

OSVALDO BENEDITO RODRIGUES

**REGENERAÇÃO AXONAL DURANTE ADMINISTRAÇÃO
SISTÊMICA DE TIAMINA, PIRIDOXINA E
CIANOCOBALAMINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Biologia Buco-Dental,
área de Anatomia.

Piracicaba
2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

000319391

OSVALDO BENEDITO RODRIGUES

**REGENERAÇÃO AXONAL DURANTE ADMINISTRAÇÃO
SISTÊMICA DE TIAMINA, PIRIDOXINA E
CIANOCOBALAMINA**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/93
CPG. 21 / 03/03
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Amélia de Lima Castro

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Heloisa Amélia de Lima Castro

Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Prof. Dr. Arthur Oscar Schelp

Piracicaba
2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	R618r
V	EX
TOMBO BCI	53685
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/06/03
Nº CPD	

CM00185487-7

010 ID 293045

Ficha Catalográfica

R618r Rodrigues, Osvaldo Benedito.
 Regeneração axonal durante administração sistêmica de tiamina, piridoxina e cianocobalamina. / Osvaldo Benedito Rodrigues. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 x, 91f. : il.

 Orientadora: Profª Drª Heloisa Amélia de Lima Castro.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

 1. Nervos. 2. Sistema nervoso – Regeneração. 3. Vitamina B – Complexo. I. Castro, Heloisa Amélia de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2003, considerou o candidato OSVALDO BENEDITO RODRIGUES aprovado.

1. Profa. Dra. HELOISA AMELIA DE LIMA CASTRO

2. Prof. Dr. ARTHUR OSCAR SCHELP

3. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

"Deêm graças ao **Senhor** pelo seu constante amor e pelas suas maravilhas para com os filhos dos homens. Ofereçam sacrifícios de louvor e relatem as suas obras com regozijo"

Salmo 107:21,22

Ao **Senhor**, que nos capacitou para realizar este trabalho, bem como deu-me: Elisabeth, minha mulher, Ana, Sara e Natália, nossas filhas. Assim foi possível este trabalho.

A **Ele** seja toda honra e glória.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

A Profa. Dra. Heloísa Amélia de Lima Castro, do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, pela orientação competente e segura, bem como o empenho na obtenção do material utilizado para a elaboração deste trabalho.

Ao Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, na pessoa de seu chefe, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, pelo uso do microscópio eletrônico de transmissão EM 10 - Zeiss, fotomicroscópio Zeiss, bem como todo material necessário para processamento do nervo até a finalização do trabalho.

A Bióloga Eliene A. Orsini Narvaes Romani, responsável técnica pela área de microscopia eletrônica do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, pelo esmero no árduo trabalho, desde o processamento inicial do material até a obtenção das fotos.

A Profa. Dra. Glaucia Maria Bovi Ambrosano do Departamento de Odontologia Social, área de Bioestatística da FOP-UNICAMP, pela pacienzosa orientação da análise estatística dos dados.

Ao Técnico em bioterismo Wanderlei Francisco Vieira, pela orientação no trato com os animais, bem como no auxílio aos procedimentos feitos.

A Heloisa Maria Ceccotti, Bibliotecária da FOP-UNICAMP, pelo trabalho de revisão técnica de todo este estudo.

A Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, na pessoa de sua diretora Profa. Dra. Marilza R. Ramos, pelo fornecimento dos animais.

*"O Temor do Senhor é o
princípio do conhecimento,
mas os loucos desprezam a
sabedoria e a instrução"*

Provérbios 1:7

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 ASPECTOS DO NERVO	9
2.2 RESPOSTAS DO NERVO FRENTE A INJÚRIA	14
2.2.1 Degeneração Walleriana	14
2.2.2 Desmielinização Segmentar	18
2.2.3 Degeneração Axonal	19
2.3 ASPECTOS SOBRE AS VITAMINAS	21
2.3.1 Histórico	21
2.3.2 Tiamina	25
2.3.3 Piridoxina	26
2.3.4 Cianocobalamina	28
2.4 REGENERAÇÃO NERVOSA E VITAMINAS	30
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 ANIMAIS	38
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	38
4.3 ALCOOLIZAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	39

4.4 ADMINISTRAÇÃO DE VITAMINAS	41
4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	42
4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA	43
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	46
5 RESULTADOS	47
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS ANIMAIS	47
5.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS NERVOS NORMAIS	47
5.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS NERVOS REGENERADOS	47
5.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRA-ESTRUTURAIS DOS NERVOS NORMAIS	48
5.5 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRA-ESTRUTURAIS DOS NERVOS REGENERADOS	50
5.6 ANÁLISE QUANTITATIVA	51
6 DISCUSSÃO	53
6.1 MODELO EXPERIMENTAL	53
6.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO	54
6.3 SOBRE REGENERAÇÃO AXONAL	56
6.4 DOSE DAS VITAMINAS	64
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Animal sob efeito anestésico já posicionado para infiltração com álcool etílico a 95%	82
FIGURA 2 - Nervo isquiático esquerdo normal	83
FIGURA 3 - Nervo isquiático esquerdo regenerado	84
FIGURA 4 - Fotomicrografia do nervo isquiático normal	84
FIGURA 5 - Fotomicrografia do nervo isquiático normal	85
FIGURA 6 - Fotomicrografia do nervo isquiático regenerado	85
FIGURA 7 - Fotomicrografia do nervo isquiático regenerado	86
FIGURA 8 - Fotomicrografia do nervo isquiático um dia após alcoolização	86
FIGURA 9 - Fotomicrografia do nervo isquiático 5 dias após alcoolização	87
FIGURA 10 - Fotomicrografia do nervo isquiático regenerado	87
FIGURA 11 - Elétronmicrografia do nervo isquiático normal	88
FIGURA 12 - Elétronmicrografia do nervo isquiático normal	88
FIGURA 13 - Elétronmicrografia do nervo isquiático normal	89
FIGURA 14 - Elétronmicrografia do nervo isquiático normal	89
FIGURA 15 - Elétronmicrografia do nervo isquiático regenerado	90
FIGURA 16 - Elétronmicrografia do nervo isquiático regenerado	90

RESUMO

As vitaminas do complexo B são importantes tanto no metabolismo do sistema nervoso central como periférico. Sua deficiência pode causar degeneração do axônio ou da bainha de mielina das fibras nervosas; sendo porém revertido o quadro quando da sua administração. Varias patologias do sistema nervoso periférico causam lesão da bainha de mielina, ou do axônio ou de ambos. Assim o uso de vitaminas está indicado como medida de tratamento, porém há controvérsia a respeito. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da tiamina, piridoxina e cianocobalamina durante a regeneração axonal. Ratos adultos foram divididos em três grupos: I II III. Nos animais dos grupos I e II foi injetado álcool etílico a 95% no nervo isquiático esquerdo, levando a degeneração da bainha de mielina e do axônio das fibras nervosas. Os animais do grupo I receberam via oral tiamina, piridoxina e cianocobalamina diariamente, os do grupo II não receberam-nas e os animais do grupo III foram usados para análise morfoquantitativa do nervo isquiático normal. Após 60 dias da infiltração com álcool etílico a 95%, o nervo isquiático esquerdo de todos os animais foi removido, processado para microscopia de luz e eletrônica, submetido à análise quantitativa e qualitativa. Os resultados mostraram não haver diferenças histológicas entre os grupos I e II. A análise do número médio de axônios mielínicos e da área média da secção transversa mostraram não haver diferença significativa entre os três grupos. Não foram observados sinais de intoxicação vitamínica com a dosagem utilizada.

ABSTRACT

The vitamin B complex are important in the metabolism of the central and peripheral nervous system. Its deficiency can lead to the disintegration of the myelin sheath and to the to axonal damage, and can be relieved by appropriated therapeutic measures. Several diseases of the peripheral nervous system may lead damage in the myelin sheath or in the axon or both. This fact has lead to the recommendation that vitamins B complex can be administrated as a therapeutic method, but there is controversy about this. The aim of this work was to study the influency of the thiamine, pyridoxine and cobalamine in the course of axonal regeneration. Fully-grown rats were divided in three groups: I II III. In the animals of the groups I and II were injected ethylic alcohol in concentration of 95% in de left ciatic nerve, what promoted degeneration of the myelin sheat and the axon of the nerve fibers. The animals of the group I daily received thiamine, pyridoxine and cobalamine by oral way, that of the group II do not received the vitamins and that of the group III were used to provide histological and quantitative data of the normal catic nerve. Sixty days after the application of ethylic alcohol - 95%, the left ciatic nerve of all animals were removed, processed for light and electron-microscopy, and carried to a histological and quantitative analysis. The results showed no histological differences between the groups I and II. The analysis of the number of the myelinic axons and the value of the cross section area showed no significant difference among the three groups. It was not seen any sign of intoxication by vitamins, with the doses used in the present study.

1 INTRODUÇÃO

Mesmo que fosse fornecida uma dieta quimicamente balanceada composta por proteínas, carboidratos, gorduras, todos os sais minerais necessários, a vida não poderia ser mantida. Seriam necessários fatores adicionais existentes nos alimentos naturais, embora em quantidades mínimas. Tais fatores são as vitaminas (HARPER, 1977).

São agrupadas em lipossolúveis e hidrossolúveis (ou do complexo B por razões históricas). Neste último grupo é que se enquadram a tiamina, piridoxina e cianocobalamina. As vitaminas do complexo B têm importante papel no metabolismo, tanto do sistema nervoso central como periférico (SINCLAIR, 1956; DAKSHINAMURTI, 1982).

A tiamina atua no metabolismo dos carboidratos, na síntese de mielina e parece servir como modulador da transmissão neuromuscular (COMBS, 1992).

A piridoxina atua no metabolismo de aminoácidos, e sua carência no homem promove neurite periférica associado com edema e hipersensibilidade de sinóvias (MARCUS & COULSTON, 1987).

A cianocobalamina tem participação importante na correção de distúrbios neurológicos, pois sua deficiência promove uma difusa e progressiva desmielinização do sistema nervoso periférico chegando até as colunas lateral e posterior da medula espinhal (KARNAZE & CARMEL, 1990; LOVBLAD et al., 1997; AL-SHUBAILI et al., 1998).

O nervo, estrutura integrante do sistema nervoso periférico, é constituído por milhares de fibras mielínicas e amielínicas, mantidas unidas por tecido conjuntivo; nutridas por uma série de vasos sanguíneos com muitas anastomoses entre si (HAM & CORMACK, 1983).

A fibra nervosa é constituída pelo axônio, envolto pela bainha de mielina, que é produzida pelas células de Schwann através do mecanismo de enrolamento. Estas células se dispõem em toda a extensão da fibra nervosa formando uma bainha, ocorrendo estrangulamentos desta a intervalos regulares nos chamados nódulos de Ranvier. Isto ocorre nas fibras mielínicas. Nas fibras amielínicas a célula de Schwann não realiza enrolamento no axônio e uma única célula de Schwann pode envolver vários axônios (FAWCETT, 1986; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Frente a um processo lesional do nervo, os achados essenciais da sua reação podem ser sumarizados em três categorias: degeneração Walleriana e regeneração, desmielinização segmentar e degeneração axonal, (RICHARDSON, 1995).

A degeneração Walleriana ocorre quando o axônio em algum ponto de seu trajeto é desconectado do seu centro trófico. No coto proximal à lesão o axônio degenera até o primeiro ou o segundo nó de Ranvier seguinte, podendo ocorrer cromatólise no corpo celular se a lesão for muito próxima a este. Distalmente à lesão tanto o axônio como a bainha de mielina se desintegram sendo digeridos pelas células de Schwann que proliferam, e por macrófagos. No processo de regeneração ocorre formação de muitos brotos a partir da extremidade distal do segmento sobrevivente do axônio, que não encontrando obstrução, irão crescer até o coto distal ao longo de um trajeto no tronco nervoso (LUNDBORG, 1987; ROBINS & COTRAN, 1991; RICHARDSON, 1995).

A desmielinização segmentar é a situação na qual frente a determinadas patologias, segmentos internodais de mielina são destruídos,

deixando os axônios intactos. Foi descrito inicialmente por Gombault em 1880 (RICHARDSON, 1995).

A degeneração axonal ocorre quando há uma disfunção inicialmente no corpo celular fazendo com que este se torne incapaz de manter seu axônio. A degeneração começa na porção periférica do axônio e avança em direção ao corpo celular, processo também conhecido como degeneração retrógrada (ROBINS & COTRAN, 1991; RICHARDSON, 1995).

Nas síndromes por deficiência de tiamina, piridoxina e cianocobalamina ocorre dano da bainha de mielina e do axônio; sendo revertido se corrigida tal deficiência (ADAMS & VICTOR, 1996).

Há possibilidade que no caso de lesões nervosas com acometimento da bainha de mielina e ou axônio, as vitaminas tenham sua indicação no processo de regeneração, mesmo não havendo sintomas de deficiência. Existe controvérsia a este respeito; alguns trabalhos mostram atuação positiva das vitaminas no processo de regeneração (HASEGAWA et al., 1973; YAMATSU et al., 1976ab; YAGIHASHI et al., 1982; ELLIS, 1987; SONOBE et al., 1988; SAKITAMA et al., 1989; BECKER et al.1990; WATANABE et al., 1994; FUJII et al., 1996;), outros mostram não haver

(AMADIO, 1985; MISUMI et al., 1985; JACOBSON et al., 1996; BENDER, 1999).

Assim, este trabalho tem por objetivo analisar as características do nervo regenerado durante a administração sistêmica das vitaminas: tiamina, piridoxina e cianocobalamina em ratos wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS DO NERVO

O Sistema Nervoso desenvolve-se a partir da placa neural, estrutura que aparece no final da terceira semana de vida fetal, consistindo do espessamento do ectoderma e localizando-se dorsal e rostralmente à linha primitiva. Cresce progressivamente tornando-se espessa na sua região central, formando um sulco no sentido longitudinal, sulco neural, que vai se aprofundando para formar a goteira neural, ficando nas suas bordas as pregas neurais, uma em cada lado (CARPENTER, 1978).

As bordas se fundem juntamente com as pregas neurais formando o tubo neural. Quando as pregas neurais se fundem algumas células do ectoderma da margem da placa neural não se incorporam ao tubo neural, formando uma lâmina na parte dorsal no sentido longitudinal de cada lado do tubo neural, é a crista neural. O tubo neural dá origem a elementos do sistema nervoso central, enquanto a crista neural origina a maior parte do sistema nervoso periférico, dentre estes os nervos. (PATTEN, 1953; CARPENTER, 1978; MOORE, 1978; MACHADO, 1980).

O nervo, estrutura em forma de cordões cilíndricos esbranquiçados, é formado por feixes de fibras nervosas envolvidas por bainhas de tecido conjuntivo, nutrido por uma grande quantidade de vasos que se anastomosam livremente. Há artérias e arteríolas a nível epineural, interfascicular, perineural, intrafascicular e endoneural. Artérias nutridoras que partem de vasos fora do nervo penetram neste, freqüentemente ao longo de seu curso comunicando-se com os vasos neurais (HAM & CORMACK, 1983).

A fibra nervosa é formada por um axônio envolto por células de Schwann, originadas das células da crista neural, dispondo-se em todo seu comprimento formando a bainha de Schwann ou neurolema (FAWCET, 1986).

O axônio é um prolongamento delgado, geralmente longo, do corpo celular do neurônio que se origina a partir de uma massa cônica do protoplasma especializado chamado cone de implantação ou cone axonal. Desde sua porção inicial contém neurofilamentos, microtúbulos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, e vesículas (CARPENTER, 1978).

No nervo existem axônios mielínicos e amielínicos; nos axônios mielínicos há a bainha de mielina, estrutura formada pelas células de

Schwann. Inicialmente uma célula de Schwann envolve um axônio fazendo com que o mesmo fique localizado dentro de uma fenda do seu citoplasma.

A partir daí a célula de Schwann começa a girar de forma espiral em torno do axônio formando uma estrutura multilamelar composta por lipídeos e proteínas. Quanto maior o número de voltas, mais espessa é a bainha de mielina que ocorre em toda extensão do axônio e apresenta estrangulamentos a intervalos regulares; os nodos de Ranvier. A bainha de mielina apresenta grande capacidade de isolamento elétrico aumentando assim a velocidade e a eficiência do estímulo nervoso (RICHARDSOM, 1995; GUYTON & HALL, 1997).

Nos axônios amielínicos não existe a bainha de mielina. Nestes uma célula de Schwann envolve entre 5 e 25 axônios, não fazendo enrolamento em espiral. As células de Schwann se unem lateralmente formando uma bainha contínua, não existindo os nodos de Ranvier. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Aspecto interessante é a presença da membrana basal revestindo cada célula de Schwann. A membrana basal é contínua em toda a extensão do axônio não sendo interrompida nem mesmo nos nodos de Ranvier. É

sintetizada pelas células de Schwann, composta por: fibras de colágeno tipo IV, glicoproteínas (laminina e entactina) e proteoglicanas como heparan-sulfato. Pode ser dividida em três camadas distintas: a primeira é a lâmina lúcida, situada mais próxima a membrana das células de Schwann, correspondendo a região elétron-lucente quando analisada a microscopia eletrônica; a segunda é a lâmina densa, situada entre a lâmina lúcida e lâmina reticular, apresentado-se elétron-densa à microscopia eletrônica; a terceira é a lâmina reticular, localizada entre a lamina densa e o endoneuro (ALBERTS et al., 1989).

A membrana basal tem importante papel na regeneração do nervo, pois mantendo-se íntegra frente à lesão do mesmo serve como arcabouço aos axônios em regeneração (ALBERTS et al, 1989; IDE et al., 1983).

As bainhas conjuntivas são representadas pelo endoneuro, perineuro e epineuro sendo responsáveis pelo suporte e nutrição do nervo.

O endoneuro envolve cada fibra nervosa dispondo-se longitudinalmente a esta. É constituído principalmente por fibras reticulares e colágenas tipo III sintetizadas pelas células de Schwann, substância

fundamental homogênea. e poucos fibroblastos (CARPENTER, 1978; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O perineuro envolve externamente cada fascículo. É composto por camadas de células achatadas, com membrana basal espessa, dispostas concêntricas e longitudinalmente em relação às fibras nervosas. As células das camadas mais profundas apresentam citoplasma ligeiramente granular com mitocôndrias esparsas e vesículas de paredes rugosas. Também foram encontradas fibras colágenas e reticulares (CARPENTER, 1978; RICHARDSON, 1995). Segundo LUNDBORG, (1987) o número de camadas do perineuro varia conforme o diâmetro dos fascículos envolvidos.

O epineuro é a camada mais externa envolvendo os fascículos nervosos. É composto por fibras colágenas dispostas longitudinalmente às fibras nervosas. Estas fibras são mais espessas que as do endoneuro e perineuro. São encontrados também mastócitos macrófagos e fibroblastos.

As bainhas conjuntivas juntamente com os vasos sanguíneos, além do papel mecânico e suporte nutricional formam uma barreira contra a entrada de microorganismos e macromoléculas, tendo também participação importante nos processos de reparação dos nervos (RICHARDSON, 1995).

2.2 RESPOSTAS DO NERVO FRENTE A INJÚRIA

Diferentemente do sistema nervoso central o sistema nervoso periférico tem grande capacidade de regeneração. Frente a uma agressão o nervo apresentara as seguintes reações: Degeneração Walleriana e Regeneração, Desmielinização Segmentar e Degeneração Axonal (ROBBINS & COTRAN, 1991; RICHARDSON, 1995).

2.2.1 Degeneração Walleriana

Quando um axônio é lesado, havendo descontinuidade com seu centro trófico ocorrem alterações no corpo celular, na extremidade proximal, e na extremidade distal a lesão (CARPENTER, 1978).

Há paralisia imediata dos músculos bem como perda da sensibilidade no território inervado por estes axônios. Ocorre um aumento do volume do corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia, e alterações na estrutura do citoplasma; é a cromatólise (FAWCETT & KEYNES, 1990).

Esta reação reflete a preparação metabólica para reposição do volume axoplasmático devido a perda do segmento distal do axônio, ocorrendo um aumento na concentração de R. N. A. para a síntese protéica. As reações do corpo celular variam conforme a proximidade da lesão; lesões muito próximas podem levá-lo a morte (LUNDBORG, 1987).

Ainda na porção proximal da fibra presa ao corpo celular, as alterações degenerativas em direção ao corpo celular estendem-se por uma distância de 1 a 2 internodos (CARPENTER, 1978). Estas alterações são semelhantes àquelas que ocorrem na porção distal à lesão.

Cerca de 20 horas após a injúria, começam a aparecer múltiplos brotos de regeneração na porção mais distal da parte proximal dos axônios. De um único neurônio podem se originar até 25 destes brotamentos que avançam em direção a porção distal (FAWCETT & KEYNES 1990; RICHARDSON, 1995).

Na porção mais distal de cada broto existe uma intumescência, o cone de crescimento, da qual se originam várias espículas ou filopódios os quais exploram o ambiente através de constantes movimentos. Quantidades

consideráveis de actina têm sido demonstradas nestes indicando papel importante na sua mobilidade (LUNDBORG, 1987; BUETTNER, 1995).

Na porção distal à lesão os axônios e a bainha de mielina se desintegram completamente em toda extensão do axônio até a sua arborização terminal (CARPENTER, 1978). As primeiras alterações na porção terminal podem ser visualizadas à microscopia eletrônica sendo caracterizadas por desintegração das estruturas do citoesqueleto (microtúbulos e neurofilamentos), com acúmulo de *granularis debris* no citoplasma. A membrana celular axonal desaparece, os axônios começam a se fragmentar mantendo-se ainda a bainha de mielina envolvendo os axônios remanescentes até que também esta se desintegre sendo fagocitada por macrófagos e células de Schwann (RICHARDSON, 1995).

As células de Schwann começam a se proliferar intensamente ficando mais alongadas, seus processos se interdigitam permanecendo envolvidas pela membrana basal, a qual forma como que um tubo em torno das mesmas. A medida que seu número vai aumentando vão se dispondo em cadeias longitudinais no interior destes tubos formando as bandas de Bungner

que apresentam papel importante na regeneração do nervo (LUNDBORG, 1987; RICHARDSON, 1995).

Cerca de um a dois dias após a lesão os macrófagos provenientes da circulação aumentam em número no local da degeneração, passando pela membrana basal da célula de Schwann fagocitam os restos da bainha de mielina e dos axônios (RICHARDSON, 1995).

No processo de regeneração, a nível do corpo celular, ocorre aparecimento dos corpos de Nissl em torno da membrana nuclear, o nucléolo toma sua posição central e o corpo vai gradualmente voltando ao seu volume normal. (CARPENTER, 1978).

A medida que o processo regenerativo continua os brotos axonais entram nas bandas de Bungner formando como que cachos de axônios em regeneração envolvidos pela membrana basal das células de Schwann. Gradualmente os axônios, aumentam em diâmetro chegando próximo daquele dos quais se originaram. (LUNDBORG, 1987)

As células de Schwann nas bandas reorganizam-se de maneira que a relação célula de Schwann/axônio regenerado seja 1:1, semelhantemente

como ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Estas células de Schwann irão promover a formação da bainha de mielina, que será mais fina e com internódios mais curtos, em relação às fibras normais. (RICHARDSON, 1995).

A membrana basal das células de Schwann desempenha papel fundamental não somente no direcionamento dos axônios em regeneração, como também na manutenção e maturação dos mesmos (IDE et al., 1983; TERENCEHI, 1999).

Os macrófagos são recrutados para o local da lesão durante a primeira semana pós-lesão, contribuindo para a lise e fagocitose da mielina e subsequente proliferação das células de Schwann. Tanto as células de Schwann como os macrófagos secretam substâncias mitogênicas e fatores de crescimento que atuam no processo de regeneração axonal e mielinização (PERRY & BROWN, 1992; TERENCEHI, 1999).

2.2.2 Desmielinização Segmentar

É caracterizada pela perda seletiva de internódios de mielina com preservação dos neurônios (RICHARDSON, 1995; ROBBINS, & COTRAN,

1991). São encontrados ao exame histopatológico, áreas de desmielinização (nos cortes transversais) ou distribuição segmentar de desmielinização (em cortes longitudinais) Assim que cesse o processo patológico que induziu a desmielinização, ocorre remielinização por células de Schwann que se proliferam no local lesado, porém os novos segmentos de mielina são mais curtos e delgados (RICHARDSON, 1995).

Tanto em circunstâncias clínicas como experimentais, episódios repetidos de desmielinização alternando com mielinização ocorrem. A medida que estes ocorrem as células de Schwann vão se dispondo em círculos em torno dos axônios juntamente com as fibras conjuntivas formando estruturas denominadas bulbos de cebola (ROBBINS & COTRAN, 1991; RICHARDSON, 1995).

2.2.3 Degeneração Axonal

Diferentemente da degeneração Walleriana que é resultado abrupto da perda da continuidade da fibra nervosa, na degeneração axonal os eventos celulares e intersticiais ocorrem de maneira lenta conseqüente a processo patológico de instalação lenta (RICHARDSON, 1995).

Várias são as patologias que podem levar a degeneração axonal, entre estas a deficiência nutricional por vitaminas do complexo B (RICHARDSON, 1995; ADAMS & VICTOR, 1996).

Sugere-se que em algum instante no axônio inicia-se degeneração na porção mais distal com relação ao corpo celular e esta progride em direção ao mesmo. Tem-se postulado que o sitio inicial da lesão é o corpo celular onde ha incapacidade deste para manter o axônio em toda sua extensão, resultando degeneração retrógrada do mesmo (ROBBINS & COTRAN, 1991).

A presença da degeneração axonal é diagnosticada ao exame histológico, em cortes transversais do nervo, pelo número diminuído de axônios mielínicos e amielínicos, acompanhado de grande quantidade de tecido conjuntivo (RICHARDSON, 1995).

2.3 ASPECTOS SOBRE AS VITAMINAS

2.3.1 Histórico

Conforme COMBS (1992), há cerca de 2600 anos aC. já era descrito pelos Chineses uma doença onde os pacientes apresentavam apatia, dores, formigamento pelo corpo, e diminuição de força muscular. Esta patologia apresentava grande incidência na população Asiática, onde a dieta era constituída basicamente de arroz branco (arroz polido). Tal doença é conhecida hoje como Beribéri, cujo termo significa fraqueza em Cingalês (DORLAND, 1994), língua falada na antiga Ilha do Ceilão hoje República do Srilanka. Nesta patologia ocorre lesão do sistema nervoso periférico e coração, causada por ingestão deficiente de tiamina.

Em 1860, na marinha Japonesa, cerca de um terço dos marinheiros apresentavam quadro clínico compatível com Beribéri. Em 1870, após estudos feitos por Takaki, diretor do centro médico naval Japonês, foi acrescentado na dieta dos marinheiros, vegetais, peixe, carne bovina e cevada. Como resultado a incidência desta patologia caiu de 40% para praticamente 0% em 1875. Assim acreditou Takaki que o beribéri era causado por uma dieta pobre em

proteínas e excessiva em carboidratos. Mesmo não estando correto em relação a causa da doença lançou uma luz para sua etiologia e também para descoberta das vitaminas, ao correlacionar a doença com dieta.

Em 1886 Christian Eijkman, juntamente com outros pesquisadores, foi enviado para onde hoje é Jacarta na Indonésia, para investigar a causa do Beribéri, pois sua incidência era bastante alta naquela região.

Tendo sido aluno de Robert Kock, eminente bacteriologista, realizou uma série de exames de sangue, saliva e inoculação destes em animais no sentido de reproduzir a doença, como tentando encontrar causa bacteriológica. Não obteve sucesso. Porém passou a observar que certas galinhas que ficavam em seu laboratório apresentavam-se fracas ficando praticamente imóveis, outras andavam com dificuldade, outras chegavam até a morrer; sinais estes presentes em pessoas com beribéri. Após algum tempo as galinhas sobreviventes apresentavam melhora do quadro. Foi então verificar os relatórios feitos pelos seus assistentes que tratavam das aves e notou que no período que estavam doentes, receberam arroz branco (arroz polido), no período que apresentaram melhora receberam arroz marrom (arroz não polido). Com esse fato em mente realizou uma série de experimentos nas

aves e observou que quando recebiam arroz polido ficavam com sintomas de beribéri, sendo revertido o quadro quando recebiam arroz não polido. Assim estava claro que havia algo na casca do arroz que protegia as aves da doença. Propôs então num ensaio clínico, que se dessem dois tipos de dieta aos prisioneiros de Java: uma com arroz polido, outra com arroz não polido. Foi clara a grande incidência de casos de beribéri entre aqueles que receberam arroz polido, e praticamente zero entre os que receberam arroz não polido. Prosseguindo seus trabalhos, em 1897 encontrou aquilo que chamou de fator antipolineurítico, ou antiberibéri, que podia ser extraído da casca do arroz com água ou álcool.

Em 1906, juntamente com outro pesquisador, Grijns, publicaram em trabalho: "Há no material proveniente do polimento do arroz uma substância diferente de proteínas, e sais minerais que é indispensável para a saúde e cuja ausência causa polineurite nutricional."

Este fato estimulou muitos pesquisadores a trabalharem no sentido de isolar esta substância da casca do arroz, entre estes Casimir Funk, bioquímico Polonês que trabalhando na Inglaterra acreditou ser uma amina tal fator e assim como era vital para a vida denominou-o vitamina.

O nome não foi alterado embora se reconhecesse posteriormente que os fatores alimentares dessa classe não são necessariamente aminas nem tem estrutura relacionada com as aminas (MARCUS & COULSTON, 1987).

Osborne e Mendel em 1913 haviam demonstrado na manteiga a presença de um fator necessário para o crescimento de ratos. Permanecia uma dúvida se este fator de crescimento era o mesmo que vitamina.

Em 1915 Maccollum e Davis demonstraram que haviam de fato pelo menos dois fatores nos alimentos, necessários para o desenvolvimento normal de ratos. Um deles podia ser extraído usando solventes para gordura, outro usando água. Assim chamou ao primeiro de fator solúvel A e ao segundo de fator solúvel B. Trabalhos seguintes mostraram que o fator solúvel B não só era necessário para o crescimento dos ratos como prevenia polineurite em galinhas. Por isso ficou claro que o fator B solúvel em água ou hidrossolúvel era idêntico ao fator antiberibéri de Funck que já havia sido descrito como uma vitamina; então passou a ser conhecido como vitamina B.

Trabalhos posteriores identificaram que a vitamina B, na realidade era constituída por um grupo de substâncias importantes para o desenvolvimento de animais e dos homens. Essas substâncias foram

originalmente agrupadas em conjunto pois podiam ser extraídas em alta concentração de certos alimentos como fígado e lêvedo, nos quais o fator B antiberibéri havia sido identificado.

Quando foram reconhecidos separadamente ingredientes ativos no fator B receberam as denominações de vitamina B₁, vitamina B₂, e assim por diante. Esses nomes foram substituídos posteriormente por designações químicas. Apesar de apresentarem estrutura química e funções diferentes, sua classificação conjunta até hoje justifica-se pela semelhança de suas fontes dietéticas e pela tendência que as doenças carenciais apresentam de envolver a ingestão inadequada de mais de um membro do grupo. (COMBS, 1992).

2.3.2 Tiamina

Foi isolada na forma cristalina em 1926 por Jansen e Donath, em 1936 sua estrutura foi determinada por Williams. O Council on Pharmacy and Chemistry dos Estados Unidos adotou o nome de tiamina para designar a vitamina B₁ cristalina, sendo atualmente o nome oficial da vitamina na USP (MARCUS & COULSTON, 1987)

A forma fisiologicamente ativa da tiamina é o pirofosfato de tiamina, que atua no metabolismo de carboidratos como coenzima na descarboxilação de alfa cetoácidos, e na utilização de pentoses no desvio de monofosfato de hexose, função que envolve a enzima transcetolase, dependente de pirofosfato de tiamina; participa também como modulador da transmissão neuronal (MARCUS & COULSTON, 1987; COMBS, 1992).

Nos casos de deficiência de tiamina, seja a nível experimental ou clínico, ocorre degeneração da bainha de mielina e dos axônios dos nervos (SINCLAIR, 1956; NISHINO & ITOKAWA, 1977; ROBBINS & COTRAN, 1991; RICHARDSON, 1995; ADAMS & VICTOR, 1996; GUYTON & HALL, 1997).

2.3.3 Piridoxina

Em 1936, Gyorgy, distinguiu do fator B₂, (vitamina B₂) um outro fator hidrossolúvel, cuja deficiência em ratos causava um tipo de dermatite, chamando-o de vitamina B₆. A estrutura da vitamina foi elucidada em 1939. Mostrou-se que vários compostos naturais relacionados (piridoxal, piridoxina, piridoxamina) possuíam as mesmas propriedades biológicas e por isso

deveriam ser chamadas de vitamina B₆. No entanto o Council on Pharmacy and Chemistry dos Estados Unidos deu a vitamina a denominação de piridoxina. As formas fisiologicamente ativas da vitamina B₆ são: fosfato de piridoxal e fosfato de piridoxamina (MARCUS & COULSTON, 1987).

O fosfato de piridoxal atua como coenzima em numerosas reações químicas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, e de proteínas. Seu papel mais importante é atuar no processo de transaminação para a síntese de aminoácidos (GUYTON & HALL 1997). Em trabalho experimental usando o porco, foram observadas na sua carência, alterações degenerativas nos nervos, células dos gânglios das raízes dorsais e colunas posteriores da medula espinhal, (MARCUS & COULSTON, 1987).

O fosfato de piridoxal é essencial para mielinização das fibras nervosas, (DAKSHINAMURTI, 1982; JACOBSON et al., 1996) e nos casos de deficiência ocorre desmielinização e degeneração axonal nos nervos (NISHINO & ITOKAWA, 1977; RICHARDSON, 1995).

2.3.4 Cianocobalamina

Em 1925, Wipple observou em cães com sinais de deficiência de ferro que o fígado é fonte de uma substância hematopoiética potente. Este fato levou Minot e Murphy a desenvolver seus experimentos clínicos onde demonstraram a eficácia da alimentação com fígado na anemia perniciosa. Em 1928 W. B. Castle definiu a necessidade tanto de um fator intrínseco, uma substância secretada pelas células parietais da mucosa gástrica, como de um fator extrínseco: o material semelhante a vitamina fornecido pelos extratos hepáticos brutos. Mary Shorb em 1947 isolou o fator extrínseco o qual chamou vitamina B₁₂. Em 1948, tanto Folkers como Smith isolaram-no na forma cristalina. Sua estrutura cristaliana foi determinada por difração de R-X, em 1955 por Dorothy Hodgkin (MARCUS & COULSTON, 1987; COMBS, 1992).

Os termos vitamina B₁₂ e cianocobalamina são usados de maneira intercambiável como termos genéricos para todas as cobamidas ativas no homem. As coenzimas ativas são metilcobalamina e 5-desoxiadenosilcobalamina (MARCUS & COULSTON, 1987). Sua função mais importante consiste em atuar como coenzima para reduzir

ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, uma etapa necessária para replicação dos genes; isto poderia explicar a sua função de promover o crescimento celular. (GUYTON & HALL, 1997).

A deficiência de vitamina B₁₂ leva, no sistema nervoso periférico desmielinização de fibras nervosas podendo progredir até as colunas laterais e posteriores da medula espinhal (MARCUS & COULSTON, 1987 KARNAZE & CARMEL, 1990; COMBS, 1992; LOVBLAD et al., 1997 GUYTON & HALL, 1997; AL-SHUBAILI et al., 1998)

NISHINO E ITOKAWA (1977) encontraram desmielinização dos axônios bem como lesão axonal importante em nervo isquiático de ratos com deficiência de vitamina B₆ e B₁₂.

TREDICI et al. (1998), analisando nervo isquiático e peroneal de ratos com deficiência de cobalamina, observaram menor densidade de fibras mielínicas e desmielinização, caracterizada por falhas nas lamelas de mielina e formação de vacúolos dentro da bainha de mielina.

2.4 REGENERAÇÃO NERVOSA E VITAMINAS

As vitaminas são usadas na terapêutica de várias patologias do sistema nervoso periférico: neurite, polineuropatia, lombociatalgia bem como terapia de suporte nos casos de neuralgia do trigêmeo, paralisia facial periférica, em casos de compressão de nervo como na síndrome do túnel do carpo (ELLIS, 1987; BECKER et al., 1990).

Nas síndromes clínicas por deficiência de vitaminas do complexo B ocorre desintegração da bainha de mielina e lesão axonal no sistema nervoso periférico, havendo regressão do quadro com administração das mesmas (ADAMS & VICTOR, 1996). Assim existe possibilidade de que as vitaminas sejam usadas em varias patologias do sistema nervoso periférico, mesmo não havendo sinais de deficiência.

A questão se as vitaminas administradas sistemicamente, durante o processo de regeneração nervosa periférica podem influenciá-lo é tema de discussão na literatura.

HASEGAWA et al. (1973) avaliaram em gatos adultos, por meio da tensão do músculo gastrocnêmio desnervado e reinervado através de secção

do nervo tibial, a regeneração nervosa na vigência de tiamina, piridoxina e cianocobalamina, nas doses de 5mg/kg, 5mg/kg, e 50µg/kg respectivamente, por cerca de 80 dias. Os resultados foram significativamente maiores, quando comparados àqueles que não receberam as vitaminas. Concluíram assim que estas vitaminas tem efeito positivo na regeneração do nervo.

YAMATSU et al. (1976a) usaram a metilcobalamina na dose de 500µg/kg por quatro semanas em ratos que tiveram o nervo isquiático esmagado. Avaliaram, o bíceps femoral desnervado e reinervado, através da eletromiografia verificando que aqueles que haviam recebido a vitamina apresentavam sinais de atividade mais precocemente com relação aos demais. Assim sugerem que a cianocobalamina tem efeito na regeneração nervosa.

YAMATSU et al. (1976b), trabalhando com ratos, provocavam esmagamento no nervo isquiático administrando posteriormente metilcobalamina na dose de 500µg/kg por 04 semanas. A cada dia era injetada em alguns animais leucina com isotopo radioativo e cerca de 3 horas após os nervos eram estudados. Observaram nos primeiros 7 dias que os animais que receberam metilcobalamina incorporavam a leucina mais rapidamente que os

demaís. Sugeriram que a metilcobalamina aumenta a síntese de proteínas nas células de Schwann nos estágios iniciais da regeneração nervosa.

YAGIHASHI et al. (1982), estudando ratos com neuropatia por diabetes induzido por streptozotocin, observaram através da análise morfométrica que os animais que haviam recebido metilcobalamina diariamente na dose de 500 µg/kg por 16 semanas apresentavam, área do axônio e da fibra nervosa significativamente maiores em relação àqueles que não receberam. Concluíram que o uso precoce e contínuo de metilcobalamina em ratos com diabetes pode prevenir lesões nos nervos.

MISUMI et al. (1985), em trabalho experimental com ratos onde foi induzido neuropatia por 2,5-hexanodione, estudaram a velocidade de condução nervosa em 3 grupos de animais: o primeiro havia recebido diariamente por 18 semanas piridoxina e cianocobalamina na dose de 10mg/kg e 400µg/kg respectivamente; o segundo recebeu somente piridoxina na mesma dose por igual período; o terceiro foi usado como grupo controle. Verificaram que não houve diferença na velocidade de condução nervosa entre os grupos. Assim, concluíram que nenhuma das drogas usadas teve efeito positivo no nervo.

AMADIO (1985), estudando pacientes que apresentavam compressão do nervo mediano a nível do punho (Síndrome do Túnel do Carpo) quando submetidos a tratamento com piridoxina na dosagem de 200mg. diariamente, por 8 semanas, concluiu não haver melhora significativa do quadro clínico. A melhora só foi conseguida com uso de outros medicamentos e em alguns pacientes somente com tratamento cirúrgico para liberação do nervo.

ELLIS (1987), através de estudos clínicos em pacientes com síndrome do túnel do carpo, evidenciou melhora significativa do quadro usando piridoxina, na dose de 100 a 200mg. por dia por 12 semanas.

SONOBE et al. (1988) em trabalho experimental com ratos que apresentavam neuropatia por diabetes induzido por streptozotocin verificaram através de análise da velocidade de condução nervosa que animais que receberam diariamente metilcobalamina na dose de 500µg/kg por duas semanas, apresentaram velocidade de condução nervosa superior aos não tratados. Assim, concluíram que a metilcobalamina é benéfica no caso de neuropatia diabética.

SAKITAMA et al. (1989) trabalhando com ratos com neuropatia por diabetes induzido por streptozotacin, que receberam tiamina, piridoxina, e cianocobalamina na dosagem de 25mg/kg, 50mg/kg e 0,5mg/kg respectivamente, por sete semanas observaram que a velocidade de condução nervosa nos animais tratados foi maior com relação aos não tratados. Sugeriram que a administração diária de tiamina, piridoxina e cianocobalamina, pode retardar o desenvolvimento de neuropatia em pacientes diabéticos bem como atuar em outros tipos de neuropatias no homem.

BECKER et al. (1990) provocaram degeneração Walleriana no nervo safeno de coelhos usando baixas temperaturas. Após dividiram em 2 grupos. Em um deles administraram tiamina, piridoxina e cianocobalamina na dose de 7mg/kg, 7mg/kg e 70µg/kg respectivamente por 21 dias. Noutro usaram somente solução fisiológica. Observaram, após 21 dias, que a proporção de fibras regeneradas/fibras degeneradas era significativamente maior nos animais que haviam recebido as vitaminas. Concluíram que estas podem ser usadas como medidas de suporte nas primeiras semanas de regeneração de nervo.

WATANABE et al. (1994), examinaram o efeito da metilcobalamina nas doses de 500µg/kg e 50µg/kg administradas por 12 semanas na regeneração do nervo tibial que foi submetido a lesão por acrilamida. Para tal usaram as amplitudes dos potenciais de ação dos respectivos músculos que foram desnervados e reinervados. Verificaram que na dose de 500µg/kg houve recuperação mais rápida da amplitude dos potenciais de ação muscular com relação a dose de 50µg/kg e do grupo controle. Concluíram que doses de 500µg/kg podem auxiliar na regeneração nervosa periférica

JACOBSON et al (1996), em trabalho de revisão de literatura sobre uso de piridoxina no tratamento da síndrome do túnel do carpo, concluíram que esta não produz efeito significativo na melhora dos sintomas. Pode ser usada em conjunto com outras medidas para o tratamento desta patologia.

FUJII et al. (1996) estudaram no nervo isquiático de ratos previamente lesado por acrilamida o efeito das vitaminas usando a velocidade de condução nervosa e o crescimento axonal in vitro usando células neuronais obtidas dos gânglios das raízes dorsais. Para avaliação do primeiro item os animais foram divididos em dois grupos; um grupo recebeu previamente dieta

balanceada contendo tiamina, piridoxina e cianocobalamina e outro dieta sem as vitaminas. A partir do dia em que foi injetada acrilamida nos dois grupos, estes passaram a receber as vitaminas via intraperitoneal na dose de 5,0mg/kg, 5,0mg/kg e 0,5mg/kg respectivamente, por 12 semanas. Verificaram diferença significativa na velocidade de condução nervosa dos animais que previamente haviam recebido dieta com vitaminas, em relação ao outro grupo.

O crescimento axonal foi significativamente maior na cultura de células nervosas que recebeu as vitaminas tiamina, piridoxina e cianocobalamina, em relação às outras que receberam somente uma vitamina cada. Concluíram que a tiamina, piridoxina e cianocobalamina têm ação reconstrutiva em fibras degeneradas

BENDER (1999) em artigo de revisão a respeito do uso de piridoxina, na síndrome do túnel do carpo, conclui que a mesma não é efetiva no seu tratamento

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar qualitativa e quantitativamente a influência das vitaminas tiamina piridoxina e cianocobalamina administradas sistemicamente, na regeneração axonal do nervo isquiático de rato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 26 semanas de idade, pesando em média 450g na época da alcoolização do nervo isquiático, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho", em Botucatu - S. P.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 3 grupos:

Grupo I : 10 ratos, cujo nervo isquiático esquerdo foi submetido a alcoolização e receberam tiamina, piridoxina e cianocobalamina diariamente via oral.

Grupo II : 10 ratos, cujo nervo isquiático esquerdo foi submetido a alcoolização e não receberam tiamina, piridoxina e cianocolbalamina diariamente via oral.

Grupo III : 10 ratos utilizados para a análise morfo-quantitativa do nervo isquiático normal.

4.3 ALCOOLIZAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

Os animais dos grupos I e II foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de cetamina (Francotar^R -100mg/ml) e cloridrato de tiazina (Rompun^R-2g/100ml) na proporção de 40mg/kg:10mg/kg respectivamente. Quando já estavam anestesiados foram posicionados em decúbito ventral, feita tricotomia na região posterior da coxa esquerda e assepsia com solução de iodo ativo a 2% (Polvidine^R tópico).

Usando o fêmur esquerdo como referência palpou-se este desde a articulação do joelho até a articulação do quadril. Neste ponto era feita punção "per" cutânea, num ângulo de 90 graus com a pele, com agulha de 0,4 mm de diâmetro e 13 mm de comprimento acoplada a seringa de 1,0 ml. de capacidade volumétrica, contendo 1,0 ml. de álcool etílico a 95 %. A agulha foi aprofundada até que tocasse no fêmur, sendo então injetado 0,2 ml de álcool etílico a 95% (FIG.1 do anexo).

Após a agulha ser tracionada levemente até o tecido sub cutâneo era novamente aprofundada no sentido mais caudal, sendo injetados mais 0,2 ml de álcool etílico a 95 %. Em cada aplicação a agulha era inclinada no sentido caudal até ter sido injetado todo o volume de 1,0 ml.

Observou-se em dissecções prévias do nervo isquiático de ratos que com o animal em decúbito ventral, este dispõem-se praticamente paralelo ao fêmur, e na sua porção proximal corre bem próximo a este. Assim fazendo aplicações em "leque" conseguimos alcançá-lo e causar a lesão.

Assim que os animais recuperaram-se da anestesia foram mantidos em número de três por gaiola confeccionada em polipropileno.

Os animais do grupo I receberam ração nuvilab cr-1 (Nuvital^R) e água a vontade. A água destes continha dissolvidas tiamina, piridoxina e cianocobalamina em concentrações previamente determinadas.

Os animais do grupo II receberam ração nuvilab cr-1 (Nuvital^R) e água à vontade, sem vitaminas

Os animais do grupo III receberam ração nuvilab cr-1(Nuvital^R) e água a vontade.

4.4 ADMINISTRAÇÃO DE VITAMINAS

Os animais do grupo I receberam as vitaminas, logo em seguida à alcoolização, por meio da água ingerida, pois nesta foram dissolvidos, em quantidade previamente conhecida, os sais da tiamina piridoxina e cianocobalamina, de maneira que suas concentrações fossem conhecidas. As concentrações foram: tiamina 0,1mg/ml; piridoxina 0, 1mg/ml; e cianocobalamina 1µg/ml.

Diariamente era calculada a quantidade de água ingerida pelo animal através da subtração do volume inicial colocado todos os dias nos frascos 500ml, pelo volume residual medido no dia seguinte com uma proveta. Conhecendo-se a concentração das vitaminas, era obtida a quantidade de vitaminas ingerida diariamente.

Os animais receberam em média 11mg/kg de tiamina, 11mg/kg de piridoxina e 110µg/kg de cianocobalamina via oral diariamente.

4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

A fim de constatar que houve realmente lesão nervosa por meio da alcoolização, (FIG.8 e 9 do anexo) 2 ratos com peso médio de 440g e idade de 26 semanas tiveram seus nervos isquiático esquerdo infiltrados com álcool etílico a 95%. Foram sacrificados por deslocamento cervical com um e outro com 5 dias após infiltração. Seus nervos foram processados e analisados a microscopia de luz seguindo mesmo protocolo para os nervos provenientes dos demais animais.

Decorridos 60 dias da alcoolização do nervo os animais dos grupos I II e III foram sacrificados por deslocamento cervical. Imediatamente após o nervo isquiático esquerdo foi exposto, do seu terço distal retirado um fragmento de 10mm. de comprimento e posteriormente dividido em três outros de aproximadamente 3,0 mm.

Estes fragmentos foram submetidos a fixação por imersão com fixador Karnovsky (1965), por seis horas a temperatura de 4⁰C e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M em temperatura ambiente por uma hora, desidratados em soluções crescentes (50% a 100%) de acetona e incluídos em resina Araldite (ARALDITE 502). Após

polimerização da resina os blocos foram levados ao ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2B, equipado com navalha de vidro sendo obtidos cortes transversais de 1 μ m de espessura que foram corados com azul de Toluidina a 1%, para análise em microscopia de luz.

Os mesmos blocos foram trimados para confecção de cortes transversais ultrafinos (60 a 90 nanômetros) em ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2B, com navalha de diamante, colocados em telas de cobre (200 mesh), contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e fotomicrografados ao microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM-10 operando a 80Kv.

4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA

Na análise quantitativa foram utilizados dois parâmetros de avaliação: a área média da secção transversal do nervo e o número médio de axônios mielínicos regenerados da área teste.

Para o cálculo da área da secção transversal de cada corte histológico foi utilizado o método de planigrafia por contagem de pontos num sistema teste de padrão quadrático (MANDARIM, 1995)

Foi confeccionado em material plástico transparente um retângulo cujos lados mediam 15cm x 10cm. nos quais foram feitas divisões de 1,0 cm em cada um dos lados e marcados com um ponto. Estes pontos foram unidos por segmentos de reta de um lado a outro do retângulo que propiciou a formação de 150 quadrados menores dentro deste. O centro geométrico de cada um destes quadrados foi calculado e marcado com um ponto. Assim, foi possível ter uma área teste, após devida calibração, onde cada ponto correspondia ao centro geométrico de um quadrado cuja área era conhecida.

Os cortes de 1 μ m, foram fotografados em fotomicroscópio marca ZEISS MC 80 DX com objetiva de 10X, fornecendo uma imagem em papel fotográfico ampliada 110X. Sobre esta imagem foi superposto o plástico transparente cuja área teste já era conhecida. O cálculo da área foi feito multiplicando-se o número de pontos dentro da imagem do corte transversal do nervo pela sua respectiva área.

De cada um dos fragmentos era analisado um corte, sendo portanto analisados de cada nervo três cortes, utilizando-se a média para cálculos posteriores.

Para o cálculo do número de axônios mielínicos os cortes de 1µm foram colocados no fotomicroscópio que previamente recebeu numa de suas oculares uma lente contendo retículo que abrangia área do corte do nervo permitindo obter 50 campos, correspondentes a uma área teste cada um. Tal observação foi feita com objetiva de 10X. Após escolha aleatória do campo, era passado para observação deste com objetiva de 100X, e após fotografado.

Foi feito também em material plástico transparente um retângulo com lados de 7,3 X 14,6cm, o que correspondia a área teste após devida calibração. Sobre a imagem obtida no papel fotográfico foi colocado a transparência e então contados os axônios mielínicos do seu interior. Não foram considerados aqueles que tocavam qualquer dos limites da área teste.

De cada um dos fragmentos do nervo eram analisados três cortes, totalizando nove cortes por animal. Para cálculos foi usada a média

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para a análise dos dados foram utilizados: a estatística descritiva e a análise da variância estabelecendo o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS ANIMAIS

Decorridos 60 dias da alcoolização os animais dos grupos I e II locomoviam-se normalmente não apresentando déficit motor algum.

Não foram observados também sinais de intoxicação vitamínica.

5.2 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS NERVOS NORMAIS

Em todos os animais os aspectos macroscópicos eram semelhantes ao descrito na literatura. Apresentavam-se como cordões cilíndricos, pouco achatados, de coloração esbranquiçada, com praticamente a mesma espessura todos eles (FIG.2 do anexo).

5.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS NERVOS REGENERADOS

Após 60 dias da alcoolização, as características dos nervos provenientes de animais que receberam vitaminas como dos que não receberam-nas eram semelhantes. Apresentavam-se com coloração levemente

mais amarelada e com mesma espessura, em relação ao dos animais normais (FIG.3 do anexo).

Próximo ao local da aplicação do álcool, o nervo encontrava-se mais aderido aos tecidos vizinhos.

5.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRA- ESTRUTURAIS DOS NERVOS NORMAIS

Nos animais estudados cerca de metade apresentavam o nervo isquiático esquerdo constituído por dois fascículos e a outra constituído por três fascículos (FIG.4 do anexo).

Envolvendo externamente os fascículos observou-se o epineuro, mais espesso que o perineuro, apresentando aspecto de tecido conjuntivo frouxo, com vasos sanguíneos (FIG.4 do anexo).

Envolvendo cada fascículo nervoso, observou-se o perineuro, (FIG.4 do anexo) constituído por várias camadas de células com aspecto fusiforme dispostas concêntricamente ao nervo cujos processos citoplasmáticos formavam uma malha. Entre estas camadas de células

observou-se fibras colágenas. No citoplasma destas células estavam presentes mitocôndrias e vesículas elétronicamente dispostas aleatoriamente. (FIG.14 do anexo).

Em cada fascículo nervoso as fibras nervosas apresentavam-se bastante próximas deixando pouco espaço extracelular (FIG.5 do anexo). Nestes espaços observou-se fibras de colágeno dispostas paralelamente aos axônios com diâmetro menor que as do perineuro (FIG.11 e 14 do anexo). Havia também vasos sanguíneos de diâmetro variável porém sempre menores que o dos vasos epineurais (FIG.5 do anexo).

Os fascículos nervosos continham axônios mielínicos e amielínicos (FIG.11 do anexo). Nos axônios mielínicos observou-se uma célula de Schwann associada ao mesmo, bem como revestimento externo formando a bainha de mielina (FIG.13 do anexo).

Nos axônios amielínicos observou-se uma única célula de Schwann envolvendo com suas projeções citoplasmáticas, vários axônios, nestes não havia bainha de mielina (FIG.12 do anexo).

No axoplasma tanto das fibras mielínicas como amielínicas foram encontradas microtúbulos neurofilamentos e mitocôndrias dispersas ao acaso. (FIG.11 do anexo).

As células de Schwann apresentavam membrana basal.

5.5 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ULTRA-ESTRUTURAIS DOS NERVOS REGENERADOS

Tanto no grupo de animais que receberam vitaminas como no grupo dos que não receberam, as características foram bastante semelhantes. Os nervos apresentavam-se organizados em minifascículos, em maior número e mais agrupados na região central sendo mais dispersos na periferia do nervo. Em alguns dos nervos observaram-se minifascículos no epineuro (FIG.7 do anexo).

O número de fibras nervosas variou no interior dos minifascículos de 6 ate 10 (FIG.16 do anexo). Entre os fascículos e mesmo entre as fibras nervosas observou-se maior espaço o qual era preenchido por tecido conjuntivo, mastócitos e macrófagos (FIG.10 do anexo).

O diâmetro das fibras nervosas mielínicas bem como a espessura da bainha de mielina eram menores com relação ao grupo normal (FIG.10 do anexo)

Algumas fibras nervosas apresentavam degeneração do axônio com desorganização da bainha de mielina (FIG.10 e 15 do anexo).

O epineuro encontrava-se mais espessado, com vasos sanguíneos em maior número e maior diâmetro com relação ao grupo normal (FIG.6 do anexo).

O endoneuro apresentava-se mais espesso e com maior quantidade de colágeno.

5.6 ANALISE QUANTITATIVA

A área da secção transversa do nervo ciático foi avaliada nos 3 grupos.

Obteve-se no grupo controle média de $0,60\text{mm}^2$; no grupo de nervos regenerados com vitaminas $0,61\text{mm}^2$ e no grupo de nervos regenerados sem vitaminas $0,64\text{mm}^2$.

Não foram observadas diferenças, a nível de 5% de significância, entre as médias dos três grupos.

O número de axônios mielínicos do nervo isquiático da área teste também foi avaliado nos animais dos três grupos.

Obteve-se no grupo controle média de 97, 67 axônios mielínicos, no grupo de nervos regenerados com vitaminas 146, 91 e no grupo de nervos regenerados sem vitaminas 131, 58.

Também para esta variável não foram observadas diferenças, a nível de 5% de significância, entre as médias dos três grupos.

Os resultados foram expressos na tabela 1, a seguir:

TABELA 1
Número médio de axônios mielínicos na área teste, e área média da seção transversa do nervo isquiático nos diferentes grupos

Grupo	número de axônios mielínicos		área em mm ²	
	média	desvio padrão	média	desvio padrão
controle	99, 63A	18, 173	0, 60A	0, 174
c/ vitaminas	147, 01A	49, 412	0, 61A	0, 125
s/ vitaminas	130, 28A	47, 787	0, 64A	0, 124

Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem entre si pela análise da variância ($p > 0,05$)

6 DISCUSSÃO

6.1 MODELO EXPERIMENTAL

A literatura mostra-nos que diversos autores têm usado diferentes animais como modelo experimental: rato (ANTOPOL & TARLOV, 1942; MOLLER et al., 1969; BRAY & AGUAYO, 1974; NISHINO & ITOKAWA, 1976; YAMATSU et al., 1976ab; JENQ & COGGESHALL, 1985; KRINKE et al., 1985; WINDEBANK et al., 1985; FIELDS & ELLISMAN, 1986; GLASBY et al., 1986; CARTER & LISNEY, 1987; LE BEAU et al., 1988; GSCHMEISSNER et al., 1990; WATANABE et al., 1994; FUJII et al., 1996; KANAIA et al., 1996; TREDICI et al., 1998), gato (HASEGAWA et al., 1973), coelho (GUTMANN & SANDERS, 1943; CRAGG & THOMAS, 1964; BECKER et al., 1990), camundongo (IDE et al., 1983; KEYNES et al., 1984), cão (SCHRODER, 1972; HOOVER & CARLTON, 1981; SCHAEPPPI & KRINKE, 1982).

Estudos feitos por MACKINNON et al. (1985) demonstraram, a nível de microscopia eletrônica de transmissão, que o nervo isquiático de ratos apresenta detalhes celulares que são indistinguíveis do nervo humano.

TERENGHI et al. (1998), estudando nervos lesados provenientes de 10 pacientes, confirmaram que as alterações celulares destes eram bastante semelhantes com aquelas descritas em modelos animais cujos nervos foram submetidos a degeneração e regeneração nervosa.

Assim neste trabalho, foi utilizado como modelo experimental o rato.

6.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO

A fim de se testar o efeito positivo ou negativo de determinada droga, na estrutura do nervo regenerado é necessário haver degeneração axonal no segmento distal a lesão evitando perda da continuidade do nervo (BECKER et al., 1990).

A literatura mostra-nos que tanto métodos físicos como químicos são usados pelos autores para promover degeneração axonal.

O álcool etílico em concentrações de 5% a 10%, atua localmente como anestésico, diminuindo a condutância do sódio e potássio; em concentrações maiores precipita e desidrata o protoplasma das células.

Quando injetado próximo a nervos pode ocasionar neurite e degeneração nervosa (RITCHIE, 1987).

MOLLER et al. (1969), aplicando álcool etílico nas concentrações de 5, 10, 20 e 40% em nervo isquiático de ratos, verificaram que na concentração de 40% houve lesão na bainha de mielina e no axônio. Na concentração de 20% as mesmas lesões eram encontradas, porém em menor intensidade. Nas concentrações de 5 e 10 % não foram encontradas lesões nos nervos estudados.

Segundo SINGLER (1981), o uso de álcool etílico em concentrações de 50 a 100% para alcoolização promove degeneração axonal distal a aplicação.

A aplicação local de álcool etílico a 35% em nervos de animais causa desmielinização mais freqüente em fibras menores e nenhuma lesão axonal. Usado em concentrações de 50 a 95% causa degeneração axonal (KONG, & CHUA, 1999).

Neste trabalho foi usado como modelo experimental de lesão nervosa a alcoolização, usando álcool etílico a 95% que promoveu tanto degeneração do axônio como da bainha de mielina (FIG.8 e 9 do anexo).

6.3 SOBRE REGENERAÇÃO AXONAL

É possível falar em regeneração nervosa bem sucedida quando a função do órgão alvo é completa ou parcialmente restaurada (BECKER et al., 1990), estando envolvidas neste processo: brotamento e crescimento axonal, reinervação de células alvo e integração das fibras regeneradas com o sistema nervoso central. (KANAIA et al, 1996).

No presente trabalho a análise do nervo regenerado tanto dos animais que receberam vitaminas quanto dos que não, mostrou presença de axônios organizados em minifascículos, cada um destes contendo de 6 a 10 axônios.

Esta forma de organização em minifascículos é semelhante a descrita por GLASBY et al. (1986), em trabalho utilizando enxertos musculares como forma de reparação de nervo isquiático de ratos.

Com relação ao número de axônios em cada minifascículo este é semelhante ao descrito por KEYNES et al. (1984), em trabalho onde usou enxerto de músculo, previamente tratado por diferentes processos químicos, como reparação do nervo isquiático de ratos.

Uma falha no perineuro ou sua ruptura parece fornecer um estímulo para a formação de minifascículos (GSCHMEISSNER et al., 1990). Esta compartimentalização é sugerida como meio pelo qual o nervo rapidamente restabelece seu ambiente endoneural (GSCHMEISSNER et al. 1990; GLASBY et al., 1986).

Segundo GSHMEISSNER et al., (1990), em trabalho realizado com enxerto de músculo para regeneração nervosa, o número de axônios e minifascículos no nervo regenerado parece ser determinado pela posição dentro do enxerto; no centro o número de minifascículos e axônios é maior com relação a periferia.

Neste trabalho foram encontrados minifascículos em maior número e com mais axônios no seu interior, na região central do nervo regenerado. Na região da periferia o número de minifascículos e axônios no seu interior eram bem menores, e bastante espaçados entre si.

Envolvendo cada minifascículo foram encontradas células semelhantes as células perineurais.

Células perineurais favorecem um ambiente endoneural apropriado facilitando a maturação das fibras (GSCHMEISSNER et al., 1990) e formam também uma barreira de difusão entre os espaços extracelular e endoneural (HUXLEY & STAMPFLI, 1955; SHANTHAVEERAPPA & BOURNE, 1962)

Segundo GSCHMEISSNER et al (1990) os axônios em regeneração e suas células de Schwann tornam-se rodeados por uma frouxa armação de finos processos celulares, cujas células num primeiro momento se assemelham a fibroblastos e em estágios mais avançados produzem uma membrana basal e exibem todas as características morfológicas de verdadeiras células perineurais. A origem destas células é incerta, no entanto fibroblastos endoneurais ou células de Schwann não diferenciadas sejam seus possíveis precursores.

LE BEAU et al., (1988), trabalhando com nervo isquiático regenerado através de tubo de silicone, observaram que entre 42 e 70 dias

após lesão o coto distal destes apresentava-se com grande número de células de Schwann, fibroblastos e quantidade aumentada de colágeno.

Neste trabalho foi verificado que o espaço, tanto entre os axônios como entre os fascículos dos nervos regenerados, era maior com relação ao nervo normal e apresentava maior quantidade de colágeno.

Para análise quantitativa dos nervos regenerados foram calculados o número de axônios regenerados (KANAI et al., 1996) e a área da secção transversa.

Verificou-se que a área média da secção transversa do nervo regenerado com vitamina foi $0,61\text{mm}^2$, do nervo regenerado sem vitamina foi $0,64\text{mm}^2$ e do nervo normal foi $0,60\text{mm}^2$. Nossos resultados são próximos aos encontrados por TREDICI (1998) que em trabalho experimental com ratos apresentando neuropatia por carência de cianocobalamina encontrou valor médio de $0,60\text{mm}^2$ no grupo normal e $0,50\text{mm}^2$ no grupo com neuropatia.

OLIVEIRA (1993), trabalhando com nervo isquiático normal de ratos com dois meses de vida, encontrou valor médio de $0,45\text{mm}^2$.

A diferença de valor encontrada no nosso trabalho pode ser pelo fato de que os animais usados em nosso trabalho tinham idade maior.

Foi observado que o número médio de axônios, na área teste, dos nervos regenerados com vitaminas (147, 01) foi maior que o dos nervos regenerados sem vitaminas (130, 28), e este foi maior nos nervos normais (99, 63).

JENQ & COGSELHALL (1985) em trabalho experimental com nervo isquiático de ratos que foram submetidos a diferentes métodos de lesão (esmagamento, secção com posterior aposição dos cotos frente a frente e secção com reparação usando tubo de silicone), verificaram 8 semanas após a lesão que o número de axônios mielínicos nos cotos distais era sempre superior ao coto proximal.

CARTER & LISNEY (1987) trabalharam com nervo safeno de ratos onde fizeram secção do mesmo deixando os cotos somente posicionados frente a frente. Cerca de seis meses após analisaram os cotos distais e proximais do nervo regenerado comparando-os com o nervo normal. Verificaram nos nervos regenerados que o numero médio de axônios

mielínicos no coto proximal era de 1055 e no coto distal era de 1675, enquanto que no nervo normal praticamente não houve variação.

BECKER et al. (1990) trabalharam com o nervo safeno de coelhos que eram leasados por meio físico. Dividiram os animais em 2 grupos: os do primeiro receberam tiamina piridoxina e cianocobalamina por 21 dias; os do segundo somente solução fisiológica por igual período de tempo. Aos 4, 10 e 21 dias os nervos foram avaliados. Verificaram que no primeiro grupo a porcentagem de fibras mielínicas em regeneração era de 69,20% enquanto que no segundo grupo era de 14,7%. Concluíram que a administração sistêmica de tiamina piridoxina e cianocobalamina pode ser usada como suporte na terapia de lesões nervosas nas 3 primeiras semanas de regeneração.

WATANABE et al. (1994) desenvolveram trabalho com ratos onde inicialmente provocavam neuropatia por acrilamida. Após os animais apresentarem sinais clínicos de neuropatia foram divididos em 3 grupos, sendo que o primeiro recebeu metilcobalamina via intraperitoneal na dose de 500µg/Kg, o segundo 50µg/Kg, e o terceiro solução salina. Após 60 dias o nervo tibial de cada um dos animais foi avaliado e o resultado mostrou que o número de fibras mielínicas no primeiro grupo foi de 5360/ mm², no segundo

foi 3290/mm² e no terceiro foi 2125/mm². Concluíram que doses altas de metilcobalamina podem ser útil na regeneração nervosa em várias patologias humanas.

Após lesão do nervo os axônios da porção proximal originam vários brotos (CARTER & LISNEY, 1987; LUNDBORG, 1987; RICHARDSON, 1995), que crescem no interior dos tubos de membrana basal das células de Schwann em direção a porção distal (IDE et al., 1983; KEYNES et al., 1984).

Assim o número de axônios na porção distal à lesão é maior em relação a proximal, após determinado tempo de lesão. Em trabalhos realizados com tubulização de nervos observou-se que após três a quatro semanas axônios mielínicos associados a células de Schwann começam a invadir o coto distal. Após cinco a seis semanas axônios amielínicos também são observados (BRAY & AGUAYO, 1974; FIELDS & ELLISMAM, 1986; LE BEAU et al., 1988).

Em nosso trabalho o número de axônios regenerados contados na área teste mostrou-se maior em relação ao controle, indicando que o fenômeno do brotamento está ativo.

GUTMAN & SANDERS (1943) usando nervo peroneal de coelhos que foi submetido a compressão ou secção com posterior reparo, observaram que nos casos de compressão o diâmetro das fibras nervosas mielínicas atingiam valores normais em 300 dias, já no caso de secção nervosa o diâmetro das fibras não atingia valores normais após 365 dias mesmo em condições ideais de laboratório, ficando com diâmetro sempre menor com relação ao nervo normal.

CRAGG & THOMAS (1964), trabalhando com nervo peroneal de coelho, que foi submetido a compressão, observaram 12 meses após lesão que o diâmetro médio das fibras nervosas regeneradas chegou a 89,4% do normal.

SCHRODER (1972) estudando nervo isquiático de ratos submetidos a compressão observou que 12 meses após a lesão o diâmetro médio das fibras regeneradas chegou a 95% do normal e a espessura média da bainha de mielina atingiu 79% do valor normal.

Embora não tendo sido feita análise morfométrica, foi possível observar que o diâmetro e a espessura da bainha de mielina dos axônios regenerados eram menores com relação ao nervo normal. Tais achados vão de encontro com os dados dos três últimos autores.

6.4 DOSE DAS VITAMINAS

A Piridoxina começou a ser usada clinicamente na metade da década de 40 sendo observado em trabalhos experimentais com ratos, realizados na mesma época, que doses de 3 a 7g. /kg levam a intoxicação. Os sinais observados são incoordenação motora, lentidão nos movimentos, hipotonia muscular, ataxia, incapacidade para a marcha até espasmos da musculatura dos membros inferiores e superiores (ANTOPOL & TARLOV, 1942).

HOOVER & CARLTON (1981), em estudo realizado com cães que receberam piridoxina via oral na dose de 150 mg/kg por período de 100 a 112 dias, verificaram que a partir do 18º dia estes apresentavam ataxia envolvendo primeiramente os membros posteriores e com o decorrer dos dias os membros anteriores também. A medida que o tempo passava os animais apresentavam dificuldade para a marcha, havendo necessidade de alargamento da base para ficar em pé quando parados. Os movimentos eram dismétricos incoordenados chegando ao ponto de não conseguirem andar e mesmo ficar em pé. Os reflexos tanto motores quanto sensitivos dos quatro membros estavam bastante diminuídos

SCHAEPPPI & KRINK, (1982) observaram que cães tratados com piridoxina via oral na dose de 3,0 g/dia por 8 a 20 dias, a partir do 6º dia apresentavam dificuldade para marcha, no 8º dia sonolência extrema não conseguindo se locomover, dificuldade respiratória, hipotonia muscular abolição de reflexos de membros inferiores

SCHAUMBURG, (1983) descreveu em 7 pacientes com idades variando de 20 a 43 anos, que tinham recebido piridoxina via oral na dose de 2 a 5g. dia por 2 a 40 meses: instabilidade de marcha, alargamento de base para a marcha, dificuldade para segurar pequenos objetos, diminuição dos reflexos profundos de membros inferiores, diminuição de sensibilidade proprioceptiva-vibratória, tátil e dolorosa dos membros superiores e inferiores. Cerca de sete meses após suspensão da vitamina os pacientes apresentavam melhora dos sinais.

WINDEBANK et al., (1985) usando doses de 100 e 200 mg /kg de piridoxina em ratos, via peritoneal, por oito semanas observaram que a partir da 6ª semana de uso os animais apresentavam instabilidade para a marcha e incoordenação motora nos membros anteriores e posteriormente nos quatro membros chegando alguns animais não conseguirem andar.

KRINKE et al. (1985), trabalhando com ratos que receberam piridoxina intraperitoneal na dose de 600mg/kg, por 14 dias relataram após o 3º dia: ataxia importante. No 8º dia apresentavam paralisia dos quatro membros impossibilitando a marcha. No 14º dia apresentavam perda de peso importante (redução de 40% aprox.) com quadro importante de debilidade.

PARRY & BREDESEN (1985), estudando 16 pacientes com idades entre 25 e 53 anos que haviam recebido piridoxina via oral na dose de 200mg a 5g. ao dia (em dois casos) por 1 a 72 meses, observaram diminuição da sensibilidade proprioceptiva vibratória, tátil e dolorosa em todos eles. Em 7 casos observou ataxia sensitiva e sinal de Romberg.

WATERSTON & GILLIGAN, (1987) relataram caso de uma paciente de 20 anos de idade que apresentava quadro clínico inicial de alteração da sensibilidade proprioceptiva, vibratória e térmica dos membros inferiores com progressão para membros superiores onde apresentou também parestesia mais evidente nas mãos. Tal paciente havia ingerido diariamente por 12 meses 01g de piridoxina. Cerca de 2 meses após retirada da vitamina houve regressão dos sinais com boa evolução o caso.

DALTON & DALTON, (1987) estudando 103 mulheres com idade média de 41,5 anos, que haviam recebido em média 117g de piridoxina via oral diariamente por tempo médio de 2,9 anos descreveu os seguintes sintomas: parestesia mais pronunciada nas extremidades dos membros superiores, adormecimento das mãos e face, dores ósseas nos membros inferiores como se fossem agulhas sendo colocadas, hiperestesias por todo o corpo, fraqueza muscular manifestada por dificuldade para caminhar rapidamente ou realização de trabalhos manuais simples como segurar pequenos objetos, diminuição de reflexos profundos dos membros inferiores.

Em nosso trabalho as doses de tiamina, piridoxina e cianocobalamina usadas não causaram intoxicação nos animais no período de 60 dias.

7 CONCLUSÃO

- O modelo experimental de lesão nervosa, realizado neste trabalho, mostrou-se eficiente para promover degeneração do axônio e da bainha de mielina.
- Não foram observados no período de 60 dias sinais de intoxicação vitamínica com as doses utilizadas.
- O uso sistêmico da tiamina, piridoxina e cianocobalamina durante regeneração nervosa, nos primeiros 60 dias, não teve influência no sentido de propiciar melhora do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADAMS, R.D.; VICTOR, M. **Neurologia**. 5.ed. Nova York: McGraw-Hill, 1996. 1003p.
2. ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the cell**. 2.ed. New York: Garland Publishing, 1989. 1342p.
3. AL-SHUBAILI, A.F. et al. Axonal and Demyelinating Neuropathy with Reversible Proximal Conduction Block, an Unusual Feature of Vitamin B12 Deficiency. **Muscle Nerve**, Safat, v.21, p.1341-1343, Oct. 1998.
4. AMADIO, P.C. Pyridoxine as an adjunct in the treatment of carpal tunnel syndrome. **J Hand Surg**, Rochester, v.10a, n.2, p.237-241, Mar. 1985.
5. ANTROPOL, W.; TARLOV, I.M. Experimental study of the effects produced by large doses of vitamin B₆ **J Neuropathol Exp Neurol**, New York, v.1, p.330-336, 1942.

* De acordo com a NBR-6023, de agosto de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
Abreviatura dos periódicos de conformidade com o Medline.

6. BECKER, K.W.; KIENECKER, E.W.; DICK, P. A contribution to the scientific assessment of degenerative and regenerative processes in peripheral nerve fibers following axonotmesis under the systemic administration of vitamins B1, B6, and B12 - light and electron microscopy findings in the saphenous nerve of the rabbit. **Neurochirurgia**, New York, v.33, n.4, p.113-121, July 1990.
7. BENDER, D.A. Non-nutritional uses of vitamin B₆. **Br J Nutr**, London, v.81, n.1, p.7-20, Sept. 1999.
8. BRAY, G.M.; AGUAYO, A.J. Regeneration of peripheral unmyelinated nerves. Fate of the axonal sprouts which develop after injury. **J Anat**, London, v.117, n.3, p.517-529, July 1974.
9. BUETTNER, H.M. Nerve Growth Dynamics: Quantitative Models for Nerve Development and Regeneration **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.745, p.210-221, 1995.
10. CARPENTER, M.B. **Neuroanatomia Humana**. 7.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1978. 700p.
11. CARTER, D.A.; LISNEY, S.J.W. The numbers of unmyelinated axons in normal and regenerated rat saphenous nerves. **J Neurol Sci**, New York, v.80, n.2/3, p.163-171, Sept. 1987.

12. COMBS, G.F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health.** San Diego: Academic Press, 1992. 528p.
13. CRAGG, B.G.; THOMAS, P.K. The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres. **J Physiol**, London, v.171, p.164-175, 1964.
14. DAKSHINAMURTI, K. Neurobiology of Pyridoxine. **Adv Nutr Res**, New York, v.4, p.143-179, 1982.
15. DALTON, K.; DALTON, M.J.T. Characteristics of pyridoxine overdose neuropathy syndrome. **Acta Neurol Scand**, London, v.76, n.1, p.8-11, July 1987.
16. DORLAND, W.A.N. **Dorland's illustrated medical dictionary.** 28.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. 1940p.
17. ELLIS, J.M. Treatment of Carpal Tunnel Syndrome With Vitamin B6. **Souther Med J**, Birmingham, v.80, n.7, p.882-884, July 1987.
18. FAWCETT, D.W. **A Textbook of Histology.** 11.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. 1017p.

19. FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral Nerve Regeneration. **Annu Rev Neurosci**, Cambridge, v.13, p.43-60, 1990.
20. FIELDS, R.D.; ELLISMAN, M.H. Axons Regenerated through Silicone Tube Splices II. Functional Morfology. **Exp Neurol**, Orlando, v.92, n.1, p.61-74, Apr. 1986.
21. FUJII, A.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, H. Effect of Vitamin B Complex on Neurotransmission and Neurite Outgrowth. **Gen Pharmacol**, Oxford, v.27, n.6, p.995-1000, Sept. 1996.
22. GLASBY, M.A. Nerve Growth in Matrices of Oriented Muscle Basement Membrane: Developing a New Method of Nerve Repair. **Clin Anat**, New York, v.3, p.161-182, 1990.
23. GLASBY, M.A. et al. Regeneration of the Sciatic Nerve in Rats; the Effect of Muscle Basement Membrane. **J. Bone Joint Surg**, Boston, v.68, n.5, p.829-833, Nov. 1986.
24. GSCHMEISSNER, S.E.; GATUSO, J.M.; GLASBY, M.A. Morphology of Nerve Fibers Regenerating Trough Freeze-Thawed Autogenous Skeletal Muscle Grafts in Rats. **Clin Anat**, New York, v.3, p.107-119, 1990.

25. GUTMANN, E.; SANDERS, F.K. Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. **J Physiol**, London, v.101, p.489-518, 1943.
26. GUYTON, A. C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.
27. HAM, A.W.; CORMACK, D.H. **Histologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 907p.
28. HARPER, H.A. Vitaminas. In: _____. **Manual de Química Fisiológica**. São Paulo: Atheneu, 1977. cap.7, p.91-130.
29. HASEGAWA, K.; HOMMA, S.; KANDA, K. Effects of vitamin B1, B6, and B12 complex on the regeneration of the peripheral nerve and muscle receptor in cats. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, Tokyo, v.69, n.3, p.483-497, May 1973.
30. HOOVER, D.M.; CARLTON, W.W. The subacute neurotoxicity of excess pyridoxine HCL and clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) in beagle dogs. I. Clinical disease. **Vet Pathol**, Washington, v.18, n.6, p.745-756, Nov. 1981

31. HUXLEY, A.F.; STAMPFLI, R. Effect of potassium and sodium on resting and action potential of single myelinated nerve fibres. **J. Physiol**, London, v.112, p.496-508, June 1951.
32. IDE, C. et al. Schwann Cell Basal Lamina and Nerve Regeneration **Brain Res**, Amsterdam, v.288, n.1/2, p.61-75, Dec. 1983.
33. JACOBSON, M.D.; PLANCHER, K.D.; KLEINMAN, W.B. Vitamin B6 (pyridoxine) therapy for carpal tunnel syndrome. **Hand Clin**, New York, v.12, n.2, p.253-257, May 1996.
34. JENQ, C.B.; COGGESHALL, R.E. Numbers of Regenerating Axons in Parent and Tributary Peripheral Nerves in the Rat. **Brain Res**, Amsterdam, v.326, n.1, p.27-40, Feb. 1985.
35. JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Basica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
36. KANAYA, F.; FIRREL, J.C.; BREIDENBACH, W.C. Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.98, n.7, p.1264-1274, Dec. 1996.

37. KARNAZE, D.S.; CARMEL, R. Neurologic and Evoked Potential Abnormalities in Subtle Cobalamin Deficiency States, Including Deficiency Without Anemia and With Normal Absorption of Free Cobalamin. **Arch Neurol**, Chicago, v.47, n.9, p.1008-1012, Sept. 1990.
38. KEYNES, R.J.; HOPKINS, W.G.; HUANG, C.L.H. Regeneration of Mouse Peripheral Nerves in Degenerating Skeletal Muscle: Guidance by Residual Muscle Fibre Basement Membrane. **Brain Res**, Amsterdam, v.295, n.2, p.275-281, July 1984.
39. KONG, K.H.; CHUA, K.S.G. Neurolysis of the Musculocutaneous Nerve With Alcohol to Treat Poststroke Elbow Flexor Spasticity. **Arch Phys Med Rehabil**, Philadelphia, v.80, n.10, p.1234-1236, Oct. 1999.
40. KRINKE, G. et al. Pyridoxine megavitaminosis: an analysis of the early changes induced with massive doses of vitamin B₆ in rat primary sensory neurons. **J Neuropathol Exp Neurol**, Lawrence, v.44, n.2, p.117-129, Mar. 1985.
41. LE BEAU, J.M.; ELLISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **J Neurocytol**, London, v.17, n.2, p.161-172, Apr. 1988.

42. LOVBLAD, K.O. et al. Retardation of myelination due to dietary vitamin B₁₂ deficiency: cranial MRI findings. **Pediatr Radiol**, Berlin, v.27, n.2, p.155-158, Feb. 1997.
43. LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. **Acta Orthop Scand**, Oslo, v.58, n.2, p.145-169, Apr. 1987.
44. MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional** São Paulo: Atheneu, 1980. 292p.
45. MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; HUNTER, D.A. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.75, n.3, p.384-388, Mar. 1985.
46. MANDARIN, C.A.M. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: Eduerg, 1995. 131p.
47. MARCUS, R.; COULSTON, A.M. As Vitaminas. In GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapeutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. cap.16, p.1011-1016.
48. MISUMI, J. et al. Effects of vitamin B₁₂ and B₆ on 2,5-hexanedione-induced neuropathy. **Arch Toxicol**, Berlin, v.56, n.3, p.204-206, Jan. 1985.

49. MOLLER, J.E.; LARSEN, J.H.; JACOBSEN, E. Histopatological lesions in the sciatic nerve of the rat following perineural application of phenol and alcohol solutions. **Dan Med Bull**, Copenhagen, v.16, n.4, p.116-119, Apr. 1969.
50. MOORE, K.L. **Embriologia Clinica** 2.ed Rio de Janeiro: Interamericana, 1978. 403p.
51. NISHINO, K.; ITOKAWA, Y. Thiamin metabolism in vitamin B6 or vitamin B12 deficient rats. **J Nutr**, Bethesda, v.107, p.775-782, Aug. 1977.
52. OLIVEIRA, A.L.R. **Estudo morfológico e morfométrico do nervo ciático de ratos antes e após transecção total.** Monografia (Bacharelado em Ciencias Biologicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 1993. 83p.
53. PARRY, G.J.; BREDESEN, D.E. Sensory neuropathy with low-dose pyridoxine. **Neurology**, Hagerstown, v.35, n.10, p.1466-1468, Oct. 1985.
54. PATTEN, B.M. **Human embryology.** 2.ed. New York: Blakiston Company, 1953. 798p.

55. PERRY, V.H.; BROWN, M.C. Role of Macrophages in Peripheral Nerve Degeneration and Repair. **BioEssays**, Cambridge, v.14, n.6, p.401-406, June 1992.
56. RICHARDSON, E.P. **Pathology of the peripheral nerve**. Philadelphia: Saunders, 1995. 522p.
57. RITCHIE, J.M. Alcoolis. In GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacologicas da terapeutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. cap.8, p.244.
58. ROBBINS, S.L.; COTRAN, R. **Patologia estrutural e funcional**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1237p.
59. SAKITAMA, K. et al. Effects of vitamin B mixture on neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, Tokyo, v.35, n.1, p.95-99, Feb. 1989.
60. SCHAUMBURG, H. et al. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. A new megavitamin syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v.309, n.8, p.445-448, Aug. 1983.

61. SCHRODER, J.M. Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. **Brain Res**, Amsterdam, v.45, n.1, p.49-65, Oct. 1972.
62. SHAEPI, U.; KRINKE, G. Pyridoxine neuropathy: correlation of functional tests and neuropathology in beagle dogs treated with large doses of vitamin B₆. **Agents Actions**, Basel, v.12, n.4, p.575-582, Oct. 1982.
63. SHANTHAVEERAPPA, T.R.; BOURNE, G.H. The "perineural epithelium", a metabolically active, continuous, protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. **J Anat**, London, v.96, n.4, p.527-537, 1962.
64. SINCLAIR, H.M. Vitamins and the nervous system. **Br Med Bull**, London, v.12, p.18-23, 1956.
65. SINGLER, R.C. Alcohol neurolysis of sciatic and femoral nerves **Anesth Analg**, Baltimore, v.60, n.7, p.532-533, July 1981.
66. SONOBE, M. et al. Methylcobalamin improves nerve conduction in streptozotocin-diabetic rats without affecting sorbitol and myo-inositol contents of sciatic nerve. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v.20, n.11, p.717-718, Nov. 1988.

67. TERENCEHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J Anat**, London, v.194, n.1, p.1-14, Aug. 1999.
68. TERENCEHI, G. et al. A morfological study of Schwann cells and axonal regeneration in chronically transected human peripheral nerves. **J Hand Surg**, Boston, v.23, n.5, p.583-587, Oct. 1998.
69. TREDICI, G. et al. Polyneuropathy due to cobalamin deficiency in the rat. **J Neurol Sci**, Amsterdam, v.156, n.1, p.18-29, 1998.
70. WATANABE, T. et al. Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. **J Neurol Sci**, Amsterdam, v.122, n.2, p.140-143, Apr. 1994.
71. WATERSTON, J.A.; GILLIGAN, B.S. Pyridoxine neuropathy. **Med J Aust**, Sydney, v.146, n.12, p.640-642, June 1987.
72. WINDEBANK, A.J. et al. Piridoxine neuropathy in rats: specific degeneration of sensory axons. **Neurology**, Hagerstown, v.35, n.11, p.1617-1622, Nov. 1985.
73. YAGIHASHI, S. et al. In Vivo Effect of Methylcobalamin on the Peripheral Nerve Structure in Streptozotocin Diabetic Rats. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v.14, n.1, p.10-13, Jan. 1982.

74. YAMATSU, K. et al. Pharmacological studies on degeneration and regeneration of peripheral nerves I. Effects of methylcobalamin and cobamide on EMG patterns and weight loss on denervated muscles following crush of the sciatic nerve in rats. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, Tokyo, v.72, n.2, p.259-268, Mar. 1976a.
75. YAMATSU, K. et al. Pharmacological studies on degeneration and regeneration of peripheral nerves II. Effects of methylcobalamin on mitosis of Schwann cells and incorporation of radio-active leucine into protein fraction of crushed sciatic nerve in rats. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, Tokyo, v.72, n.2, p.269-278, Mar. 1976b.

ANEXO



FIGURA 1-Animal sob efeito anestésico posicionado em decubito ventral. Traço preto projeção do fêmur sob a pele, azul, projeção do nervo isquiático sob a pele. Agulha (A) posicionada para infiltração de álcool etílico a 95% . Aumento 3x.



FIGURA 2-Nervo isquiático esquerdo normal (i), fêmur (f) e agulha (a) usada na infiltração do álcool etílico a 95%. Aumento 3x.

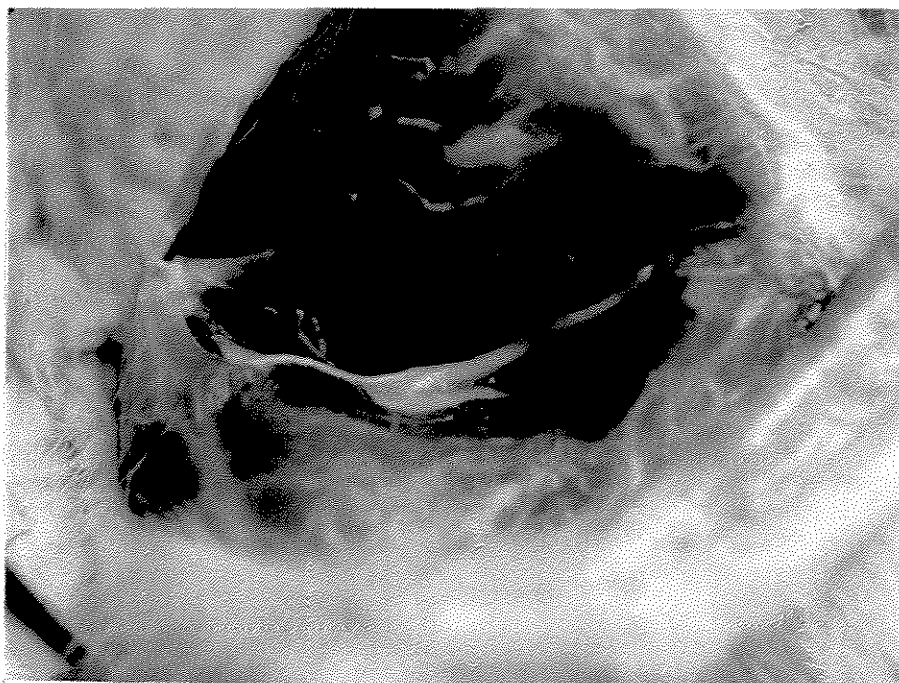


FIGURA 3-Nervo isquiático esquerdo regenerado. Observar área de aderência (seta) próximo ao local da infiltração. Aumento 6x.

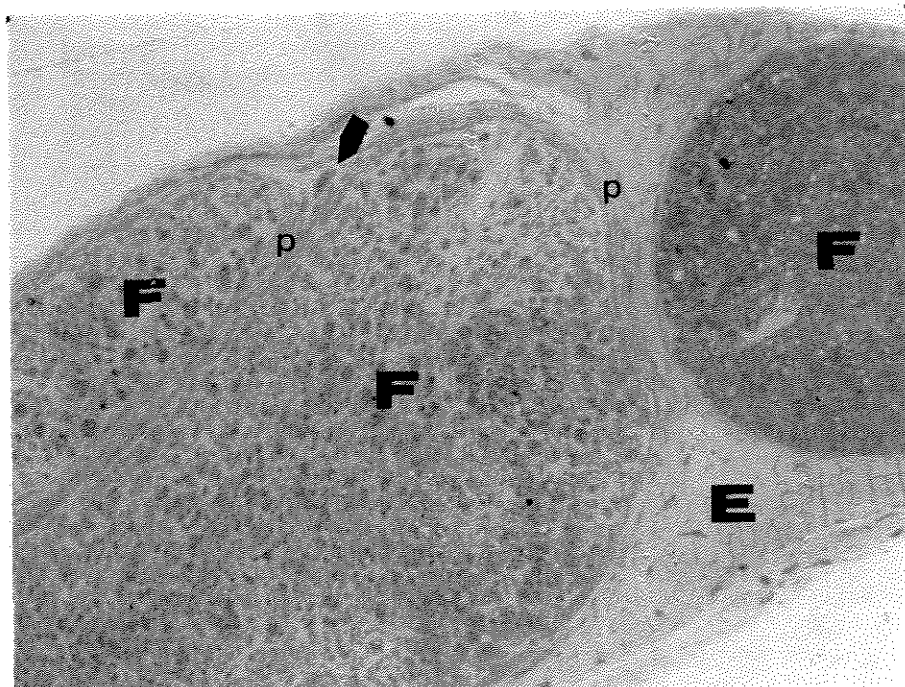


FIGURA 4-Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático normal constituído por 3 fascículos (F). Observar o epineuro (E), perineuro (p) e vaso sanguíneo (ponta da seta).Coloração azul de toluidina. 110x

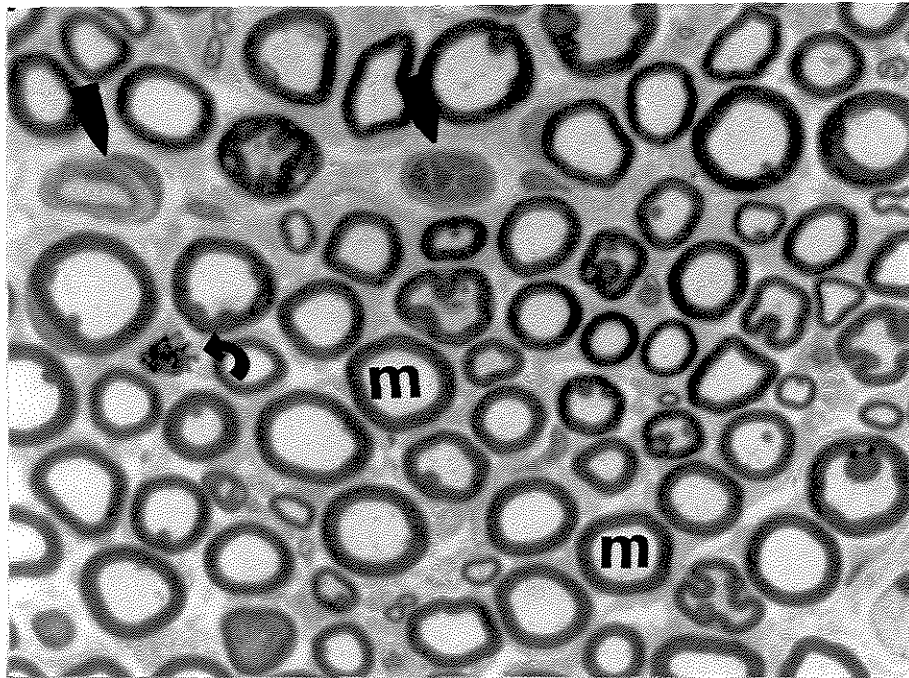


FIGURA 5-Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático normal. Observar axônios mielinicos (m) bastante próximos entre si, vasos sanguíneos (setas retas), e mastócito (seta curva).Coloração azul de toluidina. 1100x

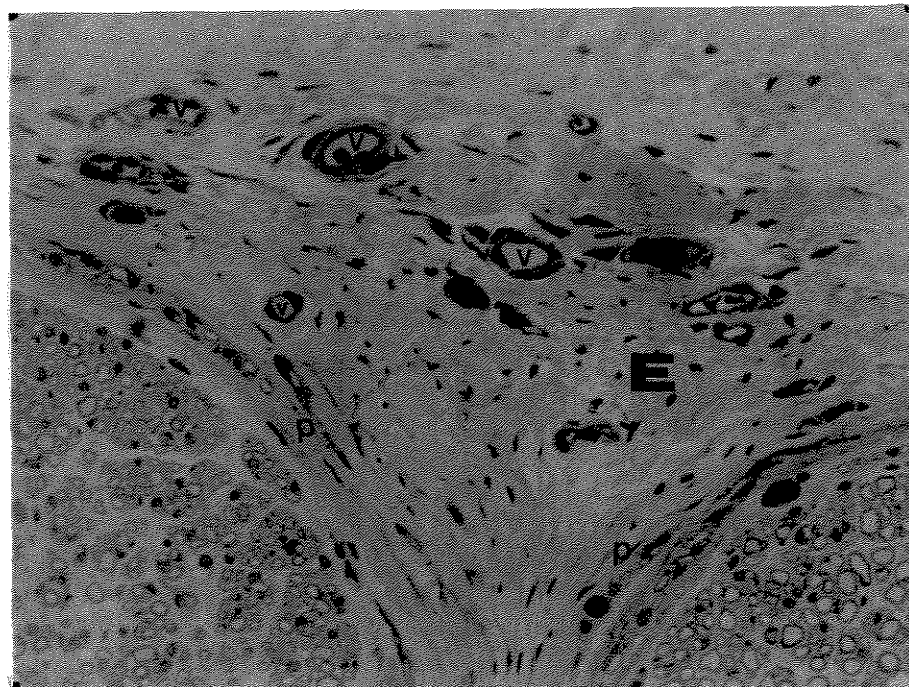


FIGURA 6-Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático regenerado.Observar epineuro espessado(E), vasos sanguíneos(v), perineuro (p). Coloração azul de toluidina. 400x.

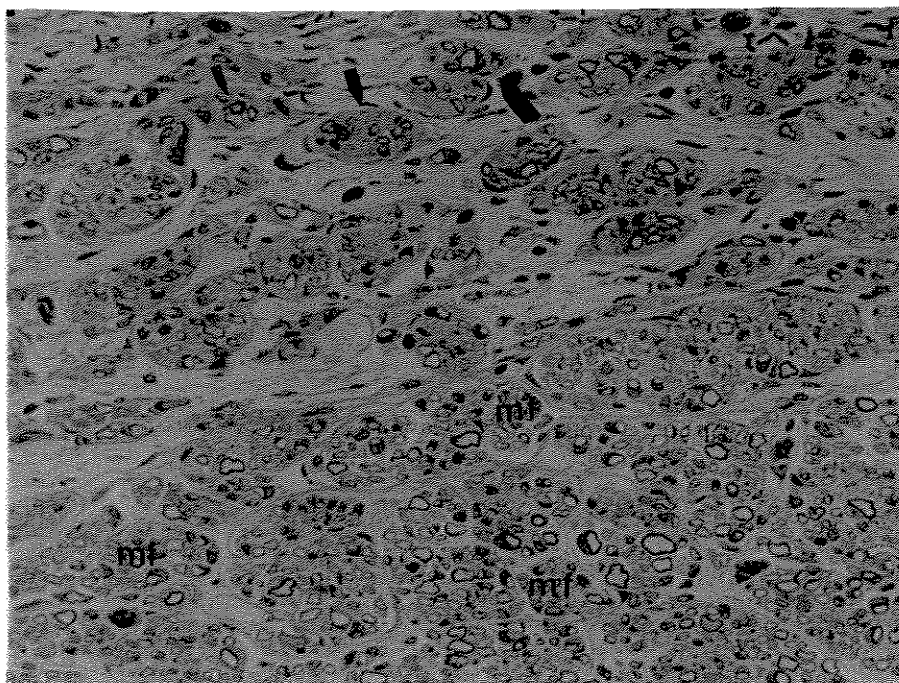


FIGURA 7-Fotomicrografia de corte transversal de nervo isquiático regenerado. Observar organização em minifascículos (mf), mais agrupados na porção central do nervo (metade inferior da foto), e mais espaçados na porção periférica (metade superior da foto), sendo alguns localizados no epineuro (setas). Coloração azul de toluidina. 400x.

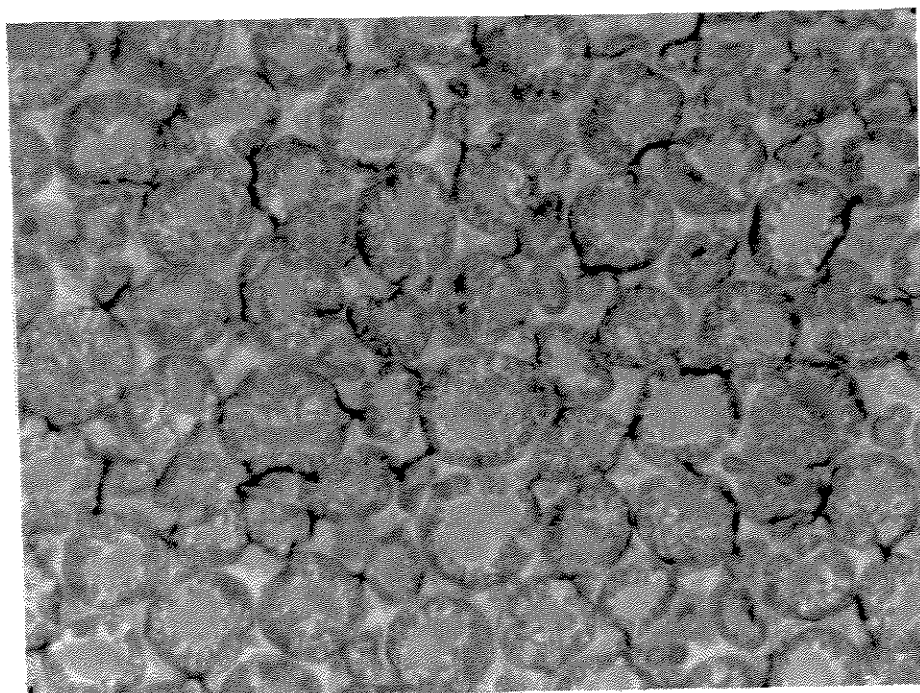


FIGURA 8-Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático um dia após infiltração com álcool etílico a 95%. Observar degeneração da bainha de mielina e do axônio. Coloração azul de toluidina. 1100x

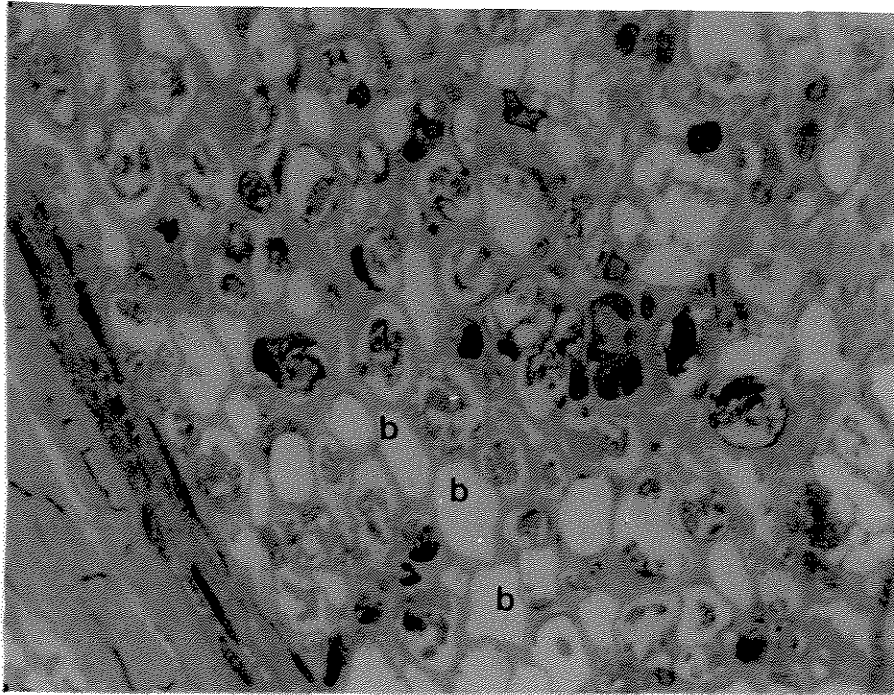


FIGURA 9- Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático 5 dias após infiltração com álcool etílico a 95%. Observar intensa degeneração da bainha de mielina e do axônio, em algumas partes já ocorrendo as bandas de **Bungner** (b).Coloração azul de toluidina. 1100x

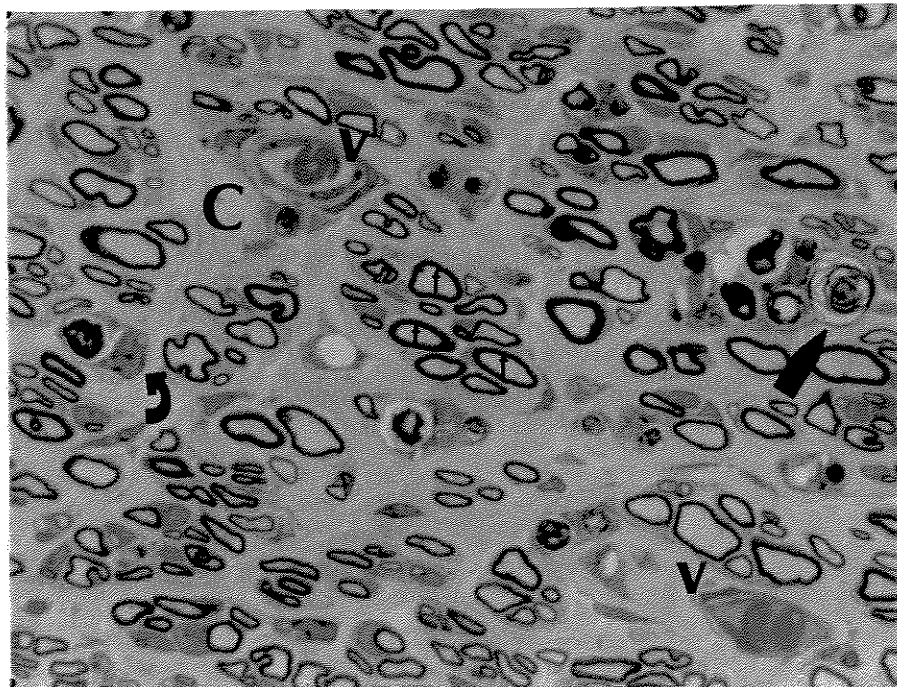


FIGURA 10-Fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático regenerado. Observar maior quantidade de tecido conjuntivo (C) entre os minifascículos, fibras nervosas com menor diâmetro e bainha de mielina mais delgada (f), vasos sanguíneos (V), macrófago (seta curva) e axônio degenerado (seta reta). Coloração azul de toluidina. 1100x

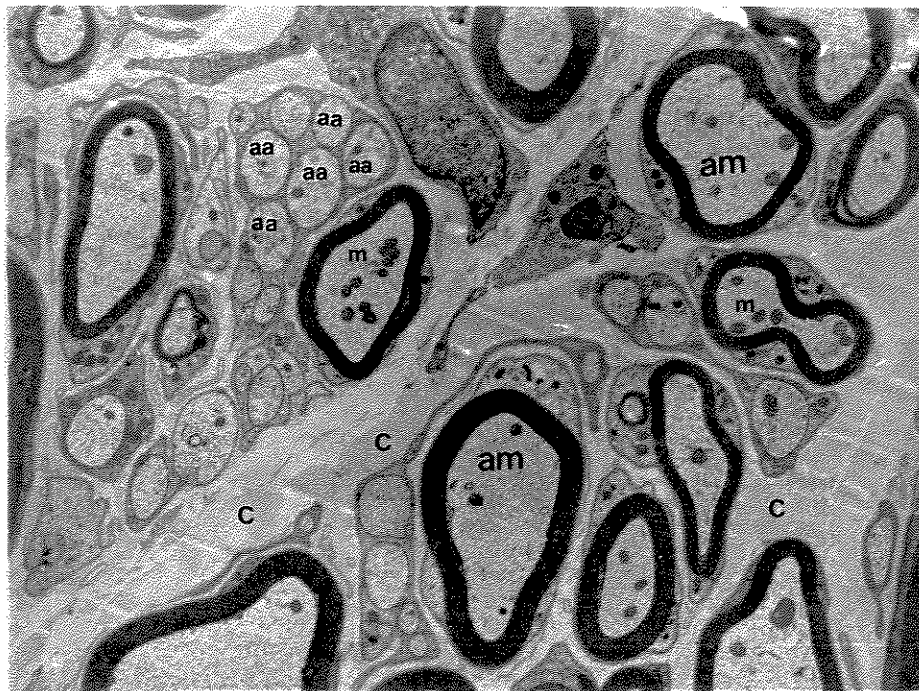


FIGURA 11-Elétronmicrografia do nervo isquiático normal. Observar fibras colágenas (c), axônios mielinicos (am), axônios amielínicos (aa), e mitocôndrias (m). 6.400x

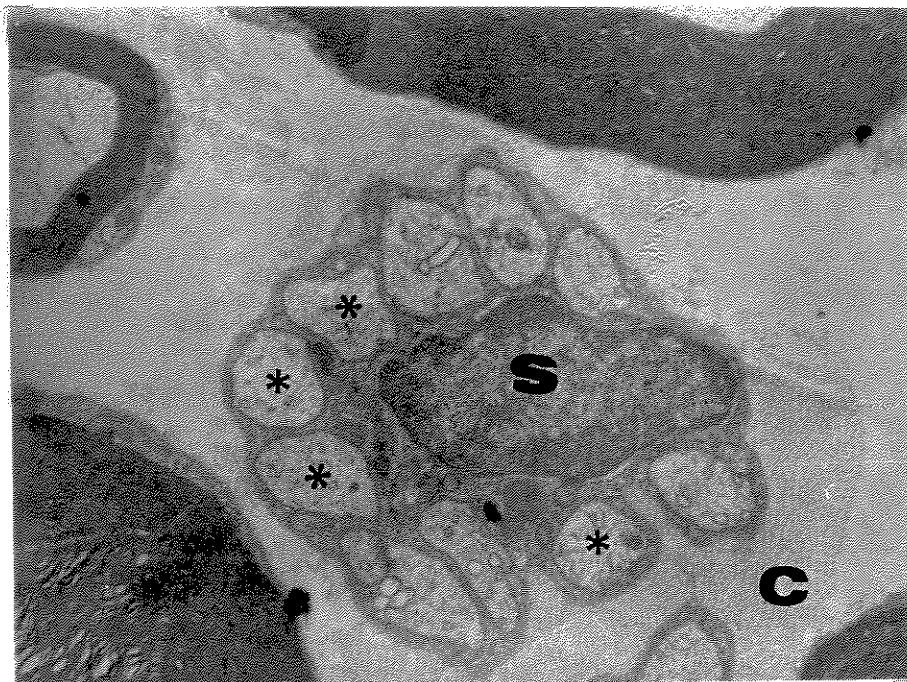


FIGURA 12-Elétronmicrografia do nervo isquiático normal. Observar axônios amielínicos (*) envoltos nas projeções citoplasmáticas da célula de Schwann (S), colágeno (C). 13.200x

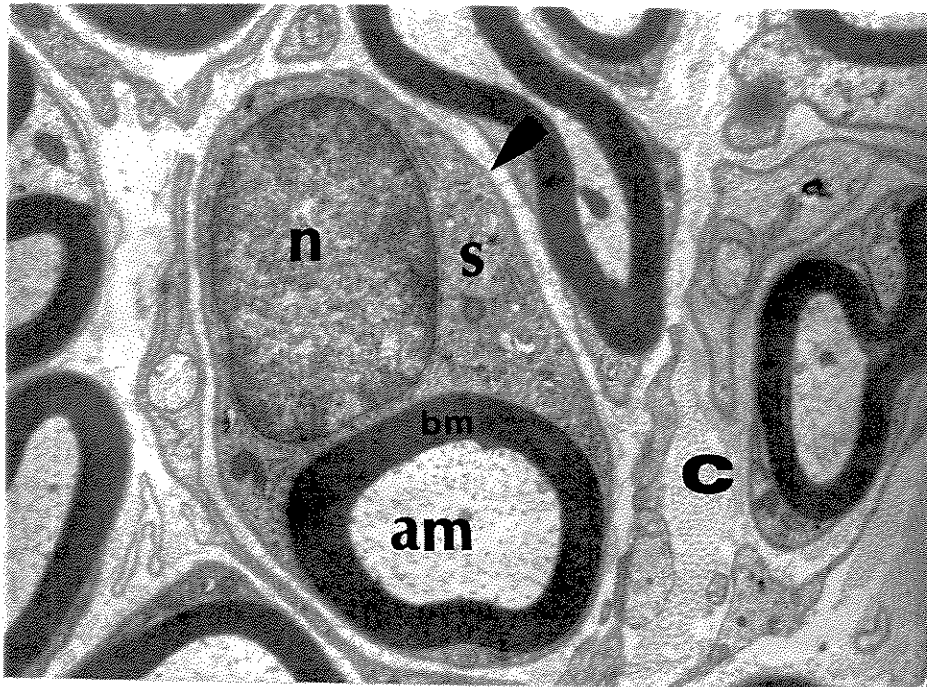


FIGURA 13-Elétronmicrografia do nervo isquiático normal. Observar axônio mielinico (am), célula de Schwann (s) núcleo da célula de Schwann (n) bainha de mielina (bm), membrana basal (ponta da seta), colágeno (C). 13.200x.

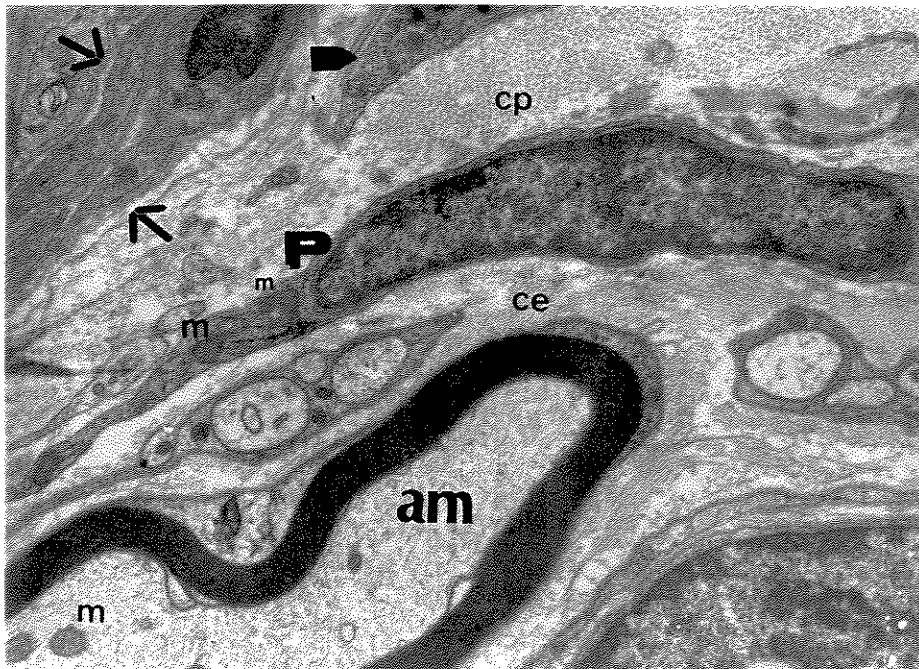


FIGURA 14-Elétronmicrografia do nervo isquiático normal. Observar célula perineural (P), vários prolongamentos de células perineurais (setas maiores), fibras colágenas do endoneuro (ce), fibras colágenas do perineuro (cp), mitocôndrias (m), vesículas elétronlucentes (seta menor), axônio mielinico (am). 13.200x

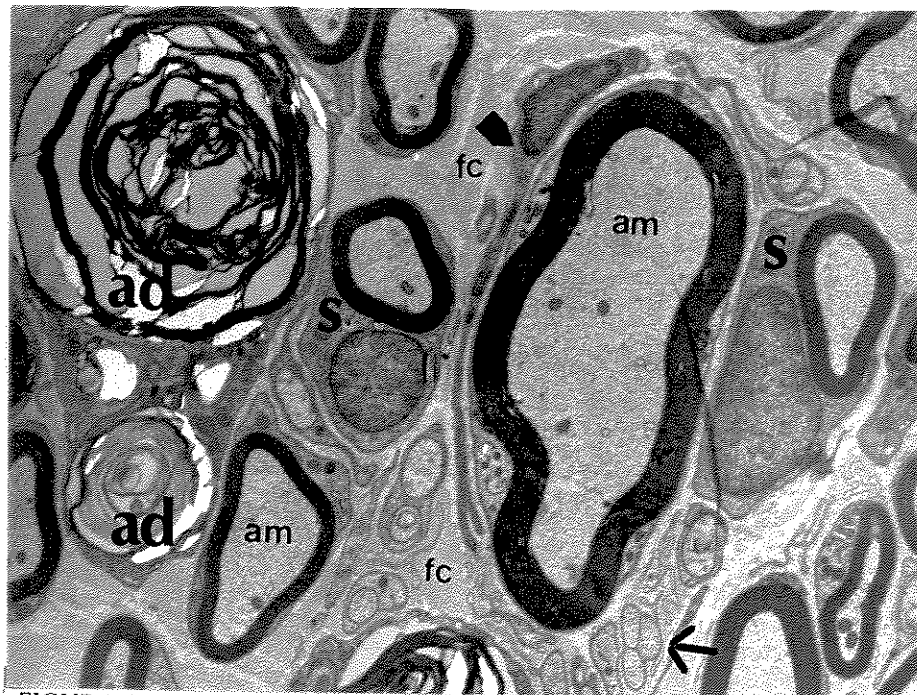


FIGURA 15- Elétronmicrografia do nervo isquiático regenerado. Observar axônios degenerados (ad), célula perineural (seta menor), axônios mielínicos (am), axônios amielínicos (seta maior), fibras colágenas (fc). 6.300x.

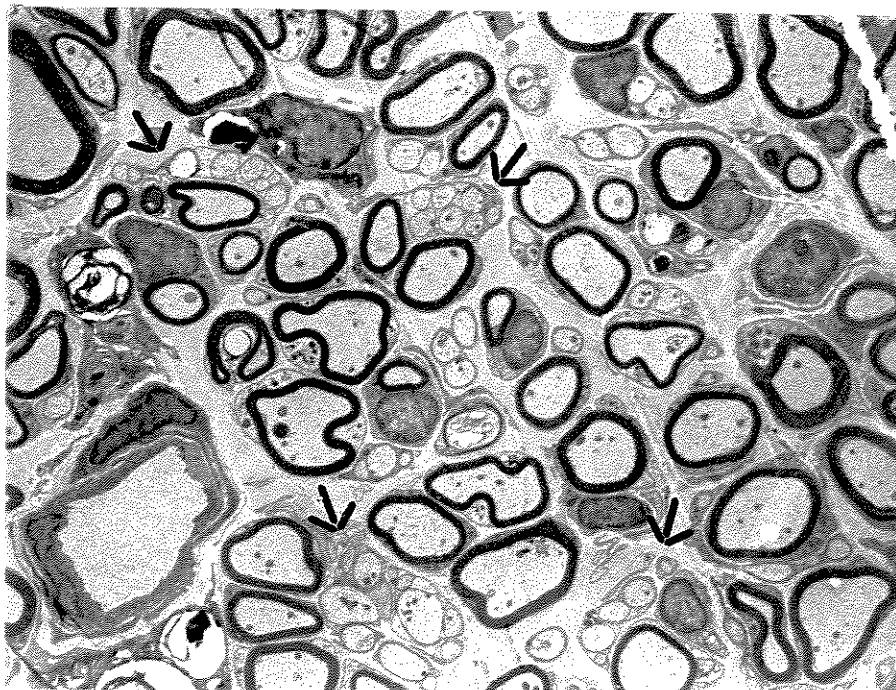


FIGURA 16- Elétronmicrografia do nervo isquiático regenerado. Observar organização em minifascículos (setas). 2.600X

Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 084-3, sobre "Uso de vitaminas do complexo B (tiamina, piridoxina, cianocobalamina) na regeneração do nervo ciático em ratos" sob a responsabilidade de Dr. Gualdo Benedito Rodrigues

está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04/10/1999. Este certificado expira em 04/10/2000.

CERTIFICATE

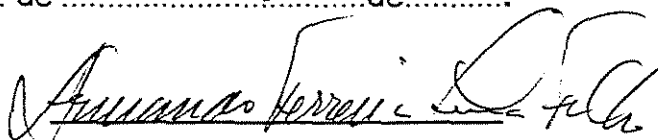
We certify that the protocol nº, about " ,

is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in / / .
Expiration date / / .

Campinas, 04 de outubro de 1999



Prof(a) Dr(a)
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP



Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) – CEEA/IB/UNICAMP