

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS
MESTRADO ACADÊMICO

**REPARO DO NERVO CIÁTICO DO RATO COM ENXERTO VENOSO AO AVESSE
"INSIDE-OUT" (VEIA DE DENTRO PARA FORA) E PREENCHIDO COM PLASMA
RICO EM PLAQUETAS.**

MARJEANE CRISTINA JAQUES HOCKMULLER

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS
MESTRADO ACADÊMICO

MARJEANE CRISTINA JAQUES HOCKMULLER

REPARO DO NERVO CIÁTICO DO RATO COM ENXERTO VENOSO
"INSIDE-OUT" (VEIA DE DENTRO PARA FORA) E PREENCHIDO COM PLASMA
RICO EM PLAQUETAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Medicina.

Orientador: Prof Dr. Gustavo Rassier Isolan

PORTO ALEGRE

2011

H685r Hockmuller, Marjeane Cristina Jaques

Reparo do nervo ciático do rato com enxerto venoso "inside-out" e preenchido com plasma rico em plaquetas / Marjeane Cristina Jaques Hockmuller ; orient. Gustavo Rassier Isolan– 2011.

139 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Regeneração nervosa 2. Nervo ciático 3. Plasma rico em plaquetas 4. Modelos animais de doenças 5. Ratos I. Isolan, Gustavo Rassier II. Título.

NLM: WE 200

*Porém onde se achará a sabedoria, e onde está o lugar da inteligência?
O homem não conhece o seu valor, e nem ela se acha na terra dos viventes.
O abismo diz: Não está em mim; e o mar diz: Ela não está comigo.
Não se dará por ela ouro fino, nem se pesará prata em troca dela.
Nem se pode comprar por ouro fino de Ofir, nem pelo precioso ônix, nem pela safira.
Com ela não se pode comparar o ouro nem o cristal; nem se trocará por jóia de ouro fino.
Não se fará menção de coral nem de pérolas; porque o valor da sabedoria é melhor que o dos
rubis.
Não se lhe igualará o topázio da Etiópia, nem se pode avaliar por ouro puro.
Donde, pois, vem a sabedoria, e onde está o lugar da inteligência?
Pois está encoberta aos olhos de todo o vivente, e oculta às aves do céu.
A perdição e a morte dizem: Ouvimos com os nossos ouvidos a sua fama.
Deus entende o seu caminho, e ele sabe o seu lugar.
Porque ele vê as extremidades da terra; e vê tudo o que há debaixo dos céus.
Quando deu peso ao vento, e tomou a medida das águas;
Quando prescreveu leis para a chuva e caminho para o relâmpago dos trovões;
Então a viu e relatou; estabeleceu-a, e também a esquadrinhou.
E disse ao homem: Eis que o temor do Senhor é a sabedoria, e apartar-se do mal é a
inteligência.*

*A SABEDORIA É DOM DE DEUS
Jó, 28: 12-28*

AGRADECIMENTOS

A Deus e Seu Filho Jesus Cristo, pela oportunidade da vida e de vivê-la em plenitude, pelo dom da Sabedoria e pela sua Guarda.

Aos meus pais, Abel e Clair, razão da minha existência, mestres em me ensinar os valores morais que norteiam minha vida, que acreditam em meus sonhos e possibilitaram todas as oportunidades até aqui.

Aos meus tios Carlos Alberto (Tio Beto) e Cecília (Tia Ciça), Ademar (Tio Laco), Ademir (Tio Mire); Bento e Amenaides, Marlene e Edgar (in memorian), pelas suas presenças constantes, pelo apoio integral, incentivando-me desde os primeiros passos em direção ao curso de Medicina.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rassier Isolan, pela sua orientação.

Ao Prof Dr. Antônio César Gonçalves Borges, pelos primeiros ensinamentos na Neurocirurgia, pelo exemplo de médico dedicado à especialidade, pelo apoio incondicional, especialmente nos momentos de maior dificuldade, possibilitando-me seguir em frente e dando-me oportunidades.

Ao Prof Dr. Mário Ferreira Coutinho, pelo modelo de homem e médico, por ensinar, além das técnicas neurocirúrgicas, o valor da ética e do respeito ao paciente e aos pares.

Ao Prof. Dr. Ápio Cláudio Martins Antunes, pelo ensino, respeito, modelo de homem, mestre e neurocirurgião, pela presença constante em todos os momentos, apoio, pelas oportunidades oferecidas e por me ensinar o caminho que devo trilhar para a obtenção de meus sonhos.

Obrigado Mestre!

Ao Profº Dr Marcos Antônio Stefani, pela amizade de muitos anos, por ter aberto a primeira porta em direção à pós-graduação, por me incentivar na pesquisa médica, pelo modelo de colega e Mestre.

Ao Prof Dr Luiz Fernando N. Franciosi, pelos ensinamentos e correção, por me guiar em uma nova área de conhecimento com respeito e carinho, e, acima de tudo, pelo apoio, com paciência, em meus objetivos e por me mostrar- o caminho correto para atingi-los.

Ao Prof. Dr. Ricardo Francalocci Savaris, pelo ensino, apoio, paciência em abdicar de suas horas de descanso para me ensinar- e auxílio na elaboração dessa dissertação. A frase: "Tu não estás sozinha nisso" representou muito mais que trabalhos lidos e revisados. Obrigado!

Ao Prof Dr. Luis Fernando Moreira, pelo modelo de professor, por ensinar de forma correta, pelo apoio prestado nos momentos de indecisão.

À Enfermeira Marta Justina Giotti Cioato, pelo respeito, disposição em ensinar e colaborar com a execução dessa dissertação, desde o planejamento até a total realização na Unidade de Experimentação Animal do HCPA.

À Médica Veterinária Fabíola Schons Meyer pela sua capacidade de ensinar, pelos cuidados dispensados a mim como Pesquisadora na Unidade de Experimentação Animal do HCPA, pelo apoio desde o primeiro dia da realização desta pesquisa.

À Profª Dra. Luíse Maurer, pela sua paciência, carinho, respeito e disponibilidade em todos os momentos em que foi solicitada a colaborar neste trabalho, e, acima de tudo, pelo seu conhecimento.

Aos Funcionários Jorge, Flávia e Everaldo, do Laboratório de Patologia Experimental, pelos sorrisos a cada chegada para a confecção das lâminas, pelo abraço carinhoso, pela paciência em

ensinar os meios de processamento, pelo fornecimento da literatura a ser estudada, pelas cópias solicitadas, enfim, pelo apoio e respeito ao Pesquisador.

À Prof^ª Dra. Leila Chimelli, pela sua disponibilidade e simplicidade.

À sra. Estela Maris Emer Araripe, por seu carinho, respeito e orientação adequada durante a realização do Mestrado.

Ao amigo Lucas Garcia, que, apesar de não nos conhecermos pessoalmente, teve a paciência de digitar esta dissertação, com a compreensão sem medida de cada dificuldade enfrentada, digitando inúmeras vezes a mesma página.

Ao amigo Vinícius Castro, pela presença em todos os momentos da realização deste trabalho, pela companhia nos procedimentos cirúrgicos e, nos finais de semana, na divisão das revisões, pelo sorriso amigo. Que o acompanhamento dessa trajetória sirva de impulso para teus sonhos.

Aos Residentes do Serviço de Neurocirurgia do HCPA: André Franciscatto, Mateus Beck, Athaulpa Strapasson, Thiago Ávila e Mateus Franzoi, pelo aprendizado, convívio e incentivo.

Aos Residentes do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Ernesto Dorneles: Giovana, Maria Cláudia e Marcel, pelo incentivo, convívio diário com aprendizado mútuo, pela amizade sincera.

Às colegas Ana Cláudia e Gueisha, pelo carinho e pelo companheirismo neste percurso, inúmeras vezes abrindo mão de suas atividades em prol das minhas funções no mestrado.

Aos colegas da Equipe de Neurocirurgia do HPS Canoas, especialmente ao Dr. Rafael Winter, Dr. Isaac Bertuol e Dra. Daniela Carla Lunelli, pelo incentivo na realização desta conquista e pela amizade demonstrada cada vez que solicitados abrindo mão de seus horários de lazer junto aos seus familiares e afazeres, para que eu pudesse realizar essa pesquisa. Quero dividir essa realização com cada um de vocês.

À colega Letícia Feldens, pela sincera amizade, pelos momentos de riso, pelo ombro amigo nas horas de angústia e parceria na divisão de tarefas.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, da Secretaria da Pós-Graduação em Ciência Cirúrgicas e do GPPG do HCPA, pela atenção e presteza gentilmente dispensadas a cada solicitação.

À grande amiga Pipoca, que, apesar de não ter o conhecimento, mantinha sua presença incondicional aos meus pés, sabendo eu que a sua lealdade e carinho eram demonstrados através desses gestos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por oportunizar a realização desse trabalho.

A cada um de vocês o meu muito obrigado e meu carinho, sabendo que minhas palavras não são suficientes, somente Deus para retribuí-los, derramando as mais ricas bênçãos sobre as suas vidas e de suas famílias.

ABSTRACT

The peripheral nerve injuries are common, resulting in motor, sensorial and autonomic impairment. In lesions occurring heavy loss of neural tissue, repair by primary suture is not allowed, being the nerve autograft treatment the choice. The use of autologous vein grafts used as a conductor pipe between injured nerve stumps filled with substances stimulating nerve regeneration is presented as an alternative technique. The platelet rich plasma is an autologous blood product for the laboratorial process, rich in growth factors originated from α -granules of platelet. The aim of this study was to study the influence of platelet rich plasma in the regeneration of peripheral nerve transected and repaired with an inside-out vein, compared to the utilization of inside-out empty vein and the direct suture of the nerve endings. The evaluation was performed by interposing a jugular inside out empty vein (Group 3) filled with platelet-rich plasma (Group 4) in 10-mm defects in a sciatic nerve of rats, in comparison to the direct suture (Group 2) of divided ends, using histological technique for the identification of coaptation of nerve stumps or not. Groups 2 and 4 showed coaptation of the nerve stumps, being concluded that the inside-out vein completed as platelet rich plasma is an attractive alternative for the treatment of peripheral nerve injuries.

RESUMO

As lesões de nervos periféricos são comuns, resultando em comprometimento motor, sensorial e autonômico. Nas lesões em que ocorre grande perda de tecido neural, a reparação através de sutura primária não é permitida, sendo a auto-enxertia de nervo o tratamento de escolha. A utilização de um enxerto venoso autólogo utilizado como tubo condutor entre os cotos nervosos lesados preenchidos com substâncias que estimulem a regeneração nervosa apresenta-se como uma técnica alternativa. O Plasma Rico em Plaquetas é um produto derivado do sangue autógeno por processo laboratorial, rico em fatores de crescimento originados dos grânulos α -plaquetários. O objetivo deste trabalho experimental foi estudar a influência do Plasma Rico em Plaquetas na regeneração do nervo periférico seccionado e reparado com veia ao avesso, comparado ao uso da veia ao avesso vazia e à sutura direta das extremidades nervosas. A avaliação foi obtida com a interposição de veia jugular externa ao avesso vazia (Grupo 3) e preenchida com plasma rico em plaquetas (Grupo 4) em defeitos de 10 mm de nervo ciático de ratos Wistar, comparados à sutura direta (Grupo 2) das extremidades seccionadas, utilizando técnica histológica para identificação da coaptação ou não dos cotos nervosos. Os grupos 2 e 4 apresentaram coaptação dos cotos nervosos, concluindo-se que a veia ao avesso preenchida como Plasma Rico em Plaquetas é uma alternativa vantajosa no tratamento de lesões nervosas periféricas.

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

Tabela 1: Classificação das lesões de nervos periféricos segundo Seddon e Sunderland	49
Tabela 2: Descrição dos grupos, procedimentos realizados e data do sacrifício dos animais.....	83
Tabela 3: Análise da Contingência entre os 4 grupos.....	86
Tabela 4: Descrição da automutilação de dedos em cada grupo	89
Tabela 6: Descrição dos óbitos e suas causas	91
Tabela 7: Descrição das intercorrências em cada Grupo	91
Tabela 8: Relação de grupos e extremidades coaptadas e não-coaptadas	95
Gráfico 1	86
Gráfico 2: Gráfico do Teste Chi-quadrado	87
Figura 1: Desenho esquemático de um neurônio motor.	21
Figura 2: Suprimento sanguíneo intrínseco para raiz nervosa.	28
Figura 3: Técnica da neurólise	63
Figura 4: Sutura epineural.....	64
Figura 5: Sutura perineural	65
Figura 6: Enxerto interfascicular (Cable graft).....	66
Figura 7: Acondicionamento dos animais.....	76
Figura 8: Anestesia dos animais	78
Figura 9: Coleta de sangue do plexo retrorbital esquerdo	80
Figura 10: Posicionamento do animal para dissecação da veia jugular externa esquerda.....	80
Figura 11: Veia jugular externa esquerda dissecada.....	80

Figura 12: Veia jugular externa esquerda com reparo das extremidades cranial e caudal	80
Figura 13: Veia jugular externa esquerda com extremidades clampeadas	81
Figura 14: Veia jugular externa esquerda com sonda periodontal em sua luz.....	81
Figura 15: Dissecção do nervo ciático direito.....	81
Figura 16: Nervo ciático direito seccionado com coto proximal (esquerdo) e distal (direito)	82
Figura 17: Animal do Grupo 3. Locais de automutilação. *1- Dedo nº1* 2- Dedo nº 2* 3- Dedo nº3 * Dedo nº4	89
Figura 18: Animal com a pata direita caída	
Figura 19: Animal com atrofia da pata	
direita	90
Figura 20: Abertura dos dedos da pata esquerda (não operada)	90
Figura 21: Teste da marcha em animal do G2	90
Figura 22: Imagem microscópica de um nervo normal	92
Figura 23: Coto proximal(inferior) e coto distal (superior)	92
Figura 24: Coto proximal : seguimento com arranjo das fibras.....	92
Figura 25: Coto distal: segmento sem arranjo de fibras	93
Figura 26: Coto proximal (inferior) e coto distal (superior)	93
Figura 27: Coto proximal (esquerda) e coto distal (direita).....	93
Figura 28: Coto proximal(inferior) e coto distal(superior)	94
Figura 29: Coto proximal (inferior) e coto distal (superior)	94
Figura 30: Coto proximal (inferior) e coto distal (superior)	94
Figura 31: Coaptação dos cotos proximal (inferior) e distal (superior) com imagens dos pontos de sutura	95
Figura 32: Coaptação adequada dos cotos	95

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1. NERVO PERIFÉRICO	20
1.1.1. HISTOLOGIA E ANATOMIA	20
1.2 VEIAS	29
1.3 PLAQUETAS	31
1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS	33
1.5 FATORES NEUOTRÓFICOS	41
1.6 TRAUMATISMO DE NERVO PERIFÉRICO	44
1.7 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS	47
1.8 MECANISMOS DA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS	49
1.9 HISTÓRICO DA CIRURGIA DOS NERVOS PERIFÉRICOS	57
1.10 TRATAMENTO DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA	59
2. OBJETIVO	73
3. MATERIAS E MÉTODOS	75
4. RESULTADOS	89
5. DISCUSSÃO	97
CONCLUSÃO	105

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	123
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	140

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As lesões em nervos periféricos resultam em comprometimento da sensibilidade e/ou da motricidade, sendo patologias frequentes. Quando a integridade morfológica do axônio é preservada, poderá haver progressão para a regeneração completa em curto período de tempo. Porém, as lesões que levam à perda tecidual podem evoluir com prejuízos na forma ou na função dos órgãos-alvo, se não tratadas de forma adequada.

Várias técnicas são propostas na tentativa de restaurar a integridade axonal ou diminuir as sequelas produzidas pela lesão nervosa periférica, uma vez que as morbidades podem levar a déficits importantes, com diminuição da qualidade de vida dos pacientes e prejuízo ao sistema previdenciário, levando à incapacidade funcional precoce (1, 2).

O trauma que atinge o nervo possui diferentes intensidades, desencadeando as mais variadas formas de lesão. As lesões mais frequentes ocorrem por trauma contuso, projéteis de arma de fogo (PAF) ou outros objetos (3). As lesões provocadas por exérese de tumores, na maioria das vezes, acarretam grande perda de tecido nervoso, impedindo a anastomose primária (4). Os nervos periféricos ainda podem ser acometidos por lesões por esmagamento e deficiências nutricionais.

A correção cirúrgica das lesões nervosas periféricas não é um conceito recente. Em 1836, já existiam relatos de reparos em lesões de nervos com sucesso. O primeiro estudo controlado ocorreu em 1893, descrito por Howell e Hubersendo realizado em cães. Seguiu-se com Sherren, 1908, estudo similar. Os maiores avanços no tratamento de lesões de nervos periféricos ocorreram durante a II Guerra Mundial, quando se reconheceu a importância dos métodos de restauração de traumas de extremidades. Nesse período, observou-se a necessidade da reparação do nervo como parte do processo da microcirurgia reconstrutiva. Vários relatos de reparações nervosas periféricas resultaram das experiências dessa guerra.

Babcock e Bunell (5), em trabalhos independentes, propuseram a padronização de técnicas cirúrgicas para reparo de nervo periférico. A grande parte das informações relatadas por esses autores forma a base para os protocolos de reparação nervosa nos dias de hoje.

As lesões de nervos com perda de tecido nervoso não são favoráveis a reparo com neurografia término-terminal já que acarretam lacunas no nervo. Assim, a possibilidade de enxerto de nervo foi relatada primeiramente por Philipeaux e Vulpian em 1870.

O aloenxerto usado em humanos foi relatado por Albert, em 1878 Em 1906, Sherren descreveu suas experiências com enxerto de nervo. Huber, em 1920, relatou a enxertia de nervos autólogos em cães com bons resultados. Ballance e Duelo, em 1932, popularizaram o uso de enxertos em lesões de nervos. Em 1937, Bunnell Boyes relatou o uso de enxertos de nervos digitais. Em todos esses relatos, o sucesso não foi uniforme, levando à busca de alternativas de tratamento cirúrgico.

Nas últimas décadas, tem-se evidenciado o refinamento nos princípios básicos e reparação de lesões nervosas. A melhor da compreensão da biologia básica do nervo levou ao avanço do tratamento cirúrgico. As investigações na área de material de sutura e implante biológico tem contribuído para o avanço das técnicas de reconstrução, assim como o uso do microscópio, para o avanço da técnica cirúrgica de reconstrução de nervos.

A pesquisa em auto-enxertia, aloenxerto e técnicas de sutura contribuíram para o conhecimento dos fatores que acarretam sucesso ou fracasso do reparo nervoso.

Estudos têm sido realizados em inúmeras áreas do conhecimento: biologia molecular, auxologia, laser de CO₂, indutores de crescimento e imunossupressores (6-13).

O uso de células tronco adultas da medula óssea associado ao plasma rico em plaquetas (PRP), em estudos mais recentes procura meios de indução do crescimento neuronal (14).

As câmaras de tubulização estão sendo estudadas extensamente. Essas câmaras são cilindros ocos que servem como canal para o encontro dos cotos nervosos seccionados, que permitem a introdução de alguns agentes indutores da regeneração nervosa.

A transposição de nervos pode auxiliar na restauração da atividade em áreas de músculo desnervado. O implante direto de cotos nervosos no tecido muscular pode levar ao retorno da função motora.

Um conhecimento amplo da biologia do nervo periférico, dos mecanismos de lesão, degeneração e regeneração, bem como as formas de tratamento cirúrgico de forma e em tempo adequados são fundamentais para o sucesso da reparação nervosa (15).

Atualmente, uma quantidade considerável de estudos tem sido realizada com o objetivo da superação da perda de substância nervosa através da utilização de tubos condutores, dos mais variados tipos, a fim de melhorar o resultado funcional da lesão nervosa periférica. Nas lesões com lacunas de nervo de até 10 mm, os tubos biológicos (veias autólogas) podem promover bons resultados e permitir a atração quimiotática entre os cotos proximal e distal. As lesões com lacunas maiores que 1 cm não permitem o tropismo, necessitando do uso de tubos biodegradáveis, apresentando resultados controversos. Os tubos condutores vazios, de qualquer tamanho, biológicos ou não, podem entrar em colapso ou ser parcialmente reabsorvidos e substituídos por áreas cicatriciais.

Assim, este estudo, associado com outros já realizados ou em fase de conclusão, permitirá avanços na área da utilização da veia autóloga como condutor, e do PRP como estimulador da regeneração nervosa.

REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. NERVO PERIFÉRICO

1.1.1. HISTOLOGIA E ANATOMIA

A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio formado por um corpo celular ou pericário, que contém o núcleo de onde partem os prolongamentos. Em geral, o volume total dos prolongamentos de um neurônio é maior do que o volume do corpo celular. A morfologia dos neurônios é complexa, porém quase todos apresentam três componentes básicos:

- a. dendritos: prolongamentos numerosos, especializados na função de receber os estímulos do meio ambiente, de células epiteliais sensoriais ou de outros neurônios;
- b. corpo celular ou pericário: é o centro trófico da célula e também capaz de receber estímulos;
- c. axônio: prolongamento único, especializado na condução de impulsos que transmitem informações do neurônio para outras células (nervosas, musculares, glandulares).

A forma e as dimensões das células nervosas e de seus prolongamentos são muito variáveis. O corpo celular pode ser esférico, piriforme ou anguloso. Em geral, as células nervosas são grandes, podendo o corpo celular chegar a medida de 150 μm . Entretanto, os neurônios ,denominados células granulomatosas do cerebelo, estão entre as menores células dos mamíferos, com o corpo celular medindo de 4 a 5 μm de diâmetro.

De acordo com sua morfologia, os neurônios podem ser classificados em:

- a. neurônios multipolares: apresentam mais de dois prolongamentos celulares;
- b. neurônios bipolares: possuem um dendrito e um axônio; e

- c. neurônios pseudo-unipolares: apresentam próximo ao corpo celular um prolongamento único que logo se divide em dois: um ramo para a periferia e outro para o sistema nervoso central (SNC).

A grande maioria dos neurônios é multipolar. Os neurônios bipolares são encontrados nos gânglios coclear e vestibular, na mucosa olfatória e na retina. Neurônios pseudo-unipolares são encontrados nos gânglios espinhais, que são gânglios sensitivos situados nas raízes dorsais dos nervos espinhais.

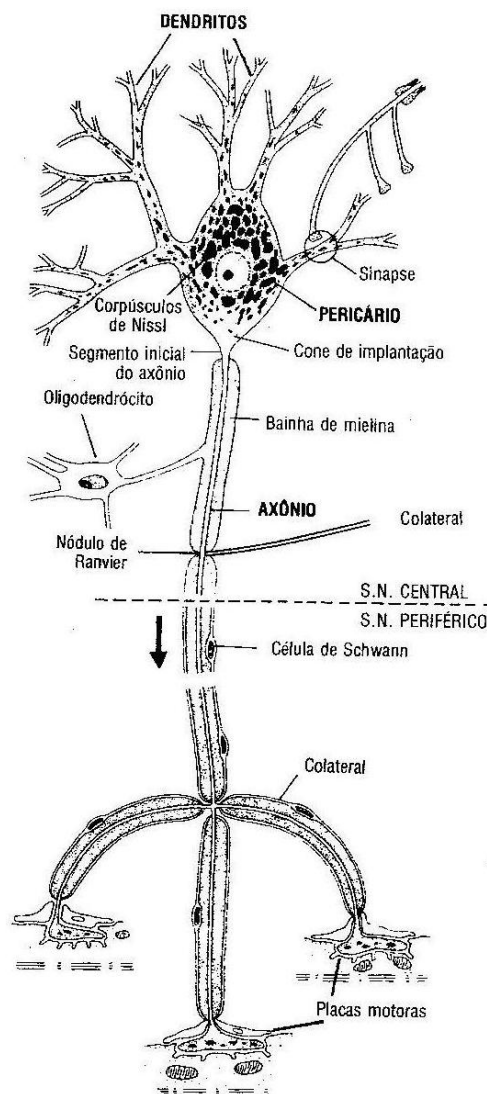


Figura 1: Desenho esquemático de um neurônio motor.
Fonte: Junqueira (16)

A mielina que envolve o axônio em seu trajeto no sistema nervoso central (SNC) é produzida pelos **oligodendrócitos**. No sistema nervoso periférico (SNP), a bainha de mielina é produzida pelas **células de Schwann**, e o **corpo celular** possui núcleo grande e claro, com nucléolo bem visível. Os **corpúsculos de Nissl** são encontrados no pericário e nos dendritos mais grossos. Na parte superior direita, observa-se um axônio de outro neurônio, com três botões terminais, um dos quais faz sinapse com o neurônio do desenho. O axônio desse neurônio termina em placas motoras, por meios das quais o impulso nervoso é transmitido às fibras musculares estriadas esqueléticas.

Nos neurônios cujos axônios são mielinizados, o segmento entre o cone de implantação e o início da bainha de mielina é denominado segmento inicial, que recebe inúmeros estímulos, tanto excitatórios como inibitórios, cujo resultado pode originar um potencial de ação em que a propagação é o impulso nervoso. Esse segmento contém vários canais iônicos e, em toda a sua extensão, mantém diâmetro constante, sem ramificação abundante. Seu citoplasma ou axoplasma é muito pobre em organelas, com poucas mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático liso (REL) e microtúbulos. Os neurofilamentos são frequentes. A porção final do axônio denomina-se telidendro e é muito ramificada.

Sistema de Transporte Axonal

Dentro de um mesmo neurônio, existem diferentes sistemas de fluxos axoplasmáticos, com a identificação de três principais fluxos: do corpo celular para os tecidos, denominado fluxo anterógrado, com um sistema de transporte lento e rápido, e dos tecidos-alvo para os corpos celulares, denominado de fluxo retrógrado (17).

1. Transporte Anterógrado: o material produzido no corpo celular é transportado ao longo do axônio em várias velocidades, classificando-se dois principais grupos: o transporte rápido, com uma velocidade de 400 mm ao dia, carregando substâncias como neurotransmissores e vesículas transmissoras, e o transporte lento, com velocidade de 6 mm ao dia, transportando material citoesquelético, como neurofilamentos e microtúbulos (17).
2. Transporte Retrógrado: esse transporte ocorre em uma velocidade de 200 mm ao dia, transportando vesículas de transmissores recicladas e materiais extracelulares, como fatores de crescimento (17).

Sinapses

A transmissão do impulso nervoso de um neurônio para outro ocorre através das sinapses. Apesar de as sinapses se estabelecerem entre o axônio e o dendrito (axodendríticas), ou entre o axônio e o corpo celular (axossomática), elas podem ocorrer também entre dois dendritos (dendrodendríticas) ou entre axônios (axoxônicas).

Nas sinapses, as membranas das duas células nervosas são separadas por um espaço de 20 a 30 nm, chamada fenda sináptica. No local da sinapse, as membranas são denominadas de pré e pós-sinápticas; essas são espessadas devido ao acúmulo de material protéico.

Na porção terminal dos axônios, estão presentes numerosas vesículas sinápticas contendo substâncias denominadas neurotransmissores, que são mediadores químicos responsáveis pela transmissão do impulso nervoso através das sinapses.

Esses mediadores químicos são liberados na membrana pré-sináptica e aderem às moléculas receptoras da membrana pós-sináptica, realizando a condução do impulso nervoso.

Os neuromoduladores são substâncias que modificam estas moléculas receptoras, aumentando ou diminuindo a resposta aos neurotransmissores.

Tecido Conjuntivo do Sistema Nervoso Periférico

Os axônios do tecido nervoso do adulto são envolvidos por dobras únicas ou múltiplas formadas por uma única célula, que, nas fibras nervosas periféricas, denomina-se célula de Schwann. As fibras nervosas são constituídas por um axônio e suas bainhas envoltórias. Em torno dos axônios mais calibrosos, a célula envoltória forma uma dobra enrolada em espiral, cujo conjunto de envoltórios concêntricos é denominado bainha de mielina e as fibras, fibras nervosas mielínicas.

Nos axônios de maior diâmetro e com bainha de mielina mais espessa, a condução do impulso nervoso é mais rápida. Já os axônios de menor diâmetro são envolvidos por uma única dobra da célula envoltória, constituindo as fibras nervosas amielínicas.

A mielina é um complexo lipoproteico, que forma bainhas descontínuas, interrompidas em intervalos regulares (os nódulos de Ranvier), onde existe um depósito de material denso. O intervalo entre dois nódulos denomina-se internódulo.

A espessura da bainha de mielina varia de acordo com o diâmetro do axônio, sendo constante ao longo do mesmo. Cada internódulo possui um comprimento de 0,08 a 1 cm, com forma cilíndrica recoberto por uma célula de Schwann, contendo um axônio em sua porção central. Os nódulos de Ranvier são locais sem mielina cobertos por prolongamentos de células de Schwann adjacentes.

No sistema nervoso periférico, as fibras nervosas agrupam-se em feixes, dando origem aos nervos, que devido à cor da mielina, são esbranquiçados.

Epineuro

O epineuro é uma camada fibrosa mais externa de tecido conjuntivo denso que forma o tecido de sustentação dos nervos, revestindo o nervo, preenchendo os espaços entre os feixes de fibras nervosas e forrando os fascículos, aumentando o deslizamento entre eles (18). É formado por 7 a 8 camadas de células fibroblásticas, com espessura média de 1 μ m (19). Arteríolas e vênulas atravessam-no, formando a seguir uma rede de capilares ao redor das fibras nervosas e ocupando o espaço interfascicular (19). A proteção do fascículo de traumas externos e a manutenção do sistema de provisão de oxigênio via vasos sanguíneos epineurais são funções do epineuro (20). O conteúdo do epineuro é variável, diferindo entre indivíduos e entre nervos de um mesmo indivíduo (17, 21). Próximo a ossos e articulações, o epineuro é, com frequência, mais abundante do que em relação a outros locais devido à maior chance de lesões nestes locais.

Perineuro

O perineuro é uma bainha de várias camadas de células achatadas, justapostas, que reveste cada um dos feixes de nervos. Dentro da bainha perineural encontram-se os axônios, cada um deles envolvido pela bainha de células de Schwann, e possui basicamente três funções (17, 22):

- Proteger os conteúdos dos tubos endoneurais,
- Agir como uma barreira mecânica a forças externas, e
- Servir como barreira de difusão, mantendo fora do meio intrafascicular substâncias tóxicas.

Em estudos experimentais realizados, antes de se romperem, os fascículos podem ser inflados através de fluídos a uma pressão de aproximadamente 1000 mmHg (20). Sob tensão, em testes de nervos periféricos, essa é a última camada a se romper (18).

Endoneuro

É um tecido conjuntivo intrafascicular constituído de fibras colágenas, com diâmetro entre 30 a 50 nm, mais abundante nos nervos superficiais do que nos profundos (19). É uma estrutura que circunda a membrana basal do neurônio, exercendo importante papel na manutenção da pressão dos fluídos no interior do espaço endoneural (18). Caracteriza-se por ser distendível, elástico, constituído de uma matriz de tecido colagenoso compacto (20). Não possui canais linfáticos (1, 17, 22). A pressão em seu interior é ligeiramente elevada ($+ 1,5 \pm 0,7$ mmHg) comparada com tecidos vizinhos como o tecido celular subcutâneo ($- 4,7 \pm 0,8$ mmHg) e o tecido muscular (-2 ± 2 mmHg) (20, 23). Na ocorrência de traumas, essa pressão pode aumentar, com edema subsequente, podendo afetar a microcirculação e a função do nervo (20).

Mesoneuro

O mesoneuro é um tecido areolar frouxo ao redor de troncos de nervos periféricos, sendo assim chamado devido à semelhança morfológica com o mesentéreo do intestino delgado (17, 24).

Circulação

O sistema nervoso representa 2% da massa corporal, consumindo 20% do oxigênio disponível na circulação sanguínea. Os neurônios são extremamente sensíveis a alterações no fluxo sanguíneo, sendo imperativo haver um suprimento vascular ininterrupto para a demanda da função neuronal normal (17).

Vasculatura das raízes nervosas

Cada raiz nervosa é irrigada por dois vasos aferentes distintos, sendo a artéria radicular proximal proveniente de uma artéria espinal longitudinal, com fluxo distal (17). A artéria radicular distal possui fluxo sanguíneo proximal (17). No encontro dos dois sistemas, há uma área de relativa hipovascularidade.

Os vasos sanguíneos distribuem-se no interior das camadas exteriores à bainha da raiz, denominado tecido epipial (20). Nesse local, existem vasos provenientes de direções proximais e distais, ocorrendo suprimento das raízes nervosas através de dois sistemas vasculares separados. Esses sistemas unem-se por anastomose a partir de aproximadamente dois terços do comprimento das raízes nervosas da medula espinal. Essa região revela uma rede vascular menos desenvolvida, e sugere um local particularmente vulnerável das raízes nervosas.

Vasculatura do sistema nervoso periférico

O nervo periférico é uma estrutura bem vascularizada, contendo redes vasculares em todas as camadas que o envolvem. A propagação do impulso e o transporte axonal dependem de uma provisão de oxigênio local, com um sistema microvascular com grande capacidade de

reserva (20). A hipótese de que esta musculatura tenha se desenvolvido devido às grandes amplitudes exigidas pelo Sistema Nervoso Periférico (SNP) foi relatada por Blutler em 2003 (17). O suprimento vascular para os nervos periféricos fornece fluxo de sangue ininterrupto, independente da posição do tronco ou dos membros (18), já o fluxo sanguíneo para os vasos "alimentadores" é fornecido por vasos extrínsecos. Os vasos alimentadores bifurcam-se nos vasos extrínsecos, entrando nos nervos periféricos nas áreas de baixa mobilidade do nervo, relativas ao tecido revestidor.

As três camadas do tecido conectivo do SNP são supridas pela vasculatura intrínseca, porém somente os capilares atravessam o perineuro (18, 25). Segundo trabalho de Nordin (20), dentro de cada fascículo, acomoda-se um plexo capilar longitudinalmente orientado com formações circulares em vários níveis, Arteriolas de 25 a 150 μm de diâmetro alimentam o sistema capilar, penetrando a membrana perineural. Esses vasos percorrem um curso oblíquo através do perineuro, sendo facilmente fechados com um sistema tipo válvulas durante um evento em que a pressão de tecidos dentro dos fascículos aumente.

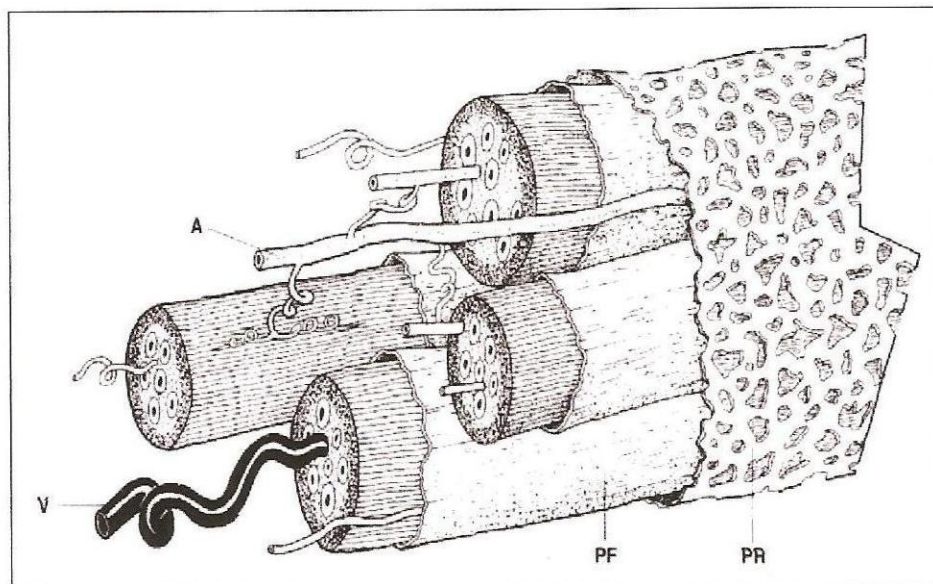


Figura 2: Suprimento sanguíneo intrínseco para raiz nervosa.
A: arterióla ; PF: pia fascicular ; PR: pia radicular; V: vênula
Adaptado de Parke e Watanebe (1988).

1.2 VEIAS

A maioria das veias do corpo humano é de pequeno ou médio calibre, possuindo de 1 a 9 mm de diâmetro. Apresentam uma túnica íntima com camada subendotelial delgada, às vezes ausente. A camada média é constituída de pequenos feixes de músculo liso entremeados de fibras reticulares e de uma rede delicada de fibras elásticas, e a camada adventícia, de natureza colágena, é bastante desenvolvida (16).

As veias de grande calibre constituem os grandes troncos venosos e estão localizadas próximas ao coração. A sua camada íntima é bem desenvolvida, porém a camada média é bem reduzida, constituída de pouco músculo e tecido conjuntivo. A camada mais evidente é a adventícia, formada por feixes de músculo liso dispostos longitudinalmente ao vaso (16).

As veias, especialmente as de pequeno e médio calibre, possuem válvulas em seu interior, que são pares de dobras da camada íntima, em forma de semilua, fazendo saliência para o interior do vaso, sendo formadas por tecido conjuntivo com fibras elásticas e revestidas por endotélio (16).

A contração dos músculos estriados esqueléticos comprime as veias, impulsionando o sangue nelas contido, e as válvulas direcionam o fluxo sanguíneo no sentido do coração, impedindo o refluxo.

O estudo estrutural das veias relata a presença de células e de uma matriz extracelular com a qual as células interagem.

1. Células: as principais células da parede venosa são a célula endotelial e a célula muscular lisa, além dos fibroblastos e pericitos.

1.1. Célula endotelial: compõe o revestimento mais interno da parede venosa. A superfície luminal do endotélio apresenta saliências correspondentes aos núcleos celulares, enquanto

que a superfície oposta à luz (tecidual) repousa sobre uma lâmina basal, cujos principais constituintes são a laminina e o colágeno.

Ao formar o endotélio, a célula endotelial mantém relações entre si com as células musculares lisas da túnica íntima e com a lâmina basal sobre a qual repousa (26, 27). Essas relações permitem ao endotélio uma maior resistência aos estresses provocados sobre o vaso (estiramentos e circulação dos elementos figurados do sangue), e uma função de filtro ao regular a passagem seletiva de moléculas, por difusão da luz para o interior da parede vascular (28).

O papel atual de maior destaque do endotélio vascular é o seu papel modulador, através da síntese e secreção de substâncias com ação anticoagulante ou antitrombótica (prostaciclina, proteínas C e S, trombomodulina e antitrombina III), de substâncias pró-coagulantes (tromboplastina, fator de Von Willebrand e alfa 2 macroglobulina), de substâncias com ação sobre a vasomotricidade (endotelina, angiotensina II e fator de relaxamento derivado do endotélio), de componentes da matriz extracelular (proteoglicanas, laminina, ácido hialurônico e colágeno), de um mediador da inflamação (interleucina) e de uma proteína adesiva (fibronectina).

1.2. Célula muscular lisa: pode também ser chamada de fibra muscular lisa devido ao fato de ser estreita, afilada e sem estriações, semelhante as artérias, participando da composição das túnicas média e adventícia das veias. Cada célula é envolta por uma lâmina basal, e, no espaço extracelular, encontra-se o colágeno, elastina e um componente amorfo. O colágeno fixa as células musculares lisas às fibras elásticas vizinhas, permitindo que a força de contração seja transmitida à rede de fibras elásticas (29, 30). A fibra muscular lisa também responde pela atividade contrátil da parede vascular.

1.3. Fibroblasto: São encontrados de forma esparsa nas túnicas da parede venosa, com predomínio na camada adventícia, enquanto os ativos sintetizam precursores de componentes da matriz extracelular, como pro-elastina, procolágeno, glicosaminoglicanas e uma proteína microfibrilar.

1.4: Pericitos: são células indiferenciadas, com provável origem mesenquimal. Podem dar origem aos fibroblastos e células musculares lisas.

2. Matriz extracelular: É a substância que preenche o espaço entre as células da parede venosa, de origem mesenquimal. Na sua composição bioquímica estão: glicosaminoglicanas, proteínoglicanas, colágenos, elastina e glicoproteínas.

Estudos realizados por Terzis e Strauch (31) demonstraram que o colágeno e a laminina promovem a regeneração neural. Uma vez que a camada adventícia é rica em colágeno e a camada muscular lisa é rica em laminina, a inversão da orientação normal da veia poderá promover uma melhor exposição dos axônios ao colágeno.

Brunelli e cols.(32) demonstraram em estudo com condutor venoso preenchido com músculo liso fresco autógeno que a presença de células musculares no interior da veia diminui a incidência de colapamento do vaso.

1.3 PLAQUETAS

As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco derivados de células gigantes e poliplóides da medula óssea, os megariócitos. O seu tamanho varia de 2 a 4 um de diâmetro nos esfregaços de sangue (33). As plaquetas promovem a coagulação do sangue,

auxiliando a reparação da parede dos vasos sanguíneos e evitando a hemorragia. Normalmente existem de 200.000 a 400.000 plaquetas por milímetro cúbico de sangue, com vida em torno de 10 a 14 dias (33, 34).

Nos esfregaços de sangue, as plaquetas possuem a tendência de aparecerem em grupos (aglutinação), com uma parte transparente, azul – clara, o hialômero, que contém grânulos corados em púrpura, que constituem o cronômero (33, 34).

As plaquetas exibem um sistema de túbulos e vesículas derivados de invaginação da membrana. Assim, seu interior se comunica livremente com sua superfície. Na periferia da plaqueta, fazendo parte do hialômero, observa-se o feixe marginal de microtúbulos, que contribui para manter a forma ovóide desses corpúsculos. O hialômero contém também microfilamentos de actina e moléculas de miosina, responsáveis pela formação de filopódios (prolongamentos finos) e pela contração das plaquetas. Esses corpúsculos possuem uma camada situada por fora da membrana, medindo 15 a 20 nm, rica em glicoproteínas e glicosaminoglicanas, responsável pela adesividade das plaquetas e que pode absorver compostos diversos (16, 34).

O granulômero, mais escuro, possui uma variedade de grânulos delimitados por membrana, algumas mitocôndrias e grânulos de glicogênio. Os grânulos densos ou delta tem 250-300 nm de diâmetro e armazenam ADP e ATP. Os grânulos delta também contêm serotonina (5-hidroxitriptamina) retirada do plasma sanguíneo. Os grânulos alfa são um pouco maiores (300 – 500 nm) e contêm fibronogênio e fator de crescimento plaquetário, que estimula as mitoses no músculo liso dos vasos sanguíneos e a cicatrização das feridas. Os grânulos menores (175 – 250 nm), chamados grânulos lambda, são lisossomos carregados com as enzimas usuais dessas organelas (35, 36).

A maioria dos grânulos azurófilos, visíveis no hialômero com o microscópio óptico, são grânulos alfa.

Normalmente, as plaquetas estão em estado inativo (37), com a ativação sendo dada por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) ou farmacológicos (ionóforo de cálcio, cloreto de cálcio e análogos de endoperidóxido cíclico) (38, 39). Acredita-se que os efeitos destes agonistas são desencadeados através da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (38). Uma vez estimulados, os alfa-grânulos plaquetários liberam proteínas por exocitose no local da lesão para iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (35).

Uma vez ativadas, as plaquetas modificam-se morfológicamente, desenvolvendo pseudópodos que promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a degranulação dos grânulos plaquetários (37). Os alfa-grânulos plaquetários são ricos em fatores de crescimento.

A degranulação plaquetária propicia a liberação das seguintes substâncias: fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fibrinogênio, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de transformação alfa (TGF- α), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), tromboplastina plaquetária, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (Harrison e Cramer, 1993). Além disso, há a liberação de outros fatores como o fator de crescimento fibroblástico (FGF) (37), o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (40) e o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (41).

1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é definido como um produto derivado do sangue autógeno por processo laboratorial, colhido em período pré-operatório e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α -plaquetários (42).

O PRP é conhecido como plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas ou ainda como gel de plaquetas (43, 44).

Métodos de obtenção

O PRP é obtido através da retirada de sangue do doador e por um processo de separação celular por centrifugação diferencial, onde as substâncias desejadas são separadas, no caso as plaquetas, e o restante do material é devolvido ao paciente por via endovenosa (45, 46). Inicialmente, obtinha-se o PRP através de máquinas de plasmaferese, utilizando-se a trombina bovina para sua ativação. O surgimento de máquinas automatizadas e diversos protocolos, além da substituição da trombina bovina por trombina humana fez com que a obtenção do PRP se tornasse mais simples e com custos diminuídos (47-49).

Caso o procedimento seja realizado em ambiente hospitalar ou em banco de sangue, no período pré-operatório, um cateter venoso central é instalado, por onde o sangue é coletado. Em média coleta-se 400 a 500 ml de sangue que permanece acondicionado em bolsa coletora identificada com rótulo e adicionado anticoagulante (44-46, 50). Se o procedimento for realizado em consultório médico, volumes menores serão retirados do paciente, em torno de 10 a 20 ml ou 70 a 150 ml, e, após, armazenados em tubos de ensaio para serem centrifugados (42, 43, 51).

O PRP possui sete Fatores de Crescimento (FCs) e três proteínas - fibrina, fibronectina e vitronectina - que atuam como moléculas de adesão celular nos processos de migração epitelial, osteoindução e na formação de matriz óssea e de tecido conjuntivo (52). O PRP deve ser sempre autólogo devido ao risco de rejeição ou à impossibilidade de secreção de FCs ativos (52).

Separação celular

Podem ser aplicados dois protocolos para a separação celular:

1. **Convencional:** realizado em equipamentos de centros de hemoterapia . O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) é obtido através da centrifugação do sangue coletado e centrifugado a uma velocidade de 5400 a 5600 rotações por minuto (rpm), permitindo a separação do PPP, eritrócitos e crosta de coágulo, contendo plaquetas e leucócitos (46). O PRP é obtido após a obtenção do PPP, através da redução da velocidade de centrifugação para 2400 rpm., que separa a crosta de coágulo, obtendo-se uma coleção de aspecto alaranjado (PRP) (46). O restante do volume obtido após a separação é devolvido ao paciente em ambos os casos.

2. **Simplificado:** realizado em nível ambulatorial ou em consultórios (principalmente odontológicos), utilizando-se minicentrífugas. A coleta de sangue do paciente varia de 10 a 20 ml, distribuídos em tubos de ensaio de 5 ml, contendo solução de citrato de trissódio a 10%, centrifugados a uma velocidade de 160 rpm durante seis minutos, em temperatura ambiente. Obtêm-se três componentes básicos: no fundo do tubo, ficam depositadas as células vermelhas do sangue, no meio do tubo, o PRP e na parte superior, o PPP. Após, faz-se a coleta do plasma acrescido de 1 a 2 mm da porção superior das células vermelhas do sangue, acrescenta-se 50 µl de cloreto de cálcio a 10% ao volume de 1,2 ml por tubo, obtendo-se o gel após 5 a 10 minutos (43, 51). O sangue a ser utilizado deve ser colhido de maneira asséptica em tubos contendo, preferencialmente, citrato como anticoagulante (53).

A manipulação do sangue deve ser realizada de maneira cuidadosa para assegurar a separação das células plaquetárias das demais células e evitar a ruptura ou danos à sua membrana . A centrifugação poderá ser realizada de maneira única ou repetida em duas etapas.

Centrifugação

1. Única: submete-se o sangue a uma rotação de 5600 rpm, durante seis minutos, obtendo-se, no final, três camadas: a fração superior contendo o PBP, a fração mediana o PRP e a inferior os eritrócitos. Procede-se o descarte da fração superior (PPP), e separa-se a fração mediana (PRP) juntamente com 1 a 2mm da fração inferior para ser usada posteriormente no local da lesão (53).

2. Repetida: ocorre em duas etapas: colhe-se o sangue e centrifuga-se a 160^a durante 20 minutos. O plasma sobrenadante resultante juntamente com 6 mm da fração vermelha é centrifugado a 400 g durante 15 minutos. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante, de coloração amarela, é descartado e o material restante utilizado no local da lesão (54).

É necessária a adição de um fator anticoagulante ao PRP na intenção de formar uma rede de fibrina, que, incorporada ao mesmo, permite sua aderência ao local da lesão, assim como impede a migração das células epiteliais e do tecido conjuntivo para fora do local da lesão (53-55). Utiliza-se trombina bovina a 100Uml⁻¹ combinada com cloridrato de cálcio a 10% ou fibrina humana (53, 54).

Composição do PRP

O extrato obtido através dos mecanismos descritos acima se constitui basicamente de plaquetas, plasma e leucócitos. Os componentes mais importantes são as plaquetas devido à sua capacidade de liberar fatores de crescimento (44, 46, 50).

1. Leucócitos: A presença destas células brancas no PRP confere ao mesmo resistência natural a processos infecciosos e alérgicos, uma vez que a sua principal função é a proteção contra substâncias estranhas (56).

2. Plaquetas: As plaquetas são corpúsculos anucleados, com a forma de disco derivados de células gigantes e poliplóides da medula óssea, os megariócitos. O seu tamanho varia de 2 a 4

um de diâmetro nos esfregaços de sangue (33). As plaquetas promovem a coagulação do sangue, auxiliando a reparação da parede dos vasos sanguíneos e evitando a hemorragia. Normalmente existem de 200.000 a 400.000 plaquetas por milímetro cúbico de sangue, com vida em torno de 10 a 14 dias (33, 34).

Nos esfregaços de sangue, as plaquetas possuem a tendência de aparecerem em grupos (aglutinação), com uma parte transparente, azul – clara, o hialômero, que contém grânulos corados em púrpura, constituindo o cronômero (33, 34) .

As plaquetas exibem um sistema de túbulos e vesículas derivados de invaginação da membrana, fazendo com que seu interior se comunique livremente com sua superfície. Na periferia da plaqueta, fazendo parte do hialômero, observa-se o feixe marginal de microtúbulos, que contribui para manter a forma ovóide desses corpúsculos. O hialômero contém também microfilamentos de actina e moléculas de miosina, responsáveis pela formação de filopódios (prolongamentos finos) e contração das plaquetas. Esses corpúsculos possuem uma camada situada por fora da membrana, medindo 15 a 20 nm, rica em glicoproteínas e glicosaminoglicanas, responsável pela adesividade das plaquetas e que pode absorver compostos diversos (16, 34).

O granulômero, mais escuro, possui uma variedade de grânulos delimitados por membrana, algumas mitocôndrias e grânulos de glicogênio. Os grânulos densos ou delta tem 250-300 nm de diâmetro e armazenam ADP e ATP. Os grânulos delta também contêm serotonina (5-hidroxitriptamina) retirada do plasma sanguíneo. Os grânulos alfa são um pouco maiores (300 – 500 nm) e contêm fibronogênio e fator de crescimento plaquetário, que estimula as mitoses no músculo liso dos vasos sanguíneos e a cicatrização das feridas. Os grânulos menores (175 – 250 nm), chamados grânulos lambda, são lisossomos carregados com as enzima (35, 57).

A maioria dos grânulos azurófilos, visíveis no hialômero com o microscópio óptico, é grânulos alfa.

Normalmente as plaquetas estão em estado inativo (37), com a ativação dada por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) ou farmacológicos (ionóforo de cálcio, cloreto de cálcio e análogos de endoperidóxido cíclico) (38, 39). Acredita-se que os efeitos destes agonistas são desencadeados através da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (38). Uma vez estimulados, os alfa-grânulos plaquetários liberam proteínas por exocitose no local da lesão para iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (35).

Quando ativadas, as plaquetas modificam-se morfologicamente, desenvolvendo pseudópodos que promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a degranulação dos grânulos plaquetários (37). Os alfa-grânulos plaquetários são ricos em fatores de crescimento.

A degranulação plaquetária propicia a liberação das seguintes substâncias: fator de crescimento de transformação beta (TGF-B), fibrinogênio, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de transformação alfa (TGF-A), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), tromboplastina plaquetária, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (35). Além disso, há a liberação de outros fatores como o fator de crescimento fibroblástico (FGF) (37), o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (40) e o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (41).

3. Fatores de crescimento: são mediadores biológicos naturais, exercendo importante papel na estimulação e regulação do processo de reparo e regeneração. São reguladores de inúmeros eventos celulares como a mitogênese, quimiotaxia, diferenciação e metabolismo (42, 43, 58-62). São apresentados como citocinas, que aparecem sob a forma de polipeptídeos e com comportamento de mensageiros químicos, induzindo as células do tecido conjuntivo a

proliferar e secretar componentes da matriz extracelular. Dentre os principais fatores de crescimento conhecidos atualmente identificam-se como principais:

1.3. Fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF): possuem esta denominação devido ao fato de terem sido encontrados pela primeira vez nas plaquetas, embora sejam produzidos pelos macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea (43). Foi um dos primeiros fatores de crescimento a ser identificado, e é o principal devido ao fato de ser o primeiro a estar presente no local da lesão e por guiar a revascularização, a síntese de colágeno e a regeneração óssea (63-65). É uma proteína armazenada nos grânulos alfa das plaquetas que é liberada quando as mesmas se agregam e iniciam a cascata de coagulação. É classificada como de ampla especificidade por possuir a capacidade de atuar em um grande número de células musculares, neurogliais, ósseas, fibroblastos (42, 66, 67). O inter-relacionamento com seus receptores correspondentes, proteínas inseridas na parede celular, permite que desenvolva suas funções. A união com a proteína correspondente desencadeia como resposta uma reação celular.

1.4. Fatores de crescimento de transformação β (TGF- β): constituem uma super-família de mediadores locais com a função de regular a proliferação e a função da maioria das células dos vertebrados. Possui essa designação por ter sido isolado inicialmente em tecidos alterados (43). Os seus efeitos nas células variam de acordo com a célula afetada, sendo eles: suprimir a proliferação celular, estimular a síntese da matriz extracelular, promover a formação óssea ou atrair células por quimiotaxia (59, 65, 68). Quando atuam sobre os osteoclastos, inibem a reabsorção óssea (43). As TGF- β mais comuns existentes no PRP são a TGF- β 1 e TGF- β 2, relacionadas com a cicatrização do tecido conjuntivo e a regeneração do tecido ósseo (46). O tipo β 1 é encontrado com abundância nas plaquetas, linfócitos e neutrófilos, enquanto o tipo β 2 é encontrado em extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos (43).

As funções mais relevantes do TGF- β 1 e β 2 são a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos precursores, estimulando a formação óssea (44).

1.5. Proteínas morfogenéticas do osso (BMP): formam uma família de proteínas com a função de regular os processos celulares como a diferenciação, proliferação e morfogênese celulares. Ocorre em diferentes espécies, regulando e determinando o desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos durante a embriogênese. Atualmente podem ser sintetizadas por processo de engenharia genética (69). Estão envolvidas na mitose e diferenciação de células mesenquimais. No peridonto, produzem cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, e, nas áreas cranioaciais, produzem osso intramembranoso.

1.6. Fator de crescimento similar à insulina (IGFs): osteoblastos são secretados durante a formação óssea para aumentar a osteogênese e acelerar a deposição óssea (44, 66, 70-74). Existem dois tipos de IGF: IGF-I e IGF-II, encontrados em grande quantidade no tecido ósseo, sendo o IGF-II o mais abundante. O IGF-I é produzido por fibroblastos, estimulando a formação óssea por proliferação celular, diferenciação e biossíntese do coágulo (58). Quando combinados com outros fatores de crescimento, podem aumentar a osteogênese em processos cicatriciais (58, 75, 76). Em suma, as IGF-s exercem múltiplos efeitos sobre o metabolismo ósseo: promovem a deposição da matriz óssea, estimulam a mitogênese das células osteoblásticas, e possuem atividade quimiotática para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos (63, 66, 71, 73, 77).

1.7. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF): estimulam a proliferação na maioria das células implicadas no reparo: células endoteliais, fibroblatos, queratinócitos e mioblastos. Os dois tipos de FGF são potentes estimulantes da angiogênese, importante para a invasão vascular em enxertos (69).

1.8. Fator de crescimento epidermal (EGF): sintetizado nos rins, pâncreas, glândulas salivares e glândulas de Brunner no duodeno. Possuem a função de estimular a síntese de

DNA na maioria das células epiteliais, na regeneração hepática e induzir a incorporação de timidina tritiada por 60 a 80% dos hepatócitos em meio de cultura. A sua ação é potencializada pela insulina e glucagon (78, 79).

1.9. Fator transformador do crescimento (TGF): é sintetizado por tecidos normais, atuando no estímulo de proliferação dos hepatócitos.

1.10. Somatotrofina (STH / GH): proteína secretada pela glândula hipófise, com atuação no estímulo do crescimento de tecidos, órgãos e conseqüentemente, do crescimento corporal.

Efeitos clínicos do PRP

O PRP é uma concentração de plaquetas quatro a cinco vezes acima dos níveis de plaquetas sangüíneas da linha de base periférica, ou seja, é a concentração de um grande número de plaquetas com seus FCs em um volume mínimo de plasma.

O PRP tem sido muito estudado na área de odontologia, com emprego principalmente em pequenos enxertos ósseos na região alveolar para futuros implantes dentários e em cirurgias periodontais e maxilo-faciais (80, 81). Os estudos realizados revelam que esse produto possui um grande potencial de melhorar resultados em diversos procedimentos ortopédicos, neurocirúrgicos e de cirurgia plástica (82, 83). No PRP, há fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e proteínas osteocondutoras que servem, além de matriz para migração epitelial, para a formação óssea e de tecido conjuntivo (52, 84, 85).

1.5 FATORES NEUROTRÓFICOS

Os fatores neurotróficos constituem um grupo heterogêneo de polipeptídeos solúveis, que permitem sobrevivência, diferenciação, manutenção e, quando possível, a regeneração axonal nos sistemas nervosos centrais (SNC) e periféricos (SNP), agindo através de receptores

específicos (86-91). Foram descritos pela primeira vez em experimentos que usavam células de mamíferos cultivadas em coágulos sanguíneos (92, 93).

Após muitos anos, foi possível o cultivo das células "in vitro" adicionando-se soro sanguíneo ao meio de cultura, e os estudos realizados constataram que esse soro fornece proteínas altamente específicas, denominadas fatores de crescimento (FCs) (92). Podem ser sintetizados por neurônios e por células efetadoras periféricas, com atuação de forma parácrina e autócrina (94-96).

Nos processos de degeneração de fibras nervosas do SNC e SNP, os índices de fatores neurotróficos diferem dos encontrados no tecido não lesado (97-99). A expressão de fatores neurotróficos encontra-se significativamente aumentada após a secção ou diminuição de fibras nervosas periféricas, retornando aos níveis normais após a regeneração axonal (100, 101).

A capacidade de regeneração no SNC, apesar da riqueza de fatores neurotróficos, é considerada baixa devido à ausência de matriz extracelular e fatores inibitórios ativos presentes no microambiente neuronal (102).

No SNP, as condições à regeneração são favoráveis: presença de matriz extracelular, células alvo de neurônios, além de as células de Schwann, fibroblastos e macrófagos constituem suporte trófico.

Os fatores de crescimento foram divididos em duas categorias: neurotrofinas (NT) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), podendo atuar de forma isolada ou em conjunto nos processos de regeneração de fibras nervosas lesadas (91, 103-105).

1. **Neurotrofinas (NT):** sintetizadas inicialmente como pró-neurotrofinas, são peptídeos com grande homologia estrutural. Quando ativadas apresentam-se como homodímeros covalentes (106). Os principais componentes do grupo das neurotrofinas são: o fator de crescimento

neural (NGF) (107, 108), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (109), a NT-3 (103) e a NT-4/5 (110, 111).

Diversos tipos celulares são capazes de produzir NGF durante o desenvolvimento e na vida adulta, podendo-se citar os queratinócitos, melanócitos, células musculares lisas, fibroblastos e células de Schwann.

O nível de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) aumenta rapidamente após a secção do nervo, diminuindo a partir do terceiro dia após o trauma, e mantendo-se estável até por duas semanas (97, 112).

A citocina interleucina 1 (IL-1) é outro fator responsável pelo aumento da expressão de RNAm para NGF, sendo secretada por macrófagos que invadem o segmento nervoso em degeneração (87, 97, 113-116).

2. Fator de crescimento derivado das plaquetas (BDNF): possui potente ação mitogênica nas células mesenquimais, incluindo os fibroblastos e as células musculares lisas, bem como promove a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão, estimulando em vivo a formação de colágeno e matriz tecidual (117, 118).

Após o terceiro dia da lesão do nervo, evidencia-se a presença de RNAm, com níveis em elevação e estabilizados na segunda semana da instalação da lesão (98). O aumento do RNAm depende da ativação da atividade elétrica no nervo em regeneração, coincidindo a elevação de seus níveis com a perda da capacidade em conduzir potenciais de ação nos axônios em degeneração (119).

Os atores neurotróficos possuem atuação direta sobre o metabolismo celular, ou indireta sobre o metabolismo das células de suporte, como, por exemplo, as células de Schwann. Esses fatores alcançam o corpo celular a partir do transporte retrógrado onde atuam na modulação da interação de diferentes enzimas através de reações de fosforilação. As proteínas produzidas a partir de reações bioquímicas após a ligação de moléculas a

receptores específicos de membrana atingem o DNA da célula, induzindo a formação do RNAm (93). Alguns fatores de crescimento como o NGF, BDNF, IGF-I e o fator neurotrófico ciliar atuam como "fertilizantes" para o crescimento dos brotos axonais (120).

1.6 TRAUMATISMO DE NERVO PERIFÉRICO

O trauma de nervos periféricos é relativamente comum, sendo a lesão mais frequente por trauma contuso ou por projétil de arma de fogo (PAF) (3). Na maioria dos traumas de nervos periféricos por PAF não ocorre secção do nervo. Em alguns casos, conforme Colohan (3), pode ocorrer transecção completa ou parcial do nervo. Aproximadamente 50% dos déficits nervosos sequelares a lesões por PAF em alta velocidade, acometendo membros superiores, são decorrentes de transecção completa (121, 122). As lesões por armas penetrantes ou corpos estranhos (lâmina de metal, vidro) não são comuns, porém apresentam uma oportunidade para o reparo primário do nervo periférico imediatamente após o trauma (3).

Aproximadamente 3% dos pacientes politraumatizados apresentam lesões dos nervos periféricos. Se consideradas lesões de plexos e raízes, esse número cresce para 5%. Nas lesões traumáticas do Sistema Nervoso Central (SNC), até 30% dos pacientes podem apresentar lesão de nervo periférico associada.

Nos membros superiores, o nervo radial é o mais frequentemente acometido, seguido dos nervos ulnar e mediano. Nos membros inferiores, há menor frequência de acometimento dos nervos em traumas, com maior incidência no nervo ciático e fibular; raras são as lesões dos nervos tibial posterior e femoral.

As causas mais frequentes de trauma em nervos periféricos são:

1. **Laceração e contusão:** são lesões causadas por instrumentos penetrantes, por fragmentos ósseos resultantes de fraturas e por PAF. Nos traumas por instrumentos penetrantes e por fragmentos ósseos, o nervo periférico é seccionado parcialmente ou de maneira completa, devido a lacerações em ferimento penetrante e por incisões com vidro ou cirúrgicas (123, 124). Nessas lesões, o nervo é lesado pelo agente no momento do trauma (125). Nas lesões por PAF, o nervo é deslocado abruptamente para fora de seu trajeto durante a passagem do projétil, retornando em seguida à sua posição original. Devido a esse mecanismo, os ferimentos por PAF resultam em contusão local e ruptura interna dos axônios e do tecido conjuntivo de sustentação (125). As lesões por PAF podem causar lesão de nervo periférico de forma direta por avulsão de partes moles, causando destruição severa dos tecidos (123, 124) ou de forma indireta devido a uma expansão rápida dos tecido no trajeto de um PAF (124). Dos nervos que sofrem paralisia completa por PAF, em torno de 50% recuperam algum grau de função, e 20% das lesões por fratura óssea causam neurotmele grave sendo necessário reparo cirúrgico do nervo (126).
2. **Estiramento/tração:** a organização anatômica interna do nervo permite seu estiramento em torno de 10 a 20% antes do dano estrutural (127, 128). Essas lesões ocorrem devido a movimentos exagerados na articulação do ombro, com ou sem luxação articular ou fratura do úmero ou da clavícula. São lesões causadoras de axoniotmele, levando à ruptura do axônio em longos segmentos do nervo. Podem ocorrer durante o parto nas manobras usadas para liberação da criança, levando à lesão de plexo braquial. Em acidentes de trabalho onde o membro superior fica preso em esteiras rolantes ou giratórias também é causa de estiramento de plexo braquial. Ocasionalmente pode haver lesão iatrogênica do plexo braquial devido a estiramento durante procedimentos cirúrgicos por hiperabdução dos braços (124). Nos membros

inferiores, as lesões por estiramento do plexo lombossacro podem ocorrer devido a meningoceles, hiperextensão grave da coxa, fraturas pélvicas, luxação ou fratura da articulação do quadril ou avulsão da cabeça da fíbula (122). As lesões por estiramento não possuem tratamento cirúrgico definitivo, embora apresentem melhora espontânea.

3. **Compressão/isquemia:** essas lesões variam desde alterações discretas da mielinização até a degeneração Walleriana completa. Podem ocorrer por pressão extrema (posturas viciosas, pressão por torniquetes ou por talas de gesso), traumas perfurantes e formação de hematomas em espaços potencialmente apertados. A ligadura venosa proximal, o trauma direto do músculo, a infecção, as queimaduras e a pressão localizada por gesso ou os curativos circulares são causas de síndrome do compartimento. A compressão da irrigação arterial do nervo predispõe ao dano celular isquêmico e morte celular (3). Longos períodos de estiramento e de compressão podem causar lesão vascular e isquemia neuronal (128). A presença de parestesias dolorosas e edema da extremidade sugere a possibilidade de uma síndrome do compartimento. O tratamento é a descompressão cirúrgica imediata. Quando as alterações isquêmicas envolvem um segmento longo do nervo, a lesão torna-se irreversível.
4. **Frio:** há um bloqueio de focal da condução e interrupção do transporte axonal na fase aguda, com recuperação precoce da função. As grandes fibras mielinizadas sofrem degeneração axonal após alguns dias de lesão (124, 129, 130). Há dano da barreira, com extenso edema do endoneuro, porém o exato mecanismo é incerto. Esse processo é progressivo, muito provavelmente pela falta de aporte linfático do endoneuro.
5. **Processos fisiológicos de fechamento:** compressão por formação de cicatriz ou ossificação.

6. Iatrogênica: pode ocorrer durante cirurgias.

1.7 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES NERVOSAS PERIFÉRICAS

Seddon, em 1943, classificou as lesões nervosas periféricas em três tipos: neuropraxia, axonotmese e neurotmese (131) e, em 1951, Sunderland dividiu-as em cinco tipos (132).

Na neuropraxia de Seddon ou grau I de Sunderland, a estrutura do nervo permanece intacta, não existindo perda de continuidade axonal entre o neurônio e o músculo. Há uma interrupção da condução nervosa por uma lesão exclusiva na bainha de mielina do nervo. O termo bloqueio de condução refere-se à incapacidade de um potencial de ação em propagar-se além de uma região específica do nervo (133-135). Envolve um bloqueio da condução em uma área local, com ou sem anormalidades histológicas presentes, que podem incluir a desmielinização segmentar sem anormalidades axonais, com recuperação rápida e completa (136).

Deste modo, na neuropraxia, há perda temporária da função motora do nervo com disfunção da propriocepção, estímulo vibratório, tato, dor e sudorese. A duração das lacerações descritas pode ser de um a seis meses, resolvendo-se geralmente em até três meses caso não ocorra degeneração Walleriana (135). O bloqueio de condução geralmente afeta as fibras motoras de forma mais intensa que as fibras sensitivas e simpáticas, principalmente as fibras maiores (137).

A axoniotmese de Seddon é caracterizada por um bloqueio da condução nervosa devido à perda de continuidade do axônio (134) com ruptura de alguns axônios, mas com ausência de lesão das bainhas conectivas (134, 135, 137). Há presença do processo de degeneração Walleriana distal à lesão, sendo a recuperação funcional associada com o crescimento axonal no interior do endoneuro individual intacto (136).

Ferreira (1998) descreveu a axoniotimose como uma lesão que acomete os axônios, ocorrendo uma reação em duas fases. Na primeira fase, ocorre a desintegração do axônio e a quebra da bainha de mielina, processo chamado de degeneração Walleriana (axonal) (133). As alterações mais importantes ocorrem abaixo da lesão, caso ocorram acima destas alterações, pode levar à degeneração do neurônio e toda a via axonal caso a lesão ocorra no Sistema Nervoso Central (SNC) e próximo ao corpo neuronal. Na segunda fase, ocorre o processo de regeneração (reinervação) da continuidade entre o axônio e seu órgão terminal. A condição do endoneuro influencia de forma significativa o processo regenerativo. Se o endoneuro é preservado, a regeneração processa-se de forma completa, já que o axônio cresce confinado no tubo originalmente ocupado por ele (120).

Assim, na axoniotimose surge a degeneração Walleriana, causando paralisia motora, sensitiva e autonômica. A recuperação pode ser de bom prognóstico, com tempo variável dependendo do nível da lesão (135).

Sunderland (1952) subdividiu a axoniotimose em três grupos:

- Grau II : lesão do axônio ou disjunção axonal completa com degeneração Walleriana sem interrupção da lâmina basal;
- Grau III : lesão da fibra nervosa (axônio e endoneuro), com interrupção da lâmina basal;
- Grau IV : disjunção axonal, endoneural e perineural;
- Grau V : disjunção axonal completa, com lesão no endoneuro, perineuro e epineuro

Na neurotímese de Seddon ou lesão grau V de Sunderland, a estrutura do nervo está totalmente desorganizada e interrompida, ocorrendo secção e separação completa de todas as estruturas nervosas, produzindo um intervalo entre as extremidades seccionadas. A desconexão do axônio, bainha de mielina e o tecido conectivo compõem a característica

histológica desse tipo de lesão e, por este motivo, pode não ocorrer regeneração . A reparação do epineuro sempre será cirúrgica devido a não haver integridade do mesmo. Geralmente os pacientes evoluem com alguma seqüela em relação à função motora (133-135, 137).

Tabela 1: Classificação das lesões de nervos periféricos segundo Seddon e Sunderland

<i>SEDDON</i>	<i>SUNDERLAND</i>	<i>LESÃO</i>
<i>Neuropraxia</i>	<i>Grau I</i>	<i>Disfunção (ausência de lesão)</i>
<i>Axonotmese</i>	<i>Grau II</i>	<i>Axônio</i>
<i>Axonotmese</i>	<i>Grau III</i>	<i>Axônio + Endoneuro</i>
<i>Axonotmese</i>	<i>Grau IV</i>	<i>Axônio + Endoneuro + Perineuro (fascículo)</i>
<i>Neurotmese</i>	<i>Grau V</i>	<i>Axônio + Endoneuro + Perineuro + Epineuro (nervo)</i>

Adaptado de : Mattar Jr E Azze (135).

1.8 MECANISMOS DA DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS

Os prolongamentos dos neurônios, dentro de certos limites, podem regenerar-se devido à atividade sintética dos respectivos pericários. Devido a isso, os nervos regeram-se, embora com dificuldade . Quando uma célula nervosa é lesada, as demais células que se ligam a ela não sofrem lesão, exceto nos casos em que um neurônio recebe impulsos exclusivamente de outro (16). Em casos em que o neurônio fica completamente privado de impulsos nervosos, ocorre a chamada degeneração transneuronal.

As lesões de nervo periférico são muito freqüentes, já que os mesmos possuem distribuição por todo o corpo. Uma vez lesado, o nervo periférico sofre alterações degenerativas seguidas de uma fase de regeneração.

Até o século XIV, sabia-se que era possível a recuperação funcional das estruturas inervadas por um nervo periférico lesionado após a sua reparação, porém esse mecanismo de regeneração era desconhecido.

Em 1850, Augustus Waller apresentou seu trabalho sobre a degeneração nervosa após lesão nos nervos hipoglosso e glossofaríngeo de sapos, demonstrando não apenas a degeneração do axônio distal, mas também o processo de regeneração nervosa. No referido trabalho, o autor notou que a progressão da regeneração é mais rápida nos jovens, e que a estimulação elétrica galvânica não influencia na velocidade de regeneração.

O conjunto de fenômenos que ocorre no axônio distal após uma lesão é denominado degeneração Walleriana (133, 135, 137-142).

O processo de regeneração axonal tem início no corpo celular nas primeiras sete horas após a lesão, através da cromatólise. A capacidade do corpo celular de regenerar fibras lesadas é ilimitada, desde que sobreviva à lesão (143). A lesão de um nervo periférico acarreta modificações no corpo celular, nos segmentos proximal e distal à lesão, no local da lesão e nos órgãos inervados.

Modificações na região proximal à lesão

Os axônios sofrem um processo de degeneração semelhante ao que ocorre no coto distal, geralmente estendendo-se apenas ao nódulo de Ranvier mais proximal (90). A morte da célula ocorre em situações extremas, quando o processo de degeneração atinge o corpo celular, cujo mecanismo mais provável é a apoptose (144).

O fator neurotrófico é a substância que regula e mantém a função do neurônio, além de promover o seu crescimento (87, 145). Mediante reação de fosforilação, esses fatores são transportados retrogradamente ao corpo celular, atuando na modulação da interação entre enzimas chamadas capases e proteínas pró-apoptóicas. Essas enzimas são as principais

efetoras da morte celular, e, uma vez inibidas, permitem a manutenção da fisiologia normal da célula. Esse mecanismo permite que os fatores neurotróficos atuem de forma direta e indireta sobre o metabolismo celular, a última através das células de Schwann (146-148).

As substâncias produzidas no local da lesão atuam como fatores neurotróficos, entre eles: fator de crescimento nervoso (nerve growth factor-NGF), fator de crescimento derivado do cérebro (brain – derived neurotrophic factor -BDNF), fator de crescimento de transformação β (transforming growth factor β - TGF- β), fator de crescimento derivado das células gliais - glial cell line – derived neurotrophic factor- GDNF), fator de crescimento derivado da insulina (insulin – like growth factor -IGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (platelet–derived growth factor-PGF) e neurotrofinas (NT) (87, 90, 101, 148). À medida em que sinais celulares chegam ao DNA no núcleo da célula, induzindo à produção de RNA, o qual induz à síntese da proteína relacionada. A produção dos fatores neurotróficos, portanto, é temporal, e muito provavelmente eles exercem suas atividades de maneira complementar no processo de regeneração.

A degeneração do axônio ocorre até o nódulo de Ranvier mais próximo da lesão, que, em situações extremas, acarreta a morte da célula por apoptose, com mecanismos diferentes às respostas induzidas pelos fatores neurotrófico (93, 149). Através de um processo de divisão mitótica, são desencadeadas uma reação enzimática e resposta imunológica com rápida ativação das células de Schwann na região final do segmento proximal, na tentativa de repor o tecido lesado. As células de Schwann iniciam a produção de moléculas, entre elas, a laminina e a fibronectina, que irão compor a matriz extracelular, com grande adesividade ao cone de crescimento que se formará no coto proximal à lesão, estimulando o crescimento do axônio lesado (93, 141, 142, 150). Há um processo de redução do diâmetro e da bainha de mielina dos axônios do coto proximal, que se estendem por um ou mais milímetros, de acordo com a gravidade da lesão (126). A ruptura da bainha de mielina estimula a proliferação das

células de Schwann e sua divisão no período máximo de três dias, com alinhamento no interior do tubo da lâmina basal, formando as bandas de Büngner, que irão fornecer o caminho para as fibras do nervo em regeneração (151). Os axônios do nervo lesado iniciam a produção de um grande número de brotos colaterais e terminais, que competem entre si na busca de substâncias tróficas produzidas pelos órgãos-alvo, localizados no coto distal, e realizando, enfim, suas conexões. Na porção final de cada broto axonal, são encontradas duas porções chamadas região do lamelipódio e os filopódios (ou neuritos). A região do lamelipódio é definida como a área central da extremidade do cone em constante remodelamento pela formação e retração dos filopódios. Os filopódios, ricos em actina, são expansões em forma de espículas que se estendem e retraem a partir da superfície do lamelipódio, movimentados pela contração dos filamentos de actina, formando uma complexa rede poligonal no seu interior. A partir desta expansão distal da extremidade proximal, surge uma protuberância denominada cone de crescimento, que, por meio desta disposição, atua de forma semelhante ao movimento amebiano (93). Há um número excessivo de brotos que invadem as colunas de Büngner, levando a um aumento do número total de axônios no coto distal. No momento em que os brotos realizam suas conexões com os órgãos-alvo, o número de axônios diminui devido a um fenômeno denominado repressão sináptica (152, 153). Em lesões do tipo neurotmeze, o crescimento axonal estimado em estudos com animais é de 2 a 3,5 mm/dia, e de 3 a 4,5 mm/dia nas lesões do tipo axonotmeze. Em estudos realizados em humanos, estima-se um crescimento não linear de 1 a 2 mm/dia (3, 122, 123, 128, 153). As lesões mais proximais podem não evidenciar melhora por muitos meses (123, 128). As substâncias denominadas fatores de crescimento, atuando por receptores específicos, auxiliam na sobrevivência, extensão e maturação do axônio. A interação entre a membrana da célula de Schwann e o cone de crescimento ocorre através de substâncias denominadas Moléculas de Adesão Celular (CAMs) (Rutishauser U, 1993). O primeiro fator de crescimento identificado

foi o Fator de Crescimento Nervoso—Nerv Growth Factor (NGF), portador de substâncias denominadas neurotrofinas, além dos demais fatores já citados no início (107, 139, 154). O NGF afeta a regeneração sensitiva, não orienta diretamente o axônio em regeneração e desperta a atenção de pesquisadores devido à sua capacidade de estimular a degeneração e regeneração Wallerianas de axônios sensitivos. O tamanho do fascículo distal parece ser o fator mais significativo em determinar o alvo do cone de crescimento regenerador, com maior probabilidade de os brotos encontrarem e se prenderem aos fascículos maiores).

Modificações no corpo celular

A série de alterações que ocorre no corpo celular inicia nas primeiras horas após a lesão do axônio e é denominada cromatólise, isto é, dissolução dos corpúsculos de Nissl e consequente diminuição da basofilia citoplasmática (16). Histologicamente, as alterações caracterizam-se por: ingurgitamento da célula, degeneração da substância de Nissl e migração do centro para a periferia (153, 155, 156). Segundo Martins e cols. (2005) e Murray (2005), as alterações representam um incremento do metabolismo celular, que visa à produção de proteínas relacionadas à regeneração do citoesqueleto do axônio, como a actina e tubulina, em detrimento da produção de neurotransmissores (157).

Modificações na região distal à lesão

Após a secção, ocorre a separação do segmento distal à lesão do restante do neurônio, com interrupção do fluxo axoplasmático e início de um processo catabólico em que o axônio e a bainha de mielina começam a fragmentar-se e as células de Schwann a proliferar. O citoesqueleto e o axoplasma degeneram, deixando o tubo endoneural vazio. A atividade dos macrófagos é estimulada pela destruição da mielina, resultando na remoção da maioria de seus fragmentos (158). Há também aumento da atividade de algumas proteinases e lipases

(120). Esse processo é denominado degeneração Walleriana, tendo início no local da lesão e progredindo em direção distal até o órgão efeto. As células de Schwann proliferam ao redor das estruturas em degeneração e iniciam a fabricação de nova mielina ao longo da porção desnudada do axônio, formando segmentos intermodais mais curtos do que os originais (133, 141, 142). A proliferação das células de Schwann no coto distal ocorre em três dias após a agressão axonal, ocorrendo neste período o seu alinhamento dentro do tubo de lâmina basal para formar as bandas de Büngner, que mais tarde fornecerão o caminho para as fibras do tecido em regeneração (151). Até o 12º-14º dias, ocorre a remoção dos restos da mielina, porém alguns restos podem persistir por meses (143). A velocidade da degeneração Walleriana varia de acordo com a gravidade da lesão. Nas secções completas, a degeneração ocorre de forma rápida, enquanto que nas lesões incompletas, o processo de degeneração pode demorar por mais de duas semanas.

Modificações nos músculos

A partir de terceira semana após a desnervação, os músculos começam a sofrer alterações histológicas e nos três primeiros meses ocorre perda de peso de forma rápida (44, 126). Histologicamente há um decréscimo em torno de 80 a 90%, no volume da fibra muscular com núcleo deslocado de sua posição original periférica para o centro da célula. As placas motoras atrofiam e desaparecem, processo esse que se inicia três meses após a lesão axonal. O tecido muscular é substituído por tecido fibrótico no período de 12 a 24 meses após a lesão do nervo (145). A denervação prolongada leva à degeneração irreversível das bainhas dos nervos intramusculares (93, 120). O processo progressivo de degeneração muscular pode estabilizar-se, dependendo da denervação ser incompleta, do grau de reinervação espontânea (normal ou aberrante) e da possível inervação contralateral (caso do

nervo facial), que apesar de não ser suficiente para executar a função motora, pode manter o trofismo muscular e evitar a evolução do músculo para a atrofia (143).

Modificações no local da lesão

No local da lesão, as alterações já estão presentes nas primeiras 24 horas (159). Quando há transecção, a primeira alteração que ocorre é a retração do mesmo (160), e o intervalo entre os dois cotos do nervo é preenchido com sangue, formando um coágulo de fibrina, para o qual convergem capilares e fibroblastos de tecidos adjacentes e dos cotos do nervo (161). Na extremidade do coto proximal, ocorre a formação de brotos de crescimento (protusões axonoplasmáticas formadas pelos axônios), podendo cada axônio originar vários axônios delimitados pelo perineuro. Esse brotamento axonal ocorre precocemente após a lesão, podendo estar presente nas primeiras três horas após a lesão (162). Há a formação do cone de crescimento e reestruturação da matriz extracelular (93). A proliferação das células de Schwann ocorre com diferenciação e up-regulation da expressão de moléculas adesivas e neurotrofinas, importantes para a fase de regeneração (120). A seguir, os brotamentos axonais múltiplos são absorvidos, formando um único axônio. Os terminais axonais continuam avançando após as primeiras 24 horas do início da lesão, estendendo-se para a área lesada durante os próximos três a oito dias. A incorporação de proteínas na extremidade do cone promove a expansão do cone de crescimento e a formação da membrana pré-sináptica, sendo esse processo determinado pela fusão de vesículas contendo proteínas específicas transportadas de forma anterógrada a partir do corpo celular, sendo as principais proteínas a sinaptofisina, a sinaptotagmina, a sinapsina, a GAP-43, a proteína quinase C e a tirosina quinase (145).

Regeneração

Nas primeiras sete horas após a lesão, inicia-se o processo de regeneração axonal através da cromatólise. Uma vez sobrevivendo à lesão, o corpo celular possui uma capacidade ilimitada de regenerar fibras lesadas (143). A partir do terceiro dia após a lesão, inicia o aparecimento dos prolongamentos protoplasmáticos chamados brotos ou "sprouts" axonais; eles atravessam o segmento lesado através das bandas de Büngner, atingindo os tubos de endoneuro do segmento distal e, posteriormente, a fibra muscular. Cada axônio do coto proximal origina em torno de 30 brotos, sendo que somente 1 a 4 alcançam um tubo endoneural. Em um mesmo tubo, podem ser encontrados mais de um broto, porém somente aqueles que encontrarem e reinervarem o receptor distal irão desenvolver-se e sofrer mielinização. Os restantes degeneram ou não se mileinizam (1, 126). Devido ao fato de um axônio em regeneração poder inervar mais de um tubo endoneural, o segmento do nervo regenerado poderá apresentar um maior número de axônios, que serão mais finos e menos mielinizados que o nervo normal. Num período de três a quatro meses, os axônios regenerados deverão encontrar os canais formados pelas bandas de Büngner, mas caso isso não ocorra, eles degenerarão e serão substituídos por tecido cicatricial. A regeneração é um processo lento de forma que os brotos axonais crescem a partir do coto proximal numa velocidade aproximada de 1 a 2 mm por dia, ou um centímetro por mês (1, 126, 143). Quando os cones de crescimento estabelecem adequadas conexões com os órgãos - alvo, ocorre a formação de uma nova bainha de mielina, mais fina e com mais internodos quando comparada com a bainha original (120). O axônio leva em torno de duas semanas para ultrapassar a região lesada quando os cotos estão apostos. A maturação axonal completa o processo de regeneração. A última etapa da regeneração ocorre com a formação de contatos efetivos com os órgãos-alvo, seja a formação da placa motora ou das terminações de receptores sensoriais (120). As novas junções neuromusculares serão formadas em número

maior que o anterior à lesão e a qualidade da reinervação irá depender da especificidade dos axônios em relação às fibras musculares. Há um mecanismo que garante o sucesso para que os brotos axonais alcancem as junções, uma vez que os mesmos competem entre si com relação a esse objetivo (143). A quantidade e a qualidade da regeneração axonal e também o estágio de atrofia em que se encontra o músculo no momento da reinervação irão definir a quantidade de músculo a ser reinervado.

1.9 HISTÓRICO DA CIRURGIA DOS NERVOS PERIFÉRICOS

A cirurgia de nervos periféricos apresentou resultados significativos no século XX, embora já se tenha conhecimento da realização da mesma desde o século anterior. O primeiro a descrever a aproximação de feridas nervosas foi Paul de Aegina em 625-690 (163). Waller, em 1850, descreveu o estudo do processo da degeneração nervosa periférica em sapos. Em 1870 Philipeaux & Vulpein não obtiveram sucesso ao realizar enxertos nervosos em cães, transplantando segmento de nervo óptico para o nervo hipoglosso entre dois animais. No mesmo ano, esses autores realizam, com pequeno sucesso, estudo com o uso de enxerto autólogo em cães (164).

A sutura epineural foi estudada e descrita em publicação por Hueter, no período de 1871 a 1873 (163). Com o passar dos anos, essa técnica foi aperfeiçoada, sendo utilizada até os dias atuais. A reparação nervosa secundária foi realizada algumas semanas após o trauma segundo descrição de Nelaton em 1864 (165, 166). A anatomia da porção distal e proximal de um nervo periférico foi descrita primeiramente por Letievan em 1872 (163). No período de 1876 a 1878, Albert descreveu o uso clínico do enxerto de nervos, usado raramente até 1943, quando Seddon iniciou sua técnica de enxerto nervoso com a utilização de nervos

cutâneos sensitivos transpostos a troncos nervosos maiores. Em 1882, Milkulicz iniciou a descrição de tração nervosa.

O encurtamento ósseo em apêndices locomotores para evitar a tração de nervos periféricos lesados em grandes segmentos foi descrito por Loebeke em 1884 (166). Em 1903, Balance et al descreveram a neurorrafia término-lateral para paralisia do nervo facial, com incisão no nervo doador. Em 1917 Langley e Hashimoto, descreveram a anastomose término-terminal.

As três técnicas para tratamento de nervos periféricos, a sutura direta, enxerto nervoso e neurólise, foram preconizadas por Babcock em 1927.

O uso da cola de fibrina foi relatada pela primeira vez em 1940 por Young & Medawar, em trabalhos experimentais com cães. Sir Sydney Sunderland estudou com detalhes a anatomia, a fisiologia e a patologia dos nervos periféricos entre 1945 e 1965.

Em 1964, Edshage mostrou em estudos que a sutura epineural poderia causar deslocamento dos fascículos neuronais, mesmo ocorrendo boa coaptação (167). No mesmo ano, Smith idealizou o microscópio cirúrgico, que passa a ser usado nessas cirurgias.

Em estudos realizados em 1972, Brown relatou que alguns fatores influenciam na regeneração nervosa, entre eles: a idade do paciente, a extensão da lesão, a ocorrência de formação de neuromas, os fatores neurotróficos e a técnica cirúrgica empregada para a reparação da lesão. Nessa mesma época, Milesi descreveu a técnica da anatomose interfascicular, relatando que a mesma poderia aumentar o volume de tecido conjuntivo (perineuro), provocando tensão na área da sutura com prejuízo ao suprimento vascular do nervo lesado (168).

Após inúmeros estudos relacionados à anatomia interna do nervo periférico, em 1979, Sunderland recomendou o uso da sutura individual dos fascículos. Em 1975, Terzis e cols. preconizaram evitar tensão na área de sutura, seguida por Sunderland em 1978. Samii, em

1975, Levinthal, em 1977, Kline, em 1980 e Hudson, em 1995, publicaram grandes casuísticas acumuladas e registradas sobre lesões e técnicas cirúrgicas de nervos periféricos.

A partir da última década, inúmeros progressos foram realizados na compreensão dos mecanismos envolvidos na regeneração de um nervo periférico lesado, embora as técnicas cirúrgicas utilizadas não tenham sofrido grandes modificações (93).

1.10 TRATAMENTO DA LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA

A recuperação da função após a lesão do nervo periférico costuma ter bom prognóstico, embora nem sempre ocorra de forma completa (Siqueira, 2007; Oliveira et AL, 2008). Em muitos casos, o restabelecimento da função perdida dá-se através de um adequado manejo da lesão (169).

1. Tratamento Conservador: é orientado no sentido de eliminar ou minimizar as complicações secundárias à lesão no aguardo por uma reinervação funcional. A fisioterapia (**reabilitação**) tem como objetivos (18, 120, 170):

- Manutenção da amplitude de movimento articular;
- prevenção da retração de tecido moles;
- prevenção da instalação de deformidades;
- retardo da atrofia muscular por desuso;
- reeducação de grupos musculares ;
- promoção da analgesia;
- orientações e treinamentos para maximizar a capacidade funcional;
- prevenção de lesões secundárias às alterações e negligência sensorial;
- avaliação e prescrição de órteses de posicionamento ou funcional.

As condutas terapêuticas a serem adotadas são (18, 170):

- Alongamentos;
- exercícios passivos, livres e resistidos;
- treino de habilidades funcionais;
- técnicas específicas da facilitação neuromuscular proprioceptiva;
- técnicas de liberação miofascial;
- eletroterapia como o TENS - Neuroestimulação Elétrica Transcutânea e o FES - Estimulação Elétrica Funcional, ultra-som terapêutico e terapia com laser;
- Técnica do feedback-visual do espelho.

O posicionamento funcional adequado de um membro comprometido pode ser garantido através do uso de talas e dispositivos de assistência especializada. A indicação específica do equipamento a ser usado evita o alongamento ou encurtamento excessivo dos músculos acometidos (120).

2. Tratamento Cirúrgico: tem por finalidade propiciar o realinhamento das estruturas nervosas com o mínimo de traumatismo cirúrgico, devendo ser aplicadas o mais rápido possível, levando em consideração as condições clínicas do paciente. Na maioria das vezes, a reparação cirúrgica faz-se a única opção terapêutica no tratamento de lesões de nervos periféricos (93), e, quando realizada precocemente, possui maiores chances de retorno à função neural (137).

As lesões nervosas isoladas não representam risco de morte, porém suas sequelas podem produzir deficiências permanentes, óbito ou eutanásia. O maior problema no tratamento de pacientes com lesões nervosas periféricas é a regeneração inadequada (137).

As lesões de nervo periférico podem ser classificadas em recentes ou tardias, dependendo do tempo de ocorrência entre o trauma e o atendimento prestado (135).

2.1. Lesões recentes: até três semanas da lesão.

2.1.2. Lesões tardias: após a terceira semana da instalação da lesão.

De acordo com a classificação acima, os reparos cirúrgicos são divididos em:

2.2: Reparo primário: é aquele efetuado no período máximo de 5 a 7 dias do traumatismo.

Esse reparo é recomendado unicamente nas seguintes condições:

- Incisão limpa do nervo, com instrumento cortante ou fragmento de vidro, sem lesões contusas das extremidades do nervo;
- contaminação mínima do local lesado;
- ausência de lesões traumáticas associadas que possam afetar a estabilidade óssea, a vascularização ou a pele que recobre o local da lesão;
- disponibilidade de equipe cirúrgica experiente e instrumental adequado;
- condições clínicas adequadas do paciente ao tratamento cirúrgico a ser empregado.

Segundo Hems & Glasby (171, 172), em lesões limpas, onde a secção do nervo deu-se por arma branca ou vidro, se houver condições técnicas apropriadas, a sutura deverá ser realizada nas primeiras vinte e quatro horas da lesão. Nessa fase, os tubos endoneurais ainda são de tamanho normal e a sutura pode ser realizada sem tensão (168). Por não haver retração e necessidade de interposição de enxerto, o reparo primário apresenta prognóstico favorável para a neurografia término-terminal.

O reparo primário apresenta vantagens em lesões do plexo braquial e da região proximal do nervo ciático. Hems e cols. (171, 172), mas em lesões de traumas graves e ressecções tumorais onde sempre há grande perda de tecido neural, este tipo de reparo está muitas vezes impossibilitado de ser realizado.

Caso as condições acima não ocorram, a reparação do nervo lesado deverá ser adiada, limitando-se o tratamento ao resto da lesão traumática, com adoção de medidas que evitem retrações e facilitem a reparação secundária.

2.2.1. Reparo secundário: realizado em um período maior a sete dias após a lesão nervosa.

Em 1982, Rojas relatou o período de 21 dias como o prazo ideal para a realização da sutura secundária por apresentar um campo livre de células inflamatórias. Acrescentou ainda que o epineuro apresenta-se mais resistente, oferecendo maior sustentação de sutura nessa fase após a lesão. É a alternativa usada preferencialmente, fundamentada sob o ponto de vista biológico, já que entre a segunda e sexta semanas após o traumatismo é que a atividade metabólica do neurônio e seu axônio é a ideal para garantir uma boa regeneração ou reparação cirúrgica.

Ducker recomendou a realização da reparação secundária entre a 2ª e 3ª semanas com o objetivo de cortar os extremos do nervo lesionado evitando a formação de neuroma da extremidade proximal e o glioma da extremidade distal. As secções referidas criam condições similares às encontradas no reparo primário do nervo lesado.

Segundo Robson, a reconstrução cirúrgica pode ser dividida em: imediata (30 dias), demorada (3 a 6 meses) e tardia ((135)1 a 2 anos ou mais) (173).

3. Técnicas cirúrgicas: as técnicas cirúrgicas mais utilizadas serão descritas a seguir, com ênfase na tubulização neural por ser motivo do presente estudo.

3.1: Neurólise: consiste na ressecção do tecido cicatricial ao redor do tronco nervoso. Divide-se em **externa**, quando a ressecção é realizada em torno do epineuro, liberando-o de aderências, e **interna ou fascicular**, quando abre-se o epineuro, e realiza-se a ressecção do tecido cicatricial entre o fascículo, com o objetivo de realizar a descompressão do tronco e

dos fascículos nervosos. É indicada em lesões com continuidade do arcabouço conjuntivo do nervo, como nos casos de neuroma (133, 135).

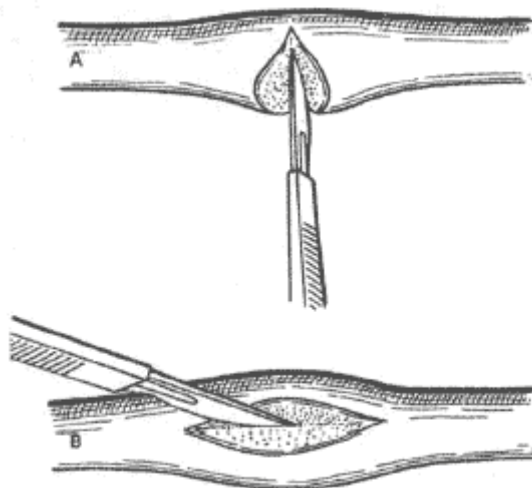


Figura 3:Técnica da neurólise
Extraído de Goffi (174)

3.2. Sutura epineural: é a técnica clássica eleita para a reparação nervosa, consistindo em unir a porção epineural dos cabos nervosos proximais e distais com o menor número possível de suturas, diminuindo, assim, o tempo de intervenção, e causando menor traumatismo ao tecido nervoso (175, 176). Essa sutura não invade o conteúdo neural, é simples e de fácil execução, não necessitando de grandes ampliações de imagem (177). Tupper, Crick e Matteck, em 1988, compararam as técnicas de sutura epineural e interfascicular, concluindo que a reparação epineural tem a vantagem de promover potencialmente um alinhamento axonal, promovendo melhores soluções de regeneração nervosa (178). A técnica de sutura epineural tem sido utilizada desde o início do século passado e permanece como prática ainda convencional (177).

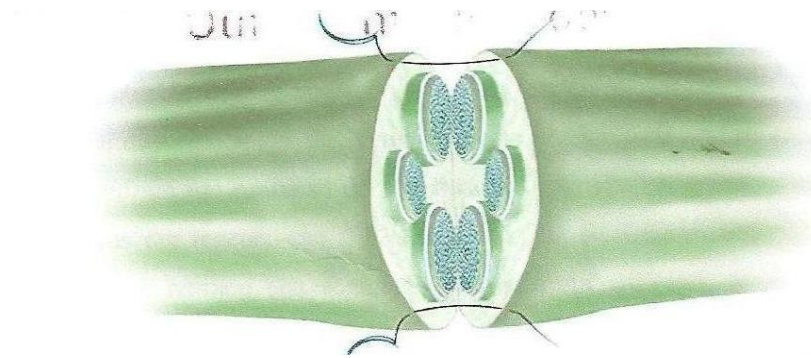


Figura 4: Sutura epineural
Fonte: Mattar Jr; Azze (135)

3.3. Sutura fascicular ou Perineural: consiste na dissecação de cada fascículo ou grupo de fascículos, liberando-os do tecido conjuntivo circundante, e aproximando-os individualmente, de acordo com o tamanho e a localização dos cabos, o que resultaria em uma maior manipulação microcirúrgica e maiores traumatismos na intimidade do nervo (175, 179). Essa técnica deve ser aplicada nas neurorrafias de injúrias nervosas onde há confinação dos axônios em seus respectivos fascículos, minimizando a perda destes no tecido conjuntivo, embora apresente um maior tempo de intervenção e dificuldade na prática das micro-suturas (180). Há necessidade de maior ampliação (8 a 16 vezes), sendo um procedimento demorado se comparado às neurorrafias epineurais (137).

Grabb, em 1970, comparou os métodos de sutura em nervos periféricos de macacos, e afirmou que a sutura fascicular traria melhores resultados de regeneração e retorno à função motora do nervo quando comparada à sutura epineural, porém tal achado não é confirmado pela maioria dos pesquisadores e cirurgiões atuantes na área (181).

A grande vantagem da sutura fascicular é que ela permite a regeneração fascicular acurada por introduzir as fibras nervosas apropriadamente nos tubos endoneurais em suas extremidades (137). As suas desvantagens são a formação de cicatrizes teciduais devido ao aumento da dissecação e da sutura, e a não possibilidade de realizar a reparação sob nenhuma tensão, com a probabilidade de ocorrer um maior dano no cruzamento das fibras interfasciculares (175).

Levinthal e cols. compararam diretamente as técnicas de reparação epineural e fascicular em modelo de nervo tibial de cães, observando que a regeneração do axônio distal é semelhante nos dois grupos (182).



Figura 5: Sutura perineural
Fonte: Mattar Jr; Azze (135).

Para ambas as técnicas descritas acima, é fundamental evitar-se a tensão na zona de sutura, com prevenção da fibrose e isquemia local (133). Quando há impossibilidade de se evitar a tensão entre os cotos neurais, o **enxerto interfascicular** poderá ser uma boa alternativa, uma vez que permite resolver o problema da tensão em caso de perda significativa de tecido nervoso (133, 137, 183).

Os enxertos de nervos periféricos podem ser, teoricamente, heteroenxertos, homoenxertos e autoenxertos. Na prática cirúrgica, somente têm interesse, no momento atual, os autoenxertos, devido aos resultados cirúrgicos obtidos com os mesmos. De acordo com o componente histológico do nervo a ser utilizado, distinguem-se três variedades de enxertos: de raiz ou tronco nervoso (a), de grupos de fibras (grouped fascicular nerve graft) e de fibras nervosas (fascicular nerve graft). A outra possibilidade é de enxerto nervoso livre vascularizado.

São empregados segmentos livres de nervos, geralmente o nervo sural, pertencentes ao doador autógeno, onde os fascículos pertencentes ao segmento proximal serão conectados aos do segmento distal por meios de um ou mais enxertos, sofrendo um processo de degeneração e funcionando apenas como conduto para os axônios em regeneração (133, 137). O nervo, do qual retirou-se seu segmento para enxerto autólogo, receberá a sutura epineural e o enxerto será anastomosado a seu sítio com sutura fascicular. Outros nervos que podem ser usados como autoenxertos são: o nervo braquial cutâneo interno, o nervo cutâneo externo, continuação do músculo cutâneo, o nervo radial superficial e os nervos intercostais.

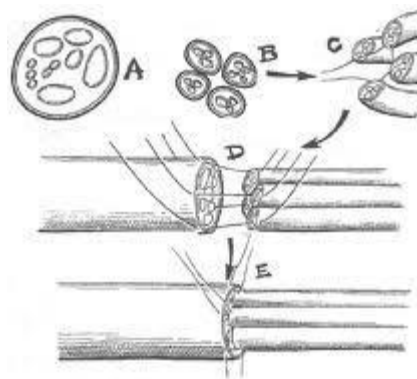


Figura 6: Enxerto interfascicular (Cable graft).

Legenda: A. nervo; B. enxertos (grafts); C. fascículos; D. posição dos fascículos; E. sutura

Fonte: Goffi (174)

Wang e cols. (13) citaram como desvantagens da técnica de enxerto autógeno a necessidade de uma segunda cirurgia no mesmo paciente, além da necessidade de um ajuste adequado da extensão e o diâmetro do nervo lesionado (184), a diminuição da função do nervo doador (185), a maior dor ao paciente, a formação de neuroma e de grandes cicatrizes não aceitáveis esteticamente em pacientes humanos.

3.4. Técnica de tubulização neural: é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma prótese tubular, objetivando propiciar um ambiente favorável à regeneração (186), servindo, ainda, como um guia para o crescimento das extremidades nervosas rompidas (187).

Os materiais que compõem esses tubos são:

A. Biológicos:

- Colágeno (135)
- Quitosano (188)
- Gelatina (13)
- **Veias**, artérias e epineuro (183)

B. Materiais sintéticos:

- Silicone (13, 14, 189-191)
- Celulose liofilizada (192)
- Poliuretano (13, 185)
- Poliglactina (185)
- Ácido poliglicólico (186)
- Adesivos de fibrina e cianocrilatos (193)

As vantagens da utilização da tubulização neural citadas nos estudos realizados são:

- A. Baixa morbidade (194);

- B. fornecimento de suporte mecânico (31, 194);
- C. redução da tensão entre os cotos (31, 195);
- D. redução da quantidade de material na sutura com redução da resposta cicatricial (31, 195);
- E. Possibilidade de manipulação experimental do micro-ambiente neural, assim como a administração de drogas estimulantes da regeneração - fatores de crescimento (NGF - nerve growth factor), gangliosídeos e neurocininas - que podem ser adicionadas de forma isolada ou concomitante às técnicas cirúrgicas (135, 196).

As desvantagens da utilização de materiais sintéticos não biodegradáveis, segundo Wang e cols. (2007), são: permanecem no local da lesão mesmo após a regeneração neural, podendo levar a uma possível reação de corpo estranho e a ocorrência tardia de compressão do nervo, resultando em dor e comprometimento da função nervos (13).

Os materiais biodegradáveis apresentam como desvantagens: baixa biocompatibilidade, liberação de produtos ácidos de degradação e a rápida perda das propriedades mecânicas durante a degradação (185).

Os tubos ideais seriam feitos de materiais de baixo custo, inertes biologicamente, ou seja, biocompatíveis, finos e flexíveis, translúcidos, absorvíveis, inibidores dos processos inflamatórios como fibrose, glioma, neuroma, edema, isquemia e aderência e facilitadores dos processos que contribuem para a regeneração, os acumuladores dos FCs do nervo (197, 198). Desse modo, a veia autógena preenche muitos desses critérios, por ser ampla no corpo humano, inerte imunologicamente, evitando sequelas nas zonas doadoras de nervos e menor fibrose local (199). É um tubo fino, flexível e de permeabilidade seletiva, que permite as trocas osmóticas das substâncias fundamentais à regeneração nervosa, impedindo a formação de tecido cicatricial entre os cotos do nervo. As desvantagens de seu uso são o colapamento

da luz que leva ao bloqueio do crescimento das fibras nervosas e o limite do comprimento do tubo, que influencia na capacidade de crescimento axonal (197, 198).

Estudos sobre grandes perdas de tecido neural e a necessidade de pontes conectando as extremidades proximais e distais foram realizados logo na segunda metade do século XIX. Foramitti, em 1904, relatou a regeneração neural bem sucedida utilizando enxerto arterial.

Em 1909, Wrede realizou, por meio de enxerto venoso, a reconstrução de nervo periférico lesado. Swan, em 1941, utilizou enxerto venoso no tratamento de nervo ulnar de seres humanos. Em 1943, Weiss utilizou um tubo de artérias dissecadas e criopreservadas para servir como condutor para a regeneração neural.

Brunelli e cols., em 1982, demonstraram a possibilidade de regeneração neural completa no interior de enxertos de veia autóloga em nervos com defeito de 1 centímetro (cm), e, em 1987, demonstraram a atração quimiotática seletiva para fibras sensitivas e motoras com o mesmo tipo de enxerto.

O uso de enxertos de veia no reparo de lesões do nervo digital foi descrito por Walton et AL., em 1989, que, comparado ao grupo controle com enxertos de nervos, mostrou resultados superiores, com 10 mm. de defeito. Porém, essa técnica apresenta a desvantagem de ser mais suscetível ao colapso.

O uso de enxertos venosos para reconstrução neural trouxe uma boa alternativa para diminuir a sequela na área doadora neural, apesar de haver algumas restrições (200):

- A. Os maiores benefícios são observados em lesões de até 10 mm;
- B. enxertos venosos invertidos parecem fornecer maiores resultados;
- C. o tempo cirúrgico permanece prolongado por requerer dissecação de vasos.

Em estudos realizados por Wolff e cols. (1993), foi apresentado que vasos podem ser preservados em glicerol, impedindo que a sua estrutura seja destruída, podendo ser usado na

microcirurgia vascular, com a vantagem adicional de reduzir a imunogenicidade do enxerto (201).

Estudos realizados por Da-Silva e cols. (2003) e Brag-Silva e e cols. (2006) em nervos ciáticos de ratos Wistar lesados, usando reparo com utilização de câmara de silicone, apresentaram tecido de interligação dos cotos neurais. De modo semelhante, Colomé e cols. (2008) realizaram modelo experimental em coelhos da Nova Zelândia, com secção bilateral do nervo tibial e posterior reparo com câmara de silicone, e observaram que, em todos os animais, o tecido de regeneração internamente à prótese de silicone, em um período de trinta dias de pós-operatório, formou uma "ponte" de interligação entre os cotos nervosos seccionados.

3.5. Adesivos: Alguns autores relatam vantagens em seu uso quando comparado ao emprego da sutura. O adesivo de fibrina é um concentrado biológico constituído por componentes derivados do plasma, de aplicação tópica, cujo mecanismo de ação se assemelha à última fase da coagulação fisiológica (formação do fibrinogênio). Pequenas quantidades de cola de fibrina podem ser facilmente aplicadas e, ao se solidificarem, formam um coágulo plasmático (193).

Segundo relatos de Mattar Jr e Azze (2008), ao colar um enxerto ao outro, várias fibras são unidas pelo adesivo, diminuindo a quantidade de pontos necessários para o afrontamento fascicular, e, conseqüentemente, diminuindo a agressão da manipulação da sutura e reduzindo o tempo cirúrgico.

Em estudo realizado por Sandrini e cols. (2007), onde foi avaliada a anatomose do nervo facial de coelhos com cola de fibrina, observou-se que houve um aumento crescente na contagem dos axônios dos animais em avaliações aos 30 e aos 120 dias, levando à conclusão de que a cola de fibrina induz a anastomose dos cotos nervosos .

Na comparação da utilização da técnica de sutura epineural com aplicação de cola de fibrina e a tubulação com BioFill na reconstrução do nervo ciático de ratos, Torres e cols. (2003) concluíram que tanto a técnica de tubulação quanto a aplicação de cola de fibrina proporcionam bom alinhamento axonal devido à menor quantidade de material de sutura no tecido neural, com menor formação de neuromas (202).

Recentemente, alguns autores realizaram experimentos com o uso de veias invertidas ("de dentro para fora" ou "ao avesso") comparados ao enxerto de nervo tradicional e ao enxerto tradicional de veia, tendo sido encontrado colágeno e lamina que facilitariam a regeneração neural (31). A camada adventícia das veias é rica em colágeno e a camada média muscular das veias é rica em lamina. Assim, a inversão da orientação normal da veia proporciona uma melhor exposição dos axônios ao colágeno existente na camada adventícia.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

- Este trabalho teve como objetivo estudar a influência do Plasma Rico em Plaquetas na regeneração de nervo periférico seccionado e reparado com veia ao avesso vazia e preenchida com PRP.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAS E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética em Saúde, que é reconhecida pela CONEP como Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cadastrado sob o número 09-537.

O projeto também foi aprovado pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do HCPA, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008.

Todos os procedimentos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA.

AMOSTRA

Para a realização desse trabalho, foi utilizada uma amostra de 40 ratos da raça Wistar, machos, com idade de sessenta dias, com peso entre 200 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas.

O cálculo do tamanho da amostra foi estabelecido através da análise de diversos trabalhos semelhantes, disponíveis na literatura médica. Após, calculou-se ser necessário pelo menos 10 ratos em cada grupo, considerando-se um nível de retirada de vírgula de significância de 0,05 , 95% intervalo de confiança .

MÉTODOS

Os animais foram mantidos na UEA do HCPA, acondicionados em gaiolas contendo cinco animais, num total de 8 gaiolas, Os animais foram alimentados com ração comercial padrão para ratos, sem restrição alimentar e água filtrada ad libitum, com período

claro/escuro a cada 12 horas, controle da umidade e temperatura ambiente de 22°C (figura 11).



Figura 7: Acondicionamento dos animais

Todos os animais, após ingresso na UEA do HCPA, passaram por um período de quarentena para adaptação. O monitoramento dos animais foi realizado pelos mesmos tratadores e médica veterinária. No encaminhamento para o procedimento cirúrgico, a caixa a ser utilizada era levada para outra sala, a de indução anestésica, onde o animal a ser submetido ao procedimento, escolhido aleatoriamente, era separado dos demais. Nesse local, era realizada a pesagem do animal para o cálculo das doses dos anestésicos a serem utilizados e todo o preparo pré-operatório. Após cada procedimento cirúrgico, o animal se recuperava em uma incubadora pré-aquecida, com analgesia e fornecimento de alimentação e água. Após a recuperação era devolvido à sua caixa de origem, com os demais animais. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre pela mesma equipe, previamente treinada.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo 1 (G1) - grupo controle = 10 animais: o nervo ciático direito foi seccionado em uma extensão de 10 mm, sem reparo. A veia jugular externa esquerda foi dissecada, clampeada com fio seda 3-0 em duas extremidades (cranial e caudal) e seccionada em

10 mm da sua extensão. Foi feita coleta de 1 ml de sangue do plexo retro-orbital esquerdo e desprezado.

- Grupo 2 (G2) = 10 animais: secção de 10 mm de extensão do nervo ciático direito com sutura epineural dos cotos restantes em dois pontos de cada extremidade nervosa, utilizando-se fio nylon 8-0. A veia jugular externa esquerda foi dissecada, clampeada com fio seda 3-0 em duas extremidades (cranial e caudal) e seccionada em 10 mm da sua extensão. Foi feita coleta de 1 ml de sangue do plexo retro-orbital esquerdo e desprezado.
- Grupo 3 (G3): = 10 animais: secção de 10 mm de extensão do nervo ciático direito. Dissecção da veia jugular externa esquerda em 10 mm da sua extensão, clampeamento das extremidades cranial e caudal com fio seda 3-0 e secção de 10 mm. Inversão da veia (de dentro para fora). Sutura de cada extremidade venosa em cada extremidade nervosa com dois pontos com fio nylon 8-0. Foi realizada coleta de 1 ml de sangue do plexo retro-orbital esquerdo e desprezado.
- Grupo 4 (G4) = 10 animais: secção de 10 mm de extensão do nervo ciático direito. Dissecção da veia jugular externa esquerda em 10 mm da sua extensão, clampeamento das extremidades cranial e caudal com fio seda 3-0 e secção de 10 mm. Inversão da veia (de dentro para fora). Sutura de cada extremidade venosa em cada extremidade nervosa com dois pontos com fio nylon 8-0. Foi realizada a coleta de 1ml de sangue do plexo retro-orbital esquerdo, com centrifugação por 6 min, aspiração do PRP com adição posterior de 0,5 ml citrato de sódio a 10 % para sua ativação. A injeção do PRP realizada no conduto venoso com auxílio de seringa e agulha para insulina. A colocação do PRP foi realizada depois de uma extremidade do enxerto estar previamente suturada.

ANESTESIA.

Os animais foram anestesiados com: Cetamina (100mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg), peso vivo, por via intraperitoneal. O animal foi considerado anestesiado quando ocorria abolição do reflexo córneo palpebral, e não esboçasse reação motora à prensão da região distal da sua cauda. Realizava-se monitoração dos reflexos citados no período trans-operatório, e caso apresentasse indícios de recuperação anestésica, a anestesia era complementada de forma inalatória.

Na analgesia pós-operatória, foram utilizados: Bupivacaína (1 mg/Kg) e Dipirona (150 mg/Kg).



Figura 8: Anestesia dos animais

MATERIAIS

1. Microscópio cirúrgico.
2. Balança de precisão.
3. Fita adesiva.
4. Régua
5. Instrumental para microcirurgia.
6. Fio seda 3-0.
7. Fio nylon 8-0.
8. Centrífuga.

9. Respirador Takaoka.
10. Câmara de sacrifício para animais de laboratório.
11. Tricótomo elétrico

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Xilazina (10 mg/Kg) e Cetamina (100 mg/Kg). Após abolição do reflexo córneo palpebral e de retirada da cauda a pressão manual, era realizada tricotomia da região lateral esquerda do pescoço e da face posterior da coxa direita com tricótomo elétrico, punção do plexo retro-orbital esquerdo e coleta de 1 ml de sangue em tubo de ensaio, contendo citrato de sódio a 10%. No grupo 4, o sangue coletado foi encaminhado para centrifugação e preparo do PRP, e, nos demais grupos, foi descartado. Os animais foram posicionados na placa de cortiça em decúbito dorsal, com suas patas traseiras e dianteiras em completa abdução e fixadas à mesa com fita adesiva. A degermação da região cervical foi realizada com iodoform aquoso.

Foi feita uma incisão reta na região cervical esquerda, de aproximadamente 5 cm de extensão e divulsão dos tecidos por planos até a exposição da veia jugular externa esquerda e seu isolamento. Introduziu-se uma sonda periodontal com ponta milimetrada na luz da veia e realizada posterior ligadura de seus segmentos cranial e caudal e secção de 12 mm de extensão da veia. O segmento de veia seccionado foi mantido mergulhado em soro fisiológico até o momento de sua colocação como enxerto entre os cotos nervosos lesados no nervo ciático direito, nos grupos 3 e 4. Nos grupos 1 e 2, o segmento de veia foi utilizado para treinamento cirúrgico e descartado.

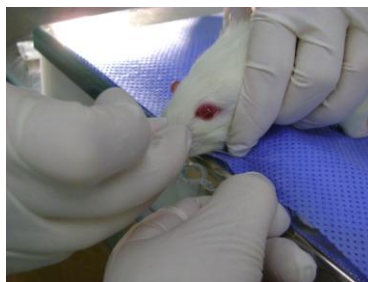


Figura 9: Coleta de sangue do plexo retrorbital esquerdo



Figura 10: Posicionamento do animal para disseção da veia jugular externa esquerda



Figura 11: Veia jugular externa esquerda dissecada

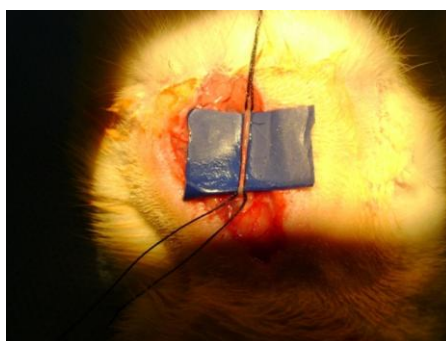


Figura 12: Veia jugular externa esquerda com reparo das extremidades cranial e caudal

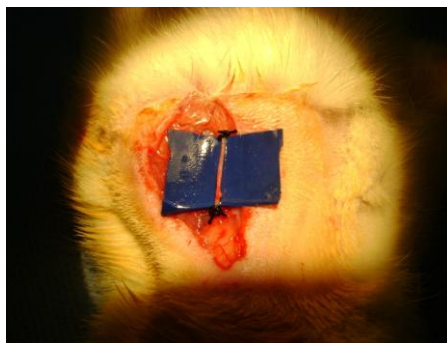


Figura 13: Veia jugular externa esquerda com extremidades clampeadas

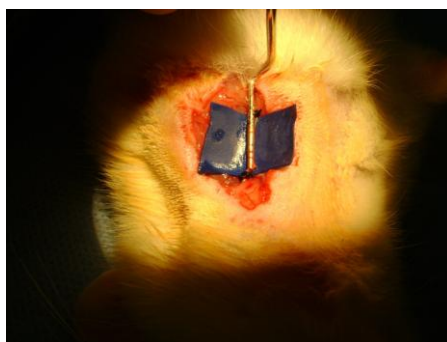


Figura 14: Veia jugular externa esquerda com sonda periodontal em sua luz

A seguir, os animais foram posicionados em decúbito ventral, com suas patas dianteiras e traseiras em completa abdução e fixadas à placa de cortiça com fita adesiva. A degermação da região posterior da coxa direita foi realizada com iodoform aquoso e feita incisão reta, perpendicular, na face posterior da coxa direita, de aproximadamente 3 cm de extensão, com dissecção dos planos até a identificação do nervo ciático direito.

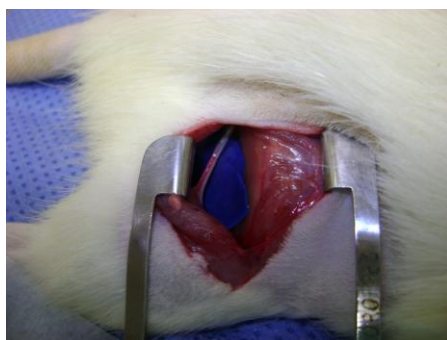


Figura 15: Dissecção do nervo ciático direito

No grupo 1, o procedimento foi realizado conforme descrito acima, com secção de 10 mm do nervo ciático direito, sem reparo.



Figura 16: Nervo ciático direito seccionado com coto proximal (esquerdo) e distal (direito).

No grupo 2, o procedimento foi realizado conforme descrito acima, e o nervo ciático direito foi seccionado em 10 mm da sua extensão, e as extremidades nervosas foram suturadas em dois pontos com fio nylon 8-0.

No grupo 3, o procedimento foi realizado conforme descrito acima, e, após, realizada a retirada do segmento de 12mm da veia jugular externa esquerda e secção de 10 mm do nervo ciático direito. O segmento de veia foi virado do avesso e interposto como enxerto entre o coto distal e proximal do nervo seccionado, com fixação de ambas as extremidades da veia através de dois pontos simples de fio nylon 8-0 ao epineuro, distante 2 mm das extremidades nervosas.

No grupo 4, o procedimento foi realizado conforme descrito no grupo 3 e o segmento de veia utilizado como enxerto entre as extremidades nervosas foi preenchido com o PRP e suturada como os outros animais.

Após cada procedimento cirúrgico, a pele da região do pescoço e da face posterior da coxa direita foi suturada com fio mononylon 4-0.

PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Após a anestesia e tricotomia da região do pescoço à esquerda e da face posterior da coxa direita, foi colhido 1 ml de sangue do plexo retro-orbitário esquerdo de cada animal. O sangue foi coletado em um tubo de ensaio contendo 0,5 ml de citrato de sódio a 10% e imediatamente levado à centrífuga sem que houvesse mudança da posição do tubo (sempre na posição vertical). A centrifugação foi realizada durante seis minutos a 800 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação, o líquido sobrenadante (PPP) era descartado e aspirado 0,5 ml do PRP obtido adicionado de mais 0,5 ml da coleção hemática da camada inferior. Esse composto era adicionado no interior do enxerto venoso do grupo 4.

SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

Após quatro semanas de pós-operatório, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico.

Os nervos ciáticos foram retirados, fixados em placas de isopor com identificação das extremidades proximal e distal e mergulhados em solução de formol durante 24 horas. Após, foram submetidos ao processamento de rotina para exame histopatológico.

Tabela 2: Descrição dos grupos, procedimentos realizados e data do sacrifício dos animais

Grupo	Defeito Nervo	Defeito veia	Tratamento	Momento do sacrifício
1	10 mm	12 mm	Secção Nervo (controle)	4 semanas
2	10 mm	12 mm	Sutura Cotos	4 semanas
3	10 mm	12 mm	Veia ao avesso vazia	4 semanas
4	10 mm	12 mm	Veia ao avesso + PRP	4 semanas

EXAME HISTOPATOLÓGICO

Para o estudo histopatológico, as espécimes foram obtidas respeitando a distância pré-estabelecida de 5 mm distal à neurorrafia, tanto do coto proximal quanto distal. Nos quatro grupos, a biópsia foi realizada na mesma zona.

Após a ressecção, o nervo foi fixado à placa de isopor com alfinete de cores que identificavam a extremidade proximal e distal, com a zona de manipulação prévia na região central, e imediatamente submersos durante 24 horas na solução de formaldeído a 4%.

A seguir, os espécimes foram submetidos ao processamento de rotina para exame histopatológico.

PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os nervos ciáticos coletados *in vivo* foram imediatamente armazenados em solução de formalina tamponada a 4%. Os cotos proximais foram corados com tinta nanquim preta.

A seguir, os espécimes foram submetidos a processamento histológico de rotina:

1. Desidratação: banhos em soluções de concentração crescente de álcool (70/80/95 e 100%).
2. Diafanização ou Clarificação: banhos com xilol para retirada total do álcool, permitindo, assim, a penetração da parafina de forma eficiente.
3. Impregnação: através da parafina, próxima a seu ponto de fusão (56 a 60°C).
4. Inclusão: em parafina.

CORTES

Os cortes em foram obtidos com espessura de 4 micrômetros e, a seguir, levados para uma vasilha com água quente.

COLORAÇÃO DE ROTINA

As lâminas, após processamento, foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina.

EXAME DAS LÂMINAS

As lâminas foram examinadas em microscópio Olympus Bx 41 e fotografadas de forma eletrônica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste qui-quadrado com independência, comparando-se os quatro grupos. Para identificar as diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste exato de Fisher (203, 204), adotando-se o nível de significância $< 0,05$.

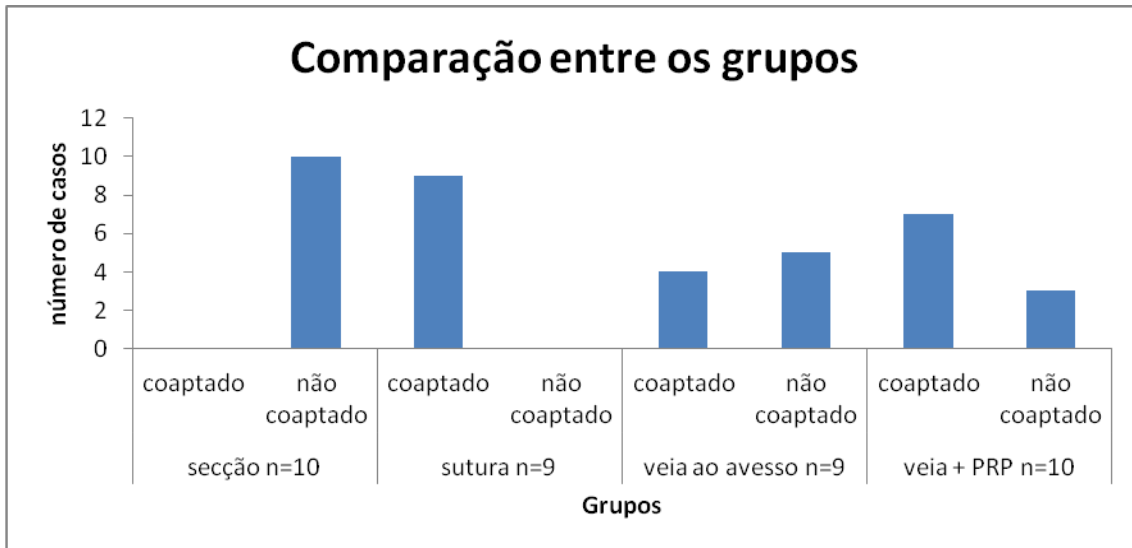


Gráfico 1

Na comparação entre grupos, houve diferença significativa entre o grupo 1 (secção), grupo 2 ($P=0,009$), grupo 3 ($P=0,03$) e grupo 4 ($P=0,003$). Nas demais comparações, não houve diferença significativa ($P>0,05$).

Tabela 3: Análise da Contingência entre ao 4 grupos:

Dados Analisados	Resultados
Qui-quadrado com independência	24,05,6
P (valor)	0,0005
Estatisticamente significativo?	Sim
Linhas / Colunas	4/3

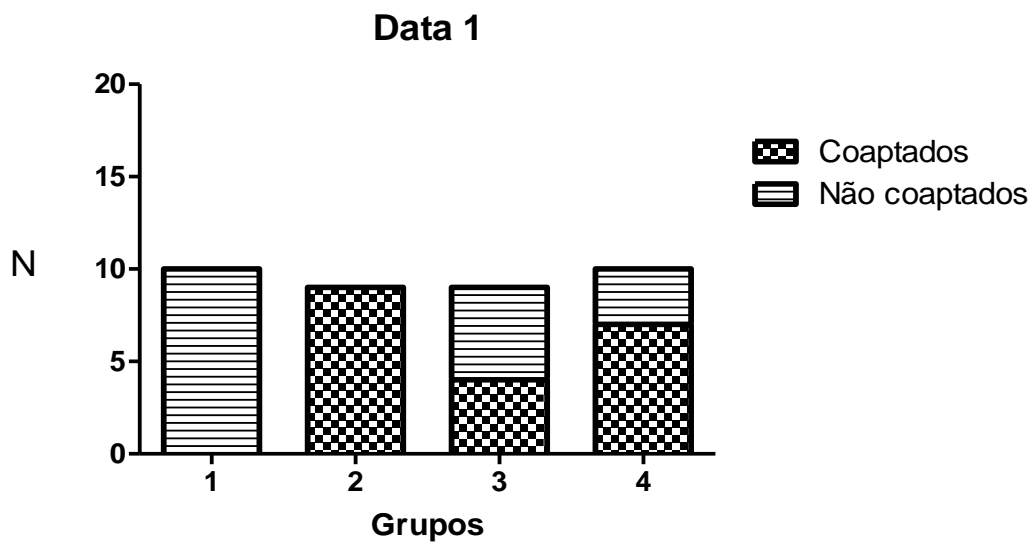


Gráfico 2: Gráfico do Teste Chi-quadrado
 N= número de casos
 Grupos= grupos estudados
 Resultados: Coaptados; Não coaptados

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Análise macroscópica

Na inspeção dos animais, observou-se que os mesmos apresentavam dificuldade na marcha no período pós-operatório imediato, com recuperação parcial ou total em alguns grupos e automutilação de partes do membro (pata) operado. A automutilação não foi persistente no período de 30 dias, e apresentou diferença entre os grupos, como demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 4: Descrição da automutilação de dedos em cada grupo

Grupos	Dedos I	Dedos II	Dedos III	Dedos IV	Dedos V
G1 (secção sem reparo)	0	0	0	0	0
G2 (secção com sutura)	0	0	0	0	0
G3 (enxerto com veia ao avesso)	0	1	1	0	0
G4 (PRP)	0	1	1	0	0



Figura 17: Animal do Grupo 3. Locais de automutilação. *1- Dedo nº1* 2- Dedo nº 2* 3- Dedo nº3 * Dedo nº4

Ocorreu visível alteração da marcha devido à paresia provocada pela secção do nervo ciático, especialmente no período pós-operatório imediato e primeira semana após a cirurgia, notando-se melhora gradativa nos grupos 2 e 4 e déficit motor mantido nos grupos 1 e 3.

Na maioria dos animais dos grupos 2 e 4, a marcha evoluiu para próximo da normalidade a partir da terceira semana.

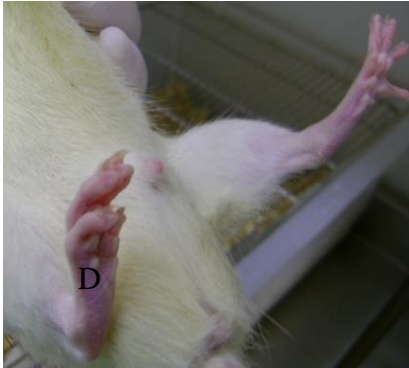


Figura 18: Animal com a pata direita caída

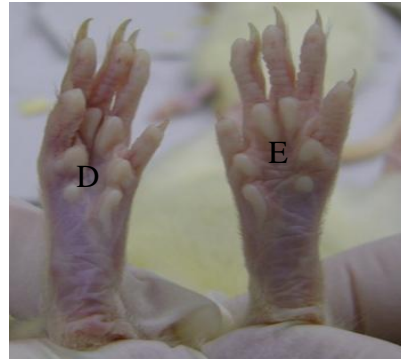


Figura 19: Animal com atrofia da pata direita



Figura 20: Abertura dos dedos da pata esquerda (não operada)

O teste de marcha foi realizado em todos os animais a partir da primeira semana após a cirurgia, sendo repetido a cada semana para uso em trabalhos futuros.



Figura 21: Teste da marcha em animal do G2

As intercorrências ocorridas caracterizam-se por deiscências de suturas, com necessidade ou não de re-suturas, lesões oculares, autofagias de patas operadas ou parte delas e óbitos. Os óbitos ocorreram devido à intercorrência anestésica no período trans-operatório em um dos animais, e o outro por eutanásia devido à perda do olho esquerdo (E).

Tabela 5: Descrição dos óbitos e suas causas

Grupo	Óbitos	Causa
1	0	
2	1	Intercorrência anestésica
3	1	Eutanásia devido à perda do olho E
4	0	

As intercorrências são listadas na tabela abaixo :

Tabela 6: Descrição das intercorrências em cada Grupo

Intercorrência	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Deiscência sutura coxa direita			2	1
Deiscência sutura região lateral do pescoço à esquerda			2	3
Lesão ocular		1		
Autofagia em pata direita				
Autofagia em partes da pata direita			2	
Autofagia em dedos da pata direita			1	1
Re-suturas		1		
Óbito		1	1	

Análise Histopatológica

Após o preparo, as lâminas foram analisadas em microscópio, com aumentos gradativos, 20 a 40x, com a finalidade de evidenciar o encontro dos cotos nervosos seccionados, reparados ou não, em cada um dos grupos. As imagens abaixo revelam os achados:

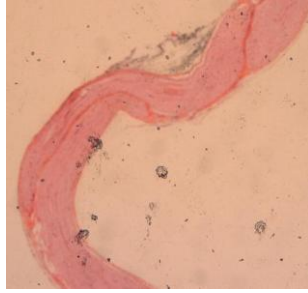


Figura 22: Imagem microscópica de um nervo normal

Aumento 40x - Coloração hematoxilina-eosina

Grupo 1: em nenhum dos nervos seccionados houve coaptação das extremidades nervosas.

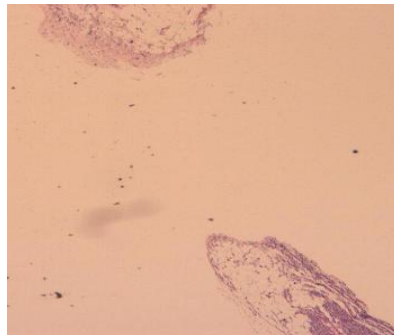


Figura 23: Coto proximal(inferior) e coto distal (superior)

Aumento 20x - Coloração hematoxilina-eosina: Não há coaptação dos cotos nervosos seccionados.

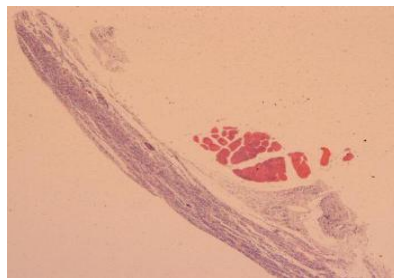


Figura 24: Coto proximal : seguimento com arranjo das fibras

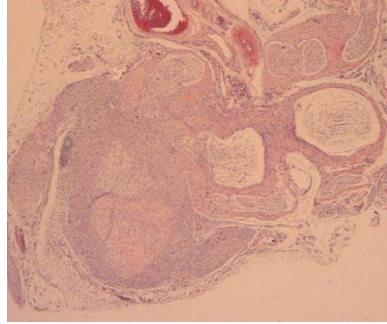


Figura 25: Coto distal: segmento sem arranjo de fibras

Grupo 2: todos os nervos seccionados tiveram coaptação de suas extremidades nervosas.

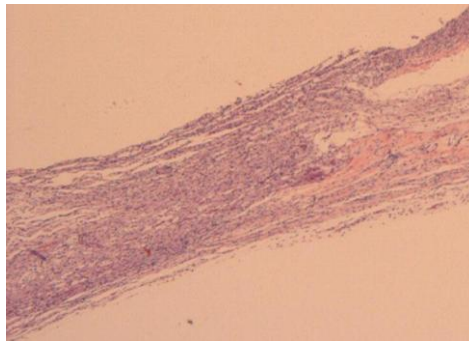


Figura 26: Coto proximal (inferior) e coto distal (superior)

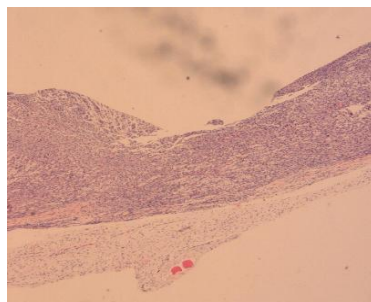


Figura 27: Coto proximal (esquerda) e coto distal (direita)

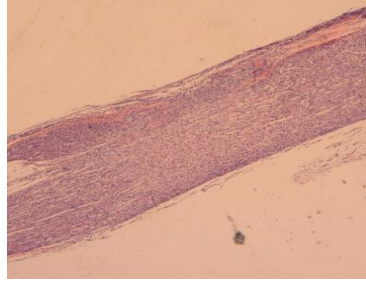


Figura 28: Coto proximal(inferior) e coto distal(superior)

Grupo 3: do total de nove (9) animais, somente quatro (4) tiveram as extremidades nervosas coaptadas.

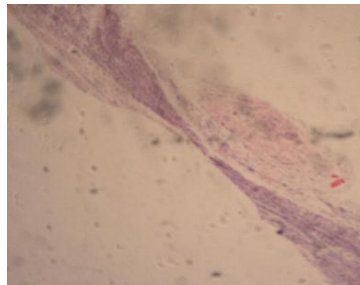


Figura 29: Coto proximal (inferior) e coto distal (superior)

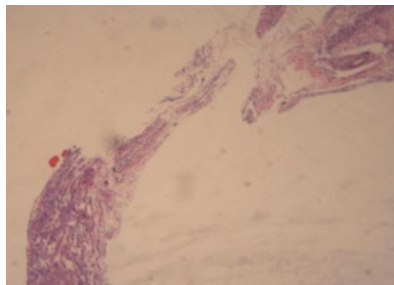


Figura 30: Coto proximal (inferior) e coto distal (superior)

Grupo 4 : sete animais com nervos seccionados tiveram coaptação das extremidades nervosas.

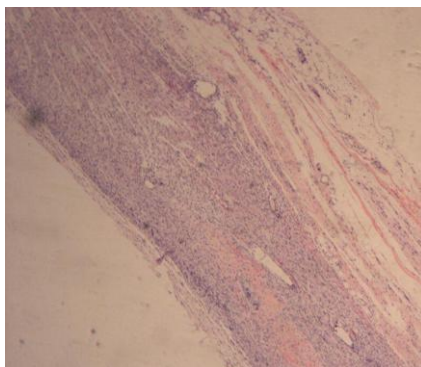


Figura 31: Coaptação dos cotos proximal (inferior) e distal (superior) com imagens dos pontos de sutura



Figura 32: Coaptação adequada dos cotos

Tabela 7: Relação de grupos e extremidades coaptadas e não-coaptadas

Grupos	Total de animais	Extremidades nervosas coaptadas	Extremidades nervosas não-coaptadas
Grupo 1	10	0	10
Grupo 2	9	9	0
Grupo 3	9	4	5
Grupo 4	10	7	3

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O rato foi usado como modelo animal nesse trabalho devido a seu uso frequente na literatura (11, 205) por apresentar anatomia e mecanismo de regeneração nervosa periférica semelhante à do homem, ser de pequeno porte, fácil manuseio e acomodação, e baixos custos para sua manutenção. Além disso, permite a análise de outros fatores como por exemplo, a avaliação da recuperação funcional do nervo ciático lesado através do “*walking track*”, metodologia estabelecida por De Medinacelli e modificada por Bain e cols. (205, 206), através do padrão da impressão da pegada desses animais.

Os animais escolhidos foram todos machos para evitar as variáveis dos ritmos hormonais que ocorrem com frequência nas fêmeas (207). A linhagem Wistar é bem conhecida biologicamente como animais resistentes, de fácil manejo e baixo custo de manutenção (208). A idade escolhida de sessenta dias de vida ocorreu na intenção de evitar a perda dos animais por doenças relacionadas ao envelhecimento, além de os aspectos envolvidos na reparação nervosa serem mais demorados com o avançar da idade (209, 210).

O tempo estabelecido de 4 semanas para o sacrifício dos animais se deu pelo fato de que esse tempo é suficiente para a regeneração do nervo (211). Nesse período, não há o risco de o nervo sofrer alterações biológicas decorrentes do envelhecimento, mantendo sua estrutura original.

O tamanho da amostra de $n = 10$ animais para cada grupo foi suficiente em termos probabilísticos, de acordo com a revisão da literatura, e porque o teste ocorreu em apenas um momento, ou seja, no final do experimento. Os dois óbitos ocorridos durante o trabalho deram-se por problemas técnicos, ou seja, a perda do animal por insuficiência cardiorrespiratória durante a anestesia. A anestesia utilizada, intraperitoneal de xilazina + quetamina foi descrita por Farrag (212).

A escolha do nervo ciático deu-se pelo fato de que seus vasos intraneurais são semelhantes aos dos nervos periféricos humanos. Além disso, é o maior nervo do corpo, facilmente acessível e possui rica vascularização e também porque o nervo ciático permite a análise de seu padrão de recuperação funcional, podendo-se comparar à melhor técnica quando ocorre a necessidade de reparo de defeito de tecido neural, embora haja relatos na literatura de lesões em membros inferiores decorrentes da utilização do nervo ciático como: autofagia das partes insensíveis, úlceras na pele (213) e dificuldade do animal manter-se em pé para se alimentar.

A escolha de 10 mm de secção de nervo ciático foi realizada de acordo com os limites descritos na literatura, ou seja, de que esta medida não deve ultrapassar os 10mm (7). As grandes distâncias entre os cotos nervosos resultam em maus resultados segundo relatos da literatura (214).

A utilização de dois pontos de sutura epineural em cada extremidade nervosa seccionada obedeceu a trabalhos realizados por Wang e cols. (215-217) e Foidart-Dessarte e cols. (214). O fio para sutura utilizado foi monofilamentar de náilon 8-0 com a finalidade de promover melhor adaptação da veia enxertada aos cotos nervosos. Outros autores relatam o emprego de três pontos de sutura (9, 218-221) ou quatro pontos (8, 222, 223).

A veia jugular externa foi escolhida devido às vantagens oferecidas pela mesma: maior diâmetro, não apresenta válvulas, seu comprimento é suficiente para a tubulização e evita grande agressão tissular à pata do rato (se a veia femural fosse usada, seriam necessárias duas incisões - uma para abordar o nervo e outra para abordar a veia). Além disso, o seu acesso cirúrgico é fácil e sua morbidade é baixa (216, 224). O uso de segmentos arteriais, com a artéria aorta, normal e ao avesso, foram relatados por Rodrigues e Silva (225). Barcelos e cols. (209) relataram o uso de veia jugular externa ao avesso e de artéria aorta abdominal

heteróloga usada ao avesso, enquanto Tos e cols. (222) relataram a utilização de veia epigástrica com resultados estatísticos semelhantes.

Nas lesões de nervos periféricos com perda de substância, quando a extensão do defeito impede a reparação direta dos cotos, a opção de tratamento é a auto-enxertia (32). Alguns fatores, porém, devem ser levados em consideração: a necessidade da retirada de tecido autólogo sempre produz morbidade da área doadora; há a necessidade da retirada de extensa quantidade de tecido autógeno para reparo de grandes lesões, indisponíveis às vezes; o uso de materiais artificiais dispensa tempo necessário para a retirada do auto-enxerto e os resultados obtidos com o uso do auto-enxerto podem não ser inteiramente satisfatórios (226).

Vários são os métodos propostos para a reparação de nervos periféricos lesados. Entre eles cita-se a tubulização, ou seja, a introdução das extremidades distal e proximal de um nervo lesado dentro de uma estrutura tubular, que pode ou não conter substâncias que promovam a regeneração axonal. Porém, o enxerto convencional de nervo é ainda o método mais eficiente e praticado pelos cirurgiões (197).

A interposição de condutores tubulares como uma ponte entre os cotos nervosos lesados tem apresentado bons resultados. Quando usados em correções de pequenos defeitos, em que a distância entre os cotos é curta, ou seja, não suficiente para permitir a atração quimiotática e quimiotrófica exercida pelo coto distal na região do crescimento axonal, os resultados obtidos são semelhantes aos do auto-enxerto (11, 32, 227). O tubo pode ser o encapamento do nervo com lâmina flexível ou uma estrutura tubular pré-moldada, de vários materiais, biológicos ou não biológicos(198).

A técnica do uso de tubos condutores oferece vantagens teóricas adicionais sobre os métodos tradicionais de enxertia: proporciona boa coaptação dos dois cotos, menor trauma na manipulação, permite melhor confinamento das fibras em crescimento dentro do tubo, isola o local de reparo em torno da resposta inflamatória circundante, orienta o crescimento das fibras

para o coto distal, possibilitando a concentração de fatores neurotróficos locais, reduz a formação de neuromas e o escape de fibras para fora do condutor e permite a veiculação de substâncias potencializadoras da regeneração (228).

O tubo ideal deve ser de material de baixo custo, inerte biologicamente, portanto biocompatível, fino e flexível, translúcido, bioabsorvível, inibidor dos processos inflamatórios como fibrose, glioma, neuroma, edema, isquemia e aderência, e facilitador dos processos que contribuem para a regeneração, os acumuladores dos fatores que promovem o crescimento do nervo (197, 198). Vários materiais têm sido utilizados para a construção dos tubos que podem ser absorvíveis ou não-absorvíveis (11, 229).

É necessária a flexibilidade do tubo para proteger a regeneração do nervo lesado quando da mobilização da parte lesada. Uma vez re-absorvíveis, os tubos devem permanecer sem degradação, durante o período necessário para que os axônios cresçam e alcancem o coto distal (195).

O enxerto venoso pode ser usado como tubo condutor, uma vez que a veia autógena preenche muitos dos critérios necessários para um tubo ideal, conforme descrito acima. É de amplo acesso no corpo humano, inerte imunologicamente, evitando sequelas nas zonas doadoras de nervos e com menor fibrose local (199). É um tubo fino, flexível e de permeabilidade seletiva, que permite a troca osmótica das substâncias fundamentais à regeneração nervosa, impedindo a formação de tecido cicatricial entre as extremidades nervosas (Allet et al, 2003). As desvantagens de seu uso são: o colapso da luz levando ao bloqueio do crescimento das fibras nervosas e o limite do comprimento do tubo que influencia na capacidade de crescimento axonal (197, 198).

Estudos realizados por Weis, em 1943, utilizando enxertos venosos em modelos experimentais, indicou que não deve haver tensão na sutura realizada entre os cotos nervosos

reparados cirurgicamente devido ao fato que esse fator contribuiria para que as fibras mantivessem sua orientação longitudinal .

Em 1975, Terzis e cols. demonstraram que a tensão sobre a sutura neural causa efeito deletério. Neste trabalho, foram tomados os cuidados necessários para que não houvesse tensão nos locais de sutura nervosa (4).

Estudos realizados (4) relatam vantagens com o uso da veia invertida (de dentro para fora) quando comparada aos enxertos venosos tradicionais e ao auto-enxerto. Mostrou-se que o colágeno e a lamina existentes na camada adventícia e média das veias, respectivamente, promoveriam a regeneração nervosa, e, uma vez invertida a orientação normal da veia, os axônios ficariam expostos a essas substâncias. Esse fator foi decisivo na realização do nosso trabalho, embora não tivéssemos meios de detectar essas substâncias nas camadas das veias utilizadas.

Para o sucesso da reparação do nervo periférico lesado, deve haver um "micro ambiente" propício à regeneração, encontrado no momento da lesão nervosa e composto por fatores como as células de Schwann, fibroblastos perineurais, componentes da matriz extracelular e fatores neurotróficos (11, 109, 198, 211). Assim, o uso de substâncias associadas aos tubos condutores demonstra ter um relevante papel no desenvolvimento de melhores resultados funcionais após a lesão de um nervo periférico.

Em 1994, Brunelli e cols. realizaram estudo onde o condutor venoso foi preenchido com músculo fresco autógeno e demonstraram resultados com qualidade superior àqueles obtidos em distâncias duas vezes mais longas do que os condutos preenchidos por axônios em tubos vazios.

O uso de vaso preservado em glicerol foi relatado em estudo realizado por Cunha e cols, em 2007, apresentando bons resultados (200).

Outras substâncias têm sido utilizadas no interior de tubos condutores, como imunossupressores, músculos e outros. Neste trabalho, foi utilizado o PRP, revelando bons resultados, embora não superiores ao auto-enxerto.

Jenq e Coggehall (230), Doolabh e cols (231) e Foidart-Dessalle e cols (214) realizaram estudos semelhantes, com os mesmos resultados para os tubos preenchidos com substâncias estimuladoras da regeneração nervosa.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Aspectos macroscópicos

A dificuldade na marcha é um achado macroscópico encontrado em todos os estudos onde há lesão nervosa periférica, revelando a efetiva falta de comunicação entre os cotos nervosos seccionados.

Guda Heidjke e cols (223) e Di Benedetto e cols (220) relatam a ocorrência de dificuldade na marcha e auto-mutilação nos animais submetidos a secção de nervo com reparação através da tubulização com veia, cessados no decorrer próximo da 4ª semana pós – operatório, embora não ocorrendo em todos os animais.

No estudo realizado, houve registro da análise da marcha para avaliação posterior, notando-se melhora gradual da marcha nos grupos 2, 3 e 4. No grupo 1, a marcha permaneceu alterada – com paralisia da pata operada - por todo o período do estudo.

A autofagia de partes onde toda a pata operada não ocorreu em todos os grupos, sendo predominante nos animais do grupo 3, onde foi usado a veia ao avesso sem preenchimento. A automutilação evidencia deservação, especialmente na área sensitiva. Não foi realizada análise estatística desses achados, porém os dados foram guardados para estudos futuros.

DISCUSSÃO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS

A análise histológica das lâminas revelou que a coaptação dos bordos foi superior no grupo 2, onde foi realizada somente a sutura entre as extremidades nervosas seccionadas. No grupo 3, onde foi utilizada a veia ao avesso, sem preenchimento, a coaptação ocorreu em menor número, porém ficou evidente que a veia funciona como tubo condutor. Entretanto, quando não utilizado preenchimento com substâncias estimulantes da regeneração, a veia cola???? e impede a orientação dos cotos e a regeneração nervosa. No grupo 4, foi utilizado o PRP como preenchimento da veia condutora, obtendo-se bons resultados quando comparados à veia vazia. A diferença de todos os grupos em relação ao grupo 1 onde nenhum tipo de tratamento foi empregado, foi estatisticamente significativa, já que em nenhum caso foi observada a coaptação das extremidades nervosas. Esses resultados são compatíveis com os estudos encontrados na literatura.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Através do modelo experimental utilizado e o tipo de lesão em nervo periférico provocada, concluímos que:

1. O resultado com auto-enxerto associado à sutura epineural em dois pontos de cada extremidade apresentaram-se superiores aos do uso de veia ao avesso preenchidas com PRP.
2. O PRP induz a regeneração de nervo periférico lesado.
3. As veias funcionam como tubos de condução.
4. O grupo que utilizou veias ao avesso preenchidas com PRP apresentou resultados superiores ao grupo que utilizou veia ao avesso vazia.
5. As perspectivas para o uso do PRP em tubos de condução – biológicos ou sintéticos- são muito boas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sunderland S. Nerves and nerves injuries. 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1978.
2. Pachioni CAS, Mazzer N, Barbieri CH, Fazan VPS, Padovani CR, Moro CA, et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2006;14:203-7.
3. Colohan AR, Pitts LH, Rosegay H. Injury to the peripheral nerves. In: Feliciano DV, Moore EE, Mattox KL, editors. *Trauma*. 3rd ed. Stamford, Conn: Appleton & Lange; 1996. p. 853-62.
4. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg*. 1975 Aug;56(2):166-70.
5. Babcock WW. Standard technique for operation of peripheral nerve with especial reference for closure of large gaps. *Surg Gynecol Obst*. 1927;45:364-78.
6. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2000 May;25(3):391-414.
7. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH. Use of a skeletal muscle basal membrane graft to treat segmentary nerve lesions experimental study in the sciatic nerve of rats: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MICROCIRURGIA E CIRURGIA DE MÃO, 5., Botucatu. *Anais Botucatu*; 2000.
8. Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler MM. Nerve regeneration through an epineurial sheath: its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery*. 2001;21(5):196-201.
9. Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India*. 2002 Mar;50(1):23-6.
10. Rummler LS, Gupta R. Peripheral nerve repair: a review. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2004;15(4):215-9.
11. Costa MP, Cunha AdS, Silva CFd, Barros Filho TEP, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2006;14:25-9.
12. Lee JM, Tos P, Raimondo S, Fornaro M, Papalia I, Geuna S, et al. Lack of topographic specificity in nerve fiber regeneration of rat forelimb mixed nerves. *Neuroscience*. 2007 Feb 9;144(3):985-90.
13. Wang YL, Wang DZ, Nie X, Lei DL, Liu YP, Zhang YJ, et al. The role of bone morphogenetic protein-2 in vivo in regeneration of peripheral nerves. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Apr;45(3):197-202.

14. Braga-Silva J, Gehlen D, Roman JA, Menta C, Atkinson EdA, Machado DC, et al. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2006;14:273-5.
15. Hupp JR. *Neuropatologia Facial. Cirurgia Maxilofacial Contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 678-391.
16. Junqueira LCU. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
17. Butler DS. *Mobilização do sistema nervoso*. São Paulo: Manole; 2003.
18. Umphred DA. *Reabilitação neurológica*. 4ª ed. São Paulo: Manole; 2004.
19. Marrero RCM. *Biomecânica clínica del aparato locomotor*. Barcelona: Masson; 2000.
20. Nordin M, Frankel VH. *Biomecânica básica do sistema musculoesquelético*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
21. Sunderland S, Bradley KC. The cross-sectional area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibers. *Brain*. 1949 Sep;72(3):428-49.
22. Lundborg G. *Nerve injury and repair*. Edinburgh and New York: Churchill Livingstone; 1988.
23. Myers RR, Rydevik BL, Heckman HM, Powell HC. Proximodistal gradient in endoneurial fluid pressure. *Exp Neurol*. 1988 Dec;102(3):368-70.
24. Smith MS, Browne JD. The effect of endothelial cell growth factor on peripheral nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Feb;118(2):178-82.
25. Breig A. *Adverse mechanical tension in the central nervous system: An analysis of cause and effect : relief by functional neurosurgery*. Stockholm and New York: Almqvist & Wiksell International; 1976.
26. Simionescu M, Ghinea N, Fixman A, Lasser M, Kukes L, Simionescu N, et al. The cerebral microvasculature of the rat: structure and luminal surface properties during early development. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1988 Apr;20(2):243-61.
27. Staehelin LA. Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes in vitro. *J Cell Biol*. 1976 Oct;71(1):136-58.
28. Miller WL, Burnett JC, Jr. *Blood vessel physiology and pathophysiology*. *Rheum Dis Clin North Am*. 1990 May;16(2):251-60.
29. Mecham RP. Laminin receptors. *Annu Rev Cell Biol*. 1991;7:71-91.

30. Walker-Caprioglio HM, Trotter JA, Mercure J, Little SA, McGuffee LJ. Organization of rat mesenteric artery after removal of cells of extracellular matrix components. *Cell Tissue Res.* 1991 Apr;264(1):63-77.
31. Terzis JK, Daniel RK, Williams HB, Spencer PS. Benign fatty tumors of the peripheral nerves. *Ann Plast Surg.* 1978 Mar;1(2):193-216.
32. Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery.* 1994;15(3):176-8.
33. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
34. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
35. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993 Mar;7(1):52-62.
36. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan-Feb;18(1):15-22.
37. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006 Jun;38(2):174-87.
38. Blockmans D, Deckmyn H, Vermynen J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995 Sep;9(3):143-56.
39. Carmona JU, Argüelles D, Climent F, Prades M. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study. 2007;27(4):167-70.
40. Kubota S, Kawata K, Yanagita T, Doi H, Kitoh T, Takigawa M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *J Biochem.* 2004 Sep;136(3):279-82.
41. Weibrich G, Buch RS, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors.* 2002 Jun;20(2):93-7.
42. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 1989 Sep;16(8):545-8.
43. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):529-35.

44. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
45. Ravel R. *Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados laboratoriais.* 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
46. Marx RE, Garg AK. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. *The Sinus Bone Graft.* 1ª ed. Colorado: Quintessence Books; 1999.
47. Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I--Background and processing techniques. *J Oral Implantol.* 2001;27(1):38-42.
48. Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Nov;62(11):1403-7.
49. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol.* 2004 Mar;36(1):28-35.
50. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294-9.
51. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Nov-Dec;15(6):879-82.
52. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
53. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):300-6.
54. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 May;62(5):555-8.
55. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol.* 2002 Feb;73(2):198-205.
56. Goldenberg S. *Descomplicando a fisiologia. Tratado de fisiologia médica.* 8ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p. 61-5.
57. Zucker-Franklin D. *Atlas of blood cells: function and pathology.* 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.

58. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991 Nov;62(11):710-6.
59. Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol.* 1992 Jun;140(6):1375-88.
60. Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1998 May;25(5):404-12.
61. Chai Y, Bringas P, Jr., Mogharei A, Shuler CF, Slavkin HC. PDGF-A and PDGFR-alpha regulate tooth formation via autocrine mechanism during mandibular morphogenesis in vitro. *Dev Dyn.* 1998 Dec;213(4):500-11.
62. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol.* 1995 Jun;66(6):522-30.
63. Panagakos FS. Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *Biochimie.* 1993;75(11):991-4.
64. Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ, Jr., Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol.* 1994 May;65(5):429-36.
65. Matsuda N, Takemura A, Taniguchi S, Amano A, Shizukuishi S. *Porphyromonas gingivalis* reduces mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to platelet-derived growth factor in vitro. *J Periodontol.* 1996 Dec;67(12):1335-41.
66. Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest.* 1980 Oct;66(4):709-19.
67. Ganio C, Tenewitz FE, Wilson RC, Moyles BG. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors. *J Foot Ankle Surg.* 1993 May-Jun;32(3):263-8.
68. Holilinger JO, Buck DC, Burder SP. Biology of bone healing: its impact on clinic therapy. *Tissue Engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics*: Ed. Quintessence Books; 1999. p. 17-53.
69. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1998 Oct;283:2-37.
70. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide levels of insulin-like growth factor I in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology.* 1989 Mar;124(3):1247-53.

71. Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res.* 1996 Jul;31(5):301-12.
72. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 1997 Dec;68(12):1186-93.
73. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol.* 1998 Feb;69(2):129-37.
74. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.* 1988 Jan;122(1):254-60.
75. Giannobile WV. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factor and gene transfer. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, editors. *Tissue engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Carol Stream: Quintessence; 1999. p. 231-44.
76. Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, Sioussat TM. Treatment of Peri-Implant Defects With Combination Growth Factor Cement. *Journal of Periodontology.* 2000;71(1):8-13.
77. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol.* 1994 Dec;65(12):1158-68.
78. Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Silva Jr OC. Regeneração Hepática - Algumas Definições num Universo de Incertezas. *Acta Cir Brasil.* 1993;8(4):177-89.
79. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):60-6.
80. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001 Aug;13(6):487-93; quiz -93.
81. Whitman DH, Berry RL. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Oct;56(10):1217-8.
82. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002 Feb;18(1):27-33.
83. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion.* 2004 Jul;44(7):1013-8.
84. Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang L. Chemotactic and mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet rich plasma suggests a mechanism for

enhancement of bone repair. Dallas, TX: 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society; 2002.

85. Henderson JL, Cupp CL, Ross EV, Shick PC, Keefe MA, Wester DC, et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J.* 2003 Aug;82(8):598-602.
86. Halegoua S, Armstrong RC, Kremer NE. Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;165:119-70.
87. da Silva C. *Biologia Celular e Molecular da Regeneração do Sistema Nervoso Periférico. Atualização em Neurociências.* 1995;1(3):1-16.
88. Walsh G. Nervous excitement over neurotrophic factors. *Biotechnology (N Y).* 1995 Nov;13(11):1167-71.
89. Yuen EC, Mobley WC. Therapeutic applications of neurotrophic factors in disorders of motor neurons and peripheral nerves. *Mol Med Today.* 1995 Sep;1(6):278-86.
90. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999 Jan;194 (Pt 1):1-14.
91. Richardson RS, Leigh JS, Wagner PD, Noyszewski EA. Cellular PO₂ as a determinant of maximal mitochondrial O₂ consumption in trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1999 Jul;87(1):325-31.
92. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raaff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula.* 3^a ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
93. Martins SF, Fonseca RA, Silva LO, Tsung FS, Mori WB, Deng SZ, et al. Three-dimensional wakes driven by intense relativistic beams in gas targets. *IEEE Transactions on Plasma Science.* 2005;33:558.
94. Blottner D, Baumgarten HG. Neurotrophs and regeneration in vivo. *Acta Anat (Basel).* 1994;150(4):235-45.
95. Acheson A, Lindsay RM. Non target-derived roles of the neurotrophins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Mar 29;351(1338):417-22.
96. Mendell LM, Munson JB, Arvanian VL. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *J Physiol.* 2001 May 15;533(Pt 1):91-7.
97. Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol.* 1987 Jun;104(6):1623-31.
98. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 1992 Oct;119(1):45-54.

99. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1993 Oct;123(2):455-65.
100. Martinelli PM, Camargos ER, Morel G, Tavares CA, Nagib PR, Machado CR. Rat heart GDNF: effect of chemical sympathectomy. *Histochem Cell Biol.* 2002 Oct;118(4):337-43.
101. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol.* 2003 Jun;27(3):277-324.
102. Fenrich K, Gordon T. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *Can J Neurol Sci.* 2004 May;31(2):142-56.
103. Hom DB, Maisel RH. Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992 Apr;101(4):349-54.
104. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Apr;4(4):299-309.
105. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002 May;3(5):383-94.
106. Ibanez CF. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 1998 Oct;21(10):438-44.
107. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1217-81.
108. Aloe L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol.* 2004 Jul;14(7):395-9.
109. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53.
110. Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.* 1991 Nov;7(5):857-66.
111. Hallbook F, Ibanez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 1991 May;6(5):845-58.
112. Date I, Furukawa S, Ohmoto T. Increased nerve growth factor level in the distal stump of transected sciatic nerve in relation to aging and its application for neural grafting. *Exp Neurol.* 1994 Nov;130(1):168-71.

113. Brown MC, Booth CM, Lunn ER, Perry VH. Delayed response to denervation in muscles of C57BL/Ola mice. *Neuroscience*. 1991;43(1):279-83.
114. Brown MC, Perry VH, Lunn ER, Gordon S, Heumann R. Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. *Neuron*. 1991 Mar;6(3):359-70.
115. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*. 1995 Feb;18(2):83-8.
116. Otten U, Gadiant RA. Neurotrophins and cytokines--intermediaries between the immune and nervous systems. *Int J Dev Neurosci*. 1995 Jun-Jul;13(3-4):147-51.
117. Hudson-Goodman P, Girard N, Jones MB. Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart Lung*. 1990 Jul;19(4):379-84.
118. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest*. 1985 Dec;76(6):2323-9.
119. Friedman B, Wong V, Lindsay RM. Review : Axons, Schwann Cells, and Neurotrophic Factors. *The Neuroscientist*. 1995 July 1, 1995;1(4):192-9.
120. Murray B, Lynch T, Farrell M. Clinicopathological features of the tauopathies. *Biochem Soc Trans*. 2005 Aug;33(Pt 4):595-9.
121. Luce EA, Griffen WO. Shotgun injuries of the upper extremity. *J Trauma*. 1978 Jul;18(7):487-92.
122. Ristic S, Strauch RJ, Rosenwasser MP. The assessment and treatment of nerve dysfunction after trauma around the elbow. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Jan(370):138-53.
123. Greenfield LJ. *Surgery: Scientific Principles and Practice*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997.
124. Adams JH, Duchen LW. *Greenfield's Neuropathology*. 5th ed. New York, NY: Oxford University Press; 1992.
125. Tatagiba M, Mazzer N, Aguiar PHP, Pereira CU. *Nervos Periféricos: Diagnóstico e Tratamento Clínico e Cirúrgico: Revinte*; 2003.
126. Kline DG, Nulsen FE. Acute injuries of peripheral nerve. In: Youmans JR, editor. *Neurological Surgery*. 2^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1982. p. 2363-429.
127. Grant DS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS*. 1997;79:317-33.
128. Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery*. 1999 Apr;44(4):825-39; discussion 39-40.

129. Basbaum CB. Induced hypothermia in peripheral nerve: electron microscopic and electrophysiological observations. *J Neurocytol.* 1973 Jun;2(2):171-87.
130. Nukada H, Pollock M, Allpress S. Experimental cold injury to peripheral nerve. *Brain.* 1981 Dec;104(Pt 4):779-811.
131. Seedon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943 December 1, 1943;66(4):237-88.
132. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain.* 1951 Dec;74(4):491-516.
133. Ferreira AS. Lesões nervosas periféricas: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Santos; 1998.
134. Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TdPA. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac.* 2003;3(2):49-54.
135. Mattar Jr R, Azze RJ. Lesões dos nervos periféricos. Atualização em traumatologia do aparelho locomotor. São Paulo: Departamento de ortopedia e traumatologia, Faculdade de Medicina, USP; 2008.
136. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortopédica Brasileira.* 2006;14:220-5.
137. Rodkey WG, Sharp NJH. Cirurgia do Sistema Nervoso Periférico. In: Slatter D, editor. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais.* 3ª ed. São Paulo: Manolle; 2007. p. 1218-26.
138. Lopes VJX, Silveira MJM. Sistema Nervoso. *Biologia num contexto social.* Santa Maria: Imprensa Universitária; 1993. p. 141-62.
139. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000 Jul-Aug;8(4):243-52.
140. Rosseto M, Fagundes DJ, Taha MO, Souza HSd, Aydos RD, Guimarães RB, et al. Regeneração de nervo periférico após anastomose término-lateral, com manutenção do epineuro, em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2001;16:155-9.
141. Lent R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu; 2005.
142. Lent R, Uziel D, Furtado AD. Neurônios. *Células Uma Abordagem Multidisciplinar.* São Paulo: Ed. Manole; 2005. p. 226-77.
143. May M, Beery Q. Muscle-nerve pedicle laryngeal reinnervation. *Laryngoscope.* 1986 Nov;96(11):1196-200.

144. Bontioti EN, Kanje M, Dahlin LB. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003 Sep;8(3):159-68.
145. Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol.* 2000 Oct-Nov;19(3):312-8.
146. Bixby JL, Jhabvala P. Extracellular matrix molecules and cell adhesion molecules induce neurites through different mechanisms. *J Cell Biol.* 1990 Dec;111(6 Pt 1):2725-32.
147. Chan YM, Yick LW, Yip HK, So KF, Oppenheim RW, Wu W. Inhibition of caspases promotes long-term survival and reinnervation by axotomized spinal motoneurons of denervated muscle in newborn rats. *Exp Neurol.* 2003 Jun;181(2):190-203.
148. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003 Dec;8(4):236-50.
149. Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional.* 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 1998.
150. Lacanna SN, Prandini MN, Pereiro JR, Moraes RF. Entubulation of sciatic nerve of rats with poly-l lactide-co p lactide. *J Bras Neurocirurgia* 2008;19(3):37-40.
151. Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* 1999 Apr;9(2):313-25.
152. Gorio A, Carmignoto G, Finesso M, Polato P, Nunzi MG. Muscle reinnervation--II. Sprouting, synapse formation and repression. *Neuroscience.* 1983 Mar;8(3):403-16.
153. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987 Apr;58(2):145-69.
154. Siqueira R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. *RevNeurocienc.* 2007;15(3):226-33.
155. Engh CA, Schofield BH. A review of the central response to peripheral nerve injury and its significance in nerve regeneration. *J Neurosurg.* 1972 Aug;37(2):195-203.
156. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 1989 Oct;18(5):671-83.
157. Tashiro T, Komiya Y. Changes in organization and axonal transport of cytoskeletal proteins during regeneration. *J Neurochem.* 1991 May;56(5):1557-63.
158. Avellino AM, Dailey AT, Harlan JM, Sharar SR, Winn RK, McNutt LD, et al. Blocking of up-regulated ICAM-1 does not prevent macrophage infiltration during Wallerian degeneration of peripheral nerve. *Exp Neurol.* 2004 Jun;187(2):430-44.
159. Midha R, Mackay M. Principles of nerve regeneration and surgical repair. *Semin Neurosurg.* 2001;12:81-93.

160. Pierucci A, Duek EA, de Oliveira AL. Expression of basal lamina components by Schwann cells cultured on poly(lactic acid) (PLLA) and poly(caprolactone) (PCL) membranes. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Feb;20(2):489-95.
161. Liuzzi FJ, Tedeschi B. Peripheral nerve regeneration. *Neurosurg Clin N Am.* 1991 Jan;2(1):31-42.
162. Torigoe K, Tanaka HF, Takahashi A, Awaya A, Hashimoto K. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 1996 Feb;137(2):301-8.
163. Davis L, Cleveland DA. Experimental Studies in Nerve Transplants. *Ann Surg.* 1934 Feb;99(2):271-83.
164. Dourado E, Dias E, Caubi AF, Lago C, Cauás M. Neurorrafia de Nervos Periféricos com Adesivo Biológico. *Rev de Cir Buco-maxilofacial.* 2001;1(1):41-5.
165. Novak CB, Mackinnon SE, Williams JI, Kelly L. Establishment of reliability in the evaluation of hand sensibility. *Plast Reconstr Surg.* 1993 Aug;92(2):311-22.
166. Novak CB, Mackinnon SE, Baratz ME. Peripheral Nerves Injuries. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(7):1802-14 and discussion -15-17.
167. Edshage S. Peripheral Nerve Suture. A Technique for Improved Intraneural Topography. Evaluation of Some Suture Materials. *Acta Chir Scand Suppl.* 1964;15:SUPPL 331:1+.
168. Rodrigues FF. Traumatismo dos Nervos periféricos. Aspectos Cirúrgicos. *Rev Eras Neural.* 1990;26:90-116.
169. Socolovsky M, Masi GD, Campero A. Conceptos actuales en la cirugía de los nervios periféricos parte III: ¿Cuándo se debe operar un nervio lesionado? *Rev Argent Neuroc, Buenos Aires.* 2007;21(2):71-6.
170. Orsini M, Mello MPd, Maron EG, Botelho JP, Santos VVd, Nascimento OJ, et al. Reabilitação motora na plexopatia braquial traumática: relato de caso. *Rev Neurocienc.* 2008;16(2):157-61.
171. Hems TE, Glasby MA. Repair of cervical nerve roots proximal to the root ganglia. An experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br.* 1992 Nov;74(6):918-22.
172. Hems TE, Glasby MA. Comparison of different methods of repair of long peripheral nerve defects: an experimental study. *Br J Plast Surg.* 1992 Oct;45(7):497-502.
173. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 1997 Jan-Mar;5(1):12-7.
174. Goffi FS. *Técnica Cirúrgica: Bases Anatômicas, Fisiopatológicas e Técnicas da Cirurgia.* Rio de Janeiro: Atheneu; 1978.

175. Urbaniak JR. Fascicular nerve suture. *Clin Orthop Relat Res.* 1982 Mar(163):57-64.
176. Sawamura Y, Abe H. Hypoglossal-facial nerve side-to-end anastomosis for preservation of hypoglossal function: results of delayed treatment with a new technique. *J Neurosurg.* 1997 Feb;86(2):203-6.
177. Silva-Neto JC. Estudo clínico e histopatológico do uso de gangliosídeos na regeneração nervosa em ratos após axonotmesis: Faculdade de Odontologia de Pernambuco, Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (Dissertação de Mestrado); 2003.
178. Tupper JW, Crick JC, Matteck LR. Fascicular nerve repairs. A comparative study of epineurial and fascicular (perineurial) techniques. *Orthop Clin North Am.* 1988 Jan;19(1):57-69.
179. Bora FW, Jr. Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch. *J Bone Joint Surg Am.* 1967 Jun;49(4):659-66.
180. Crumley RL. Interfascicular nerve repair. Is it applicable in facial injuries? *Arch Otolaryngol.* 1980 Jun;106(6):313-6.
181. Grabb WC, Bement SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg.* 1970 Jul;46(1):31-8.
182. Levinthal R, Brown WJ, Rand RW. Comparison of fascicular, interfascicular and epineurial suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J Neurosurg.* 1977 Nov;47(5):744-50.
183. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 20;25(33):5194-202.
184. Paula S, Pedroso MF, Dalbem A, Costa ZSM, Vitola A, Baes CVW, et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. *Scientia Medica.* 2005;15(4).
185. Huang YC, Huang YY. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artif Organs.* 2006 Jul;30(7):514-22.
186. Oliveira AR, Pierucci A, Pereira KdB. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. *Brazilian Journal of Morphological Sciences.* 2004;21:225-31.
187. Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron.* 1992 Aug;9(2):295-305.
188. Pinedo UG, Chávez Delgado E, López Dellamary F, Mora Galindo J, González Pérez O, Martínez Contreras A, et al. Utilización de prótesis de quitosana y silicona em La regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. *Archivos de Neurociências Mexicanas.* 2001;6(4):184-93.

189. Contesini EA. Avaliação clínico-morfológica da regeneração nervosa periférica mediante alinhamento por tubo de silicone em caninos. *Ciência Rural*. 1992;1:65-71.
190. Stopiglia ÂJ, Lainetti RD, Pires RS, da Silva CF. Avaliação morfométrica de fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1998;35:00-.
191. Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural*. 2008;38:2529-34.
192. Mello LR, Feltrin Y, Selbach R, Macedo G, Jr., Spautz C, Haas LJ. [Use of lyophilized cellulose in peripheral nerve lesions with loss of substance]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001 Jun;59(2-B):372-9.
193. Sandrini FAL, Pereira-Júnior ED, Gay-Escoda C. Anastomose do nervo facial de coelhos com cola de fibrina: estudo da velocidade de condução nervosa. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007;73:196-201.
194. Gibbels E. Morphometry of unmyelinated nerve fibers. *Clin Neuropathol*. 1989 Jul-Aug;8(4):179-87.
195. Gibson KL, Daniloff JK. Peripheral nerve repair. *The Compendium on Continuing Education for the Practitioner Veterinarian*. 1989;11:938-44.
196. Lundborg G, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1982 Jul;41(4):412-22.
197. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein, silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg*. 1995 Sep;35(3):266-71.
198. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol*. 1989;33(2):87-134.
199. Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*. 1982 Feb;91(2):226-33.
200. Cunha AdS, Lemos SPdS, Silva CFd, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. Utilização da veia glicerolada na regeneração neural: Estudo experimental em ratos. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2007;15:210-3.
201. Wolff KD, Walter G, Zimmer C. Nerve reconstruction with glycerol-preserved allogenic grafts in the rat. *Microsurgery*. 1993;14(5):315-22.

202. Torres MFP, Graça DL, Farias ELP. Reparação microcirúrgica de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de BioFill® em ratos Wistar. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2003;55:557-61.
203. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 3th ed. New York: Prentice-Hall; 1996.
204. Fisher RA. The comparison of samples with possibly unequal variances. *Ann Eugen*. 1939;9:174-80.
205. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995 May;58(1-2):29-37.
206. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989 Jan;83(1):129-38.
207. Fraher JP, O'Leary D, Moran MA, Cole M, King RH, Thomas PK. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. 1. Normal animals. *Acta Neuropathol*. 1990;79(4):364-74.
208. Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery*. 1993;14(2):135-40.
209. Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery*. 2003;23(1):66-71.
210. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20:28-34.
211. Politis MJ, Sternberger N, Ederle K, Spencer PS. Studies on the control of myelinogenesis. IV. Neuronal induction of Schwann cell myelin-specific protein synthesis during nerve fiber regeneration. *J Neurosci*. 1982 Sep;2(9):1252-66.
212. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope*. 2007 Jan;117(1):157-65.
213. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of peripheral nerve regeneration by an isolated nerve segment. *Ann Plast Surg*. 1986 Jun;16(6):494-501.
214. Foidart-Dessalle M, Dubuisson A, Lejeune A, Severyns A, Manassis Y, Delree P, et al. Sciatic nerve regeneration through venous or nervous grafts in the rat. *Exp Neurol*. 1997 Nov;148(1):236-46.
215. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16(2):65-70.
216. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Jones DS, Seckel BR. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1993;14(9):608-18.

217. Wang MS, Chen ZW, Zhang GJ, Chen ZR. Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery*. 1995;16(8):542-6.
218. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*. 1989 Mar;22(3):257-73.
219. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1994 Sep;10(5):345-54.
220. Di Benedetto G, Zura G, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Bertani A. Nerve regeneration through a combined autologous conduit (vein plus acellular muscle grafts). *Biomaterials*. 1998 Jan-Feb;19(1-3):173-81.
221. Nicolino S, Raimondo S, Tos P, Battiston B, Fornaro M, Geuna S, et al. Expression of alpha2a-2b neuregulin-1 is associated with early peripheral nerve repair along muscle-enriched tubes. *Neuroreport*. 2003 Aug 6;14(11):1541-5.
222. Tos P, Battiston B, Nicolino S, Raimondo S, Fornaro M, Lee JM, et al. Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. *Microsurgery*. 2007;27(1):48-55.
223. Heijke GC, Klopper PJ, Dutrieux RP. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. *Microsurgery*. 1993;14(9):584-8.
224. Ulkur E, Yuksel F, Acikel C, Okar I, Celikoz B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 2003;23(1):40-8.
225. Rodrigues AdC, Silva MDP. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery*. 2001;21(3):102-7.
226. Kitahara AK, Nishimura Y, Shimizu Y, Endo K. Facial nerve repair accomplished by the interposition of a collagen nerve guide. *J Neurosurg*. 2000 Jul;93(1):113-20.
227. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg*. 1988 Nov;82(5):849-56.
228. Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am*. 1972 Jun;54(4):727-50.
229. Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol*. 1985 Jun;88(3):767-72.
230. Jenq CB, Coggeshall RE. Permeable tubes increase the length of the gap that regenerating axons can span. *Brain Res*. 1987 Apr 7;408(1-2):239-42.
231. Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci*. 1996 Jan-Mar;7(1):47-84.

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

REPARO DE NERVO CIÁTICO DE RATO COM VEIA AO AVESSE (DE DENTRO PARA FORA) E PREENCHIDA COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS.

Marjeane Cristina Jaques Hockmuller¹, Vinícius Rosa de Castro², Marco Antônio Stefani³, Ápio Cláudio Martins Antunes⁴, Luiz Fernando N. Franciosi⁵, Gustavo Rassier Isolan⁶, Tiago Hochmuller Rodrigues⁷

¹Neurocirurgiã – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Mestrado Medicina: Ciências Cirúrgicas- UFRGS

²Acadêmico de Medicina – Universidade Luterana do Brasil

³Neurocirurgião- Professor de Anatomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Preceptor do Serviço de Neurocirurgia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴Neurocirurgião- Professor de Neurocirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Chefe do Serviço de Neurocirurgia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA

⁵Membro Titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica; Membro Titular da Sociedade Brasileira de Microcirurgia Reconstructiva; Chefe do Serviço de Microcirurgia do Hospital Cristo Redentor, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS; preceptor do Serviço de Residência Médica de Cirurgia Plástica do Hospital Ernesto Dornelles, Porto Alegre, RS.

⁶Neurocirurgião Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Professor Pós Graduação em Medicina :Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁷Acadêmico Fisioterapia da Universidade Federal de Santa Maria - RS

Correspondências: Dra Marjeane Hockmuller - Hospital de Clínicas de Porto Alegre- 2 ° Andar- Serviço de Neurocirurgia- Ramiro Barcelos, 2.350 - Bairro Santa Cecília -Porto Alegre / RS CEP 90035-903 -PABX (51) 3359.8000 - FAX (51) 3359.8001

RESUMO

As lesões de nervos periféricos são comuns, resultando em comprometimento motor, sensorial e autonômico. Nas lesões em que ocorre grande perda de tecido neural, a reparação através de sutura primária não é permitida, sendo a auto-enxertia de nervo o tratamento de escolha. A utilização de um enxerto venoso autólogo utilizado como tubo condutor entre os cotos nervosos lesados preenchidos com substâncias que estimulem a regeneração nervosa apresenta-se como uma técnica alternativa. O Plasma Rico em Plaquetas é um produto derivado do sangue autólogo por processo laboratorial, rico em fatores de crescimento originados dos grânulos α -plaquetários. O objetivo deste trabalho experimental foi estudar a influência do Plasma Rico em Plaquetas na regeneração do nervo periférico seccionado e reparado com veia ao avesso, em comparação ao uso da veia ao avesso vazia e à sutura direta das extremidades nervosas. A avaliação foi obtida com a interposição de veia jugular externa ao avesso vazia (Grupo 3) e preenchida com plasma rico em plaquetas (Grupo 4) em defeitos de 10 mm de nervo ciático de ratos Wistar, comparados à sutura direta (Grupo 2) das extremidades seccionadas, utilizando técnica histológica para identificação da coaptação ou não dos cotos nervosos. Os grupos 2 e 4 apresentaram coaptação dos cotos nervosos, concluindo-se que a veia ao avesso preenchida como Plasma Rico em Plaquetas é uma alternativa vantajosa no tratamento de lesões nervosas periféricas.

PALAVRAS -CHAVE: Nervos periféricos/cirurgia. Regeneração nervosa. Plasma rico em plaquetas / uso terapêutico. Veia ao avesso/uso terapêutico.

ABSTRACT

The peripheral nerve injuries are common, resulting in motor sensorial and autonomic impairment. . In lesions with heavy loss of neural tissue, repair by primary suture is not allowed, and the nerve autograft is the treatment chosen. The use of an autologous vein graft used as a conductor pipe between injured nerve stumps filled with substances stimulating nerve regeneration is presented as an alternative technique. The platelet-rich plasma is an autologous blood product for the laboratory process, rich in growth factors originated from α -granules of platelet. The aim of this survey was to study the influence of platelet rich plasma in the regeneration of peripheral nerve transected and repaired with a vein inside out, in comparison to the utilization of inside-out and empty vein and the direct suture of the nerve endings. The evaluation was obtained interposing a jugular inside-out empty vein (Group 3) and filled with platelet-rich plasma (Group 4) in 10mm-sciatic nerve defects in rats Wistar, compared to direct suture (Group 2) of divided ends, using histological technique for the identification of coaptation of nerve stumps or not. Groups 2 and 4 showed coaptation of the nerve stumps, concluding that the inside-out vein completed with platelet rich plasma is an attractive alternative in the treatment of peripheral nerve injuries.

KEYWORDS:Peripheral Nerves/surgery. Nerve regeneration. Platelet-rich plasma/therapeutic use. inside-out Vein / therapeutic use

INTRODUÇÃO

A reparação de nervos periféricos lesados através de técnicas microcirúrgicas que promovam a reabilitação das funções motoras e sensoriais continua sendo uma preocupação e um desafio aos cirurgiões (1, 2).

A recuperação após uma lesão nervosa raramente é completa apesar dos consideráveis avanços das técnicas cirúrgicas, já que inúmeros fatores influenciam na regeneração da fibra nervosa lesada, entre eles a natureza e o nível da lesão, o tempo da denervação, o tipo e o diâmetro da fibra nervosa lesada, variáveis individuais de cada paciente, como a idade, a técnica cirúrgica utilizada para o reparo nervoso e a probabilidade de recuperação funcional satisfatória (3, 4).

A destruição parcial de fibras nervosas pode ocorrer devido a traumas, tumores e iatrogenias (1). A finalidade das técnicas de reparação cirúrgica é o realinhamento das estruturas nervosas com o mínimo de trauma cirúrgico. O método clássico de reparo de nervo é a sutura direta dos cotos nervosos, porém, quando há grandes perdas de tecido neural, a sutura do nervo pode não ser possível sem uma tensão indevida (5), optando-se pela auto-enxertia (6, 7).

A necessidade de pontes conectando as extremidades proximais e distais é fonte de estudos realizados desde a metade do século XIX (8). A interposição de tubos condutores entre os cotos do nervo seccionado apresenta-se como uma boa alternativa

Materiais como vasos (9, 10), fásia (11), tubos plásticos, absorvíveis, de silicone e sintéticos (12-14) e músculo (15) têm sido utilizados para substituir o enxerto de nervo.

Várias substâncias têm sido usadas para avaliação de tratamento em lesões de nervos periféricos, como o FK506 (16, 17), o Plasma Rico em Plaquetas (Roque, 2007), GM1 (monossialotetraesossilgangliosídeo) (17).

O objetivo deste estudo é avaliar a coaptação dos cotos nervosos seccionados através da análise histopatológica após reparação com veia ao avesso e preenchida com Plasma Rico em Plaquetas em lesões de 5mm de nervo ciático de ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando 40 ratos da linhagem Wistar, todos machos, com 60 dias de vida e peso médio entre 250 e 300 gramas. Através de técnica microcirúrgica, foram seccionados 12 mm da veia jugular externa esquerda, criados defeitos de 10 mm de extensão em nervo ciático da pata direita e coletado 1 ml de sangue do plexo retroorbitário esquerdo para a confecção do plasma rico em plaquetas.

Os animais foram divididos em quatro grupos contendo 10 animais cada, de acordo com o tratamento empregado.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (10mg/Kg e 100 mg/Kg). O segmento de veia jugular externa esquerda foi obtido com tricotomia e assepsia da porção anterior cervical, incisão paramediana e segregação da veia jugular externa com ressecção de 12 mm de sua extensão. Depois da coleta, o enxerto de nervo foi canulado com sonda periodontal, virado ao avesso e mantido mergulhado em solução fisiológica 0,9% até o seu uso final. O nervo ciático lesado foi dissecado por incisão dorsal na pata direita, e seccionado em 10 mm de sua extensão. O sangue obtido para o preparo do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) foi coletado do plexo retrorbitário esquerdo, sob punção direta, em um volume de 1ml, em tubos contendo citrato de sódio a 10%. A seguir, os tubos foram levados para centrifugação durante 10 minutos a uma velocidade de 800 rpm, obtendo-se uma coleção formada por três camadas: camada superior - Plasma Pobre em Plaquetas, que foi aspirada com pipeta e desprezado; camada média - PRP, aspirado 0,5ml (totalidade), acrescido de 0,5 ml da camada inferior (células vermelhas do sangue). Imediatamente após, o volume obtido era introduzido no tubo de veia ao avesso já suturado em dois pontos de uma das extremidades nervosas e depois, realizada sutura em dois pontos da extremidade restante. Para as suturas, foi utilizado fio mononylon 8-0. Todos os animais foram submetidos à ressecção do segmento de 12 mm de veia jugular externa e realizada a coleta de sangue do plexo retrorbitário, ambos à esquerda, para que os grupos fossem uniformes.

No Grupo 1, foi seccionado 10 mm de nervo ciático direito, sem reparo entre as extremidades nervosas. No Grupo 2, o nervo ciático direito foi seccionado em 10 mm, e as extremidades nervosas foram suturadas em dois pontos no epineuro de cada coto com fio mononylon 8-0. No Grupo 3, houve a lesão de 10mm do nervo ciático direito e as extremidades nervosas foram suturadas com fio mononylon 8-0 em cada extremidade da veia jugular externa esquerda ao avesso (de dentro para fora).

No Grupo 4, foi interposta a veia jugular externa esquerda ao avesso, preenchida com 0,5ml de Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Primeiramente, foi suturada uma extremidade com dois pontos e, após o preenchimento com PRP, a outra extremidade recebeu a mesma sutura.

Os animais receberam água e comida *ad libitum* e sacrificados 4 semanas após o procedimento cirúrgico. Os cotos nervosos reparados foram coletados com identificação das regiões proximal e distal, mergulhados em solução de formaldeído 4% durante 24 horas. A seguir, a extremidade proximal de cada coto nervoso foi identificada com tinta nanquim preta e os espécimes submetidos ao processamento histológico de rotina, que consiste em banhos em soluções de concentração crescente de álcool para desidratação, seguido de diafanização, impregnação e inclusão na parafina. Os cortes de 4 micrômetros de espessura foram obtidos, corados pelo HE e analisados em microscópio Olympus Bx 41 para a avaliação da copatação das extremidades nervosas.

RESULTADOS

Dois óbitos ocorreram durante a realização do estudo devido à intercorrência anestésica (Grupo 2 e 3). Houve deiscência de ferida operatória da região cervical e da pata direita em animais dos grupos 2, 3 e 4 (G2= 1 animal; G2=4 animais e G4=4 animais.), com necessidade de reparo. A automutilação ocorreu em animais dos grupos 3 e 4 na primeira semana pós-operatória, que não resistiram depois deste período (Figuras 1,2 e 3).

Locais de automutilação

*

Figura 1

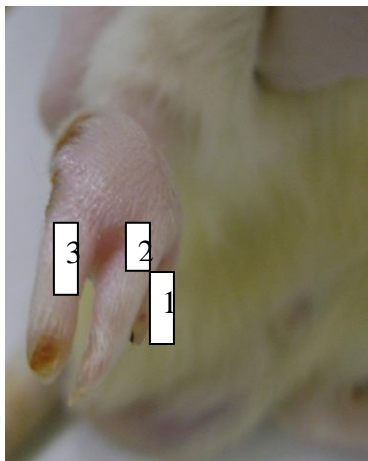
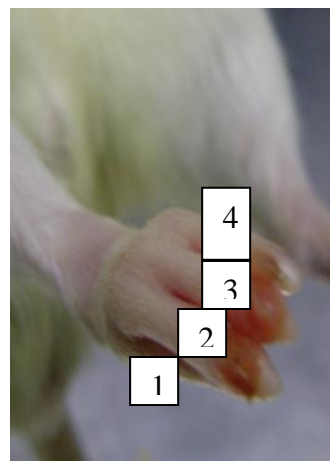


Figura 2



Figura 3



1- Dedo nº1* 2- Dedo nº 2* 3- Dedo nº3 * Dedo nº4

Ocorreu visível alteração da marcha devido à paresia provocada pela secção do nervo ciático, especialmente no período pós-operatório imediato e primeira semana após a cirurgia, notando-se melhora gradativa nos grupos 2 e 4 e, déficit motor mantido nos grupos 1 e 3. O teste de marcha foi realizado em todos os grupos no período pré-operatório e a cada semana pós-operatória, sendo os resultados armazenados em banco de dados para estudo posterior (Figura 4).

Figura 4: Teste de marcha em animal do G2



Figura 5

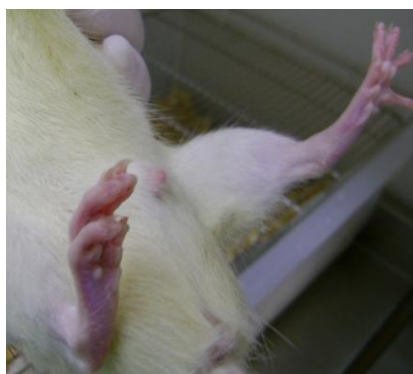


Figura 6

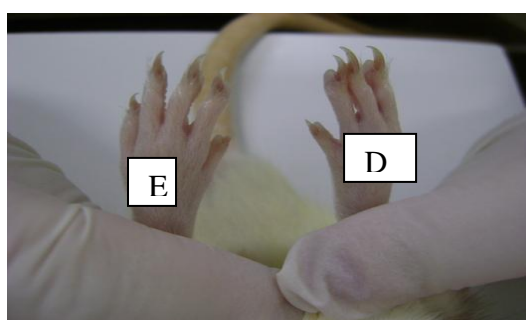
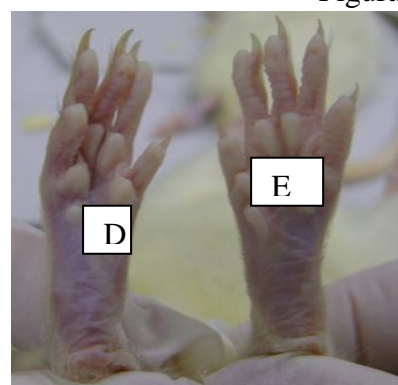


Figura 7

Figuras 5,6 e 7: atrofia da pata direita (operada) comparada a esquerda (não operada).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise das lâminas ao microscópio óptico sob aumento de até 40 x revelou a coaptação de todos os cotos do Grupo 2 (onde o reparo de 10 mm de nervo ciático seccionado deu-se com a sutura direta das extremidades) e de 7 das dez espécimes do Grupo 4 (onde o reparo do nervo ciático deu-se com veia ao avesso preenchida com PRP).

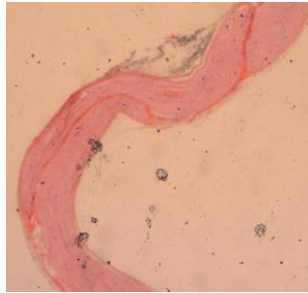


Imagem de nervo ciático normal, sob aumento de 40x, corado com HE.

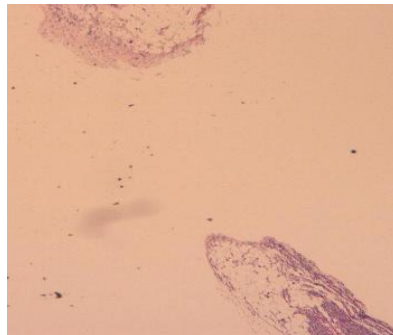


Imagem de nervo ciático do Grupo 1(secção do nervo sem reparo), onde não houve coaptação de nenhuma extremidade nervosa.

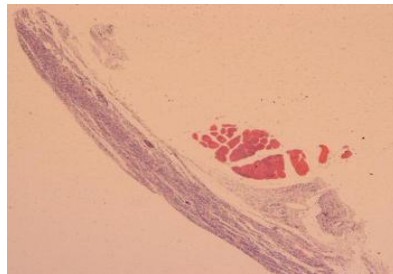


Imagem de nervo ciático do Grupo 2

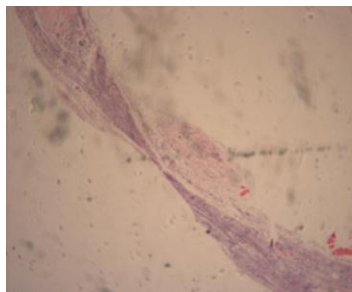


Imagem de nervo ciático reparado com veia ao avesso vazia (Grupo 3)

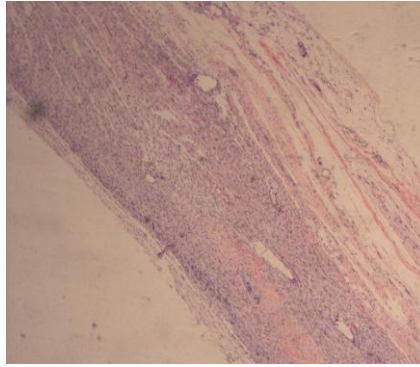
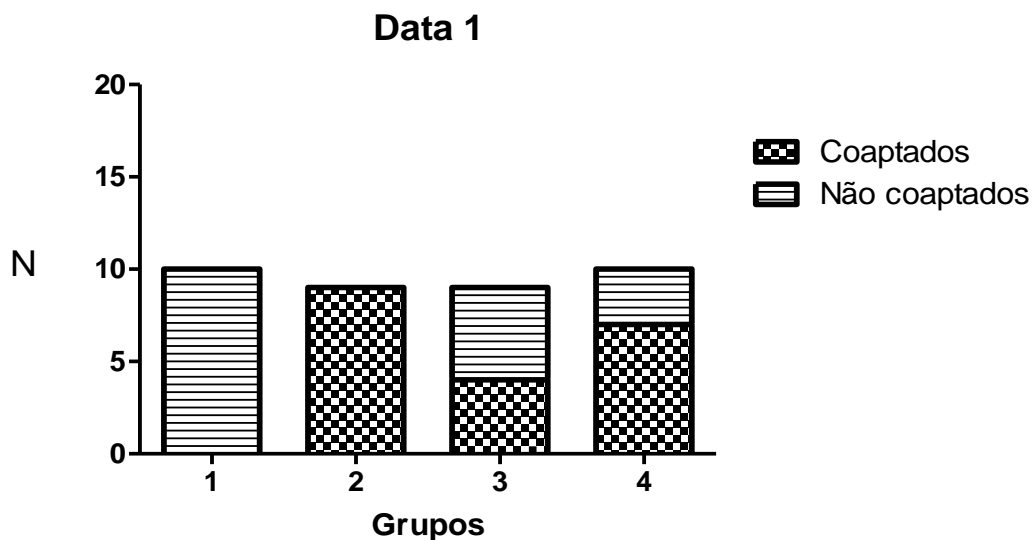


Imagem de nervo ciático reparado com veia ao avesso preenchida com PRP.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste qui-quadrado com independência, comparando-se os quatro grupos. Para identificar as diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste exato de Fisher (18, 19), adotando-se o nível de significância $< 0,05$.



N= número de casos

Grupos= grupos estudados

Resultados: Coaptados

Não coaptados

Na comparação entre grupos, houve diferença significativa entre o grupo 1 (secção) com grupo 2 ($P=0,009$), grupo 3 ($P=0,03$) e grupo 4 ($P=0,003$). Nas demais comparações, não houve diferença significativa ($P>0,05$).

DISCUSSÃO

O rato foi usado como modelo animal neste trabalho devido a seu uso ser frequente na literatura (17, 20), por apresentar anatomia e mecanismo de regeneração nervosa periférica semelhante à do homem, ser de pequeno porte, de fácil manuseio e acomodação e baixos custos para sua manutenção. Além disso, permite a análise de outros fatores como por exemplo, a avaliação da recuperação funcional do nervo ciático lesado através do “*walking track*”, metodologia estabelecida por De Medinacelli (20) e modificada por Bain e cols. (21), através do padrão da impressão da pegada desses animais.

Os animais escolhidos foram todos machos para evitar as variáveis dos ritmos hormonais que ocorrem com frequência nas fêmeas (22). A linhagem Wistar é bem conhecida biologicamente, como animais resistentes, de fácil manejo e baixo custo de manutenção (23). A idade escolhida de sessenta dias de vida ocorreu na intenção de evitar a perda dos animais por doenças relacionadas ao envelhecimento (24), além de os aspectos envolvidos na reparação nervosa serem mais demorados com o avançar da idade (25, 26).

O tempo estabelecido de 4 semanas para o sacrifício dos animais se deu pelo fato de que este tempo é suficiente para a regeneração do nervo (27). Nesse período, não há o risco de o nervo sofrer alterações biológicas decorrentes do envelhecimento, mantendo sua estrutura original.

O tamanho da amostra de $n=10$ animais para cada grupo foi suficiente em termos probabilísticos, de acordo com a revisão da literatura, e porque o teste ocorreu em apenas um momento, ou seja, no final do experimento. Os dois óbitos ocorridos durante o trabalho deram-se por problemas técnicos, ou seja, a perda do animal devido à insuficiência cardiorrespiratória durante a anestesia. A anestesia utilizada, intraperitoneal de xilazina + quetamina foi descrita por Farrag (28).

A escolha do nervo ciático deu-se ao fato de que os seus vasos intraneurais são semelhantes aos dos nervos periféricos humanos. Além disso, é o maior nervo do corpo, facilmente acessível e possui rica vascularização. Também, o nervo ciático permite a análise de seu padrão de recuperação funcional, podendo-se comparar a melhor técnica quando ocorre a necessidade de reparo de defeito de tecido neural, embora haja relatos na literatura de lesões em membros inferiores decorrentes da utilização do nervo ciático como: autofagia das partes insensíveis (24), úlceras na pele (29) e dificuldade do animal de se manter em pé para se alimentar.

A escolha de 10 mm de secção de nervo ciático foi realizada de acordo com os limites descritos na literatura, ou seja, de que esta medida não deve ultrapassar os 10mm (30). As grandes distâncias entre os cotos nervosos resultam em maus resultados segundo relatos da literatura (31).

A utilização de dois pontos de sutura epineural em cada extremidade nervosa seccionada obedeceu a trabalhos realizados por Wang e cols. (32-34) e Foidart-Dessalçe e cols. (31). O fio para sutura utilizado foi monofilamentar de nylon 8-0, com a finalidade de promover melhor adaptação da veia enxertada aos cotos nervosos. Outros autores relatam o emprego de três pontos de sutura (35-39) ou quatro pontos (40-42).

A veia jugular externa foi escolhida devido às vantagens oferecidas pela mesma: maior diâmetro, não apresenta válvulas, seu comprimento é suficiente para a tubulização e evita grande agressão tissular à pata do rato (se fosse usada a veia femural, seriam necessárias duas incisões - uma para abordar o nervo e outra para abordar a veia). Além disso, o seu acesso cirúrgico é fácil e sua morbidade é baixa (33, 43). O uso de segmentos arteriais, com a artéria aorta, normal e ao avesso, foi relatado por Rodrigues & Silva (44). Barcelos e cols. (2003) relataram o uso de veia jugular externa ao avesso e de artéria aorta abdominal heteróloga usada ao avesso (25), enquanto Tos e cols. (2007) relataram a utilização de veia epigástrica, com resultados estatísticos semelhantes (41).

Nas lesões de nervos periféricos com perda de substância, quando a extensão do defeito impede a reparação direta dos cotos, a opção de tratamento é a auto-enxertia (6). Alguns fatores, porém, devem ser levados em consideração: a necessidade da retirada de tecido autólogo sempre produz morbidade da área doadora; há a necessidade da retirada de extensa quantidade de tecido autógeno para reparo de grandes lesões, indisponíveis; às vezes, o uso de materiais artificiais dispensa tempo necessário para a retirada do auto-enxerto e os resultados obtidos com o uso do auto-enxerto podem não ser inteiramente satisfatórios (45).

Vários são os métodos propostos para a reparação de nervos periféricos lesados. Entre eles cita-se a tubulização, ou seja, a introdução das extremidades distal e proximal de um nervo lesado dentro de uma estrutura tubular, que pode ou não conter substâncias que promovam a regeneração axonal. Porém, o enxerto convencional de nervo é ainda o método mais eficiente e praticado pelos cirurgiões (46).

A interposição de condutores tubulares como uma ponte entre os cotos nervosos lesados tem apresentado bons resultados. Quando usada em correções de pequenos defeitos, em que a distância entre os cotos é curta, ou seja, não suficiente para permitir a atração quimiotática e quimiotrófica exercida pelo coto distal na região do crescimento axonal, os resultados obtidos são semelhantes aos do auto-enxertos (6, 47, 48).

O tubo pode ser o encapamento do nervo com lâmina flexível ou uma estrutura tubular pré-moldada, de vários materiais, biológicos ou não biológicos (49).

A técnica do uso de tubos condutores oferece vantagens teóricas adicionais sobre os métodos tradicionais de enxertia: proporciona boa coaptação dos dois cotos; menor trauma na manipulação; permite melhor confinamento das fibras em crescimento dentro do tubo; isola o local de reparo em torno da resposta inflamatória circundante; orienta o crescimento das fibras para o coto distal, possibilitando a concentração de fatores neurotróficos locais; reduz a

formação de neuromas e o escape de fibras para fora do condutor; e permite a veiculação de substâncias potencializadoras da regeneração (50, 51).

O tubo ideal deve ser de material de baixo custo, inerte biologicamente, portanto, biocompatível, fino e flexível, translúcido, bioabsorvível, inibidor dos processos inflamatórios como fibrose, glioma, neuroma, edema, isquemia e aderência, e facilitador dos processos que contribuem para a regeneração, os acumuladores dos fatores que promovem o crescimento do nervo (46, 49). Vários materiais têm sido utilizados para a construção dos tubos, que podem ser absorvíveis ou não-absorvíveis (17, 52).

A flexibilidade do tubo é necessária para proteger a regeneração do nervo lesado quando da mobilização da parte lesada. Uma vez re-absorvíveis, os tubos devem permanecer sem degradação, durante o período necessário para que os axônios cresçam e alcancem o coto distal (53).

O enxerto venoso pode ser usado como tubo condutor, uma vez que a veia autógena preenche muitos dos critérios necessários para um tubo ideal, conforme descrito acima. É de amplo acesso no corpo humano, inerte imunologicamente, evitando sequelas nas zonas doadoras de nervos e com menor fibrose local (54). É um tubo fino, flexível e de permeabilidade seletiva, que permite a troca osmótica das substâncias fundamentais à regeneração nervosa, impedindo a formação de tecido cicatricial entre as extremidades nervosas. As desvantagens de seu uso são: o colapso da luz levando ao bloqueio do crescimento das fibras nervosas, e o limite do comprimento do tubo, que influencia na capacidade de crescimento axonal (46, 49).

Estudos realizados por Weis, em 1943, utilizando enxertos venosos em modelos experimentais, indicaram que não deve haver tensão na sutura realizada entre os cotos nervosos reparados cirurgicamente devido ao fato de que esse fator contribuiria para que as fibras mantivessem sua orientação longitudinal.

Em 1975, Terzis e cols, demonstraram que a tensão sobre a sutura neural causa efeito deletério. Neste trabalho, foram tomados os cuidados necessários para que não houvesse tensão nos locais de sutura nervosa (7).

Estudos realizados (7) relatam vantagens com o uso da veia invertida (de dentro para fora) em comparação aos enxertos venosos tradicionais e ao auto-enxerto. Mostrou-se que o colágeno e a lamina existentes na camada adventícia e média das veias, respectivamente, promoveriam a regeneração nervosa, e, uma vez invertida a orientação normal da veia, os axônios ficariam expostos a estas substâncias. Esse fator foi decisivo na realização do nosso trabalho, embora não tivéssemos meios de detectar essas substâncias nas camadas das veias utilizadas.

Para o sucesso da reparação do nervo periférico lesado deve haver um "micro ambiente" propício à regeneração, encontrado no momento da lesão nervosa e composto por fatores como as células de Schwann, fibroblastos perineurais, componentes da matriz extracelular e fatores neurotróficos (17, 27, 49, 55). Assim, o uso de substâncias associadas

aos tubos condutores demonstra ter um importante papel no desenvolvimento de melhores resultados funcionais após a lesão de um nervo periférico.

Em 1994, Brunelli e cols. realizaram estudo onde o condutor venoso foi preenchido com músculo fresco autógeno e demonstraram resultados com qualidade superior aos resultados obtidos em distâncias duas vezes mais longas que os condutos preenchidos por axônios em tubos vazios (6). O uso de vaso preservado em glicerol foi relatado em estudo realizado por Cunha e cols., 2007, com bons resultados (47).

Outras substâncias têm sido utilizadas no interior de tubos condutores, como imunossuppressores, músculos e outros. Neste trabalho foi utilizado o PRP, que revelou bons resultados, embora não superiores ao auto-enxerto.

Jenq & Coggehall (56), Doolabh e cols. (57) e Foidart-Dessalle e cols. (31) realizaram estudos semelhantes, com os mesmos resultados apresentados para os tubos preenchidos com substâncias estimuladoras da regeneração nervosa.

A dificuldade na marcha é um achado macroscópico encontrado em todos os estudo onde há lesão nervosa periférica, revelando a efetiva falta de comunicação entre os cotos nervosos seccionados.

Guda e cols. (1993) e Di Benedetto e cols. (37) a ocorrência de dificuldade na marcha e auto-mutilação nos animais submetidos à secção de nervo com reparação através da tubulização com veia, cessados no decorrer próximo da 4ª semana pós-operatório, embora não ocorrendo em todos os animais.

No estudo realizado, houve registro da análise da marcha para avaliação posterior, notando-se melhora gradual da marcha nos grupos 2, 3 e 4. No grupo 1, a marcha permaneceu alterada – com paralisia da pata operada durante todo o período do estudo.

A autofagia de partes ou de toda a pata operada não ocorreu em todos os grupos, sendo predominante nos animais do grupo 3, onde foi usada a veia ao avesso sem preenchimento. A automutilação evidencia deservação, especialmente na área sensitiva. Não foi realizada análise estatística desses achados, porém os dados foram guardados para estudos futuros.

A análise histológica das lâminas revelou que a coaptação dos bordos foi superior no grupo 2, onde foi realizada somente a sutura entre as extremidades nervosas seccionadas. No grupo 3, onde foi utilizada a veia ao avesso sem preenchimento, a coaptação ocorreu em menor número, porém evidenciou-se que a veia funciona como tubo condutor. Entretanto, quando não utilizado preenchimento com substâncias estimulantes da regeneração, a veia cola e impedia a orientação dos cotos e a regeneração nervosa. No grupo 4, foi utilizado o PRP como preenchimento da veia condutora, obtendo-se bons resultados quando comparados à veia vazia. A diferença de todos os grupos em relação ao grupo 1, onde nenhum tipo de tratamento foi empregado, foi estatisticamente significativa, já que em nenhum caso

foi observada a coaptação das extremidades nervosas. Esses resultados são compatíveis aos estudos encontrados na literatura.

CONCLUSÃO

Com o modelo experimental utilizado e o tipo de lesão em nervo periférico provocada, concluímos que:

1. O resultado com auto-enxerto associado à sutura epineural em dois pontos de cada extremidade apresentaram-se superiores aos do uso de veia ao avesso preenchida com PRP.
2. O PRP induz à regeneração de nervo periférico lesado.
3. As veias funcionam como tubos de condução.
4. O grupo que utilizou veias ao avesso preenchidas com PRP apresentou resultados superiores ao grupo que utilizou veia ao avesso vazia.
5. As perspectivas para o uso do PRP em tubos de condução – biológicos ou sintéticos – são muito boas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altissimi M, Mancini GB, Azzara A. Results of primary repair of digital nerves. *J Hand Surg Br.* 1991 Dec;16(5):546-7.
2. Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TdPA. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac.* 2003;3(2):49-54.
3. Orsini M, Mello MPd, Maron EG, Botelho JP, Santos VVd, Nascimento OJ, et al. Reabilitação motora na plexopatia braquial traumática: relato de caso. *Rev Neurocienc.* 2008;16(2):157-61.
4. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):300-6.
5. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987 Apr;58(2):145-69.
6. Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery.* 1994;15(3):176-8.
7. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975 Aug;56(2):166-70.
8. Millesi H. Progress in peripheral nerve reconstruction. *World J Surg.* 1990 Nov-Dec;14(6):733-47.
9. Foramitti C. Zur Technik der Nervennaht. *Arch Klinik Chirurg.* 1904;73:643-8.
10. Swan JJ. Discussion on injuries to the peripheral nerves. *Proc R Soc Med.* 1941;34:521-32.
11. Kirk EG, Lewis D. Fascial tubulization in the repair of nerve defects. *JAMA.* 1915;65:486-92.
12. Garrity RW. The use of plastics and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. *Surg Forum.* 1955;6:517-20.
13. Lundborg G, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1982 Jul;41(4):412-22.
14. Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve.* 1982 Jan;5(1):54-7.

15. Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J Cell Biol.* 1978 Jul;78(1):176-98.
16. Kino T, Goto T. Discovery of FK-506 and update. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Jun 23;685:13-21.
17. Costa MP, Cunha AdS, Silva CFd, Barros Filho TEP, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortopédica Brasileira.* 2006;14:25-9.
18. Fisher RA. The comparison of samples with possibly unequal variances. *Ann Eugen.* 1939;9:174-80.
19. Zar JH. *Biostatistical analysis.* 3th ed. New York: Prentice-Hall; 1996.
20. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods.* 1995 May;58(1-2):29-37.
21. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989 Jan;83(1):129-38.
22. Fraher JP, O'Leary D, Moran MA, Cole M, King RH, Thomas PK. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. 1. Normal animals. *Acta Neuropathol.* 1990;79(4):364-74.
23. Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery.* 1993;14(2):135-40.
24. Leite VM. Estudo do comportamento das lesões altas do nervo ciático através da utilização de Fluoro-Gold e Horseradish Peroxidase como marcadores neuronais: [Tese]. São Paulo, Brasil: Escola Paulista de Medicina; 1994.
25. Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* 2003;23(1):66-71.
26. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2005;20:28-34.
27. Politis MJ, Sternberger N, Ederle K, Spencer PS. Studies on the control of myelinogenesis. IV. Neuronal induction of Schwann cell myelin-specific protein synthesis during nerve fiber regeneration. *J Neurosci.* 1982 Sep;2(9):1252-66.
28. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope.* 2007 Jan;117(1):157-65.

29. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of peripheral nerve regeneration by an isolated nerve segment. *Ann Plast Surg.* 1986 Jun;16(6):494-501.
30. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH. Use of a skeletal muscle basal membrane graft to treat segmentary nerve lesions experimental study in the sciatic nerve of rats: WORKSHOP INTERNACIONAL DE MICROCIURURGIA E CIRURGIA DE MÃO, 5., Botucatu. *Anais Botucatu;* 2000.
31. Foidart-Dessalle M, Dubuisson A, Lejeune A, Severyns A, Manassis Y, Delree P, et al. Sciatic nerve regeneration through venous or nervous grafts in the rat. *Exp Neurol.* 1997 Nov;148(1):236-46.
32. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1995;16(2):65-70.
33. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Jones DS, Seckel BR. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1993;14(9):608-18.
34. Wang MS, Chen ZW, Zhang GJ, Chen ZR. Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery.* 1995;16(8):542-6.
35. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg.* 1989 Mar;22(3):257-73.
36. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 1994 Sep;10(5):345-54.
37. Di Benedetto G, Zura G, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Bertani A. Nerve regeneration through a combined autologous conduit (vein plus acellular muscle grafts). *Biomaterials.* 1998 Jan-Feb;19(1-3):173-81.
38. Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India.* 2002 Mar;50(1):23-6.
39. Nicolino S, Raimondo S, Tos P, Battiston B, Fornaro M, Geuna S, et al. Expression of alpha2a-2b neuregulin-1 is associated with early peripheral nerve repair along muscle-enriched tubes. *Neuroreport.* 2003 Aug 6;14(11):1541-5.
40. Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler MM. Nerve regeneration through an epineurial sheath: its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery.* 2001;21(5):196-201.
41. Tos P, Battiston B, Nicolino S, Raimondo S, Fornaro M, Lee JM, et al. Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. *Microsurgery.* 2007;27(1):48-55.
42. Heijke GC, Klopper PJ, Dutrieux RP. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. *Microsurgery.* 1993;14(9):584-8.

43. Ulkur E, Yuksel F, Acikel C, Okar I, Celikoz B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 2003;23(1):40-8.
44. Rodrigues AdC, Silva MDP. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery*. 2001;21(3):102-7.
45. Kitahara AK, Nishimura Y, Shimizu Y, Endo K. Facial nerve repair accomplished by the interposition of a collagen nerve guide. *J Neurosurg*. 2000 Jul;93(1):113-20.
46. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein, silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg*. 1995 Sep;35(3):266-71.
47. Cunha AdS, Lemos SPdS, Silva CFd, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. Utilização da veia glicerolada na regeneração neural: Estudo experimental em ratos. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2007;15:210-3.
48. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg*. 1988 Nov;82(5):849-56.
49. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol*. 1989;33(2):87-134.
50. Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am*. 1972 Jun;54(4):727-50.
51. Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg*. 1991 Jan;7(1):31-6.
52. Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol*. 1985 Jun;88(3):767-72.
53. Gibson KL, Daniloff JK. Peripheral nerve repair. *The Compendium on Continuing Education for the Practitioner Veterinarian*. 1989;11:938-44.
54. Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*. 1982 Feb;91(2):226-33.
55. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-53.
56. Jenq CB, Coggeshall RE. Permeable tubes increase the length of the gap that regenerating axons can span. *Brain Res*. 1987 Apr 7;408(1-2):239-42.
57. Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci*. 1996 Jan-Mar;7(1):47-84.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

REPAIR OF THE SCIATIC NERVE OF A RAT WITH AN INSIDE OUT VEIN FILLED WITH PLATELET RICH PLASMA .

Marjeane Cristina Jaques Hockmuller¹; Vinícius Rosa de Castro²; Marco Antônio Stefani³; Ápio Cláudio Martins Antunes⁴; Luiz Fernando N. Franciosi⁵; Gustavo Rassier Isolan⁶; Tiago Hochmuller Rodrigues⁷

¹ Neurosurgeon – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – MSc. Medicine: Surgical Sciences – Universidade Federal do RGS (UFRGS)

² Medical Student – Universidade Luterana do Brasil

³ Neurosurgeon - Professor of Anatomy at Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Preceptor in the Neurosurgery Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴ Neurosurgeon- Professor of Neurosurgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Head of the Neurosurgery Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA

⁵ Full Member of the Brazilian Society of Plastic Surgery; Full Member of the Brazilian Society of Reconstructive Microsurgery; Head of the Microsurgery Service at Hospital Cristo Redentor, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS; preceptor in the Medical Residency Service of Plastic Surgery at Hospital Ernesto Dornelles, Porto Alegre, RS.

⁶ Neurosurgeon, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Professor of the Graduate Program in Medicine: Surgical Sciences at Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁷ Student of Physiotherapy at Universidade Federal de Santa Maria - RS

Correspondence to: Dra Marjeane Hockmuller - Hospital de Clínicas de Porto Alegre- 2^o Andar- Serviço de Neurocirurgia- Ramiro Barcelos, 2.350 - Bairro Santa Cecília -Porto Alegre / RS CEP 90035-903 -PABX (51) 3359.8000 - FAX (51) 3359.8001

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are common, resulting in motor, sensory and autonomic impairment. In lesions with heavy loss of neural tissue repair by primary suture is not allowed, and the treatment of choice is the nerve autograft. The use of an autologous vein graft as a conduit between injured nerve stumps filled with substances that stimulate nerve regeneration is presented as an alternative technique. Platelet rich plasma is an autologous blood laboratory product, rich in growth factors originating from α -granules of platelet. The aim of this study was to look at the influence of platelet rich plasma in the regeneration of peripheral nerve transected and repaired with an inside out vein, compared to using the vein inside out and empty and to the direct suture of the nerve endings. The evaluation was performed by interposing a jugular vein inside out and empty (Group 3) and filled with platelet-rich plasma (Group 4) in defects in a 10 mm sciatic nerve of rats, compared to direct suture (Group 2) from divided ends, using a histological technique to identify coaptation of nerve stumps or not. Groups 2 and 4 showed coaptation of the nerve stumps, concluding that the inside out vein filled with platelet rich plasma is an attractive alternative for treating peripheral nerve injuries.

KEYWORDS: Peripheral Nerves/ surgery. Nerve regeneration. Platelet-rich plasma/ therapeutic use. Inside out vein/ therapeutic use

INTRODUCTION

The repair of injured peripheral nerves using microsurgical techniques that promote the rehabilitation of motor and sensory functions is still a concern and a challenge to surgeons (1, 2).

Full recovery is rare after a nerve injury, despite considerable advances in surgical techniques, since many factors influence the regeneration of the injured nerve fiber, including the nature and level of the injury; time since denervation; type and diameter of the injured nerve fiber, individual variables of each patient, such as age; the surgical technique used for the nerve repair and the probability of a satisfactory functional recovery (3, 4).

Partial destruction of nerve fibers may occur due to trauma, tumors and iatrogenic factors (1).

The purpose of the surgical repair techniques is to realign the nerve structures with minimal surgical trauma. The classical method used for nerve repair is direct suturing of the nerve stumps. However, when there is great loss of neural tissue, suturing may not be possible without excessive tension (5), and therefore autografting is chosen (6, 7).

The need for bridges connecting the proximal and distal ends led to studies performed since the mid-19th century (8). The interposition of conducting tubes between the transected nerve stumps appears to be a good alternative.

Materials such as vessels (9, 10), fascia (11), absorbable plastic tubes of silicone and synthetics (12-14) and muscle (15) have been used to replace the nerve graft.

Several substances were used to evaluate the treatment of peripheral nerve injuries, such as FK506 (16, 17), Platelet Rich Plasma, GM1 (monosialotetraesoylganglioside) (16).

The purpose of this study is to evaluate the coaptation of the transected nerve stumps by analyzing the histopathology after repair, with the veins inside out and filled with Platelet Rich Plasma in 5mm lesions of the sciatic nerve of Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

The work was done at the Animal Experimental Unit at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, with 40 male Wistar rats, 60 days old, mean weight 250 to 300 grams. Using a microsurgical technique, 12mm of the left external jugular vein were transected, and 10mm long defects created in the sciatic nerve of the right foot, and 1 ml of blood was collected from the left retro-orbital plexus to make the platelet rich plasma. The animals were divided into four groups, each with 10 animals, according to treatment employed.

For the surgical procedure, the animals were anesthetized with xylazine and ketamine (10mg/Kg and 100 mg/Kg). The segment of left external jugular vein was obtained by shaving and cleaning the anterior cervical portion, paramedian incision and segregation of the external jugular vein with a 12mm resection over its length. After collection, the nerve graft was cannulated with a periodontal catheter, turned inside out and kept immersed in a 0.9% saline solution until it was finally used. The injured sciatic nerve was dissected through a dorsal incision of the right foot and 10mm of its length transected. The blood obtained to prepare the Platelet Rich Plasma (PRP) was collected from the retro-orbital plexus by direct puncture. The 1 ml volume was placed in tubes containing 10% sodium citrate. Then the tubes were centrifuged for 10 minutes at 800 rpm, and a collection was obtained formed by three layers: upper layer -Platelet Poor Plasma- which was aspirated with a pipette and discarded; middle layer – PRP – 0.5 ml aspirated (all) , added to 0.5 ml of the lower layer (red blood cells). The volume obtained was immediately placed in the inside out vein tube, which had already been sutured at two points of one of the nerve ends and then sutured at two points of the remaining end. Mononylon 8-0 thread was used for suturing. All the animals were submitted to resection of the 12 mm segment of external jugular vein, and blood was collected from the retro-orbital plexus, both on the left side, so that the groups would be uniform.

In Group 1, 10 mm of right sciatic nerve were transected without repairing between the nerve ends.

In Group 2, 10 mm of the right sciatic nerve were transected and the nerve ends were sutured at two points, in the epineurium of each stump using mononylon 8-0 thread.

In Group 3 10 mm of the right sciatic nerve were injured and the nerve ends were sutured with mononylon 8-0 at each end of the left external jugular vein inside out (from inside out).

In Group 4 the left external jugular vein was interposed inside out, filled with 0.5 ml of Platelet Rich Plasma (PRP). First two sutures were placed at one end, and after filling with PRP, the other end was sutured the same way.

Next the proximal end of each nerve stump was identified with black China ink and the specimens were submitted to routine histological processing, which consists of bathing in solutions with a growing concentration of alcohol for dehydration, followed by diaphanization, impregnation and inclusion in paraffin. The 4 micrometer thick sections were obtained, stained with HE and analyzed under an Olympus Bx 41 microscope to evaluate nerve end coaptation.

RESULTS

Two deaths occurred during the study due to anesthetic incidents (Group 2 and 3).

Dehiscence of the surgical wound of the cervical region and right foot occurred in animals of Groups 2, 3 and 4 (G2= 1 animal; G2 = 4 animals and G4= 4 animals), and needed to be repaired.

Self mutilation occurred in animals of groups 3 and 4, during the first week postoperatively, but did not occur after this period (Figures 1, 2 and 3).

Self mutilation sites

*

Figure 1



Figure 2

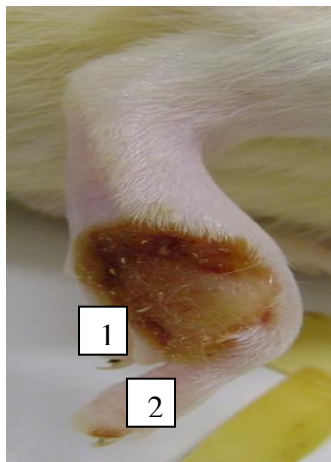
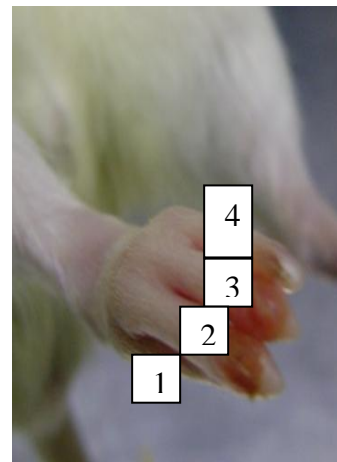


Figure 3



1- Toe nº1* 2- Toe nº 2* 3- Toe nº3 * Toe nº4 (Dedo do pé é toe, não é finger...)

There was a visible change in gait due to the paresis caused by transecting the sciatic nerve, especially during the immediate postoperative period and the first week after surgery, and a gradual improvement was noted in groups 2 and 4, and motor deficit continued in groups 1 and 3. The gait test was performed in all groups during the preoperative period and every week postoperatively, and the results were stored in a database for later study (Figure 4).

Figure 4: Gait test



Gait test in animals from G2

Figure 5



Figure 6

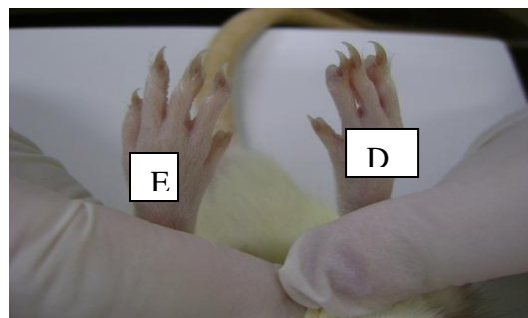
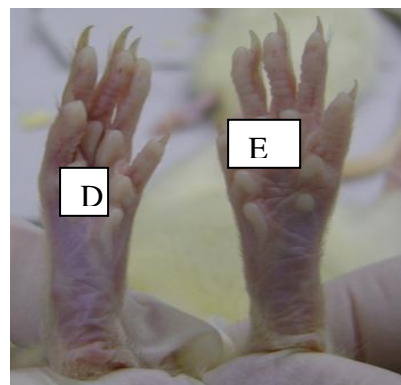


Figure 7

Figures 5,6 and 7: atrophy of the right foot (operated) compared to the left (not operated).

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS

Analysis of the slides under the optical microscope with up to 40 x magnification showed the coaptation of all stumps in Group 2 (where the repair of 10 mm of sciatic nerve occurred by direct suturing of the ends) and of 7 of the 10 specimens in Group 4 (where the sciatic nerve was repaired with the inside out vein filled with PRP).

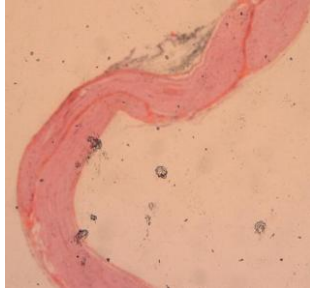


Image of a normal sciatic nerve, with 40 x augmentation, stained with HE.

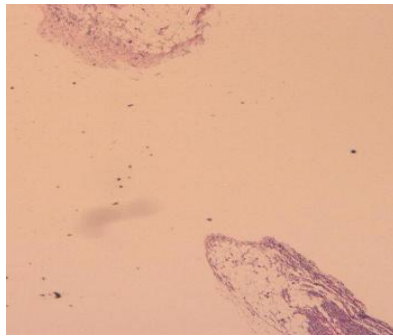


Image of a sciatic nerve of Group 1 (nerve transected and not repaired) where no coaptation of any nerve end occurred.

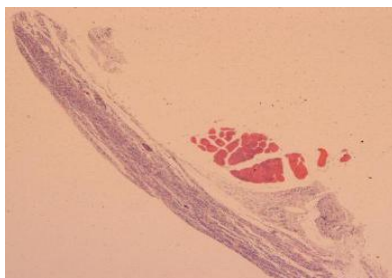


Image of a sciatic nerve of Group 2

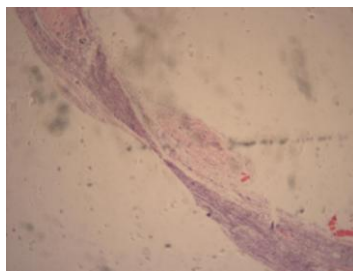


Image of a repaired sciatic nerve with empty vein inside out (Group 3)

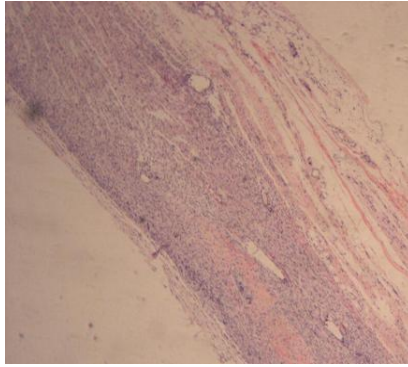
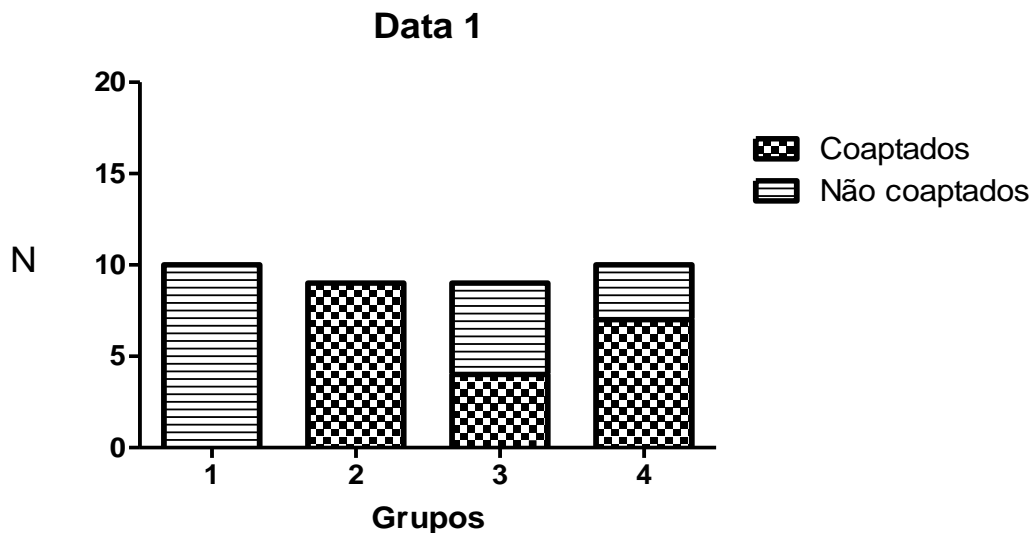


Image of a repaired sciatic nerve with vein inside out filled with PRP.

Statistical analysis of the results was performed using the Chi-square test with independence, comparing the four groups. The exact Fisher test (18, 19) was used to identify the differences between the groups, adopting a <0.05 level of significance.



N= number of cases

Groups = groups studied

Results: Coapted and Non-coapted

Comparing the groups, there was a significant difference between group 1 (transected) and group 2 ($P=0.009$), group 3 ($P=0.03$) and group 4 ($P=0.003$). No significant difference was found in the other comparisons ($P>0.05$).

DISCUSSION

Rats were used as the animal model in this study because they are often used in the literature (16, 20) since they have an anatomy and peripheral nerve regeneration mechanism similar to that of Man. They are small, easy to handle and accommodate, and maintenance is low cost. Besides, this allows analyzing other factors, as for instance evaluating the functional recovery of the injured sciatic nerve using the walking track methodology established by De

Medinacelli (20) and modified by Bain e cols. (21) through the footprint pattern of these animals.

All the animals chosen were male, to avoid the variables of hormonal rhythm that often occur in females (22). The Wistar strain is well known biologically, with resistant animals, easy to manage and low cost maintenance (23). The age chosen, 60 days, was intended to avoid loss of animals to aging-related diseases (24) and, among other aspects, nerve repair takes longer as they become older (25, 26).

The 4 weeks until slaughter were chosen because this time is long enough to regenerate the nerve (11). During this period there is no risk that the nerves will undergo biological changes as a result of aging, and they maintain their original structure.

The sample size of $n=10$ animals for each group was enough in probabilistic terms, according to the review of literature, and because the test occurred at only a single moment, i.e., at the end of the experiment. The two deaths that occurred during the study were due to technical problems, i.e., loss of the animal due to cardiorespiratory failure during anesthesia.

The anesthesia used, intraperitoneal xylazine + ketamine, was described by Farrag (27).

The sciatic nerve was chosen because its intraneural vessels are similar to the human peripheral nerves. Furthermore, it is the largest nerve of the body, easily accessible and richly vascularized. Besides, it is possible to analyze the functional recovery pattern of the sciatic nerve, and one can compare the best technique when it is necessary to repair the neural tissue defect. However, there are reports in the literature of lesions in the lower limbs as a results of using the sciatic nerve, such as: autophagy of the insensitive parts (24), skin ulcers (28) and the animal may find it difficult to remain standing in order to feed.

A 10mm section of sciatic nerve was chosen in accordance with the limits described in the literature, so that this measure should not be greater than 10 mm (29). The great distances between the nerve stumps lead to bad results according to reports in the literature (30).

The use of two epineurial sutures at each nerve end was according to studies performed by Wang e cols. (31-33) and Foidart-Dessalçe e cols. (30). The suture thread used was monofilamentary nylon 8-0, in order to help adapt the grafted vein to the nerve stumps. Other authors report using three suture points (34-38).

The external jugular vein was chosen due to the advantages it offers: larger diameter, no valves, length sufficient for tubulization, and it avoids strong tissue aggression to the rat foot (if the femoral vein were used, two incisions would be necessary – one to approach the nerve and the other to approach the vein). Moreover, surgical access is easy and morbidity is low (32, 39). The use of arterial segments with the normal artery inside out were reported by Rodrigues & Silva (40). Barcelos e cols. (25) reported using the external jugular vein inside

out and heterologous abdominal aorta used inside out, while Tos e cols. (41) reported using the epigastric vein with statistically similar results.

In peripheral nerve injuries with loss of substance, when the size of the defect does not allow direct repair of the stumps, the treatment chosen is autografting (Brunelli, 1994). Some factors must, however, be taken into account: the need to remove autologous tissue always causes morbidity of the donor area. It is necessary to remove a large amount of autogenous tissue to repair large lesions, and this is sometimes unavailable. The use of artificial materials needs less time than retrieving an autograft and the results obtained using autograft may not be entirely satisfactory (42).

Several methods have been proposed to repair injured peripheral nerves. They include tubulization, i.e., the introduction of the distal and proximal ends of an injured nerve into a tubular structure, which may or not contain substances that promote axonal regeneration. However, conventional nerve grafts are still the most effective method and practiced by surgeons (43).

The interposition of tubular conduits as a bridge between the injured nerve stumps has had good results. When used to correct small defects, where the distance between stumps is short, i.e., not enough to allow the chemotactic and chemotropic attraction exerted by the distal stump in the axonal growth region, the results obtained are similar to those of autografts (6, 16, 44).

The tube can be the sheath of the nerve with a flexible lamina or a pre-molded tubular structure, from several biological or non biological materials (45).

The technique using conduit tubes has additional advantages over the traditional graft method: it provides a good coaptation of the two stumps; less trauma from handling; it allows a better confinement of growing fibers inside the tube; it isolates the repair site around the surrounding inflammatory response; it guides fiber growth to the distal stump, enabling the concentration of local neurotrophic factors; it reduces the formation of neuromas and the escape of fibers from the conduit; it allow transporting substances that potentiate regeneration (46, 47).

The ideal tube should be made of low cost material, biologically inert, and thus biocompatible, thin and flexible, translucent, bioabsorbable, inhibit inflammatory processes such as fibrosis, glioma, neuroma, edema, ischemia and adhesion, and facilitate the processe (43, 45).

Several materials have been used to construct the tubes, and they may be absorbable or non-absorbable (16, 48).

Tube flexibilization is necessary to protect the regeneration of the injured nerve when the injured part is mobilized. When they are reabsorbable, the tubes must always remain undegraded during the period needed for the axons to grow and reach the distal stump (49).

The vein graft can be used as a conduit tube, since the autogenous vein meets many of the criteria needed for an ideal tube, described above. It is easily accessed in the human body, immunologically inert, avoiding sequelae in the nerve donor zones and with less local fibrosis (50). It is a thin, flexible tube with selective permeability, which allows osmotic exchange of the substances essential for nerve regeneration, preventing the formation of scar tissue between the nerve ends. Its disadvantages are: collapse of the lumen blocking the growth of nerve fibers and the limit of tube length which influences the axonal growth capacity (43, 45).

Studies performed by Weis, et al. 1943, using vein grafts in experimental models indicated that there should be no tension in the suture performed between the surgically repaired nerve stumps because this factor would contribute to the fibers maintaining their longitudinal orientation..

In 1978, Terzis et al., showed that tension on the neural suture has a deleterious effect. In this study care was taken to avoid tension at the nerve suture sites (51).

Studies performed (7) report advantages of using the inverted vein (inside out) compared to the traditional vein grafts and to autograft. It was shown that collagen and the lamina that exist in the adventitious and middle layer of the veins, respectively, promote nerve regeneration, and once the normal orientation of the vein has been inverted, the axons appear to be exposed to these substances. This factor was decisive in doing our study, although we did not have the means to detect these substances in the vein layers used.

In order to successfully repair the injured peripheral nerve, there must be a “micro environment” that will favor regeneration, found at the time when the nerve injury occurs and composed of factors such as the Schwann cells, perineural fibroblasts, components of the extracellular matrix and neurotrophic factors (11, 16, 45, 52). Thus, the use of substances associated with the conduit tubes plays a major role in the development of better functional results after a peripheral nerve is injured.

In 1994, Brunelli et al did a study in which the venous conduit was filled with fresh autogenous muscle and they showed higher quality results than those obtained at distances twice as long as the conduits filled by axons in empty tubes.

The use of a vessel preserved in glycerol was reported in a study performed by Cunha et al. (53), with good results.

Other substances have been used inside conduit tubes, such as immunosuppressants, muscle and others. In this study PRP was used and its results were good, although not superior to autografting.

Jenq & Coggehall (54), Doolabh et al. (55) and Foidart-Dessalle et al. (30) did similar studies with the same results for the tubes filled with nerve regeneration stimulating substances.

Difficulty in walking is a macroscopic finding in all studies where there is peripheral nerve injury, showing that there is really lack of communication between the transected nerve stumps.

According to Guda e cols. and Di Benedetto e cols. (36) difficulty in walking (gait) and self-mutilation occur in the animals submitted to nerve transection with repair through the tube with a vein, and this stops approximately during the 4th week postoperatively although this does not happen in all animals.

In the study there was a record of the gait analysis for later evaluation, and a gradual improvement of gait was observed in groups 2, 3 and 4. In group 1 gait remained unchanged 0 with a paralysis of the operated foot throughout the period of the study.

Autophagy of part or all of the foot operated did not occur in all groups. It prevailed in animals of group 3, where the vein was used inside out without filling. The self-mutilation shows denervation, especially in the sensitive area. No statistical analysis of these findings was performed, but the data were kept for future studies.

Histological analysis of the slides showed that there was more coaptation of the borders in group 2, where only one suture was performed between transected nerve ends. In group 3, where the vein was used inside out without filling, coaptation occurred less, but it was shown that the vein acts as a conduit tube. However, when no filling was done with regeneration stimulating substances, the vein collapses and prevents the orientation of the stumps and nerve regeneration. In group 4 PRP was used to fill the conduit vein and good results were obtained compared to the empty vein. The difference of all groups from group 1, where no type of treatment was used, was statistically significant, since in no case was coaptation of the nerve ends observed. These results are compatible with the studies found in the literature,

CONCLUSION

From the experimental model used and the type of peripheral nerve injury provoked, we concluded that:

6. The result with autograft associated with the epineurial suture at two point at each end were superior to the use of the inside out vein filled with PRP;
7. PRP induces the regeneration of the injured peripheral nerve;
8. The veins act as conduit tubes;
9. The results of the group that used veins inside out filled with PRP were superior to those of the group that used an empty inside out vein;
10. There are very good prospects for the use of PRP in conduit tubes – whether biological or synthetic.

REFERENCES

1. Altissimi M, Mancini GB, Azzara A. Results of primary repair of digital nerves. *J Hand Surg Br.* 1991 Dec;16(5):546-7.
2. Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro TdPA. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac.* 2003;3(2):49-54.
3. Orsini M, Mello MPd, Maron EG, Botelho JP, Santos VVd, Nascimento OJ, et al. Reabilitação motora na plexopatia braquial traumática: relato de caso. *Rev Neurocienc.* 2008;16(2):157-61.
4. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):300-6.
5. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987 Apr;58(2):145-69.
6. Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery.* 1994;15(3):176-8.
7. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975 Aug;56(2):166-70.
8. Millesi H. Progress in peripheral nerve reconstruction. *World J Surg.* 1990 Nov-Dec;14(6):733-47.
9. Foramitti C. Zur Technik der Nervennaht. *Arch Klinik Chirurg.* 1904;73:643-8.
10. Swan JJ. Discussion on injuries to the peripheral nerves. *Proc R Soc Med.* 1941;34:521-32.
11. Politis MJ, Sternberger N, Ederle K, Spencer PS. Studies on the control of myelinogenesis. IV. Neuronal induction of Schwann cell myelin-specific protein synthesis during nerve fiber regeneration. *J Neurosci.* 1982 Sep;2(9):1252-66.
12. Garrity RW. The use of plastics and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. *Surg Forum.* 1955;6:517-20.
13. Lundborg G, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1982 Jul;41(4):412-22.
14. Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve.* 1982 5(1):54-7.

15. Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J Cell Biol.* 1978 Jul;78(1):176-98.
16. Costa MP, Cunha AdS, Silva CFd, Barros Filho TEP, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortopédica Brasileira.* 2006;14:25-9.
17. Kino T, Goto T. Discovery of FK-506 and update. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 685:13-21.
18. Fisher RA. The comparison of samples with possibly unequal variances. *Ann Eugen.* 1939;9:174-80.
19. Zar JH. *Biostatistical analysis.* 3th ed. New York: Prentice-Hall; 1996.
20. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods.* 1995 May;58(1-2):29-37.
21. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989 83(1):129-38.
22. Fraher JP, O'Leary D, Moran MA, Cole M, King RH, Thomas PK. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. 1. Normal animals. *Acta Neuropathol.* 1990;79(4):364-74.
23. Bertelli JA, Mira JC. Nerve repair using freezing and fibrin glue: immediate histologic improvement of axonal coaptation. *Microsurgery.* 1993;14(2):135-40.
24. Leite VM. Estudo do comportamento das lesões altas do nervo ciático através da utilização de Fluoro-Gold e Horseradish Peroxidase como marcadores neuronais: [Tese]. São Paulo, Brasil: Escola Paulista de Medicina. 1994.
25. Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* 2003;23(1):66-71.
26. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2005;20:28-34.
27. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope.* 2007 Jan;117(1):157-65.
28. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of peripheral nerve regeneration by an isolated nerve segment. *Ann Plast Surg.* 1986 Jun;16(6):494-501.
29. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH. Use of a skeletal muscle basal membrane graft to treat segmentary nerve lesions experimental study in the sciatic nerve of rats: WORKSHOP

INTERNACIONAL DE MICROCIRURGIA E CIRURGIA DE MÃO, 5., Botucatu. Anais Botucatu; 2000.

30. Foidart-Dessalle M, Dubuisson A, Lejeune A, Severyns A, Manassis Y, Delree P, et al. Sciatic nerve regeneration through venous or nervous grafts in the rat. *Exp Neurol*. 1997 Nov;148(1):236-46.
31. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16(2):65-70.
32. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Jones DS, Seckel BR. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1993;14(9):608-18.
33. Wang MS, Chen ZW, Zhang GJ, Chen ZR. Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery*. 1995;16(8):542-6.
34. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*. 1989 Mar;22(3):257-73.
35. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1994 Sep;10(5):345-54.
36. Di Benedetto G, Zura G, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Bertani A. Nerve regeneration through a combined autologous conduit (vein plus acellular muscle grafts). *Biomaterials*. 1998 Jan-Feb;19(1-3):173-81.
37. Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India*. 2002 Mar;50(1):23-6.
38. Nicolino S, Raimondo S, Tos P, Battiston B, Fornaro M, Geuna S, et al. Expression of alpha2a-2b neuregulin-1 is associated with early peripheral nerve repair along muscle-enriched tubes. *Neuroreport*. 2003 Aug 6;14(11):1541-5.
39. Ulkur E, Yuksel F, Acikel C, Okar I, Celikoz B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery*. 2003;23(1):40-8.
40. Rodrigues AdC, Silva MDP. Inside-out versus standard artery graft to repair a sensory nerve in rats. *Microsurgery*. 2001;21(3):102-7.
41. Tos P, Battiston B, Nicolino S, Raimondo S, Fornaro M, Lee JM, et al. Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. *Microsurgery*. 2007;27(1):48-55.
42. Kitahara AK, Nishimura Y, Shimizu Y, Endo K. Facial nerve repair accomplished by the interposition of a collagen nerve guide. *J Neurosurg*. 2000 Jul;93(1):113-20.
43. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein, silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg*. 1995 Sep;35(3):266-71.

44. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg*. 1988 Nov;82(5):849-56.
45. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol*. 1989;33(2):87-134.
46. Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am*. 1972 Jun;54(4):727-50.
47. Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg*. 1991 7(1):31-6.
48. Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol*. 1985 Jun;88(3):767-72.
49. Gibson KL, Daniloff JK. Peripheral nerve repair. *The Compendium on Continuing Education for the Practitioner Veterinarian*. 1989;11:938-44.
50. Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*. 1982 Feb;91(2):226-33.
51. Terzis JK, Daniel RK, Williams HB, Spencer PS. Benign fatty tumors of the peripheral nerves. *Ann Plast Surg*. 1978 Mar;1(2):193-216.
52. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-53.
53. Cunha AdS, Lemos SPdS, Silva CFd, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. Utilização da veia glicerolada na regeneração neural: Estudo experimental em ratos. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2007;15:210-3.
54. Jenq CB, Coggeshall RE. Permeable tubes increase the length of the gap that regenerating axons can span. *Brain Res*. 1987 Apr 7;408(1-2):239-42.
55. Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci*. 1996 Jan-Mar;7(1):47-84.