lesão apresentava área de secção transversa maior que a do fragmento nervoso neoformado dentro do tubo de polietileno. Aqueles animais ainda apresentavam uma maior quantidade e densidade de fibras nervosas mielínicas, sendo estas fibras, em maior proporção, de calibre intermediário.

Para que o processo de regeneração nervosa ocorra de forma adequada, é preciso uma ação eficaz de proteínas axoplasmáticas, das células de Schwann e dos macrófagos (FLORES, LAVERNIA e OWENS, 2000; LANDERS e ALTENBURGER, 2003; MAGGI, LOWE e MACKINNON, 2003; BURNETT e ZAGER, 2004).

As proteínas axoplasmáticas desempenham um importante papel no transporte de substâncias no interior dos axônios (NAVARRO, VIVÓ e VALERO-CABRÉ, 2007). Após a injúria nervosa, essas proteínas tornam-se ativadas e promovem o transporte de substâncias, como os fatores neurotróficos, proveniente de células de Schwann e macrófagos do coto proximal em direção ao corpo dos neurônios e vice-versa. Da mesma forma que, as proteínas são responsáveis em auxiliar estruturalmente o crescimento axonal, como, por exemplo as tubulinas, que são proteínas presentes no citoesqueleto, que servem como suporte físico para o alongamento (NAVARRO, VIVÓ e VALERO-CABRÉ, 2007).

Dessa forma, a ausência de seqüelas observada no processo regenerativo, 120 dias após a secção nervosa total do nervo ciático, nos animais desnutridos precocemente, nos leva a sugerir que, pelo menos a longo-prazo, a desnutrição protéica durante o aleitamento não provocou alterações na função das proteínas relacionadas com o processo neuro-regenerativo. Entretanto, uma análise biomolecular dessas proteínas e funcional é necessária, para um maior entendimento em relação à ação da desnutrição precoce seguida de longo período de reposição nutricional, sobre essas moléculas envolvidas na regeneração nervosa.

Outros dois elementos que demonstram importância no processo regenerativo são as células de Schwann e os macrófagos.

A capacidade fagocitária das células de Schwann em recolher restos de axônio e mielina tem sido verificada (REICHERT, SAADA e ROTSHENKER, 1993; PERRIN, LACROIX, AVILÉS-TRIGUEROS *et al.*, 2005). Recentemente, Perrin, Lacroix, Avilés-Trigueros e colaboradores (2005) analisaram a função fagocitária de células de Schwann presentes no segmento nervoso sofrendo degeneração Walleriana, em animais mutantes, utilizando anticorpos específicos, e observaram uma redução no recrutamento de macrófagos, provenientes do sangue, para o local da lesão. Constatou-se que, com a função reduzida dos macrófagos, as células de Schwann fagocitavam os débris de mielina, porém não com a mesma intensidade que os macrófagos. Dessa forma acredita-se que em situações onde a função fagocitária dos macrófagos se encontra reduzida, as células de Schwann assumam este papel, no entanto, o processo regenerativo ocorrerá em menor velocidade.

Estudos anteriores demonstram que um dos fatores que podem prejudicar a capacidade fagocitária dos macrófagos durante o processo inflamatório é a desnutrição protéica ou protéico-calórica (BORELLI, SOUZA, BOROJEVIC *et al.*, 1998; SOUZA, KANG, NARDINELLI *et al.*, 2001; PRESTES-CARNEIRO, LARAYA, SILVA *et al.*, 2006; FOCK *et al.*, 2008). Souza, Kang, Nardinelli *et al.*, (2001) verificaram que a desnutrição protéica precoce, durante período de aleitamento, induziu alterações permanentes na função fagocitária dos macrófagos e na mobilização destas células para o local da resposta inflamatória de animais adultos.

Diante desses achados, acredita-se que, no processo regenerativo do nervo ciático em animais desnutridos, uma maior quantidade de macrófagos seria necessária para efetivação do reparo nervoso. Este dado poderia justificar os resultados encontrados no grupo que sofreu lesão, onde os animais desnutridos precocemente necessitaram de uma maior quantidade de vasos sanguíneos do que os animais normonutridos provavelmente para favorecer uma maior disponibilidade de macrófagos para a região em reparação.

Outro fator que também poderia justificar a presença de uma maior quantidade de vasos nos animais desnutridos seria a liberação do IGF em níveis

normais. Um estudo realizado por Boujendar, Arany, Hill *et al.*, (2003) analisou a liberação de IGF no pâncreas de animais desnutridos precocemente com dieta hipoproteica (caseína 8%). Os níveis desta citocina apresentaram-se bastante baixos quando foram analisados logo após o término da indução da desnutrição, recuperando valores normais após a instalação da reposição nutricional.

Devido à escassez de estudos que correlacionem o processo de desnutrição protéica ou protéico-calórica com a resposta regenerativa do sistema nervoso periférico, não foi possível realizar uma comparação entre os achados deste trabalho com outros dados da literatura.

Diante deste fato, outros estudos devem ser realizados para um esclarecimento mais aprofundado da relação entre a desnutrição protéica em períodos precoces de vida dos animais (período de grande vulnerabilidade do sistema nervoso periférico), a análise de componentes neurais periféricos e o processo de regeneração nervosa periférica após secção total do nervo.

Por fim, destaca-se a importância do presente estudo na contribuição para o entendimento dos mecanismos de resposta, frente a lesões nervosas periféricas, de organismos adultos que foram desnutridos durante fases precoces de seu desenvolvimento.

8. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que a desnutrição protéica, a base de caseína 8%, induzida durante a fase de aleitamento dos animais, seguida por reposição nutricional até os 210 dias de vida:

- Não alterou nem a estrutura do tecido nervoso periférico dos animais adultos nem a quantidade de vasos no interior do nervo;
- O padrão da resposta regenerativa diante da injúria nervosa periférica mostrou aspectos semelhantes quanto aos componentes estruturais do nervo periférico entre os grupos normonutridos e desnutridos precocemente
- A vascularização no tecido nervoso neoformado após a lesão no nervo ciático se mostrou maior nos animais que foram desnutridos precocemente, provavelmente, em decorrência da resposta adaptativa desses animais à agressão nutricional precoce.

9. Perspectivas

Diante das questões ainda esclarecidas, o presente estudo suscitou o interesse para as seguintes investigações complementares:

- Avaliar o papel das células de Schwann no processo regenerativo do nervo periférico de animais desnutridos precocemente;
- Avaliar a função do nervo periférico;
- Avaliar no animal desnutrido precocemente, as características estruturais do nervo periférico imediatamente após o término da indução da desnutrição.

Referências

ABERNETHY, D.A.; RUD, A; THOMAS, P.K. Neurotropic influence of the distal stump of transected peripheral nerve on axonal regeneration: absence of topographic specificity in adult nerve. **Journal of anatomy**, 180:395-400, 1992.

ALIPPI, R.M.; META, M.D.; OLIVERA, M.I.; BOZZINI, C.; SCHNEIDER, P.; META, I.F.; BOZZINI, C.E. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. **Archives of Oral Biology**, 47: 47–53, 2002.

ALMEIDA, M.F.L.; SILVEIRAM A.C.D; GUEDES, R.C.A.; HOKOC, J.N.; MARTINEZ, A.M.B. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. **Nutritional neuroscience**, 8(2): 91-99, 2005.

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience & Biobehavioral Review** 20(3): 389-402, 1996.

BARBACID, M. Neurotrophic factors and their receptors. **Current Opinion in Cell Biology**, 7:148-155, 1995.

BARROS, K.M.F.T.; MANHÃEDE-CASTRO, R.; DE-SOUZA, S.L.; MATOS, R.J.B.; DEIRO, T.C.B.J.; CABRAL-FILHO, J.E.; CANON, F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional Neuroscience**, 1–6, 2006.

BELKAS, J.S.; SHOICHET, M.S.; MIDHA, R.; Axonal Guidance Channels in Peripheral Nerve Regeneration. **Operative techniques in Orthopaedics**, 190-198, 2004.

BENNIS-TALEB, N.; REMACLE, C.; HOET, J.J.; REUSENS, B. A Low-Protein Isocaloric Diet During Gestation Affects Brain Development and Alters Permanently Cerebral Cortex Blood Vessels in Rat Offspring. **Nutritional Neurosciences**, 129: 1613–1619, 1999.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Annals of Nutrition & Metabolism**, 42:367-373, 1998.

BOUJENDAR, S.; ARANY, E.; HILL, D.; REMACLE, C.; REUSENS, B. Taurine supplementation of a low protein diet fed to rat dams normalizes the vascularization of the fetal endocrine pancreas. **Journal of Nutrition**, 133: 2820–2825, 2003.

BOXWELL, J.; AYSON, P.; RAMENOFISKY, M. Growth and metabolic parameters in pups of undernourished lactating rats. **Physiology & Behavior**, 57 (3): 469 – 475, 1995.

BRAGA-SILVA, F.; GEHLEN, D.; ROMAN, J.A.; MENTA, C.; ATKINSON, E.A.; MACHADO, D.C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G.L.; BAES, C.V.W.; SILVA, V.D.; COSTA, J.C. 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 ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, 14(5): 273-275, 2006.

BURNETT, M. G.; ZAGER, E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review, **Neurosurgery Focus**, 16 (5):1, 2004.

CONPOLAT, L.; KÜKNER, A.; CONPOLAT, I.; OZAN, E. Ultrastructural and morphometric analysis of peripheral nerve regeneration within silicone tubes, **Turkish Journal of Medical Sciences**, 29, 203-209, 1999.

CHEN, R.; COHEN, L.G.; HALLETT, M. Nervous system reorganization following injury. **Neuroscience**, 111,(4):761-773, 2002.

CHEN, Y.S.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CHEN, T.S.; CHENG, W.C.; HU, C.L.; YAO, C.H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, 21: 1541-1547, 2000.

CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; CHEN, S.Y.; WU, C.W.; WANG, C.C.; WANG, W.Y.; HUANG, Y.S.; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair . **Experimental Neurology**, 204:443–453, 2007.

CHOPRA, J.S.; Neurological-consequences of protein and protein-calorie undernutrition. **Critical Reviews in Neurobiology**. 6(2):99-118, 1991.

CHOPRA, J.S.; DHAND, U.K.; MEHTA, S.; BAKSHI, V.; SATYAVATI RANA; MEHTA, J. Effect of protein calorie malnutrition on peripheral nerves. **Brain**, 109:307-323, 1986.

CORNBLATH, D.R.; BROWN, M.J. Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves. **Experimental neurology**, 99:403-411, 1988.

DA-SILVA, A.T.; COSTA, F.B.R.; COSTA, J.A.; TEODÓSIO, N.R.; CABRAL-FILHO, J.E.; GUEDES, R.C.A. sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human “basic regional diet” of the northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 20:383-392, 1987.

DELANEY, A.J.; SAMORAJSKI, T.; FULLER, G.N; WIGGINS, R. Morphometric comparison of central and peripheral hypomyelination induced by postnatal undernourishment of rats. **Journal of Nutrition**, 111: 746-754, 1981. 1981.

DELISTOIANOV, N; PEREIRA, R.N.; FILIPPO, P.A.D.; DÓRIA, R.G.S.; ALESSI, A.C. Implante de tubo de silicone com e sem colágeno na regeneração de nervos em equinos. **Ciência Rural**, 38(6): 1667-1674, 2008.

DE SÁ, J.M.R.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; BARREIRA, A.A. The end-to-side peripheral nerve repair Functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, 136:45–53, 2004.

DOBBING J, SANDS J. Head circumference, biparietal diameter and brain growth in fetal and postnatal life. **Early Human Development**, 2:81-87, 1978.

DUCKER, T.B.; KAUFFMAN, F.C. Metabolic factors in surgery of peripheral nerves. **Clinical Neurosurgery**, 24:406-424, 1977.

DUNCAN, G.J.; BROOKS-GUNN, J.; KLEBANOS, P.K. Economic deprivation and early childhood development. **Child Development**, 65: 296-318, 1994.

ENDO C. Estudo dos efeitos do tratamento com laser num modelo experimental de lesão nervosa por esmagamento do nervo ciático em ratos. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo (SP): USP; 2002.

FIELDS, R.D.; ELLISMAN, M.H. Axons regenerated through silicone tube splices. II – Functional morphology. **Experimental Neurology**, 92(6): 61-74, 1986.

FLORES, A.J.; LAVERNIA, C.J.; OWENS, P.W. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. **The American Journal of Orthopedics** : 167 – 173, 2000.

FOCK, R. A; RAMIREZ, V. M. A.; RABELLO, C. A.; NAKAJIMA, K.; MACEDO, R. M.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition modifies the Production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. **Journal of nutritional science and vitaminology**, 54(5):371-7, 2008.

GAMA, S.A.M.; MATTAR JR, R.; DA SILVA, C.F. Estudo experimental comparativo da ação das neuroquinas cardiotrofina – e oncostatina – na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, 8(2): 55-69, 2000.

GUERTIN, A.D.; ZHANG, D.P.; MAK, K.S.; ALBERTA, J.A.; KIM, H.A. Microanatomy of Axon/Glial Signaling during Wallerian Degeneration. **The Journal of Neuroscience**, 25(13):3478 –3487, 2005.

GURMINI, J.; CECÍLIO, W.A.C.; SCHULER, S.L.; OLANDOSKI, M.; NORONH, L. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 41(4):271-8, 2005.

IKEGUSHI, R.; KAKINOKI, R.; MATSUMOTO, T.; TSUJI, H.; ISHIKAWA, J.; NAKAMURA, T. Rat nerve regeneration through a silicone chamber implanted with negative carbon ions. **Developmental Brain Research**, 140: 127-131, 2003.

HALL, S.M. Regeneration in the peripheral nervous system. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 15(6): 513-529, 1989.

HASHIMOTO, T.; SUZUKI, Y.; KITADA, M. Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regeneration axons. **Experimental Brain Research**, 368: 356-368, 2002.

HEDLEY-WHYTE, E.T.; MEUSER, C.S. The effect of undernutrition on myelination of rat sciatic nerve. **Laboratory investigation**, 24(2):156-161, 1971.

HESS, J.R.; BRENNER, M.J.; MYCKATYN, T.M.; HUNTER, D.A.; MACKINNON, S.E. Influence of Aging on Regeneration in End-to-Side Neurorrhaphy. **Annals of Plastic Surgery**, 57(2): 217-222, 2006.

KINGHAM, P.J.; TERENCE, G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. **Journal of anatomy**, 209:511–526, 2006.

KHORRAM, O.; KHORRAM, N.; MOMENI, M.; HAN, G.; HALEM, J.; DESAI, M.; ROSS, M. Maternal undernutrition inhibits angiogenesis in the offspring: a potential mechanism of programmed hypertension. **American Journal of Physiology**, 1-31, 2007.

LANDERS, M.; ALTENBURGER, P. Peripheral nerve injury. **Advances in physiotherapy**, 5: 67-82, 2003.

LEVITSKY, D.A.; BARNES, R.H. Nutritional and Environmental Interactions in the Behavioral Development of the Rat: Long-Term Effects. **Science**, 176 : 68-71, 1972.

LEVITSKY, D.A.; STRUPP, B. Malnutrition and Brain: Change in concepts, Change in concepts. **Journal of Nutrition**, 125 (8 suppl.):2210-2220, 1995.

LUNDBORG G: Nerve regeneration, in Lundborg G (ed): Nerve Injury and Repair. London, UK, **Churchill Livingstone**, 149-195, 1988.

LUNDBORG, G.; ROSEN, B. Hand function after nerve repair. **Acta Physiologica**, 189: 207–217, 2007.

MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R. Clinical application of peripheral nerve transplantation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 90:695-699, 1992.

MAGGI, S.P.; LOWE, J.B.; MACKINNON, S.E. Pathophysiology of nerve injury. **Clinical Plastic Surgery**, 30:109-126, 2003.

MAKWANA, M.; RAIVICH, G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. **The FEBS Journal**, 272: 2628-2638, 2005.

MARKUS, A.; PATEL, T.D.; SNIDER, W.D.; Neurotrophic factors and axonal growth. **Current Opinion in Neurobiology**, 12:523–531, 2002.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 235 p, 1988.

MEEK, M.F.; DIJKSTRA, J.R.; DEN DUNNEN, W.F.A.; IJEMA-PAASSEN, J.; SCHAKENRAAD, J.M.; GRAMSBERGEN, A.; ROBINSON, P.H.; FRCS. Functional assessment of sciatic nerve reconstruction: biodegradable poly (DLA-e-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts. **Microsurgery**, 19:381-388, 1999.

MILLER, J; GERMAN, R. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. **Journal of Nutrition**, 129:2061–2069, 1999.

MIÑANA-SOLIS, M.C.; ESCOBAR, C. Post-Weaning Protein Malnutrition in the Rat Produces Short and Long Term Metabolic Impairment, in Contrast to Earlier and Later Periods. **International Journal of Biology and Sciences**, 4:422-432, 2008.

MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, E.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Review**, 2:137–230, 1978.

MORRIS, J.H., HUDSON A.R., WEDDELL, G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. **Z Zellforsch Mikrosk Anat** 124:165-203, 1972.

NAVARRO, X.; VIVÓ, M.; VALERO-CABRE, A.; Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in Neurobiology**, 82: 63–201, 2007.

NAVARRO, X.; VERDÚ, E.; RODRÍGUEZ, F.J.; CEBALLOS, D. Artificial nerve graft for the repair of peripheral nerve injuries. **Neurology Science**, 22: 7-13, 2001.

NOBACK, C.R.; EISEMANN, L.M. Some effects of protein-calorie undernutrition on the developing central nervous system of the rat. **The Anatomical Record**, 201: 67-73, 1981.

NUNES, M.L.; BATISTA, B.B.; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. **Jornal de Pediatria**, 78 (1): 39-44, 2002.

ÖGÜN, T.C.; ÖZDEMİR, M.; SENARAN, H., ÜSTÜN, M.E. End-to-side neurorrhaphy as a salvage procedure for irreparable nerve injuries. **Journal of Neurosurg**, 99:180–185, 2003.

OLDFORS, A. Nerve Fibre Degeneration of the Central and Peripheral Nervous Systems in Severe Protein Deprivation in Rats. **Acta Neuropathology**, 54:121-127, 1981.

OLDFORS, A.; PERSSON, M. Peripheral Nerve Fibre Degeneration in Protein-deprived Young Rats. **Acta Neuropathology (Berl)**, 57:1 – 6, 1982.

OLDFORS, A.; SOURANDER, P. The effect of undernutrition on spinal ganglion nerve cell size. **Acta Neuropathology**, 39:75-80, 1977.

OLDFORS, A.; ULLMAN, M.; Motor Nerve Conduction Velocity and Nerve Fibre Diameter in Experimental Protein Deprivation. **Acta Neuropathology**, 51:215-221, 1980.

OLIVEIRA, A.L.R.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K.B.. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. **Brazilian Journal of Morphology Science**, 21(4): 225-231, 2004.

OULTON, M.R.; MEZEI, C. Characterization of myelin of chick sciatic nerve during development. **Journal of Lipid Research**, 17: 167-175, 1976.

PALMER, A.A.; PRINTZ, D.J.; BUTLER, P.D.; DULAWA, S.C.; PRINTZ, M.P.; Prenatal protein deprivation in rats induces changes in prepulse inhibition and NMDA receptor binding. **Brain Research**, 996: 193–201, 2004.

PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, 20 (2):1603-1612, 2000.

PASSOS, M.C.F.; RAMOS C.F.; TEIXEIRA, C.V.; MOURA, E.G. Comportamento alimentar de ratos adultos submetidos à restrição protéica cujas mães sofreram desnutrição durante a lactação. **Revista de Nutrição**, 14sup:7-11, 2001.

PEARSE, D.D.; PEREIRA, F.C.; MARCILLO, A.E.; BATES, M.L.; BERROCAL, Y.A.; FILBIN, M.T.; BUNGE, M.B.; cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. **Nature medicine**, 2002.

PERRIN, F.E.; LACROIX, S.; AVILÉS-TRIGUERO, M. DAVID, S. Involvement of monocyte chemoattractant protein – 1, macrophage inflammatory protein - 1 α and interleukin - 1 β in Wallerian degeneration. **Brain**, 128: 854 – 866, 2005.

PRESTES-CARNEIRO, L.E.; LARAYA, R.D.; SILVA, P.R.C.; MOLITERNO, R.A.; FELIPE, I.; MATHIAS, P.C. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, 52(6): 414-420, 2006.

QUEIROZ, L.V.C. **Efeitos do treinamento físico na estrutura do nervo ciático de ratos adultos submetidos à dieta hipoproteica durante a gestação e lactação.** Dissertação (Mestrado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento) – Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2008.

RAMOS, C.F.; LIMA, A.P.S.; TEIXEIRA, C.V.; BRITO, P.D.; MOURA, E.G. Thyroid function in post-weaning rats whose dams were fed a low-protein diet during suckling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 133-137, 1997.

RANA, S.V.; CHOPRA, J.S.; MEHTA, S. CHAND, U.K.; SHARMA, U. Electrophysiological and histopathological changes in peripheral nerves of postnatally undernourished and rehabilitates young rhesus monkeys. **Indian journal of experimental biology**, 29: 385-390, 1991.

REDDY, P.V.; DAS, A.; SASTRY, P.S. Quantitative and compositional changes in myelin of undernourished and protein malnourished rat brains. **Brain research**, 161:227-235, 1979.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified Diets for laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, 123: 1939-1951, 1993.

REICHERT, F.; SAADA, A.; ROTSHENKER, S. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. **The Journal of Neuroscience**, 14(5): 3231 – 3245, 1994.

SANDERS, F.K. The repair of large gaps in the peripheral nerves. **Brain**, 65:281-337, 1942.

SAWAYA, A.L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, 20 (58): 147-158, 2006.

SCHMIDT, C.E.; LEACH, J.B. **Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. Annual Review of Biomedical Engineering**, 5:293–347, 2003.

SECKEL, B.R. Enhancement of peripheral nerve regeneration. **Muscle Nerve**, 13:785-800, 1990.

SEGURA, B.; GUADARRAMA, J.C.; PRATZ, G.; MERCADO, V.; MERCHANT, H.; CINTRA L.; JIMÉNEZ, I. Conduction failure of action potentials in sensory sural nerves of undernourished rats. **Neuroscience Letters**, 354:181–184, 2004.

SILVA, V.C.; ALMEIDA, S.S. Desnutrição protéica no início da vida prejudica memória social em ratos adultos. **Revista de nutrição**, 19(2): 195-201, 2006.

SILVA, H.J.; BARROS, K.M.F.T.; CUNHA, D.A.; SANTOS, F.A.S.; SOARES, E.B.; SILVA, C.N.S.; MORAES, S.R.A.; CASTRO, R.M. Malnutrition and Somatic Development: Application of Protocol of Mensuration to Evaluation of

Indicators of Wistar Rats. **International Journal of Morphology**, 24(3):469-474, 2006.

SIMA, A.; SOURANDER, P. The effect of pre- and postnatal undernutrition and axonal growth and myelination of central motor fibers. **Acta neuropathology**, 42:15-18, 1978.

SOUZA, I.P.; KANG, H.C.; NARDINELLI, L.; BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeito sobre o espraçamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 37(2): 143 – 151, 2001.

STURMAN, J.A.; DEVINE, E.; RESNICK, O.; MORGANE, P.J. Maternal protein malnutrition in the rat: effect on protein and two enzymes in the milk. **Nutrition Research**, 6: 437-442, 1986.

TANTUWAYA, V.S.; BAILEY, S.B.; SCHMIDT, S.E.; VILLADIEGO, A.; TONG, J.X.; RICH, K.M. Peripheral nerve regeneration through silicone chambers in streptozocin-induced diabetic rats. **Brain Research**, 759: 58–66, 1997.

TATLIA, M.; GUZELA, A.; KIZILB, G.; KAVAKC, V.; YAVUZZB, M. KIZILB, M.; Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. **Brain Research** 1156: 21–30, 2007.

TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of anatomy**, 194: 1-14 199.

TOFARIS, G.K., PATTERSON, P.H., JESSEN, K.R., MIRSKY, R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **Journal of Neuroscience**, 22: 6696–6703, 2002.

VARGAS, V.; VARGAS, R.; MARQUEZ, G.; VONASEK, E.; MATEU, L.; LUZZATI, V.; BORGES, J. Malnutrition and myelin structure: an X-ray scattering study of rat sciatic and optic nerves. **The European Biophysics Journal**, 29:481-486, 2000.

VERDÚ, E.; BUTI, M.; NAVARRO, X. The effect of aging on efferent nerve fibers regeneration in mice. **Brain Research**, 696: 76-82, 1995.

YAMANO, Y. Experimental study of interfascicular grafts in the peroneal nerve of the rabbit. **Archive of Orthopaedics Traumatic Surgery**, 99(6): 97-103, 1981.

Fontes Consultadas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Informação e documentação – referências - apresentação: NBR 6023:2005. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

_____. Informação e documentação – numeração progressiva das seções de um documento escrito – apresentação: NBR6024:2003. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

_____. Informação e documentação – sumário – apresentação: NBR 6027:2003. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

_____. Informação e documentação – citações em documentos – apresentação: NBR 10520:2002. Rio de Janeiro: ABNT, 2002

_____. Informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação: NBR 14724:2005. 2.ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

ANEXOS

Anexo A – Composição nutricional das dietas dos animais

Composição da dieta à base de caseína (*)

CASEÍNA a 8%		CASEÍNA a 17%	
Ingredientes	Quantidade por Kg de ração	Ingredientes	Quantidade por Kg de ração
Caseína	79,30g	Caseína	179,30g
Mix de vitamina	10,00g	Mix de vitamina	10,00g
Mix de sais minerais	35,00g	Mix de sais minerais	35,00g
Celulose	50,00g	Celulose	50,00g
Bitartarato de colina	2,50 g	Bitartarato de colina	2,50 g
DL-metionina	3,00g	DL-metionina	3,00g
Amido	750,20g	Amido	650,20g

(*) fonte: (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993).

Composição da dieta padrão de biotério - Labina

ENRIQUECIMENTO (Kg DE RAÇÃO)*:		NÍVEIS DE GARANTIA*:	
Vitamina A	20000UI	Umidade (máx.)	13%
Vitamina D ₃	6000 UI	Proteína (mín.)	23%
Vitamina E	30 UI	Extrato Etéreo (mín.)	2.5%
Vitamina K	6 mg	Matéria Fibrosa (máx.)	9.0%
Vitamina B ₁₂	10 µg	Matéria Mineral (máx.)	8.0%
Vitamina B ₂	8 mg	Cálcio (máx.)	1.8%
Pantotenato de Cálcio	24 mg	Fósforo (mín.)	0.0%
Niacina	95 mg	COMPOSIÇÃO BÁSICA (Segundo a Agribrands do Brasil Ltda)*: Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz Cru, Carboneto de Cálcio, Fosfato Bicálcico, Sal, Pré-mix.	
Tiamina	4 mg		
Colina	2000 mg		
Piridoxina	6 mg		
Biotina	0.1 mg		
Ácido Fólico	0.5 mg		
Manganês	50 mg		
Iodo	2 mg		
Ferro	65 mg		
Zinco	35 mg		
Cobre	26 mg		

* Composição da dieta segundo Purina do Brasil

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa animal

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 61/07

Recife, 06 de julho de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Profa. Silvia Regina Arruda de Moraes**
Departamento de Anatomia - UFPE
Processo nº 004721/2007-95

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO NA REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE ANIMAIS DESNUTRIDOS”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Silene Carneiro
Prof. Silene Carneiro do Nascimento



Presidente CEEA