

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARTINA LICHTENFELS

EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DE PLAQUETA RICA EM
FIBRINA NA REGENERAÇÃO DE LESÕES COM PERDA DE SUBSTÂNCIA DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS

Porto Alegre

2012

MARTINA LICHTENFELS

EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DE PLAQUETA RICA EM
FIBRINA NA REGENERAÇÃO DE LESÕES COM PERDA DE SUBSTÂNCIA DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Jefferson Luis Braga da Silva

Porto Alegre
2012

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

L699e Lichtenfels, Martina

Efeito do plasma rico em plaquetas e de plaqueta rica em fibrina na regeneração de lesões com perda de substância do nervo ciático em ratos / Martina Lichtenfels. Porto Alegre: PUCRS, 2012.

114 f.: gráf. il. tab. Inclui artigo de periódico a ser submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. PLASMA RICO EM PLAQUETAS. 2. FIBRINA. 3. NERVO CIÁTICO/lesões. 4. REGENERAÇÃO NERVOSA. 5. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO/ultraestrutura. 6. TRANSPLANTE AUTÓLOGO. 7. SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA. 8. MODELOS ANIMAIS. 9. RATOS WISTAR. I. Silva, Jefferson Luis Braga da. II. Título.

C.D.D. 616.548

C.D.U. 611.83:616-008.852(043.3)

N.L.M. WL 403

MARTINA LICHTENFELS

EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DE PLAQUETA RICA EM
FIBRINA NA REGENERAÇÃO DE LESÕES COM PERDA DE SUBSTÂNCIA DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 19 de Março de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Prof. Dr. Henrique Sarubbi Fillmann

Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Porto Alegre
2012

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Jefferson Braga Silva** pela orientação e acolhida em seu laboratório.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura disponibilizada.

Ao **CNPQ**, pela bolsa concedida e pelo apoio à pesquisa.

A toda equipe do **Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica** da PUCRS, pelo apoio e cooperação na execução deste trabalho.

Aos colegas **Alessandra Deise Sebben** e **Lucas Colomé** por dividirem seus conhecimentos, pela grande ajuda, apoio, compreensão e amizade durante todo o trabalho.

Aos meus pais, **Henriete e Ivo**, meus maiores incentivadores, pelo grande apoio e amor incondicional, por me ensinar a lutar e persistir mesmo nas dificuldades, e principalmente pela paciência de me escutar e aconselhar durante todo este período.

Aos meus irmãos **Patricia e Eduardo**, pelo apoio nos momentos difíceis, por sempre estarem a disposição para me ouvir e pelo incentivo.

Ao meu namorado, **Diego Demarco De Grandi**, pelo grande apoio e incentivo, pela paciência incansável de me escutar, por sua presença em todos os momentos desta batalha, e pelo carinho e amor.

Às minhas grandes amigas, **Isa, Mano, Mari e Paula**, pelas risadas, conversas, pelo apoio com suas palavras na piores horas, por sempre me incentivarem e apoiarem, e por nossa grande amizade.

À todos os **familiares e amigos** que de alguma forma colaboraram para mais esta conquista em minha vida.

A Deus pela força de persistir mesmo com tantos obstáculos e dificuldades.

Obrigada

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do uso de Plasma rico em plaquetas (PRP) e de Plaqueta rica em fibrina (PRF) no reparo de nervos periféricos, comparando com os resultados do padrão-ouro (enxerto autólogo) e com grupo controle (solução salina).

Materiais e Métodos: Trinta e seis ratos Wistar foram utilizados no estudo, sendo quatro ratos utilizados apenas como doadores de sangue para obtenção de PRP e PRF. Foram criadas lesões de 10mm nos nervos ciáticos da pata esquerda dos ratos, e estas foram reparadas com um dos 4 tipos de tratamentos: enxerto autólogo (AE); tubulização com solução salina (TS); tubulização com PRP; tubulização com PRF. Foram realizados Testes de marcha no período pré-operatório, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Após 90 dias, os ratos foram eutanasiados e foram realizadas análises histomorfométricas avaliando diâmetro das fibras, diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina.

Resultados: Com 90 dias pós-operatórios, os grupos AE, PRF e PRP demonstraram uma melhora funcional significativa em relação ao grupo TS ($p = 0,000$), que continuou apresentando déficit na marcha. Na histomorfometria, o grupo AE apresentou uma melhor organização estrutural, com distribuição regular das fibras mielinizadas, com pouco tecido conjuntivo entre as fibras. Os grupos TS, PRP e PRF demonstraram maior espaço endoneural entre as fibras nervosas e a presença de processos degenerativos. O grupo AE demonstrou maior diâmetro de fibra nervosa no segmento proximal quando comparado ao grupo TS ($p = 0,037$), e também apresentou maior diâmetro de fibra em relação ao grupo PRF ($P = 0,001$) e PRP ($P = 0,002$), quando comparados os segmentos medianos. Quanto ao diâmetro axonal e espessura da bainha de mielina, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos.

Conclusão: Os dados deste estudo sugerem que tanto o PRP quanto o PRF possuem efeito positivo na recuperação funcional nervosa, apresentando resultados funcionais similares aos encontrados pelo grupo AE. Porém, não apresentam melhora significativa nas análises histomorfométricas.

Palavras-Chave: Nervos ciáticos. Plasma rico em plaquetas. Regeneração nervosa. Sistema nervoso periférico. Fibrina.

ABSTRACT

Objective: This study evaluates the effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Platelet Rich Fibrin (PRF) on peripheral nerve repair, comparing the results to the gold-standard (autologous nerve graft) and to the control group with saline solution.

Materials and Methods: Thirty six Wistar rats were used in the study, and four of these were blood donors to obtain the PRP and the PRF. The Injuries were made on the sciatic nerve from the left paw with 10mm long gap and they were repaired with one of the four treatments: Autologous nerve grafts (ANG); tubulization with saline solution (TS); tubulization with PRP; tubulization with PRF. Walking track analysis were performed at pre-operative period, 30, 60 and 90 days after surgery. On the 90 postoperative day, the rats were euthanized and histomorphometric analysis were made measuring the fiber diameter, axonal diameter and the myelin sheath thickness.

Results: On 90 days post-operative, the ANG, PRF and PRP groups presented a significant functional improvement in relation to the TS group ($p = 0.000$), which showed functional deficit. On the histomorphometric test, the ANG group presented a better structural organization, with a regular distribution among the myelinated fibers, and little conjunctive tissue between the fibers. The TS, PRP and PRF groups had a larger endoneural tissue between the nerve fibers and presented degenerative process. The ANG group achieved a larger nerve fiber diameter at the proximal segment while comparing with the TS ($p = 0.037$), and also comparing with the PRF ($p = 0.001$) and the PRP ($p = 0.002$) while analyzing the medial segments. About the axonal diameter and the myelin sheath thickness, no statistical significant difference has been found between the groups.

Conclusion: This research data suggests that PRP and PRF have positive effects on functional nerve recovery, presenting results similar to the ANG group. However, the PRP and PRF don't achieve a significant improvement on the histomorphometric analysis.

Keywords: Sciatic nerve. Platelet rich plasma. Nerve regeneration. Peripheral nervous system. Fibrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Figura ilustrativa da descrição anatômica do nervo periférico.....	17
Figura 2 – Seção de 10 mm do nervo ciático de ratos wistar.....	36
Figura 3 – Tubo de silicone suturado a extremidade proximal do nervo ciático injuriado preenchido com PRF.....	37
Figura 4 – Sangue do rato após a 1ª centrifugação para obtenção do PRP. Na porção superior encontra-se o plasma acelular, na porção inferior os remanescentes sanguíneos e a porção intermediária corresponde as plaquetas.....	38
Figura 5 - Coágulo de PRF.....	40
Figura 6 – Impressões das patas deixadas nas tiras de papel. Pata esquerda experimental, e pata direita normal (não injuriada). Pegadas obtidas com 30 dias pós-cirurgicos (A), pegadas após 60 dias pós-cirurgicos (B), e pegadas após 90 dias pós-cirurgicos (C).....	41
Figura 7 – Figura ilustrativa das secções transversais do nervo regenerado em três segmentos: proximal, mediano e distal.....	42
Figura 8 – Gráfico comparando a concentração de plaquetas no sangue total utilizado para obtenção de PRP e PRF e concentração plaquetária no PRP e no PRF.	46
Figura 9 – Coto proximal e coto distal do nervo ciático não apresentando regeneração nervosa após 12 semanas pós-cirúrgicas, grupo tratado com solução salina.....	48
Figura 10 – Nervo ciático completamente regenerado em 12 semanas pós-cirúrgicas , grupo tratado com PRF.....	49
Figura 11 - Segmentos proximais dos grupos AE (A), grupo TS (B), grupo PRF (C), grupo PRP (D), com coloração azul de toluidina. Aumento de 100X. Presença de fibras mielinizadas, em A notamos distribuição regular das fibras e nos demais grupos (B,C,D) nota-se maior espaço endoneural entre as fibras.....	50
Figura 12 - Segmentos medianos dos grupos AE (A), grupo PRF (B), grupo PRP (C), com coloração azul de toluidina. Aumento de 100X. Observa-se bainhas de mielina mais espessas em B e C quando comparadas a A.....	50

Figura 13 – Segmentos distais dos grupos AE (A), grupo TS (B), grupo PRF (C), grupo PRP (D), com coloração azul de toluidina. Aumento de 100X. Observa-se bainhas de mielina mais espessas no grupo A em relação aos demais grupos (B,C,D).....	51
Figura 14 - Comparações do diâmetro médio das fibras mielínicas (μm) nos três segmentos nervosos entre os grupos AE, PRP, PRF e TS.....	52
Figura 15- Comparações dos diâmetros médios dos axônios (μm) nos três segmentos nervosos entre os grupos AE, PRP, PRF e TS.....	52
Figura 16 - Comparações das espessuras médias das bainhas de mielina (μm) nos três segmentos nervosos entre os grupos AE, PRP, PRF e TS.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvio padrão do SFI dos diferentes grupos obtidas nos períodos de avaliação através do Teste de Marcha. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de confiança de 5%.....47

LISTA DE SIGLAS

ACD-A	Ácido citrato dextrose-A
AE	Autoenxerto
BMSC	Células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CAMS	Molécula de Adesão Celular
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
EGF	Fator de crescimento epithelial
g	Gravidades
GDNF	Fator neurotrófico derivado de linhagem de células glia
IFC	Índice de Função Ciática
IGF	Fator de crescimento insulínico
IL-1	Interleucina – 1
IL-6	Interleucina - 6
IL-12	Interleucina - 12
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MSC	Células Tronco Mesenquimais
NF	Neurotrofinas
NGF	Fator de crescimento do nervo
NT-3	Neurotrofina -3
OADNC	Células tronco derivadas de tecido adiposo omental
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PLGA	Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PPP	Plasma Pobre em plaquetas
PRF	Fibrina Rica em Plaquetas
PRFM	Fibrina rica em plaqueta matriz

PRP	Plasma Rico em Plaquetas
RBC	Remanescentes sanguíneos
rpm	Rotação por minuto
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TS	Tubo com solução salina
U	Unidades
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VEGF	Fator de crescimento endothelial vascular
μg	Microgramas
μl	Microlitros
μm	Micrômetros
β	Beta
%	Porcento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1 Anatomia do nervo periférico.....	16
2.2 Lesões de nervos periféricos.....	17
2.3 Degeneração e Regeneração de nervos periféricos.....	19
2.4 Técnicas de reparo de nervos periféricos.....	22
2.5 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	25
2.6 Fibrina Rica em Plaqueta (PRF)	28
3 JUSTIFICATIVA	31
4 HIPÓTESES	32
4.1 Hipótese Operacional.....	32
4.2 Hipótese Conceitual.....	32
5 OBJETIVOS	33
5.1 Objetivo Primário.....	33
5.2 Objetivos Secundários.....	33
6 MATERIAIS E MÉTODOS	34
6.1 Delineamento.....	34
6.2 Animais.....	34
6.3 Grupos de experimentação.....	34
6.4 Procedimentos Cirúrgicos.....	35
6.4.1 Procedimento Anestésico.....	35
6.4.2 Técnica Cirúrgica.....	35
6.4.3 Pós-operatório.....	37
6.5 Obtenção de Plasma Rico em Plaquetas.....	37

6.6 Obtenção de Plaqueta Rica em Fibrina.....	39
6.7 Contagem de plaquetas.....	40
6.8 Eutanásia.....	40
6.9 Análise Funcional.....	41
6.10 Análise histomorfométrica.....	42
6.11 Análise Estatística.....	43
6.12 Aspectos Bioéticos.....	43
7 RESULTADOS.....	45
7.1 Resultados Clínicos e Cirúrgicos.....	45
7.2 Resultados da Contagem Plaquetária.....	45
7.3 Resultados Funcionais.....	46
7.4 Resultados Histomorfométricos.....	48
7.4.1 Histologia.....	49
7.4.2 Morfometria.....	51
7.4.2.1 Diâmetro da fibra.....	51
7.4.2.2 Diâmetro dos axônios.....	52
7.4.2.3 Espessura da bainha de mielina.....	53
8 DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIA.....	62
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	75
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	96
ANEXO A. Carta de aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais.....	114

1 INTRODUÇÃO

Injúrias em nervos periféricos são comuns e ocorrem frequentemente como resultado de transecções, esmagamento, compressão, isquemia, e estiramentos.^{1,2}

As transecções de nervos periféricos normalmente causam perda de sensibilidade e motricidade nervosa comprometendo as atividades diárias dos pacientes, causando impactos sócio-econômicos que representam sérios problemas a sociedade.^{3,4} O comprometimento das atividades diárias de pacientes com injúria nervosa é o fator determinante para o estabelecimento de novas técnicas de recuperação do mesmo.³

O traumatismo por transecção de nervo periférico acarreta modificações no corpo celular, nos segmentos proximal e distal à lesão, no próprio local de lesão e nos órgãos inervados pelo referido nervo.⁵ A regeneração nervosa depende de diversos fatores, como a distância entre o local de lesão e o órgão final, o mecanismo gerador do trauma, a duração do intervalo entre a lesão e o reparo cirúrgico, a idade e a condição geral do paciente, a técnica cirúrgica empregada no reparo⁶, a formação de neuromas, a extensão da lesão, o espaço criado entre os cotos nervosos (“gap” nervoso) e a disponibilidade de fatores tróficos.⁷

Regeneração nervosa é encontrada sem a intervenção cirúrgica para reparo e orientação do crescimento do nervo.^{8,9} Na maioria das ocorrências a intervenção cirúrgica torna-se a única opção terapêutica aplicável.⁵ A literatura especializada cita diversas técnicas cirúrgicas possíveis de serem empregadas na reparação nervosa, dentre estas ressalta-se a neurorrafia epineural,¹⁰ os enxertos nervosos,¹¹ e a técnica de tubulização.^{7,12,13,14} Essas alternativas utilizadas no reparo de lesões nervosas periféricas apresentam bons resultados porém demonstram problemas associados que comprometem sua eficácia e limitam o seu uso na clínica.

Diversos pesquisadores tem como foco de estudo otimizar as técnicas de reparo nervoso já utilizadas com a adição da engenharia tecidual, visando restabeler a capacidade funcional e estrutural dos nervos periféricos injuriados e diminuindo as limitações associadas a estas lesões.^{15,16,17}

Concentrados plaquetários como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido utilizados com sucesso na regeneração tecidual, devido à alta concentração de fatores de crescimento contidos nas plaquetas. Quando ativadas, as plaquetas liberam altas quantidades de fatores de crescimento como, PDGF, TGF- β 1, EGF e VEGF, que promovem proliferação e

diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese otimizando o processo regenerativo.^{10,11} O uso do PRP foi testado no reparo nervoso apresentando resultados contrastantes.^{12,13}

Plaqueta rica em Fibrina (Platelet-rich fibrin (PRF)) é definida como um concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com alto potencial regenerativo.¹⁴ Assim como o PRP, o uso do PRF é baseado na liberação de fatores de crescimento pela ativação plaquetária.¹⁵ O PRF apresenta além do concentrado de plaquetas, uma matriz de fibrina que suporta tanto as plaquetas como as células imunes circulantes, desempenhando assim mecanismos de defesa e papel importante na reparação tecidual.^{16,17}

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do PRP e do PRF no reparo de lesões de 10mm do nervo ciático em ratos, e comparar seus efeitos com o autoenxerto “padrã-ouro” e solução salina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia do nervo periférico

Os nervos periféricos são constituídos por três componentes principais, os axônios, as células de Schwann e tecido conjuntivo.¹⁸

O axônio origina-se do corpo celular no cone de implantação como um prolongamento único dos neurônios, e sua espessura é proporcional a sua velocidade de condução, quanto maior o diâmetro do axônio, maior a velocidade de condução.¹⁹ Suas funções de conduzir e receber estímulos, tanto de outros neurônios quanto de células efectoras, irão determinar seu comportamento.

As células de Schwann possuem a importante função de formar a bainha de mielina em torno dos axônios permitindo que estes tenham isolamento elétrico e proporcionando uma condução de impulsos nervosos mais rápida. Ao longo do comprimento do axônio ocorrem interrupções nesta bainha de mielina, formando intervalos regulares, que são denominados nódulos de Ranvier.¹⁹ Segundo sua relação com a célula de Schwann, os axônios podem ser classificados como mielínicos ou amielínicos. Os axônios mielínicos são recobertos pela bainha de mielina e possuem diâmetro de 2 a 24 μm , e os axônios destituídos desta bainha de mielina são chamados de amielínicos, e possuem um menor diâmetro 0,2 a 3,0 μm .^{20,21}

Nervos periférico são feixes de fibras nervosas (axônios), denominados fascículos, que são revestidos pela camada mais externa de três envoltórios de tecido conjuntivo, o epineuro. O epineuro, composto por tecido conjuntivo colagenoso contendo algumas fibras elásticas, reveste o nervo periférico como um todo protegendo os fascículos de traumas externos.^{18,22} Cada fascículo (feixe de fibra nervosa) é coberto individualmente pelo perineuro, camada média de tecido conjuntivo denso e fibroblastos que possui função de preservar o microambiente endoneural.¹⁹ A camada de tecido conjuntivo mais interna, denominada endoneuro reveste os axônios (fibra nervosa) individualmente (Figura 1). Este apresenta tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos, macrófagos, capilares, mastócitos, células de Schwann, e os nodos de Ranvier²³ que regulam o microambiente da fibra nervosa.^{24,25}

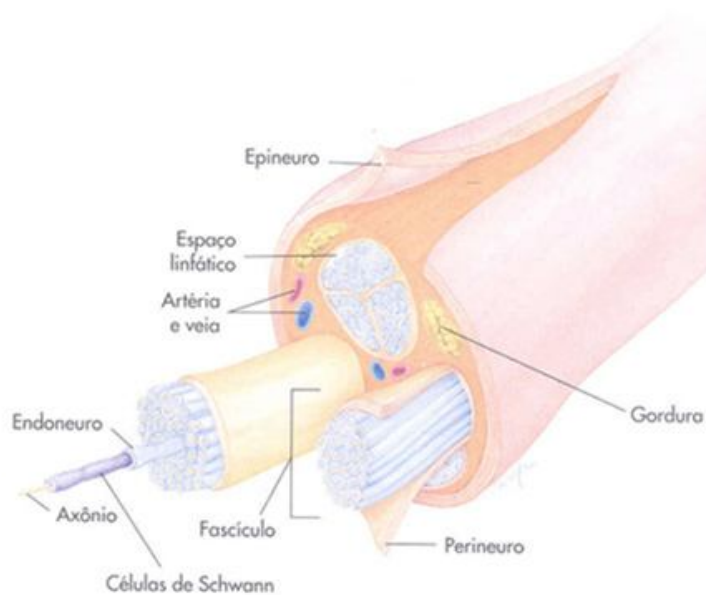


Figura 1. Figura ilustrativa da descrição anatômica do nervo periférico.

2.2 Lesões de nervos periféricos

Existem duas classificações para as injúrias nervosas: a classificação de Seddon, primeira a ser utilizada e a classificação de Sunderland.

Seddon^{26,27} classificou as lesões nervosas periféricas em:

- a) Neuropraxia — lesão leve com recuperação em semanas a meses, com perda motora e sensitiva devido a desmielinização, mas sem alteração estrutural, sem rompimento axonal ou degeneração Waleriana. A perda de função irá persistir até ocorrer a remielinização.
- b) Axonotmese — lesões causadas comumente por esmagamento ou estiramento. Ocorre perda de continuidade axonal, subsequente degeneração Walleriana do segmento distal porém não ocorre perda de célula de Schwann. A recuperação depende do grau de desorganização do nervo e também da distância ao órgão terminal.

c) Neurotmeze — lesão completa do nervo, o tronco nervoso é rompido sem ter continuidade anatômica. Ocorre a desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com conseqüente interrupção do crescimento axonal. A recuperação espontânea é pobre, não regenera sem intervenção cirúrgica.^{18,1}

Sunderland²¹ modificou a classificação de Seddon dividindo-a em cinco graus de injúria: (1) neurapraxia, (2) perda de continuidade dos axônios sem violar a bainha do endoneuro das fibras nervosas, (3) axotmeze com descontinuidade axonal e endoneural, porém o perineuro é preservado, (4) estrutura interna completamente rompida, apenas o epineuro continua intacto e a continuidade do nervo é mantida por tecido cicatricial. Esse rompimento irá gerar neuroma, (5) perda de continuidade do tronco nervoso. Nenhuma reinervação ocorre no grau 4 e 5 sem reparo cirúrgico.

A neuropraxia de Seddon foi classificada por Sunderland como lesão de grau I; a axotmeze foi dividida em três tipos, que variam de acordo com o grau da lesão (II, III, IV), e a neurotmeze foi classificada como grau V. Raramente é possível, através da classificação de Sunderland, classificar com exatidão uma lesão axotmética com base em dados clínicos e eletromiográficos. O subtipo é geralmente discriminável pelo exame histológico da lesão do nervo.^{18,28}

2.3 Degeração e Regeneração de nervos periféricos

Quando ocorre transecção completa do nervo periférico (axotomia), ocorre a degeneração imediata no local da lesão, ocasionando a retração do nervo que passa a apresentar um coto proximal e um coto distal.²⁹ No local da lesão, o intervalo formado entre os dois cotos nervosos é preenchido por sangue formando um coágulo de fibrina.³⁰ Macrófagos são recrutados para o local da lesão promovendo lise e fagocitose da mielina, e proliferação das células de Schwann.³¹ Tanto os macrófagos como as células de Schwann secretam mitógenos e fatores de crescimento que possuem papel importante na regeneração axonal e remielinização.³²

No coto distal ocorre a degeneração axonal, denominada de degeneração Walleriana, nas primeiras 48-96 horas após a injúria.³³ Devido à interrupção do contato com o corpo celular, ocorre ausência de suporte trófico e aumento da entrada de íons cálcio (Ca^{+2}) nas fibras axotomizadas levando a degeneração do coto distal, que possui início com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios.³⁴ Juntamente com este processo, as células de Schwann e macrófagos são recrutados para o local da lesão para realizar a fagocitose dos fragmentos de mielina e de neurofilamentos dos axônios em degeneração.^{35,36}

As células de Schwann possuem papel fundamental na regeneração nervosa, elas proliferam alinhando-se dentro do tubo de lâmina basal formando as bandas de Büngner,³⁷ microambiente favorável para o crescimento e direcionamento dos axônios em direção ao órgão-alvo.³⁸ Outra importante função das células de Schwann é ser fonte de fatores neurotróficos.³⁹ Estes se difundem do coto distal através da área injuriada para exercer uma influência trófica nos axônios em regeneração direcionados para o coto proximal.⁴⁰ Experimentalmente, após a transecção do nervo ciático as células de Schwann do coto distal expressam altos níveis de receptores de fator de crescimento neural (NGF), em 7 dias o número de receptores aumenta em torno de 50 vezes quando comparado aos receptores de células de Schwann de um nervo ciático normal.⁴¹

Os macrófagos também secretam fatores de crescimento e citocinas como IL-1, IL-6 e IL-12, que irão agir como fatores quimiotáticos para as células de Schwann e neurônios lesados. Além disso, removem substâncias que inibem o crescimento axonal.⁴² As células de Schwann, macrófagos e fibroblastos passam a apresentar características relacionadas à proliferação e migração celular tanto no coto proximal quanto no distal.^{43,44} Portanto, o

processo regenerativo está ligado diretamente a manutenção das células de Schwann, podendo atingir meses com a existência de sinais celulares produzidos por estas células.⁴⁵

No coto proximal, o corpo celular entra em cromatólise, processo caracterizado pela degeneração da substância de Nissl, pelo ingurgitamento da célula, e pela migração do núcleo do centro para a periferia.⁴⁶ Além disso, há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela produção de moléculas de reparo e os axônios degeneram retrogradamente até a formação do primeiro nó de Ranvier, gerando uma pequena área de degeneração Walleriana.^{19,47} Estas modificações tem como objetivo produzir proteínas, principalmente actina e tubulina, que estão intimamente relacionadas com a movimentação do cone de crescimento.⁴⁸

Poucas horas após a lesão, na extremidade do coto proximal os axônios injuriados formam diversos brotos neurais (protrusões axoplasmáticas),⁴⁹ que com o aumento de mitocôndrias irão formar os cones de crescimento. O cone de crescimento é considerado a extremidade de um axônio bem desenvolvido, e possui duas porções, a região do lamelipódio e os filopódios, que juntos formam uma rede complexa que permite o cone de crescimento explorar o microambiente extracelular e se ligar as células de Schwann formando a reorientação para ocorrer o crescimento axonal em direção ao coto distal.⁵⁰ A sobrevivência das células de Schwann é fundamental para o crescimento do cone e geralmente ocorre por interações destes elementos mediada por moléculas de adesão celular (CAMS) expressa por ambos elementos.⁴⁵ As células de Schwann liberam fatores de crescimento que podem potencializar a regeneração axonal pela superregulação da expressão de CAMS.⁵¹

Conforme os axônios são regenerados, as células de Schwann são mantidas pela atuação de fatores de crescimento como o IGF, o PGF e o NT-3 que são liberados no local da lesão.⁵² Os fatores de crescimento também possuem a função de conservar a integridade dos axônios no coto distal e permitir que estes atinjam os órgãos-alvo.⁵³

Fatores de crescimento são polipeptídeos constitutivos que são superregulados e particularmente ativados em situações de traumas ou inflamação. Dentro dos fatores de crescimento, estão os fatores neurotróficos que estão relacionados à regeneração de nervos periféricos.⁵⁴ No processo de regeneração nervosa, os fatores neurotróficos exercem seus efeitos de regular e manter a função do neurônio promovendo seu crescimento diretamente sobre o metabolismo celular, no entanto, eles também podem atuar indiretamente pela ação no metabolismo de células de suporte, sendo a célula de Schwann a principal representante.⁴⁴

Os nervos degenerados são importantes fontes de fatores neurotróficos, assim como as células de Schwann, estes se dividem em 3 famílias de moléculas e seus receptores, e são responsáveis pelo crescimento e sobrevivência dos axônios e neurônios motores e sensitivos após danos teciduais. Várias substâncias que são produzidas no local da lesão atuam como fatores neurotróficos, dentre elas se destacam: o Fator neurotrófico derivado do cérebro (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), o Fator de crescimento do nervo (nerve growth factor, NGF), o Fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF), o Fator neurotrófico ciliar (ciliar neurotrophic factor, CNTF), o Fator de crescimento transformador- β (transforming growth factor- β , TGF- β), o Fator de crescimento insulínico (insulin-like growth factor, IGF), o Fator de crescimento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF) e as neurotrofinas (NF). Estes exercem seus efeitos separadamente, porém podem ter efeitos complementares.^{55,54}

O uso do NGF demonstrou capacidade de otimizar o processo de regeneração de nervos periféricos, aumentando a capacidade de recuperação funcional após lesão nervosa.⁵⁶ Embora, o NGF apresente efeitos positivos após lesão periférica, doses excessivas deste fator no local da lesão podem inibir o processo de regeneração.⁵⁷

Estudo experimental evidenciou que a dose e duração dos níveis de NGF são determinantes para a recuperação após injúria nervosa em ratos.⁵⁸ Wang et al., 2010 incorporaram o NGF em condutos de PLGA para reparar defeitos de 13 mm no nervo ciático de ratos. Os resultados demonstraram que a recuperação funcional do grupo PLGA/NGF foi superior quando comparada ao grupo que utilizou apenas o conduto de PLGA, demonstrando que o NGF juntamente com o conduto de PLGA otimiza o processo de recuperação de nervos periféricos.⁵⁹

A administração de BDNF também possui a capacidade de otimizar a regeneração de nervos periféricos após transecção nervosa.⁶⁰ E este efeito benéfico do BDNF pode ser aumentado com a administração conjunta de CNTF.⁶¹

Estudo experimental em ratos avaliou o efeito de injeção de CNTF na regeneração de nervos ciáticos. O CNTF demonstrou capacidade de promover regeneração dos axônios motores, aumentando a recuperação funcional nervosa.⁶² Outro estudo envolvendo CNTF, utilizou o tubo de PLGA/chitosan acrescido de CNTF foi para reparar defeitos de 25 mm do nervo tibial de cães. As avaliações histológicas demonstraram que o tubo de PLGA/Chitosan-CNTF obteve resultados semelhantes ao enxerto autólogo (padrão ouro), tornando o conduto juntamente com o CNTF uma alternativa promissora na regeneração nervosa.⁶³ A utilização de

GDNF também foi evidenciada na regeneração de lesões de 13 mm no nervo ciático de ratos.⁶⁴

Diversos estudos demonstraram a eficácia de fatores de crescimento específicos no reparo de lesões de nervos periféricos, porém a regeneração nervosa completa depende da ação conjunta de diferentes fatores neurotróficos, estes agindo de forma sinérgica ou em seqüência definida.⁵⁴

A regeneração após reparo cirúrgico é mais lenta que a regeneração espontânea, e esta regeneração axonal não é sinônimo de retorno funcional. Após os axônios atingirem seus órgãos-alvo, deve ocorrer a remielinização, alargamento axonal, e estabelecimento de conexões com os órgão alvos para resultar na recuperação funcional.⁶⁵ Em humanos, estima-se que a taxa de crescimento axonal seja de aproximadamente 1 mm/dia, porém esta taxa não é linear devido à variabilidade individual.²²

2.4 Técnicas de reparo de nervos periféricos

Traumatismos por transecção em nervos periféricos raramente apresentam recuperação sem a intervenção cirúrgica.^{8,9} A literatura especializada cita diversas técnicas cirúrgicas possíveis de serem empregadas na reparação nervosa periférica, dentre estas a neurorrafia epineural,¹⁰ neurorrafia fascicular,⁶⁶ enxertos nervosos,¹¹ aplicação de cola de fibrina,¹⁷ aplicação de laser,^{67,68} aplicação de estímulo elétrico,⁶⁹ e técnicas de tubulização com condutos de diferentes materiais.^{7,12,70,13,14}

Quando houver interrupção da continuidade do nervo, sem perda de substância nervosa, a técnica cirúrgica mais utilizada é a sutura direta também chamada de neurorrafia. A neurorrafia consiste na sutura das extremidades do nervo lesado, porém quando o defeito formado entre os cotos nervosos for longo demais esta técnica não é aconselhada, pois causa tensão excessiva no nervo levando a uma maior formação de cicatriz, impedindo o fluxo microvascular e prejudicando a qualidade da regeneração nervosa.^{71,72} O uso de veias para reparar lesões nervosas tem sido vastamente pesquisado. Estudos experimentais^{73,74} e clínicos^{75,76,77} demonstraram a eficácia de veias no reparo de lesões nervosas, porém seu uso tem maior efetividade em defeitos nervosos pequenos.⁷⁵

Os enxertos surgem como alternativa quando as lesões de nervos periféricos formam longos defeitos. Os aloenxertos são considerados bons condutos nervosos pois atuam como *scaffold* temporário permitindo regeneração nervosa do paciente. Aloenxertos nervosos podem ser constituídos por tecido nervoso cadavérico ou de doador vivo, e ambos demonstram bons resultados no reparo de longos defeitos nervosos, tanto experimentalmente quanto clinicamente.^{78,79,80} Porém, a necessidade de imunossupressão sistêmica limita o uso clínico de aloenxertos nervosos, pois os imunossupressores podem causar problemas como infecções oportunistas e formação de tumor.⁸¹

O transplante autólogo, também denominado autoenxerto, de nervo periférico representa atualmente o padrão ouro de reparação quando há perda de substância nervosa que impossibilite a neurografia. Este apresenta algumas limitações como a necessidade de realização de dois procedimentos cirúrgicos em locais distintos, maior morbidade e a escassez de sítios doadores, e déficit sensitivo resultante na área doadora.^{82,8,71,83,76}

Philippeaux e Vulpian foram os pioneiros a utilizar enxerto autólogo, e observaram regeneração nervosa confirmada por neovascularização do enxerto.⁸⁴

Outra alternativa para os casos em que a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos nervosos⁸⁵ é a técnica de tubulização, a qual utiliza condutos artificiais para substituir o uso de autoenxerto.

Esta técnica, também denominada entubulação, é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma prótese tubular, formando um microambiente ideal para a regeneração nervosa^{72,86,87}. Proporciona ainda o direcionamento do crescimento das fibras nervosas do coto proximal ao coto distal⁸ protegendo-as do tecido cicatricial e evitando a formação de neuroma.⁴⁷

Numerosas referências relatam a utilização de diferentes materiais para a confecção dos condutos nervosos,^{14,88,89} dentre eles o uso do silicone.⁹⁰

Lundborg *et al.* desenvolveram um modelo experimental utilizando tubo de silicone com o objetivo de estudar a regeneração nervosa sem a interferência do meio externo²³ e o estudo demonstrou que o silicone era ideal para regeneração.⁹¹

Em (1991) Lundborg *et al.* relataram uma aplicação clínica em um paciente de 21 anos com perda de 3 mm do nervo mediano no punho. Após três anos, em virtude do desconforto ocasionado pelo tubo de silicone, os autores realizaram uma revisão do procedimento anterior, constatando neoformação nervosa completa e considerando o aspecto macroscópico como

normal, sem sinais de compressão causada pelo tubo. A recuperação motora e sensitiva foi relatada como excelente.⁹² Em 1997 o mesmo grupo realizou um estudo prospectivo, randomizado e comparativo da utilização do tubo de silicone e do enxerto microcirúrgico convencional em 18 pacientes. Os pesquisadores evidenciaram uma recuperação sensitiva mais rápida no grupo em que foi utilizado o tubo de silicone.⁹³

A técnica de tubulização pode ser otimizada com acréscimo de fatores neurotróficos, componentes da matriz extracelular, células diferenciadas e indiferenciadas,⁹⁴ e concentrados de plaquetas.^{12,95}

Rodríguez et al., avaliou a habilidade de células de Schwann transplantadas em regenerar nervos ciáticos com lesões de 6mm em ratos. Os resultados mostraram que essas células podem ser uma alternativa promissora para regenerar longos defeitos de nervos periféricos.⁹⁶

Estudo envolvendo células tronco objetivou investigar se MSCs possuem capacidade de melhorar os resultados das reparações nervosas com enxerto de nervo acelular em um modelo de defeito de 10 mm do nervo ciático em camundongos. O enxerto de nervo acelular acrescido de MSCs otimizou a recuperação funcional e demonstrou um maior número de axônios na regeneração nervosa quando comparada ao enxerto de nervo acelular sozinho.¹⁵

Outro grupo de pesquisa realizou uma comparação do uso de BMSCs e OADNCs para regenerar lesão de 10mm do nervo ciático de ratos. Ambos os tipos celulares apresentaram bons resultados funcionais e morfométricos.⁷⁴

Em estudo envolvendo fatores de crescimento, Ho et al., demonstraram que o tubo de colágeno acrescido dos fatores de crescimento BDNF e CNTF demonstrou uma melhora na recuperação funcional em modelo de lesão do nervo ciático em ratos.⁹⁷ Em 2011, com o objetivo de avaliar o efeito do GDNF na reparação de lesões de 1,5cm do nervo ciático de ratos durante 16 semanas, os autores realizaram análises funcionais e histológicas que demonstraram a efetividade do GDNF em melhorar a regeneração nervosa através da técnica de tubulização.¹⁶

2.5 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O plasma rico em Plaquetas (PRP) é definido como um volume de plasma autólogo que possui concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos.⁹⁸ Ele é constituído por uma pequena porção de plasma e principalmente por plaquetas. O plasma é a porção líquida do sangue que contém sais e compostos orgânicos, como aminoácidos, lipídios, vitaminas, proteínas e hormônios.⁹⁹

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos formados na medula óssea, e estão concentradas no baço. São células de aproximadamente 2 μ m de diâmetro, anucleadas, que possuem alfa-grânulos contendo fatores de crescimento, citocinas, e proteínas bioativas que possuem papel importante na homeostase de locais lesados e regulam e iniciam os primeiros estágios da regeneração tecidual.^{100,101} A concentração normal de plaquetas no sangue humano varia entre 150.000 a 400.000 plaquetas/ μ l, e estas permanecerão na circulação em média por dez dias antes de serem removidas pelos macrófagos.¹⁰²

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) deve possuir a concentração de 1,000,000 plaquetas/ μ l, em um volume de 5ml de plasma para ser considerado terapêutico (aumentar a capacidade regenerativa), ou seja, as plaquetas estão 4-5x mais concentradas, tendo assim o mesmo aumento nas concentrações de fatores de crescimento.⁹⁸ O PRP é constituído por 95% plaquetas, 4% células vermelhas e 1% células brancas, enquanto o hematoma formado naturalmente pelo sangue basal possui 95% células vermelhas, 4% plaquetas e 1% células brancas.¹⁰³

Em resposta ao dano tecidual, ocorre a ativação das plaquetas e formação de um coágulo que promove hemostase e secreção de proteínas ativas. A coagulação leva a ativação plaquetária, que resulta na liberação dos fatores de crescimento contidos nos alfa-grânulos das plaquetas, processo denominado de degranulação. Aproximadamente 70% dos fatores de crescimento são liberados nos primeiros 10 minutos, pico de liberação, e o restante é liberado dentro de 1 hora. Pequenas quantidades de fatores de crescimento podem continuar sendo liberadas pelas plaquetas durante o resto de tempo de suas vidas (8-10 dias).⁹⁸

Os principais fatores de crescimento liberados pelas plaquetas são três isômeros do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF; PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$), dois isômeros do fator de crescimento transformador (TGF; TGF β 1 e TGF β 2), fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes fatores

de crescimento desempenham diversas funções como promover a proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese.^{104,105,98}

O PDGF é uma proteína dimérica consistida por 2 subunidades: a e b, e pode ser encontrado em 3 combinações: PDGF-aa, PDGF-bb, e PDGF-ab. É encontrado principalmente nas plaquetas, monócitos, macrófagos, células musculares lisas, células endoteliais.¹⁰⁶ O PDGF é o primeiro fator de crescimento que age no processo de regeneração e seu efeito depende da presença de outros fatores de crescimento. Sua principal função é estimular mitose, aumentando o número de células regenerativas (incluindo células tronco mesenquimais, células osteoprogenitoras e fibroblastos), e angiogênese.¹⁰⁷ Outra função importante do PDGF é ativar os macrófagos que irão estimular a secreção de fatores de crescimento pelos tecidos adjacentes.¹⁰⁸

Encontrado em altas concentrações nas plaquetas e nos ossos¹⁰⁹ o TGF não tem sua ação limitada ao microambiente das células que o produzem.¹¹⁰ Quando liberado pelas plaquetas ou secretado pelos macrófagos o TGF-beta1 exerce seus efeitos nas células adjacentes, incluindo fibroblastos, células tronco da medula, células endoteliais, e pré-osteoblastos.^{111,107} As plaquetas secretam isômeros b1 e b2 que estão envolvidos em todos os estágios da regeneração, tendo papel importante na inflamação, angiogênese, reepitelização, e regeneração de tecido conectivo.¹¹³

O TGF possui efeitos adversos, ele possui habilidade de antagonizar os efeitos mitógeno de outros fatores de crescimento, como PDEGF e PDGF possuindo assim ação anti-proliferativa.¹¹⁴

Outros importantes fatores de crescimento encontrados no PRP são o VEGF e EGF. O VEGF tem como principais funções aumentar a permeabilidade do microambiente, promover proliferação e migração celular,¹¹⁵ e angiogênese¹¹⁶ e o EGF é um potente mitógeno para fibroblastos, células epiteliais e endoteliais estimulando a epitelização, e também estimula angiogênese.^{117,118}

Diversos estudos têm demonstrado que o PRP é uma fonte abundante dos fatores de crescimento PDGF, TGF, EGF, e VEGF.^{119,120,102} Comparações realizadas por Teste de Elisa entre amostras de sangue basal e PRP mostraram que o PRP apresentou aumento de 3,6x na concentração do TGF- β 1, 5,1x na concentração do PDGF-bb, 3,9x na concentração do EGF e 6x na concentração do VEGF quando comparado com o sangue basal.¹⁰²

A eficácia do PRP depende dos níveis dos fatores de crescimento secretados pela ativação plaquetária.^{102,105} Estes níveis dos fatores de crescimento irão depender de fatores como, a concentração destes nos alfa-grânulos, a técnica de processamento do PRP, e a proporção de plaquetas que são ativadas.^{102,121} A literatura verificou que existe uma tendência geral linear na correlação entre o número de plaquetas e a concentração dos fatores de crescimento.^{98,102} Porém, alguns autores^{122,105} ressaltam que podem existir diferenças nos resultados encontrados nesta correlação entre número de plaquetas e concentração de fatores de crescimento devido a variabilidade individual na produção e estoque dos fatores de crescimento e das diversas técnicas de ativação do PRP utilizadas.

O PRP ainda é constituído por fibrina, fibronectina e vitronectina que atuam como moléculas de adesão celular e otimizam o processo de reparo tecidual promovendo migração celular.^{100,98} O PRP possui as mesmas concentrações destas moléculas de adesão que o sangue basal, por isso não pode ser considerado uma matriz de fibrina (200 µg-400 µg/ml).⁹⁸

A obtenção do PRP só pode ser realizada a partir de sangue anticoagulado, pois a formação de coágulo irá reter as plaquetas inviabilizando-as.¹⁰⁰ Este pode ser mantido viável por 8h em anticoagulante.¹¹⁹

A preparação do PRP tem início com a adição de anticoagulante ao sangue coletado para prender o cálcio ionizado inibindo a cascata de coagulação. O anticoagulante ACD-A é considerado ideal para a obtenção de concentrados de plaquetas, pois este mantém a viabilidade das plaquetas durante um período mais longo.⁹⁸

Logo após, as amostras de sangue anticoagulado são submetidas a primeira centrifugação que irá separar o sangue em 3 camadas distintas: células vermelhas, plaquetas e células brancas do plasma. Células vermelhas (7 µm diâmetro) e células brancas (7-15 µm diâmetro) são muito maiores que as plaquetas (2 µm diâmetro) por isso se separam facilmente durante o processo de centrifugação.¹⁰⁰ As camadas contendo o plasma e plaquetas são retiradas e colocadas em um novo tubo que irá ser submetido a segunda centrifugação. Esta irá concentrar as plaquetas formando assim duas camadas: o PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP). O PRP necessita ser ativado, pela adição de cloreto de cálcio e trombina bovina, para reverter a ação do anticoagulante e ativar a coagulação, induzindo a ativação plaquetária.¹¹⁹

O PRP vem sendo utilizado com sucesso tanto experimentalmente,^{123,17,124} quanto clinicamente,^{125,126,127,128} mostrando ser um material promissor na regeneração tecidual.

O uso do PRP já foi testado na regeneração nervosa demonstrando resultados contrastantes. Sariguney et al., utilizaram o PRP juntamente com a neurografia para reparar lesões do nervo ciático de ratos. O PRP otimizou a remielinização dos nervos lesados sendo considerado uma opção para a regeneração de nervos periféricos.¹²⁹ Em contraste, Piskin et al., utilizaram tubo de colágeno acrescido com gel de plaqueta para reparar lesões de 10mm no nervo ciático de ratos Wistar, e não evidenciaram melhora na regeneração axonal¹⁷.

Existem, porém problemas ligados ao uso do PRP. Estes são o manejo das amostras, que propicia a ocorrência de erros e também aumenta a chance de contaminação, e o uso da trombina bovina que pode causar complicações, podendo resultar em coagulopatias.¹³⁰

2.6 Plaqueta Rica em Fibrina (PRF)

A Fibrina Rica em Plaqueta (*Platelet-Rich Fibrin*, PRF) foi desenvolvida pela primeira vez por Choukroun et al.,¹³¹ na França, e é definida como um concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com alto potencial regenerativo.¹³²

Assim como o PRP, o uso do PRF está baseado na liberação de fatores de crescimento pela ativação das plaquetas. A degranulação das plaquetas faz com que seus fatores de crescimento sejam liberados acelerando o processo de reparação tecidual.¹³³ As plaquetas liberam pelo menos sete fatores de crescimento que atuam na fase inicial da cicatrização, os três isômeros do fator de crescimento plaquetário PDGF, PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$, os dois isômeros do fator de crescimento beta (TGF β), TGF $\beta\beta$ 1 e TGF $\beta\beta$ 2, fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que possuem papel fundamental no reparo tecidual.^{134,98}

O PRF apresenta além do concentrado de plaquetas, uma matriz de fibrina contendo todos os elementos moleculares e celulares que permitem a cicatrização ideal.¹³⁵ Esta matriz de fibrina suporta tanto as plaquetas como as células imunes circulantes e possui capacidade de guiar a angionênese, permitir a migração de células endoteliais e fibroblastos e promover o remodelamento da fibrina em tecido conectivo resistente. Desempenhando assim mecanismos de defesa e papel importante na reparação tecidual.¹³⁶

A técnica de obtenção do PRF é muito parecida com o Plasma Rico em Plaquetas, porém ela não requer a adição de fatores externos como, anticoagulante, trombina bovina, ou outros agentes gelificantes.¹³⁵

O sangue é coletado em tubos plásticos sem adição de anticoagulante e é imediatamente centrifugado na velocidade de 3000 rpm (aproximadamente 400 g) por 10 minutos. Este processo deve ser realizado rapidamente, pois assim que o sangue entra em contato com a parede do tubo a cascata de coagulação é iniciada, causando a ativação plaquetária, e subsequente liberação dos fatores de crescimento. Durante a centrifugação o fibrinogênio é revertido em fibrina formando um coágulo.

Após a centrifugação o coágulo se encontra na parte média do tubo, abaixo se encontram as células vermelhas e acima se encontra o plasma acelular. As plaquetas e células imunes, principalmente leucócitos, estão aderidas nas malhas de fibrina, sendo encontradas dentro do coágulo de fibrina.¹³⁵

O sucesso da técnica de obtenção do PRF depende da rapidez da coleta de sangue e da sua transferência para a centrífuga. De fato, sem a adição de anticoagulante, as amostras de sangue iniciam a coagulação quase imediatamente no contato com o tubo de vidro.¹³⁷ O manejo rápido é a única maneira de se obter um coágulo de PRF viável.¹³⁵

O PRF é resultado de uma polimerização natural e progressiva que ocorre durante a centrifugação das amostras. Esta polimerização realizada com trombina fisiológica forma uma arquitetura matricial elástica.¹³⁸ A distribuição de plaquetas e leucócitos não é uniforme nas malhas de fibrina, elas se encontram concentradas na camada intermediária localizada entre as células vermelhas e o coágulo de PRF, representando uma “zona de névoa” na superfície do coágulo de PRF.¹³⁹

Além disto, a polimerização lenta e progressiva gera um aumento na incorporação de citocinas nas malhas de fibrina, com isso aumentando o tempo de vida das mesmas, tendo assim um efeito prolongado.¹³⁸ Os fatores de crescimento PDGF-AB, TGF-beta 1, VEGF e EGF possuem uma liberação aumentada constante até 60 minutos após a formação do coágulo de PRF, e após este período até 300 minutos ocorre uma liberação ainda maior dos mesmos.¹³⁴

A eficiência do PRF reside neste prolongado fornecimento de fatores de crescimento e de proteínas bioativas contidos no coágulo de PRF que otimizam a regeneração tecidual.

Além disto, o coágulo de fibrina constitui a primeira matriz cicatricial no local da lesão estimulando a migração celular e o processo de reparo.

Contudo, o PRF possui diversas vantagens sobre o PRP: elimina o processo redundante de adicionar anticoagulante e o neutralizar com cloreto de cálcio e não utiliza trombina bovina; a eliminação destes passos diminui o manejo bioquímico das amostras e o risco de transmissão de doenças associado ao uso da trombina bovina, tornando o protocolo de obtenção de PRF mais simples e seguro que o do PRP.¹³⁷

Estudos *in vitro*,^{140,141,142} experimentais¹⁴³ e clínicos^{144,132} vem demonstrado bons resultados com o uso de PRF, evidenciando a eficiência do mesmo na regeneração de tecidos.

Em estudo clínico, Sanchez et al., utilizaram o PRFM no tratamento do tendão de Aquiles de 12 atletas. Os resultados mostraram que o PRFM otimizou a regeneração tendínea e a recuperação funcional.¹⁴⁵ O PRF também demonstrou ser eficiente na regeneração timpânica de humanos, acelerando a proliferação celular e remodelamento da matriz.¹⁴⁶ Bracini & Dohan, avaliaram o uso do PRF para otimizar os enxertos adiposos na lipoestrutura facial em 32 pacientes. Todos os pacientes ficaram satisfeitos com os resultados, e ocorreu pequena reabsorção associada.¹⁴⁷ Em ensaio clínico recente, o PRF demonstrou capacidade de otimizar a regeneração óssea em defeitos intra-ósseos na periodontite crônica sendo considerado um biomaterial promissor na regeneração óssea.¹⁴⁸

3 JUSTIFICATIVA

A procura por alternativas que sejam eficazes no reparo de transecções de nervos periféricos é de extrema importância, uma vez que estas injúrias apresentam regeneração nervosa limitada e causam importantes impactos sócio-econômicos. Otimizar o processo regenerativo nervoso através de tratamentos eficientes e seguros é o objetivo dos pesquisadores. A engenharia tecidual vem sendo vastamente utilizada no campo da medicina regenerativa, e os concentrados plaquetários apresentam resultados promissores no processo regenerativo. O Plasma Rico em Plaquetas e a Plaqueta Rica em Fibrina podem demonstrar a capacidade de otimizar e acelerar a regeneração nervosa, pois ambos são fontes de fatores neurotróficos essenciais no processo de regeneração de nervos periféricos.

4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese Operacional

Não existe diferença entre o uso de PRP e PRF na regeneração estrutural e funcional de lesões de 10mm em nervos ciáticos de ratos wistar.

4.2 Hipótese Conceitual

Existe diferença entre o uso de PRP e PRF na regeneração estrutural e funcional de lesões de 10mm em nervos ciáticos de ratos wistar.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Primário

Avaliar o efeito do uso de Plasma rico em plaquetas (PRP) e de Plaqueta rica em fibrina (PRF) no reparo de lesões agudas de grande porte em nervo ciático de ratos Wistar.

5.2 Objetivos Secundários

1. Avaliar quantitativa e qualitativamente as diferenças dos grupos experimentais de tratamento, PRP e PRF, com o grupo tratado com enxerto autólogo na regeneração do nervo ciático de ratos Wistar;
2. Avaliar quantitativa e qualitativamente as diferenças dos grupos experimentais de tratamento, PRP e PRF, com o grupo controle (solução fisiológica) na regeneração do nervo ciático de ratos Wistar.
3. Avaliar quantitativa e qualitativamente as diferenças entre os grupos experimentais de tratamento, PRF e PRP, na regeneração do nervo ciático de ratos Wistar;
4. Avaliar quantitativa e qualitativamente as diferenças entre o grupo tratado com enxerto autólogo e o grupo controle (solução salina) na regeneração do nervo ciático de ratos Wistar;

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Delineamento

Estudo experimental, comparado, controlado e cego.

6.2 Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos adultos (acima de 60 dias de vida) pesando 200 - 250 gramas de massa corporal. Todos os animais foram provenientes do vivário do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica (LHMPC) da Faculdade de Medicina da PUCRS, e mantidos no mesmo local no período pós-operatório. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com água e alimentação *ad libitum*.

Estando o presente estudo conforme Lei Arouca 2008, nº 11.794/08 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

6.3 Grupos de Experimentação

O experimento foi constituído por 4 grupos, sendo os grupos experimentais PRP e PRF compostos por 10 ratos, 8 ratos utilizados nos experimentos e 2 ratos doadores de sangue. E os grupos controles de autoenxerto e solução salina compostos por 8 ratos cada. Os grupos estão representados abaixo:

Grupo I– Autoenxerto (AE) (n=8);

Grupo II– Tubulização com adição de solução salina (TS) (n=8);

Grupo III– Tubulização com adição de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (n=10);

Grupo IV– Tubulização com adição de Plaqueta Rica em Fibrina (PRF) (n=10).

6.4 Procedimentos Cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da PUCRS.

6.4.1 Procedimento Anestésico

Para realização das cirurgias os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Cetamina (60 mg.kg^{-1}) e meperidina (20 mg.kg^{-1}).

6.4.2 Técnica Cirúrgica

Os animais foram tricotomizados na área de acesso cirúrgico e colocados em decúbito lateral direito sobre bolsa térmica aquecida de forma a evitar hipotermia trans-operatória.

Uma incisão longitudinal foi realizada 3mm paralela e posterior ao eixo do fêmur direito, desde o tubérculo maior do fêmur até a região postero-lateral do joelho. A pele foi divulsionada, o músculo glúteo e bíceps femoral foram divididos por dissecação e o nervo ciático foi visualizado. O nervo ciático foi liberado de suas inserções fasciais, e um segmento do nervo foi ressecado criando defeito de 10 mm no nervo ciático.

No grupo tratado com autoenxerto (grupo I), foi realizada a secção de um segmento de 10 mm no nervo ciático (Figura 1) que foi reparada com o mesmo segmento invertido 180° graus para alterar a disposição fascicular. O músculo foi suturado com fio polipropileno (Prolene® 6-0, M8306 T, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) e a pele foi suturada com fio mononylon 4-0 (Ethilon® P1667, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil).



Figura 2. Seção de 10 mm do nervo ciático de ratos wistar.

Nos grupos que foram reparados com sistema de tubulização (grupo II, III e IV), um segmento do nervo ciático de aproximadamente 5 mm foi ressecado, gerando um defeito de 10 mm. Um tubo de silicone de 12 mm foi interposto nas extremidades proximal e distal do nervo através de dois pontos de sutura ao epineuro em cada extremo, utilizando um fio mononylon 9-0 (Ethilon®, BV130-4, Johnson & Johnson Intl., Belgium). O tubo de silicone foi preenchido com solução salina, Plasma rico em plaquetas, ou com Plaqueta rica em fibrina, de acordo com os grupos (Figura 2). O músculo foi suturado com fio polipropileno (Prolene® 6-0, M8306 T, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) e a pele foi suturada com fio mononylon 4-0 (Ethilon® P1667, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil).



Figura 3. Tubo de silicone suturado a extremidade proximal do nervo ciático danificado preenchido com PRF.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil) e desenvolvidos de forma asséptica.

6.4.3 Pós-operatório

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais após as cirurgias no mesmo laboratório de origem. No pós-operatório imediato foi aplicado cetoprofeno (5mg.kg^{-1}) via subcutânea a cada 24 horas durante 2 dias, como medicação analgésica e antiinflamatória e cloridrato de tramadol via subcutânea (5mg.kg^{-1}) a cada 12 horas durante 2 dias, como medicação analgésica.

6.5 Obtenção de Plasma Rico em Plaquetas

Utilizaram-se 2 ratos machos adultos doadores de sangue, que foram anestesiados com com injeção intramuscular de Cloridrato de Cetamina (60 mg.kg^{-1}) e meperidina (20 mg.kg^{-1}) na mesma seringa via intramuscular. A artéria aorta de cada animal foi canulada e foram coletados aproximadamente 6 ml de sangue de cada rato doador com seringa contendo 1,2 ml

de anticoagulante ácido citrato dextrose- A (ACD-A) para evitar a degranulação das plaquetas. Foram transferidos 0,05 ml de sangue para tubos Eppendorf para contagem de plaquetas do sangue total. O restante do sangue (aproximadamente 6 ml) foi centrifugado para a obtenção de PRP. No final do processo, a partir destes 6 ml de sangue foram obtidos 0,6 ml de PRP, 10% do sangue basal.

O sangue anticoagulado foi centrifugado na velocidade de 1800 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente em centrífuga para laboratório Hettich modelo Universal 320, conforme protocolo adaptado¹²⁴. Ao final da centrifugação se formaram três camadas: a camada inferior onde estão os remanescentes sanguíneos (RBC) (55% do volume total), a camada intermediária, chamada de “zona de névoa” onde estão as plaquetas (5% do volume total), e a camada superior, porção do plasma acelular (PPP) (40% do volume total) (Figura 3).

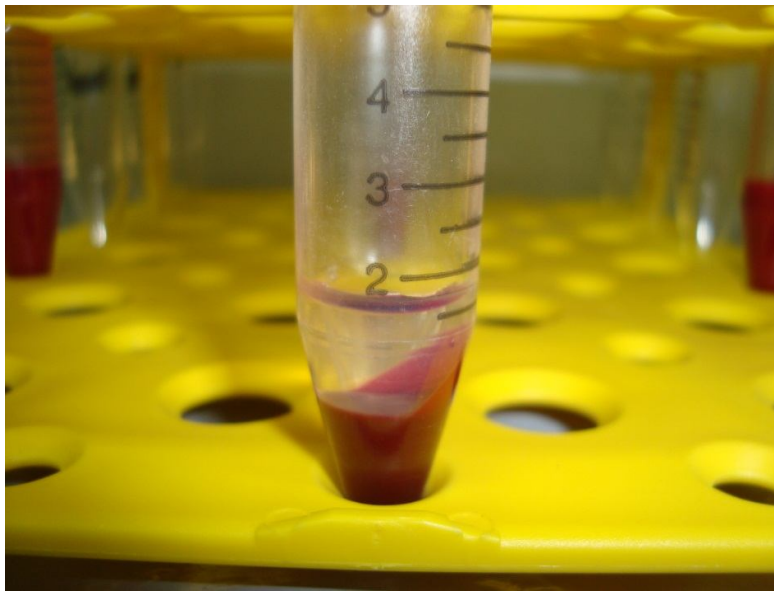


Figura 4. Sangue do rato após a 1ª centrifugação para obtenção do PRP. Na porção superior encontra-se o plasma acelular, na porção inferior estão os remanescentes sanguíneos e a porção intermediária corresponde as plaquetas.

A camada superior contendo plasma acelular e a camada intermediária, foram cuidadosamente pipetadas e transferidas para um novo tubo sem anticoagulante que foi centrifugado novamente. Esta segunda centrifugação realizada na velocidade de 3600 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Ao final da segunda centrifugação, se formaram duas camadas: a camada inferior contendo o PRP e poucos remanescentes sanguíneos (RBC) e a

camada superior contendo o plasma acelular. O plasma acelular foi removido e guardado para calibrar a concentração de plaquetas do PRP em 1.000,000 de plaquetas/ μ l antes de ser utilizado nas cirurgias. O restante no tubo, aproximadamente 0,6 ml, corresponde ao PRP. Destes 0,6 ml de PRP obtidos, 0,05 ml foram transferidos para tubo Eppendorf para a contagem de plaquetas do PRP. O PRP restante, 0,550 ml, foram calibrados na concentração de 1.000,000 de plaquetas/ μ l e ativados para uso nas cirurgias.

A ativação do PRP foi realizada apenas no momento de aplicação na cirurgia. O PRP foi ativado pela adição de 1:1 Beriplast, mistura de cloreto de cálcio 6% (CaCl_2) e trombina humana 600U, ao PRP. Foram inseridos 0,02 ml de PRP e 0,02 ml de Beriplast em cada tubo de silicone. Após ativação, o PRP ativado formou um gel dentro do tubo de silicone.

6.6 Obtenção de Plaqueta Rica em Fibrina

Utilizaram-se 2 ratos machos adultos doadores de sangue, que foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Cetamina (60 mg.kg^{-1}) e meperidina (20 mg.kg^{-1}) na mesma seringa via intramuscular.

A artéria aorta de cada animal foi canulada e foram coletados aproximadamente 6,5ml de sangue de cada rato doador. O sangue foi dividido em 2 tubos, um tubo Falcon sem adição de anticoagulante no qual foram adicionados aproximadamente 6ml de sangue para a obtenção do PRF e o outro tubo Eppendorf contendo 20% de anticoagulante ácido citrato dextrose- A (ACD-A) no qual foram adicionados 0,05 ml de sangue para contagem de plaquetas do sangue total.

O tubo contendo o sangue sem adição de anticoagulante foi rapidamente centrifugado na velocidade de 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, conforme protocolo estabelecido¹³⁵. Após a centrifugação, 3 camadas se formaram: a camada inferior com os remanescentes sanguíneos (RBC), a camada intermediária contendo o coágulo de PRF e a camada superior de plasma pobre em plaquetas (PPP). O coágulo de PRF foi retirado do tubo com auxílio de pinça cirúrgica reta e separado dos remanescentes sanguíneos com tesoura cirúrgica (Figura 4). O coágulo de PRF foi recortado em pequenos pedaços e introduzidos dentro do tubo de silicone no momento da cirurgia. O restante do coágulo foi colocado em placa estéril de metal para liberar o soro contido nele. Após 10 minutos este soro foi coletado e utilizado para contagem de plaquetas PRF.

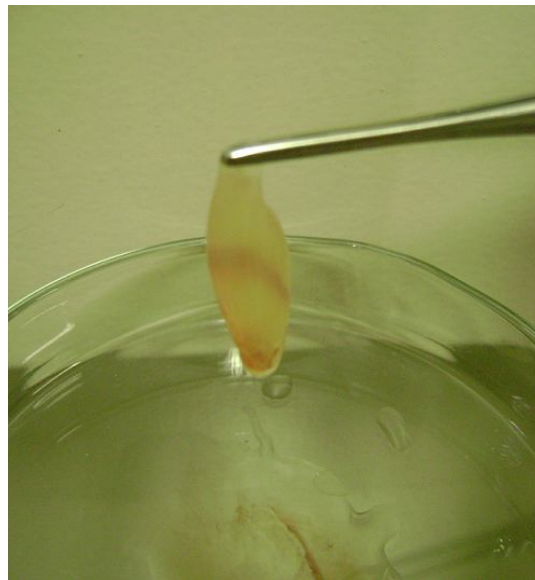


Figura 5. Coágulo de PRF.

6.7 Contagem de plaquetas

A quantificação das plaquetas do sangue total dos ratos, e das amostras de PRP e PRF foram realizadas no contador automatizado de células sanguíneas CELM modelo CC530, utilizado pelo laboratório do Hospital Veterinário da UFRGS, de acordo com especificações do fabricante.

6.8 Eutanásia

Após 90 dias pós-operatórios os animais foram anestesiados conforme protocolo anteriormente descrito, e eutanasiados com sobredose do mesmo medicamento sem provocar dor ou outro sofrimento ao animal.

6.9 Análise funcional

Os animais foram submetidos ao Teste de marcha, de acordo com o método De Medinaceli et al.,1982¹⁴⁹ e modificado por Lowdon et al., 1988.¹⁵⁰ O Índice de Função Ciática (IFC) foi calculado de acordo com o método de Bain et al.,1989¹⁵¹ para cada rato.

Foram obtidas impressões pré-operatórias e nos 30^o, 60^o e 90^o dias pós-operatórios de cada rato. Tiras de papel brancas foram inseridas sobre uma passarela de madeira com 43cm de comprimento por 8,7 cm de largura e 5,5cm de altura, fechada nas laterais e dotada de casinhola escura no final (abrigo para o rato). Os animais tiveram suas patas traseiras pintadas com tinta nanking preta e foram posicionados na passarela para caminharem. Logo após o animal percorrer o percurso total, as tiras de papel contendo as impressões das pegadas foram deixadas em temperatura ambiente para secar.



Figura 6. Impressões das patas deixadas nas tiras de papel. Pata esquerda experimental, e pata direita normal (sem lesão). Pegadas obtidas com 30 dias pós-cirúrgicos (A), pegadas após 60 dias pós-cirúrgicos (B) e pegadas 90 dias após a cirurgia (C).

Estas tiras contendo as impressões das pegadas foram digitalizadas com scanner e os dados quantitativos foram obtidos através do software de análise de imagens Image J (cálculo do IFC, tanto das impressões pré-operatórias, como das impressões pós-operatórias). Foram medidos o comprimento da pegada: do calcanhar até o dedo mais longo; a abertura total dos dedos: do primeiro dedo ao quinto dedo; e a abertura dos dedos intermediários: entre o segundo dedo e o quarto dedo, e estes valores foram inseridos na fórmula do IFC. Quando o valor de IFC for igual a menos cem significa disfunção total do nervo e quando o valor for igual a zero significa função normal, ou seja, quanto mais próximo de zero o valor melhor será a capacidade funcional do rato.

6.10 Análise histomorfométrica

Após 90 dias pós-cirúrgicos os ratos sofreram eutanásia para as análises histomorfométricas conforme descrito acima.

Os tubos de silicone foram removidos, os segmentos de nervo ciático operados foram seccionados transversalmente, sendo cada nervo dividido em 3 porções: proximal, mediana e distal, tanto a porção proximal quanto a distal foram retiradas em conjunto com uma porção do tecido neural normal do nervo (Figura 6). Este mesmo processo foi realizado para nervos utilizados nos autoenxertos.

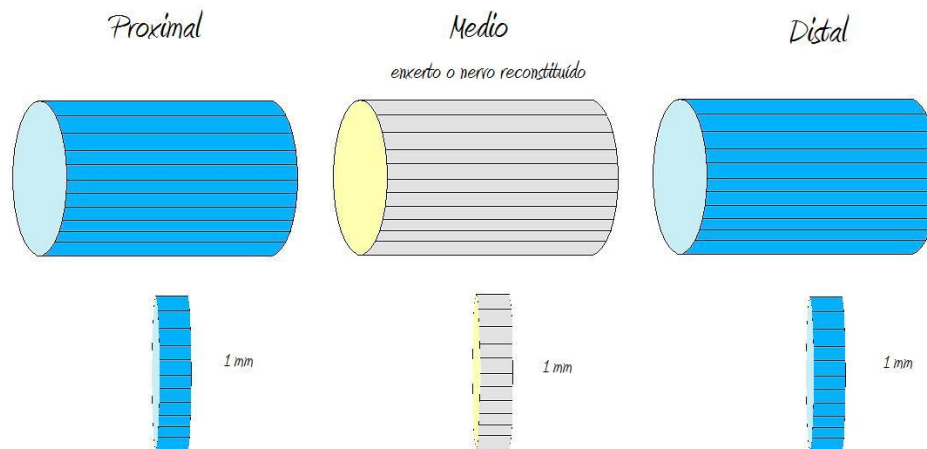


Figura 7. Figura ilustrativa das secções transversais do nervo regenerado em três segmentos: proximal, mediano e distal.

As amostras, porção proximal, mediana e distal de cada nervo, foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0.1M (pH 7.4)) por 48h a temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram enxaguados em tampão fosfato (pH 7.4) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. As amostras foram incluídas em resina epoxy em moldes de silicone numerados com cavidades de 5mm de profundidade cada. Este molde oferece orientação adequada e ângulo de corte para as secções do nervo ciático. Posteriormente, as amostras foram seccionadas em ultra-micrótomo (Super Nova Reichert-Yung, Austria), e foram realizados cortes semi-finos de 1 μ m de espessura. Estes cortes foram corados com azul de toluidina 1% para observação em microscopia de luz objetivando avaliação da regeneração das estruturas nervosas.

Todas as amostras foram analisadas por especialista cegado em relação aos grupos de tratamento. Para a mensuração dos parâmetros morfométricos como preservação da arquitetura do nervo, presença de degeneração Walleriana, espessura da bainha de mielina, área das fibras de axônios mielinizados, densidade das fibras nervosas (número de fibras/mm²), e número de axônios foi utilizado um software analisador de imagens Image Pro Plus, versão 4.1.¹⁵² O número de axônios será contado randomizadamente pela seleção de campos (80x60 μ m²) em aumento de 400x.

6.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias confirmadas ao nível de 5% de significância, com auxílio do software SPSS. A hipótese de que não existe diferença entre os grupos será rejeitada quando o valor *p* for inferior ao nível de 0,05 de significância. Caso a hipótese nula seja rejeitada, devemos identificar quais os grupos são diferentes estatisticamente, utilizando o teste de comparação de Tukey.

6.12 Aspectos Bioéticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob o número de protocolo 10/00173 (Anexo A).

O estudo foi realizado respeitando os preceitos para minimizar o sofrimento e a dor dos animais utilizados no experimento, conforme Lei Arouca 2008, nº 11.794/08 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

Em todos os procedimentos cirúrgicos, foi administrada a anestesia anteriormente referida, sendo a eutanásia efetuada com sobredose do mesmo medicamento, o qual deprime o sistema nervoso central, sendo uma maneira rápida e indolor de eutanásia.

7 RESULTADOS

7.1 Resultados Clínicos e Cirúrgicos

O protocolo anestésico empregado foi efetivo durante a realização de todos os procedimentos cirúrgicos. As medicações administradas no período pós-operatório foram suficientes para manter o bem estar dos animais, permitindo que os animais caminhassem e movimentassem o membro operado logo após a cirurgia.

Nenhum animal apresentou infecções nas feridas operatórias e todos os ratos demonstraram boa cicatrização das mesmas. Não foi observada nenhuma complicação clínica durante o decorrer do estudo.

7.2 Resultado da contagem plaquetária

A média de plaquetas encontradas no sangue total dos ratos utilizados para obtenção do PRP foi de 460.000 plaquetas/ μ l e o PRP apresentou média de 2.623.000 plaquetas/ μ l (Figura 7). A alta concentração plaquetária encontrada demonstra que a técnica de preparação do PRP foi efetiva, obtendo um aumento de 5,7 vezes no número de plaquetas no PRP quando comparado ao sangue total. A média de plaquetas encontradas no sangue total dos ratos utilizados para obtenção do PRF foi de 423.000 plaquetas/ μ l e o PRF apresentou média de 35.000 plaquetas/ μ l (Figura 7). Estes resultados demonstram que a técnica utilizada para preparação do PRF foi efetiva, demonstrando que as plaquetas ficaram contidas dentro do coágulo de PRF, e por isso apresentaram baixas concentrações plaquetárias no exsudato de PRF.

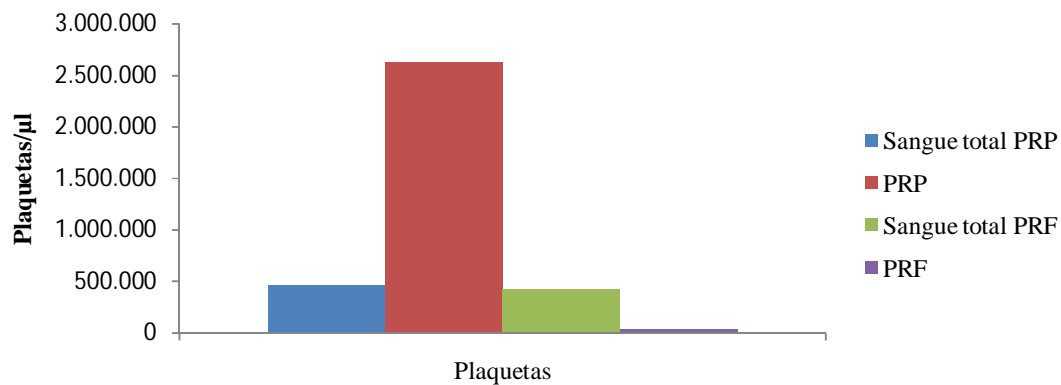


Figura 8. Gráfico comparando a concentração de plaquetas no sangue total utilizado para obtenção de PRP e PRF e concentração plaquetária no PRP, e PRF.

7.3 Resultados Funcionais

Os resultados de SFI obtidos através dos testes de marcha nos períodos pré-operatório, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios demonstraram que a maioria dos ratos apresentou melhora funcional significativa durante o período de acompanhamento, sendo os melhores resultados encontrados com 90 dias pós-operatórios.

O resultado de análise de variância ANOVA não evidenciou diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos no período pré-operatório, ou seja, todos apresentaram função nervosa normal. Após 30 dias pós-operatórios, começaram a existir diferenças estatísticas no grau de melhora funcional entre os grupos ($p = 0,014$). O grupo AE apresentou uma maior melhora funcional quando comparado aos grupos PRP e TS, entretanto o grupo PRF não diferiu do grupo AE mas também não diferiu dos demais grupos (PRP e TS). Com 60 dias pós-operatórios a diferença na melhora do nervo ciático entre os grupos AE e TS continuou sendo evidenciada porém tanto o grupo PRP quanto o grupo PRF possuíram semelhanças com ambos os grupos controles. Com 90 dias pós-operatórios a diferença entre os grupos se torna única, o grupo TS obteve uma melhora funcional pobre, possuindo diferença estatística significativa ($p = 0,000$) quando comparado aos grupos AE, PRP e PRF.

Os grupos AE, PRP e PRF não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, todos obtendo uma boa melhora funcional. Estes dados podem ser observados através do código de letras na tabela 1.

Tabela 1. Médias e desvio padrão do SFI dos diferentes grupos obtidas nos períodos de avaliação através do Teste de Marcha. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Períodos	Grupos	Média	Desvio Padrão
Pré-operatório	TS	-5,6 ^a	6,661
	AE	-5,42 ^a	6,373
	PRP	-6,4 ^a	8,3
	PRF	-5,63 ^a	7,546
30 dias	TS	-77,13b	8,756
	AE	-58,32 ^a	17,835
	PRP	-76,76b	4,586
	PRF	-69,63ab	12,951
60 dias	TS	-71,54b	5,623
	AE	-52,84 ^a	15,901
	PRP	-63,67ab	9,217
	PRF	-59,85ab	13,379
90 dias	TS	-81,02b	8,298
	AE	-42,39 ^a	10,348
	PRP	-55,86 ^a	11,2
	PRF	-53,5 ^a	11,88

7.4 Resultados Histomorfométricos

Para avaliação histomorfométrica foram utilizadas 6 amostras dos grupos controle AE e TS, devido a previsibilidade dos resultados, e 8 amostras dos grupos experimentais PRF e PRP. Cada nervo regenerado foi seccionado em 3 segmentos: proximal, mediano e distal que foram analisados histomorfometricamente. O grupo TS não demonstrou regeneração nervosa em nenhuma amostra (Figura 8), sendo seccionado em apenas 2 segmentos, proximal e distal.



Figura 9. Coto proximal e coto distal do nervo ciático não apresentando regeneração nervosa após 12 semanas pós-cirúrgicas, grupo tratado com solução salina.

No grupo PRF foram observados 5 nervos regenerados (Figura 9) e no grupo PRP apenas 2 nervos obtiveram regeneração, os demais ratos apresentaram regeneração incompleta do nervo ciático. Alguns segmentos nervosos demonstraram fibrose ou necrose tecidual, não podendo ser analisados por histomorfometria.



Figura10. Nervos ciáticos completamente regenerados em 12 semanas pós-cirúrgicas, grupo tratado com PRF.

7.4.1 Histologia

A análise estrutural dos nervos regenerados mostrou diferenças entre os grupos PRF, PRP e TS em relação ao grupo AE. Observação qualitativa evidencia que as fibras mielinizadas apresentam distribuição regular com pouco tecido conjuntivo entre as fibras (Figura 10) e possuem maior tamanho nos 3 segmentos do grupo AE quando comparados aos demais grupos. Nos segmentos proximais, o grupo PRF e PRP apresentaram fibras nervosas maiores que o grupo TS, porém quando comparados os segmentos distais ocorreu o inverso, o grupo TS apresentou fibras maiores que os grupos experimentais.

Nos grupos PRF, PRP e TS o espaço endoneural entre as fibras mielinizadas foi maior que no grupo AE. Os grupos PRF e PRP demonstraram a presença de macrófagos, câmaras de digestão e algumas lâminas apresentaram fibrose impedindo suas análises. No grupo TS observou-se presença de macrófagos, neutrófilos, degeneração axonal e alguns tecidos necrosaram impossibilitando suas análises. Em relação a espessura da bainha de mielina, quando comparados os segmentos medianos, os grupos PRP e PRF apresentaram bainhas de mielina maiores que o grupo AE (Figura 11). O grupo AE apresentou bainhas mais espessas que os grupos PRF, PRP e TS, no segmento proximal e distal (Figura 12).

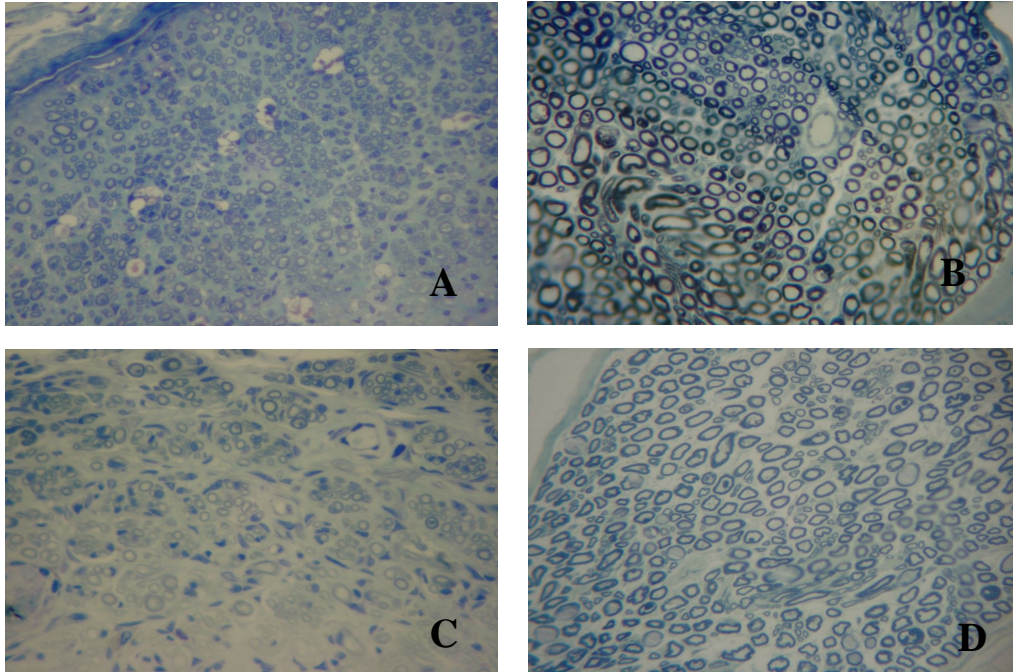


Figura 11. Segmentos proximais dos grupos AE (A), grupo TS (B), grupo PRF (C), grupo PRP (D), com coloração azul de toluidina. Aumento de 100X. Presença de fibras mielinizadas, em A notamos distribuição regular das fibras e nos demais grupos (B,C,D) nota-se maior espaço endoneural entre as fibras.

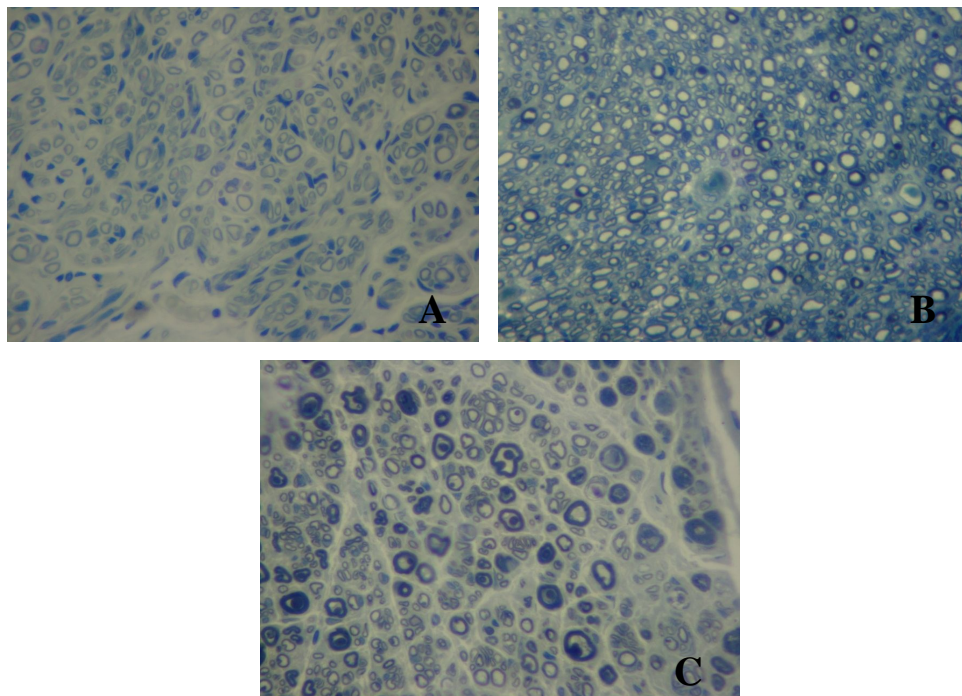


Figura 12. Segmentos médianos dos grupos AE (A), grupo PRF (B), grupo PRP (C), com coloração de azul de toluidina. Aumento de 100X. Observa-se bainhas de mielina mais espessas em B e C quando comparadas a A.

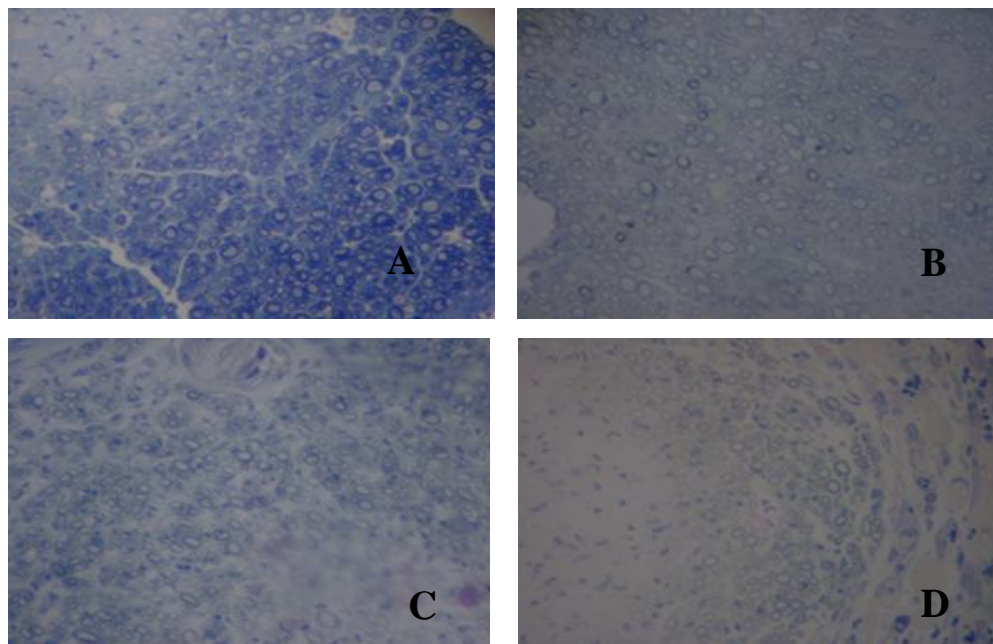


Figura 13. Segmentos distais dos grupos AE (A), grupo TS (B), grupo PRF (C), grupo PRP (D), com coloração azul de toluidina. Aumento de 100X. Observa-se bainhas de mielina mais espessas no grupo A em relação aos demais grupos (B,C,D).

7.4.2 Morfometria

7.4.2.1 Diâmetro da fibra

Quando comparados os segmentos nervosos proximais dos grupos AE, TS, PRF e PRP foi encontrada diferença estatística significante ($p = 0,049$). O grupo AE demonstrou melhores resultados quando comparado ao grupo TS ($p = 0,037$). Porém, quando comparados os segmentos nervosos proximais dos demais grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

A comparação do diâmetro da fibra dos segmentos nervosos medianos entre os grupos AE, PRP e PRF também demonstrou diferença estatística significante ($p \leq 0,001$). O grupo AE obteve maior diâmetro de fibras nervosas nos segmentos medianos em relação aos grupo PRF ($P = 0,001$) e PRP ($P = 0,002$). Os dois grupos experimentais, PRF e PRP, não obtiveram diferenças significativas. Nos segmentos nervosos distais, não foram encontradas diferenças significativas no diâmetro das fibras nervosas entre nenhum dos grupos (AE, TS, PRF, PRP). Os dados citados acima estão dispostos na figura 13.

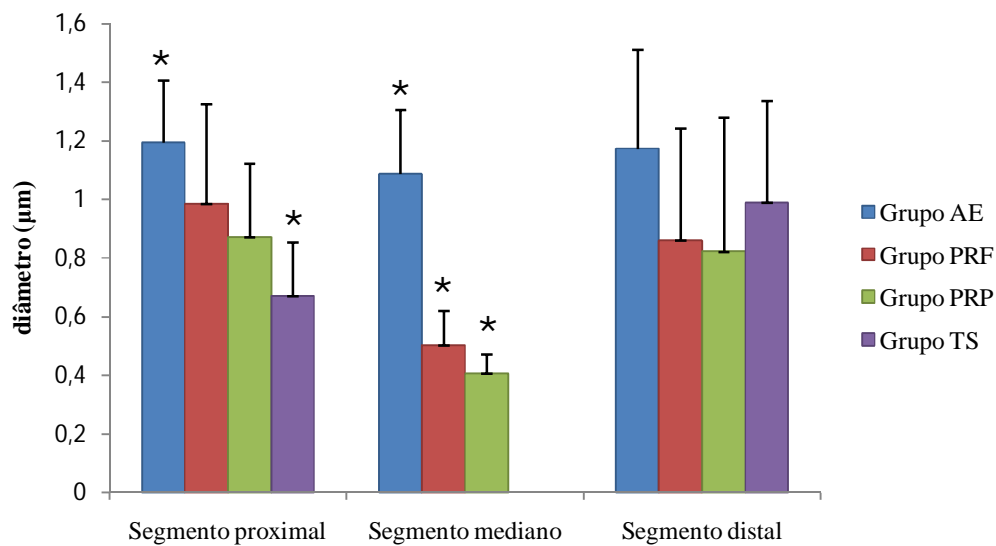


Figura 14. Comparações do diâmetro médio das fibras mielínicas (μm) nos três segmentos nervosos entre os grupos AE, PRP, PRF e TS.

7.4.2.2 Diâmetro dos axônios

Quanto ao diâmetro dos axônios, nenhum dos segmentos nervosos mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos AE, TS, PRF e PRP. Todos os grupos apresentaram resultados semelhantes (Figura 14).

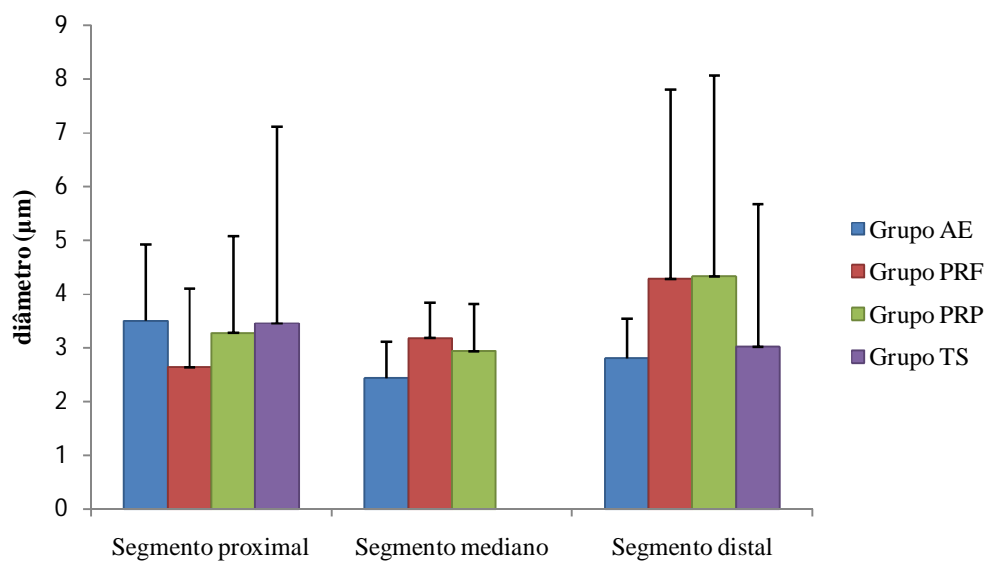


Figura 15. Comparações do diâmetro médio dos axônios (μm) nos três segmentos nervosos entre os grupos AE, PRP, PRF e TS.

7.4.2.3 Espessura da bainha

Os resultados da espessura da bainha de mielina também não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas nos 3 segmentos nervosos entre nenhum dos grupos comparados (Figura 15).

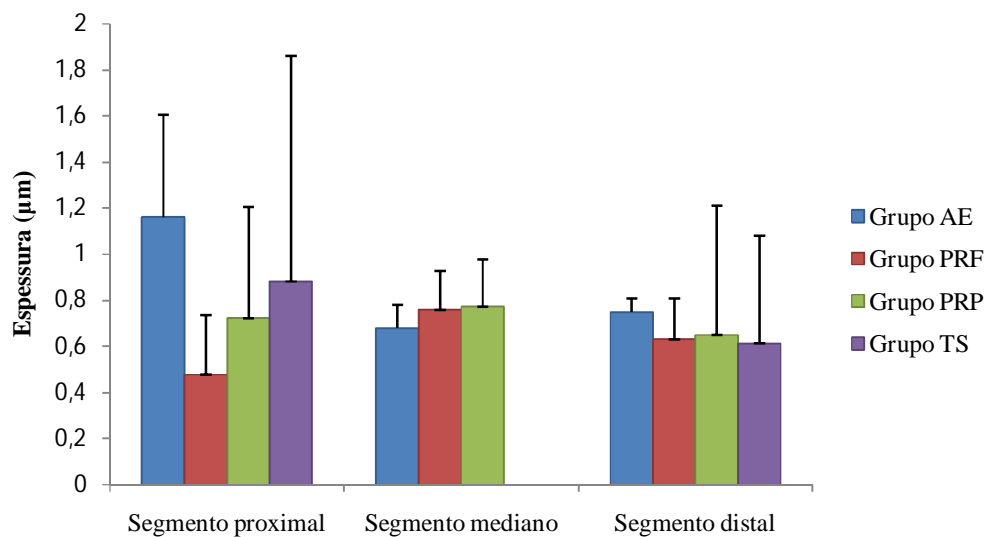


Figura 16. Comparações das espessuras médias da bainha de mielina (µm) nos três segmentos nervosos entre os grupos AE, PRP, PRF e TS.

8 DISCUSSÃO

Traumatismos por transecção de nervo periférico são comuns e ocorrem frequentemente causando perda de sensibilidade e motricidade nervosa, comprometendo as atividades diárias dos pacientes com conseqüente impacto sócio-econômico.^{3,4}

Atualmente, o transplante autólogo de nervo periférico é considerado o padrão ouro no reparo de transecções com perda de substância nervosa. Embora apresente características de histocompatibilidade e capacidade de guiar o crescimento axonal, o enxerto autólogo demonstra algumas limitações, como a necessidade de realização de dois procedimentos cirúrgicos em locais distintos, maior morbidade e a escassez de sítios doadores, e déficit sensitivo resultante na área doadora.^{82,8,71,83,76}

A técnica de tubulização surge como alternativa para substituir o uso de enxerto autólogo. Esta técnica utiliza condutos artificiais que podem ser otimizados com acréscimo de componentes celulares afim de formar um microambiente ideal para a regeneração nervosa.^{72,86,87}

A engenharia tecidual vem pesquisando biomaterias que possam ser utilizados para otimizar o processo de regeneração nervosa. Estes devem oferecer os mesmos benefícios do enxerto autólogo mas não devem apresentar as mesmas limitações.

A regeneração de nervos periféricos depende da interação entre diferentes elementos celulares e mediadores químicos que irão guiar o processo regenerativo modulando sua rapidez e seu grau.

Os fatores neurotróficos são superregulados e ativados em situações de traumas, e estão fortemente relacionados à regeneração de nervos periféricos.⁵⁴ Estes podem atuar diretamente ou indiretamente no processo regenerativo e exercem seus efeitos separadamente, porém podem apresentar efeitos complementares.^{55,54}

Com isto, a utilização de Plasma Rico em Plaquetas e de Plaqueta Rica em Fibrina juntamente com a técnica de tubulização pode se tornar uma alternativa terapêutica promissora no reparo de lesões com perda de substância de nervos periféricos. Estudos demonstraram que o tubo de silicone é ideal para a regeneração nervosa obtendo recuperação motora e sensitiva.^{90,93}

A literatura especializada mostra que tanto o PRP, quanto o PRF são alternativas promissoras no reparo de lesões, pois estes são fontes abundantes de fatores de crescimento essenciais ao processo de regeneração.

O PRF vem sendo utilizado com sucesso em estudos experimentais¹⁴³ e clínicos^{144,132,153,154b}, evidenciando a eficiência do mesmo na regeneração de tecidos. Porém, existe pouca evidência sobre o uso de PRF na regeneração nervosa.¹⁵⁵

O uso de PRP foi testado no reparo de lesões nervosas demonstrando resultados contrastantes^{17,129}, provavelmente devido as diferentes técnicas de obtenção de PRP utilizadas, na variação interpessoal em relação ao número de plaquetas de cada indivíduo, e aos diferentes modelos experimentais utilizados.

No presente trabalho, a concentração média de plaquetas encontrada no PRP dos ratos foi 5,7 vezes maior quando comparada ao sangue total (PRP = 2.623.000 plaquetas/ μ l). Neste estudo foi utilizada a concentração plaquetária de 1.000.000 plaquetas/ μ l, pois esta é considerada a concentração terapêutica para humanos.¹¹⁹

Weibrich et al. sugeriram que a eficácia do PRP sobre a regeneração óssea depende da concentração plaquetária. Enquanto concentrações plaquetárias baixas podem ter efeitos pouco expressivos, altas concentrações de plaquetas podem apresentar efeitos inibitórios no processo regenerativo.¹²¹

Trowbridge et al., demonstraram que a quantidade média de plaquetas no sangue de ratos é significativamente mais alta que no sangue humano, porém o volume médio de plaquetas é significativamente mais baixo que no sangue humano.¹⁵⁶ Em estudo comparativo entre a concentração de fatores de crescimento do PRP de humanos, ratos e cabra foi demonstrado maiores concentrações dos fatores TGF- β 1, e PDGF- $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ no PRP humano, evidenciando diferenças entre espécies.¹⁵⁷

Considerando estas diferenças entre as espécies, e a inexistência da padronização de um protocolo de obtenção de PRP, os níveis terapêuticos de concentração plaquetária e as taxas de fatores de crescimento em animais necessitam ser definidos para a obtenção de melhores resultados com o uso de PRP em animais.

A média de plaquetas encontradas no sangue total dos ratos utilizados para obtenção do PRF foi de 423.000 plaquetas/ μ l e o PRF apresentou média de 35.000 plaquetas/ μ l, demonstrando a tendência das plaquetas ficarem contidas dentro do coágulo de PRF, liberando baixas concentrações plaquetárias no seu exsudato. Este achado esta de acordo com

os resultados encontrados por Ehrenfest et al., nos quais aproximadamente 97% das plaquetas ficam concentradas no coágulo de PRF.¹³⁹

Os resultados da análise da marcha indicaram uma melhora significativa no grupo AE com 30 dias pós-operatórios. Os grupos PRP e TS não demonstraram déficit funcional significativo em relação ao grupo AE, enquanto o grupo PRF não diferiu estatisticamente de nenhum dos outros grupos. Com 60 dias pós-operatórios, foi observada melhora na marcha dos grupos AE, PRF e PRP, não apresentando diferenças estatísticas, porém os grupos PRF e PRP também não demonstraram diferenças estatística com o grupo TS, que continuou apresentando perda funcional significativa. Com 90 dias pós-operatórios, não foi observada diferença significativa entre os grupos AE, PRF e PRP, todos obtendo grande melhora funcional, entretanto o grupo TS continuou demonstrando déficit significativo na marcha.

Estes achados corroboram os resultados encontrados por Ho et al., que demonstraram melhora nos grupos experimentais em relação ao grupo que utiliza o tubo vazio, nos períodos de 30, 60 e 90 dias.⁹⁷ De acordo com pesquisas, a recuperação funcional começa a ser evidenciada com 30 dias pós-operatórios, e com 90 dias pós-operatórios os grupos experimentais não demonstram diferença estatística entre si, obtendo bons resultados funcionais.^{97,158} Tal fato também pode ser observado nesta pesquisa. A perda funcional observada nos ratos que tiveram reparação com o tubo preenchido por solução salina pode ter ocorrido devido a ausência de regeneração nervosa neste grupo.

Após 90 dias pós-operatórios, todos os ratos do grupo AE apresentaram enxertos nervosos viáveis demonstrando que a técnica foi bem realizada, e nenhum dos ratos do grupo TS demonstrou regeneração, não ocorrendo regeneração nervosa espontânea. Destes, 6 ratos de cada grupo foram utilizados para análises histológicas e morfométricas devido a previsibilidade dos resultados. No grupo PRF 5 ratos tiveram seus nervos regenerados completamente enquanto apenas em 2 ratos do grupo PRP foi evidenciada regeneração completa do nervo ciático, os demais ratos apresentaram regeneração incompleta. Este melhor desempenho encontrado no grupo PRF em relação ao grupo PRP quanto a regeneração nervosa pode ser explicado pela capacidade do PRF em liberar os fatores de crescimento contidos nas plaquetas por um período de tempo mais longo que o PRP, possuindo efeito prolongado no processo regenerativo¹³⁸. Além deste prolongado fornecimento de fatores de crescimento e de proteínas bioativas, o coágulo de fibrina constitui a primeira matriz cicatricial no local da lesão, estimulando a migração celular, guiando a angiogênese, e permitindo a migração de células endoteliais e fibroblastos afim de promover o

remodelamento da fibrina em tecido conectivo resistente.¹³⁸ Com isso, o PRF otimizou o processo de regeneração do nervo ciático dos ratos.

Os resultados encontrados no grupo PRP, que apresentaram apenas 2 ratos com regeneração nervosa completa, podem ser devido a concentração de plaquetas do PRP, 1.000.000 plaquetas/ μ l, utilizada neste experimento. Como já citado, esta concentração plaquetária do PRP é considerada terapêutica para humanos, as plaquetas estão 4-5x mais concentradas em comparação ao sangue basal.⁹⁸ Porém, como os ratos apresentam uma concentração de plaquetas maior em seu sangue basal em relação ao sangue humano¹⁵⁶, podemos supor que a concentração plaquetária terapêutica do PRP para ratos deveria possuir um número maior de plaquetas que a utilizada para humanos e utilizada neste experimento. Esta baixa concentração plaquetária pode ter influenciado os resultados pouco expressivos do grupo PRP em relação a capacidade de regenerar os nervos ciáticos neste estudo. A inexistência de padronização de um protocolo de obtenção de PRP, juntamente com a falta de definição de níveis terapêuticos de concentração plaquetária e taxas de fatores de crescimento em animais faz com que os resultados encontrados em pesquisas que utilizam PRP no reparo nervoso sejam contrastantes.^{17, 129}

Algumas amostras do grupo TS, PRP e PRF apresentaram fibrose ou necrose tecidual, não sendo possível realizar análise histológica e morfométrica destas.

Em relação a análise histológica, foi evidenciada diferenças entre os grupos PRF, PRP e TV em relação ao grupo AE. O grupo AE apresentou fibras mielinizadas de maior tamanho quando comparadas aos demais grupos, com distribuição regular e pouco tecido conjuntivo entre as fibras. Estes resultados estão de acordo com a recuperação funcional encontrada neste grupo pelo SFI. A análise histológica mostrou que mesmo apresentando recuperação da função motora, o nervo ciático dos ratos dos grupos PRF e PRP permaneceram com a presença de processos degenerativos, possuindo aparência de casca de cebola (desfiada), com a presença de macrófagos e câmaras de digestão e com aumento de tecido conjuntivo entre as fibras nervosas. Além disto, muitos ratos apresentaram regeneração nervosa incompleta dentro do tubo de silicone. No grupo TS também pode se observar a permanência de processos degenerativos, com a presença de macrófagos, neutrófilos, degeneração axonal e aumento de tecido conjuntivo entre as fibras nervosas, estes resultados concordando com o déficit funcional encontrado pelo Teste de marcha.

A análise morfométrica demonstrou pouca diferença entre os 4 grupos analisados, possuindo resultados contrastantes com os encontrados pelo SFI. A análise morfométrica após

lesão traumática de nervo evidencia as condições tróficas dos nervos porém não reproduz a capacidade funcional.¹⁵⁹ Diversos autores que pesquisam regeneração de lesões traumáticas de nervos periféricos não encontraram relação entre SFI e análises morfométricas, estando estes de acordo com os achados desta pesquisa.^{160,161}

Em relação ao diâmetro da fibra, os segmentos nervosos proximais do grupo AE demonstraram maior diâmetro de fibra quando comparado ao grupo TS ($p = 0,037$). Os grupos PRF e PRP não mostraram diferença significativa em relação ao grupo AE mas também não foram estatisticamente diferentes quando comparado ao TS. Os segmentos medianos também apresentaram diferença estatística significativa entre o grupo AE e os grupos PRF ($P = 0,001$) e PRP ($P = 0,002$). O grupo AE revelou diâmetro de fibra maiores, enquanto que os experimentais, PRF e PRP, não obtiveram diferenças. Nos segmentos nervosos distais, não foram encontradas diferenças significativas no diâmetro das fibras nervosas entre nenhum dos grupos (AE, TS, PRF, PRP). Estas diferenças foram ressaltadas pela análise histológica que mostrou uma melhor organização estrutural do grupo AE em relação aos demais grupos. Yu et al., utilizou diferentes técnicas para reparar lesão de 10mm no nervo ciático de ratos wistar e constataram um diâmetro de fibra maior que os encontrados na presente pesquisa.¹⁶² Tal fato pode ser explicado pela regeneração incompleta encontrada em diversos ratos dos grupos experimentais, e provavelmente os valores encontrados no grupo AE se apresentassem normais se esta variável fosse analisada em um período de tempo maior. Chamberlain et al., demonstrou um aumento no diâmetro das fibras nervosas com o passar do tempo, 30 semanas após a cirurgia o diâmetro de fibra encontrado foi de 3,2 – 3,8 μm e após 60 semanas pós-cirúrgicas estes valores aumentaram para 3,6 – 4,4 μm , ressaltando a necessidade de um maior período de avaliação.¹⁶³

A maturação das fibras axonais regeneradas pode ser analisada pelo diâmetro axonal e espessura da bainha de mielina.¹⁶⁴ O diâmetro axonal é diretamente correlacionado com a velocidade de condução nervosa, portanto os melhores resultados funcionais são esperados nos grupos com maior diâmetro axonal.⁹⁷ Esse fato não foi evidenciado nesta pesquisa, na qual os grupos comparativos não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao diâmetro axonal em nenhum dos segmentos analisados.

Diversos estudos indicam que a diminuição do calibre do axônio no nervo injuriado é acompanhada pela diminuição da espessura da bainha de mielina.^{165,166} No grupo AE e no grupo TS podemos observar essa característica, nos 3 segmentos analisados, quando o diâmetro axonal se mostrou menor, a bainha de mielina também teve sua espessura diminuída.

Porém, nos grupos PRF e PRP este fato não foi constatado. Mesmo o grupo AE tendo apresentado maior espessura de bainha de mielina nos segmentos proximal e distal, não existiu diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos.

Os grupos PRF e PRP apresentaram maior diâmetro axonal e maior espessura de bainha de mielina nos segmentos medianos, isto pode ser explicado pela presença dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas contidas no PRF e PRP. Estes fatores de crescimento agem no reparo tecidual aumentando a proliferação e diferenciação celular otimizando o processo regenerativo. Os valores de diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina encontrados neste estudo estão de acordo com os valores encontrados por outros autores.^{162,167}

Comparando diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina, o fato de não existir diferença estatística entre os grupos AE, PRP e PRF em relação ao grupo TS indica que estes apresentaram uma maturação incompleta do nervo durante o processo de regeneração. Provavelmente, os valores apresentassem diferenças estatísticas se estas variáveis fossem analisadas em um maior período de tempo.

Röyttä & Salonen constataram que o diâmetro dos axônios e a espessura da bainha de mielina aumentaram até 50 semanas após o reparo do nervo ciático de ratos.¹⁶⁸ O período pós-operatório utilizado nesta pesquisa foi de apenas 12 semanas, o que sugere que as fibras nervosas não tenham alcançado o seu desenvolvimento regenerativo completo, estando o processo de mielinização ainda incompleto. O tempo de 12 semanas de observação utilizado neste estudo, o mesmo empregado por Braga-silva et al.¹² e Gravvanis et al.¹⁶⁹, parece ter sido insuficiente para o crescimento e maturação dos axônios não apresentando diferenças estatísticas significantes em relação ao diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina. Porém, como citado anteriormente, a mielinização das fibras nervosas é somente um sinal de maturidade, podendo estas fibras conduzirem impulsos nervosos antes de sua mielinização completa.

Na reparação nervosa, a principal meta a ser alcançada é a recuperação funcional das estruturas injuriada. Constatamos em nossa pesquisa que mesmo não apresentando diferenças morfométricas significantes na maior parte das análises morfométricas, o grupo AE, PRF e PRP apresentaram recuperação funcional adequada demonstrada no teste de marcha pelo SFI. Ressaltamos que provavelmente com um período mais longo de observação, o resultado morfométrico das fibras nervosas fosse compatível com o resultado funcional obtido.

9 CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados é possível concluir:

- A análise estrutural demonstrou que o grupo Plaqueta rica em fibrina teve maior número de regenerações nervosas no interior dos tubos quando comparado ao grupo Plasma Rico em Plaquetas. Cinco dos oito ratos do grupo Plaqueta rica em fibrina obtiveram regeneração nervosa completa enquanto apenas dois dos 8 ratos do grupo Plasma rico em plaquetas apresentaram completa regeneração do nervo ciático.
- Com 90 dias pós-operatórios, não foi observada diferença significativa entre os grupos Autoenxerto, Plaqueta rica em fibrina e Plasma rico em plaquetas, todos obtendo boa melhora funcional, entretanto diferiram estatisticamente do grupo tubulização com solução salina que continuou demonstrando déficit na marcha.
- Nas análises histológicas, o grupo Autoenxerto apresentou estrutura nervosa organizada, com maior tamanho de fibras mielinizadas e pouco tecido conjuntivo entre as fibras. Os demais grupos permaneceram com a presença de processos degenerativos e aumento de tecido conjuntivo entre as fibras nervosas. Além disso, algumas amostras do grupo tubulização com solução salina apresentaram fibrose e necrose tecidual.
- Observou-se nos dados morfométricos que o grupo Autoenxerto apresentou maior diâmetro de fibra nervosa nos segmentos proximais e medianos quando comparado aos demais grupos. Nos segmentos distais não foi evidenciada diferenças significativas.
- Em relação ao diâmetro axonal e espessura da bainha de mielina os grupos não diferiram significativamente.

- Os dados do presente estudo sugerem que tanto o Plaqueta rica em fibrina quanto o Plasma rico em plaquetas possuem efeito positivo na melhora funcional nervosa, apresentando a mesma melhora funcional do grupo Autoenxerto.

REFERÊNCIAS

1. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000 Jun;23(6):863-73.
2. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Suppl Clin Neurophysiol* 2004;57:173-86.
3. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004;1(2):177-85.
4. Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GR. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *J Cell Mol Med*. 2006 Apr-Jun;10(2):309-17.
5. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. *Arq Bras Neurocir*. 2005;24(1):20-25.
6. Seim III. Cirurgia dos nervos periféricos. In: FOSSUM, T.W. Cirurgia de pequenos animais. São Paulo, Roca, 2005.
7. Dourado E, Gomes ACA, Gomes PFS, Ribeiro A. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev Cir e Traumatol Buco-maxilo-facial*. 2003 Jun;3(2):49-54.
8. Oliveira ALR, Pierucci A, Pereira KB. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. *Braz J Morphol Sci*. 2004;21(4):225-231.
9. Hart AM, Terenghi G, Wiberg M. Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. *Neurol Res*. 2008;30:999-1011.
10. Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Conventional versus epineural sleeve neuroorrhaphy technique: functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg*. 2002 Oct;49(4):397-403.
11. Isaacs J, Adams S, Mallu S, Loveland K, Sandbulte Z. Comparison of the performance of chronically versus freshly denervated autograft in nerve repair. *J Hand Surg Am*. 2010 Dec;35(12):2001-7.
12. Braga Silva J, Gehlen D, Javier ARR, Menta C, Atkinson EA, Machado DC. 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 Ortop Bras*. 2006;14(5):273-75.
13. Allet MA, Leite VM, Albertoni WM, Fernandes FAZ, Fernandes M, Fallopa F. Enxerto “versus” enxerto coberto com tubo de veia nas reparações nervosas. *Rev Bras Ortop*. 2003 Abr;38(4):193-200.
14. Bian YZ, Wang Y, Aibaidoula G, Chen GQ, Wu Q. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2009 Jan; 30(2):217-25.

15. Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhan S, Liu Y, Zhao B, Zhao Q, Zhang L, Guo Q, Xu W, Lu S. Repair of nerve defect with acellular nerve graft supplemented by bone marrow stromal cells in mice. *Microsurgery*. 2011 Jul;31(5):388-94.
16. Kokai LE, Bourbeau D, Weber D, McAtee J, Marra KG. Sustained Growth Factor Delivery Promotes Axonal Regeneration in Long Gap Peripheral Nerve Repair. *Tissue Eng Part A*. 2011 May;17(9-10):1263-75.
17. Piskin A, Kaplan S, Aktas A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt HH, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological and electron microscopic study. *Microsurg*. 2009;29(2):144-53.
18. Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery*. 1999 Apr;44(4):825-39.
19. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em cores*. Editora Guanabara Koogan S.A., segunda edição, Rio de Janeiro, 2003.
20. Gibbels E. Morphometry of unmyelinated nerve fibers. *Clin Neuropathol*. 1989;8:179-87
21. Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*, 2nd edition. New York: Churchill Livingstone, 1978, pp.133-8.
22. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop Scand*. 1987;58:145-69.
23. Erhart EA. *Neuroanatomia*. 3.ed. Sao Paulo: Atheneu, 1965. 374p.
24. Montes GS, Cotta-Pereira G, Junqueira LCU. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Adv Cell Neurobiol*. 1984;5:177-218.
25. Da-Silva CF. Fatores Neurotróficos: estrutura, função e aplicações clínicas. *Atual Neurociênc*. 1995;1:1-20.
26. Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.
27. Seddon H. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943;66:237-88.
28. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *Am Acad Ortho Surg*. 2000;8(4):243-52.
29. Lundborg G. Peripheral nerve injuries: pathophysiology and strategies for treatment. *J Hand Ther*. 1993;6(3):179-88.
30. Liuzzi FJ, Tedeschi B. Peripheral nerve regeneration. *Neurosurg Clin N Am*. 1991;2:31-42.
31. Beuche W, Fried RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol*. 1984 Oct;13(5):767-96.

32. Reynolds ML, Woolf CJ. Reciprocal Schwann cell-axon interaction. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Oct;3(5):683-93.
33. Fenrich K, Gordon T. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems – current issues and advances. *Can J Neurol Sci.* 2004 May;31(2):142-56.
34. Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience.* 1990;35(1):157-65.
35. Bruck W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 1997 Apr;7(2):741–52.
36. 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.
37. Campbell WW. Evaluation and Management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008;119:1951-65.
38. Son YL, Thompson WJ. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron.* 1995 Jan;14(1):125-32.
39. Sendtner M, Stockli KA, Thoenen H. Synthesis and localisation of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol.* 1992 Jul;118(1):139-48.
40. Torigoe K, Tanaka H, Takahashi A, Awaya A, Hashimoto K. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 1996 Feb;137(2):301-8.
41. Taniuchi M, Clark HB, Johnson Jr EM. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 Jun;83(11):4094–8.
42. Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001 Jun;64(2):109-27.
43. Cheng C, Zochodne DW. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience.* 2002;115(1):321-9.
44. Dezawa M, Adachi-Usami E. Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2000 Mar;19(2):171–204.
45. Jessen KR, Mirsky R. Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat.* 2002 Apr; 200(4):367-76.
46. 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):198-203.
47. Pierucci A. Influencia do agrecam sobre a migração das células de Schwann in vitro e regeneração nervosa periférica in vivo após transsecção do nervo ciático [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

48. Tashiro T, Komiya Y. Changes in organization and axonal transport of cytoskeletal proteins during regeneration. *J Neurochem.* 1991 May;56(5):1557-63.
49. Mcdonal D, Cheng C, Chen Y, Zochodne G. Early events of peripheral nerve regeneration. *Neuron Glia Biol.* 2006 May;2(2):139-47.
50. Buettner HM: Nerve growth dynamics. Quantitative models for nerve development and regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Nov;745:210-21.
51. Seilheimer B, Schachner M. Regulation of neural cell adhesion molecule expression on cultured mouse Schwann cells by nerve growth factor. *EMBO J.* 1987 Jun;6(6):1611-6.
52. Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3 and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci.* 1999 May;19(10):3847-59.
53. Evans GRD. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol.* 2000 Dec;19(3):312-18.
54. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14.
55. 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.
56. Scholz T, Rogers JM, Krichevsky A, Dhar S, Evans GRD. Inducible Nerve Growth Factor Delivery for Peripheral Nerve Regeneration In Vivo. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Dec;126(6):1874-89.
57. Yong C, Miller E, Nicklous DM, Hoffman JR. Nerve growth factor and neurotrophin-3 affect functional recovery following peripheral nerve injury differently. *Restor Neurol Neurosc.* 2001;18(4):167-75.
58. Kemp SW, Webb AA, Dhaliwal S, Syed S, Walsh SK, Midha R. Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol.* 2011 Jun;229(2):460-70.
59. Wang CY, Liu JJ, Fan CY, Mo XM, Ruan HJ, Li FF. The Effect of Aligned Core-Shell Nanofibres Delivering NGF on the Promotion of Sciatic Nerve Regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010 Dec.
60. Alrashdan MS, Sung MA, Kwon YK, Chung HJ, Kim SJ, Lee JH. Effects of combining electrical stimulation with BDNF gene transfer on the regeneration of crushed rat sciatic nerve. *Acta Neurochir.* 2011.
61. Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope.* 1997 Jul;107(7):992-9.

62. Xu JJ, Chen EY, Lu CL, He C. Recombinant ciliary neurotrophic factor promotes nerve regeneration and induces gene expression in silicon tube-bridged transected sciatic nerves in adult rats. *J Clin Neurosci*. 2009 Jun;16(6):812-17.
63. Shen H, Shen ZL, Zhang PH, Chen NL, Wang YC, Zhang ZF, Jin YQ. Ciliary neurotrophic factor-coated polylactic-polyglycolic acid chitosan nerve conduit promotes peripheral nerve regeneration in canine tibial nerve defect repair. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2010 Oct;95(1):161-70.
64. Wood MD, Moore AM, Hunter DA, Tuffaha S, Borschel GH, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Affinity-based release of glial-derived neurotrophic factor from fibrin matrices enhances sciatic nerve regeneration. *Acta Biomater*. 2009 May;5(4): 959-68.
65. Mello LR, Feltrin Y, Selbach R, Junior GM, Spautz C, Haas LJ. Uso da cellulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001 59(2):372-79.
66. Kus H. Microsurgical fascicular neuroorrhaphy. Our method. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 1983 Dec;15(4):235-7.
67. Endo C, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2008;16(5):305-10.
68. Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF, Parizotto NA. Effects of 660 and 780 nm low-level laser therapy on neuromuscular recovery after crush injury in rat sciatic nerve. *Lasers Surg Med*. 2010 Nov;42(9):673-82.
69. Huang J, Lu L, Hu X, Ye Z, Peng Y, Yan X, Geng D, Luo Z. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in the rat model of 15-mm sciatic nerve gap bridged by scaffolds with longitudinally oriented microchannels. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010 Oct;24(8):736-45.
70. Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol*. 1998 Jan;149(1):243-52.
71. Krarup C, Archibald SJ, Madison RD. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol*. 2002 Jan;51(1):69-81.
72. Navarro X, Verdú E, Rodríguez FJ, Ceballos D. Artificial nerve graft for the repair of peripheral nerve injuries. *Neurol Sci*. 2001;22(suppl):S7-S13.
73. 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.
74. Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini K. Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2011 Feb; 43(2): 157-63.

75. Pogrel MA, Maghen A. The use of autogenous vein grafts for inferior alveolar and lingual nerve reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59:985-988.
76. Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2002 Feb;18(2):97-109.
77. Flores LP. The use of autogenous veins for microsurgical repair of the sural nerve after nerve biopsy. *Neurosurgery*. 2010
78. Elkwood AI, Holland NR, Arbes SM, Rose MI, Kaufman MR, Ashinoff RL, Parikh MA, Patel TR. Nerve allograft transplantation for functional restoration of the upper extremity: case series. *J Spinal Cord Med*. 2011 Mar;34(2):241-7
79. Rustemeyer J, Dicke U. Allografting combined with systemic FK506 produces greater functional recovery than conduit implantation in a rat model of sciatic nerve injury. *J Reconstr Microsurg*. 2010 Feb;26(2):123-9. Epub 2009 Dec 10.
80. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plastic and Reconstructive Surg* 2001;107:1419-29.
81. Muir D. The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair. *Experimental Neurology* 2010;223:102-11.
82. Ichihara S, Inada Y, Nakamura T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury*. 2008 Oct;39(4):29-39.
83. Hudson TW, Evans GRD, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg*. 1999 Oct;26(4):617-28.
84. Philipeaux JM, Vulpian A. Recherches experimentales sur la reunion bout a bout de nerfs de fonctions differents. *J. Physiol. C'homme Anim*. 1863;6:421-74.
85. Torres MFP, Graça DL, Farias ELP. Reparação microcirúrgicas de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de Biofill® em ratos Wistar. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003;55(5):557-561.
86. Borkenhagen M, Stoll RC, Neuenschwander P, Suter UW, Aebischer P. In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials*. 1998 Dec;19(23):2155-165.
87. Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1583-92.
88. Lu MC, Huang MT, Lin JH, Yao CH, Lou CW, Tsai CC, et al. Evaluation of a multi-layer microbraided polylactic acid fiber-reinforced conduit for peripheral nerve regeneration. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009 May; 20(5):1175-80.
89. Panseri S, Cunha C, Lowery J, Del Carro U, Taraballi F, Amadio S, et al. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnol*. 2008 Apr;8:39-51.

90. Daza CHM, Rengifo YR, Rubio JJS, Alzate LH, Hurtado H. Câmaras de silicona como injerto nervioso, análisis de la especialidad de regeneración del nervio peroneal o tibial : estudio experimental em ratas. *Rev Colomb de Ortop y Traumatol.* 1993;13(3):285-92.
91. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N. Nerve regeneration across an extended gap: A neurobiological view of nerve and the possible involvement of neurotrophic factors. *J Hand Surg Am.* 1982 Nov;7(6):580-7.
92. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 1991;25(1):79-82.
93. Lundborg G, Rósen B, Dahlin L, Danielsen N, Holmberg J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: Early results from a prospective, randomized, clinical study. *J Hand Surg AM.* 1997 Jan;22(1):99-106.
94. Braga Silva J, Gehlen D, Padoin A, Machado DC, Garicochea B, Costa da Costa J. Can Local Supply of Bone Marrow Mononuclear Cells Improve the Outcome from Late Tubular Repair of Human Median and Ulnar Nerves? *J Hand Surg Eur Vol.* 2008;33(4):488-93.
95. Ding XG, Li SW, Zheng XM, Hu LQ, Hu WL, Luo Y. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian J Androl.* 2009 Mar;11(2):215-21.
96. Rodríguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve Guides Seeded with Autologous Schwann Cells Improve Nerve Regeneration. *Exp Neurol.* 2000 Feb; 161(2):571-84.
97. Ho PR, Coan GM, Cheng ET, Niell C, Tarn DM, Zhou H, Sierra D, Terris DJ. Repair With Collagen Tubules Linked With Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor in a Rat Sciatic Nerve Injury Model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Jul;124(7):761-6.
98. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
99. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia.* Elsevier 128-156, 2004.
100. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-Rich Plasma: From Basic Science to Clinical Applications. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2259-72.
101. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7:52-62.
102. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Nov;114(6):1502-8.
103. Mehta S, Watson JT. Platelet Rich Concentrate: Basic Science and Current Clinical Applications. *J Orthop Trauma.* 2008 Jul;22(6):433-8.

104. Thorwarth M, Wehrhan F, Mosgau SS, Wiltfang J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone*. 2006 Jan;38(1):30-40.
105. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002 Apr;30(2):97-102.
106. Heldin CH, Westermark B. PDGF-like growth factors in autocrine stimulation of growth. *J Cell Physiol Suppl*. 1987;133(Suppl 5):31-34.
107. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004 Dec;13(4):301-9.
108. Pierce GF, Mustoe TA, Atrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*. 1991 Apr;45(4):319-26.
109. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification and characterization. *J Biol Chem*. 1983;258:7155-160.
110. Canalis E, Pash J, Varghese S. Skeletal growth factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1993;3(3):155-66.
111. Rudkin GH, Miller TA. Growth factors in surgery: Review. *J Plastic Reconstr Surg*. 1996;97:469-76.
112. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt R, 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.
113. Gibble J, Ness P. Fibrin glue: The perfect operative sealant? *Transfusion*. 1990;30:741-47.
114. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated Healing of Incisional Wounds in Rats Induced by Transforming Growth Factor-I. *Science*. 1987 Sep;237(4820):1333-6.
115. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, Orpana A, Ristimäki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost*. 1998 Jul;80(1):171-5.
116. Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 May;39(6):1028-35.
117. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Jan-Feb;18(1):93-103.

118. Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol.* 1990 May;94(5):624–9.
119. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
120. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE. Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-Inflammatory Properties. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):661-69.
121. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 Apr;34(4):665–71.
122. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet®, RegenPRP-Kit®, Plateltex® and one manual procedure. *Vox Sang.* 2009 Aug;97(2):110-8.
123. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004 Feb;75(1):93–99.
124. Gandhi A, Doumas C, O'Connor P, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone.* 2006 Apr;38(4):540–6.
125. 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 human. *J Periodontal Res.* 2002 Aug;37(4):300-6.
126. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Presti ML, Russo A, Bondi A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M. Platelet-rich plasma: New clinical application A pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury.* 2009 Jun;40(6):598–603.
127. Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-Rich Plasma for Bone Graft Enhancement in Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement: Patient Series Study. *Implant Dent.* 2004 Mar;13(1):65–72.
128. Mishra A, Pavelko T. Treatment of Chronic Elbow Tendinosis With Buffered Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1774-8.
129. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C. Effect of Platelet-Rich Plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 2008 Apr;24(3):159-67.
130. Zehnder JL, Leung LLK. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood.* 1990 Nov;76(10):2011-6.
131. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit  en parodontologie: le PRF. *Implantodontie.* 2001;42:55-62.

132. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):299-303.
133. Vasconcellos AVB, Teixeira APF, Cruz PV. Plaqueta rica em fibrina: um novo conceito em reparação tecidual. *Innov Implant J - Biomater Esthet.* 2008 Set;3(6):27-31.
134. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jul;108(1):56-61.
135. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):E37-44.
136. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):E56-60.
137. Raja SV, Naidu ME. Platelet-Rich Fibrin: Evolution of a second –generation platelet concentrate. *Indian J Dental Res.* 2008 Jan;19(1):42-6.
138. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):E45-50.
139. Ehrenfest DMD, Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 2010 Apr;81(4):546-55.
140. Ehrenfest DMD, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary Cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Sep;108(3):341-52.
141. Ehrenfest DMD, Doglioli P, Peppo GM, Corso M, Charrier JB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bonemesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 2010 Mar;55(3):185-94.
142. Huang FM, Yang SF, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2010 Oct;36(10):1628-32.
143. Lee EH, Kim JY, Kweon HY, Jo YY, Min SK, Park YW, Choi JY, Kim SG. A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):e33-8.

144. Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent*. 2011 Feb;20(1):2-12.
145. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically Repaired Achilles Tendon Tears Using Platelet-Rich Fibrin Matrices. *Am J Sports Med*. 2007 Feb;35(2):245-51.
146. Braccini F, Tardivet L, Dohan Ehrenfest DM. The relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) during middle ear surgery: preliminary results. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2009;130(3):175-80.
147. Braccini F, Dohan DM. [The relevance of Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) during facial aesthetic liposuction (Coleman's technique): preliminary results]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2007;128(4):255-60.
148. Pradeep AR, Sharma A. "Treatment of 3-Wall Intra-bony Defects in Chronic Periodontitis Subjects With Autologous Platelet Rich Fibrin - A Randomized Controlled Clinical Trial". *J Periodontol*. 2011 Apr 5.
149. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982 77:634-43.
150. Lowdon IMR, Seabe AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli. *J Neurosci Methods*. 1988 24:279-81.
151. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989 83:129-36.
152. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology* 204:443-453, 2007.
153. Lee JW, Kim SG, Kim JY, Lee YC, Choi JY, Dragos R, Rotaru H. Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jul 15.
154. Thorat M, Pradeep AR, Pallavi B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011 Oct;38(10):925-32.
155. Kuffler DP, Reyes O, Sosa IJ, Santiago-Figueroa J. Neurological recovery across a 12 cm long ulnar nerve gap repaired 3.25 years post trauma: case report. *Neurosurgery*. 2011 Dec;69(6):1321-6.
- 156 Trowbridge EA, Martin JF, Slater DN, Kishk YT, Warren CW, Harley PJ, et al. The origin of platelet count and volume. *Clin Phys Physiol Meas*. 1984 Aug;5(3):145-170

157. Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 3067–3073
158. Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini K. Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration. *Muscle Nerve*. Nov 2010.
159. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995 May;58(1-2):29-37.
160. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci. Methods*. 2001 Jul 15;108(1):1-9.
161. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 1998 Aug;21(8):1095-7.
162. Yu H, Peng J, Guo Q, Zhang L, Zhao B, Sui X, Wang Y, Xu W, Lu S. Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery*. 2009;29(4):330-6.
163. Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz G, Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol*. 15:315-329, 1998.
164. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical Focus*, Charlottesville, v. 16, n. 5, p. 132-135, May. 2004.
165. Carrmignoto G, Finesso M, Siliprandi R, Gorio A. Muscle reinnervation: I. Restoration of transmitter release mechanisms. *Neuroscience*. 1983 Mar;8(3):393-401.
166. Fraher J, Dockery PA. Strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. *Journal of Anatomy*. 1998 Aug;193(2):195-201.
167. Apel PJ, Ma J, Callahan M, Northam CN, Alton TB, Sonntag WE, Li Z. Effect of locally delivered IGF-1 on nerve regeneration during aging: an experimental study in rats. *Muscle Nerve*. 2010 Mar;41(3):335-41.
168. Roytta M, Salonen V. Long-term endoneurial changes after nerve transection. *Acta Neuropathol. Berlin*, 1988;76:35-45.
169. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004;24(5):408-15.

ARTIGOS

Efeito do Plasma Rico em Plaquetas e de Plaqueta Rica em Fibrina na regeneração de nervos
ciáticos em ratos

Martina Lichtenfels^I, Lucas Colomé^{II}, Alessandra Deise Sebben^{III}, Jefferson Braga-Silva^{IV}

I Bióloga, Mestranda em Medicina e Ciências da Saúde (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

II Médico Veterinário, Doutorando em Medicina e Ciências da Saúde (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

III Bióloga, Doutoranda em Medicina e Ciências da Saúde (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

IV Professor Titular Departamento de Cirurgia da PUCRS; Professor Livre-Docente em Cirurgia da Mão; Ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Microcirurgia Reconstructiva; Ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Cirurgia da Mão.

Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS.

*Autor correspondência. Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica, Faculdade de Medicina, PUCRS, Brasil, (51 33203500).
E-mail: martinalichtenfels@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do uso de Plasma rico em plaquetas (PRP) e de Plaqueta rica em fibrina (PRF) no reparo de nervos periféricos, comparando com os resultados do padrão-ouro (enxerto autólogo) e com grupo controle (solução salina).

Materiais e Métodos: Trinta e seis ratos Wistar foram utilizados no estudo, sendo quatro ratos utilizados como doadores de sangue. Segmentos de 10mm foram removidos do nos nervos ciáticos e reparados com um dos tratamentos: enxerto autólogo (AE); tubulização com solução salina (TS); tubulização com PRP; tubulização com PRF. Foram realizados Testes de marcha foram realizados periodicamente e após 90 dias pós-operatórios foram realizadas análises histomorfométricas.

Resultados: Os grupos AE, PRF e PRP demonstraram uma melhora funcional significativa em relação ao grupo TS ($p = 0,000$), que continuou apresentando déficit na marcha. O grupo AE demonstrou maior diâmetro de fibra nervosa no segmento proximal quando comparado ao grupo TS ($p = 0,037$), e também apresentou maior diâmetro de fibra em relação ao grupo PRF ($P = 0,001$) e PRP ($P = 0,002$), quando comparados os segmentos medianos. Quanto ao diâmetro axonal e espessura da bainha de mielina, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos.

Conclusão: Os dados deste estudo sugerem que tanto o PRP quanto o PRF possuem efeito positivo na recuperação funcional nervosa, apresentando resultados funcionais similares aos encontrados pelo grupo AE. Porém, não apresentam melhora significativa nas análises histomorfométricas.

Palavras-Chave: Nervos ciáticos. Plasma rico em plaquetas. Regeneração nervosa. Sistema nervoso periférico. Fibrina.

INTRODUÇÃO

Injúrias em nervos periféricos possuem uma alta prevalência, causando impactos socioeconômicos que representam sérios problemas a sociedade (1, 2, 3). Os nervos injuriados raramente apresentam recuperação funcional sem intervenção cirúrgica, e geralmente com resultados insatisfatórios. Portanto, apesar dos avanços na microcirurgia, o reparo de nervos periféricos ainda é um grande desafio (4). Em defeitos pequenos, o reparo primário é a técnica mais efetiva de reparo. Porém, quando ocorre perda de tecido nervoso resultando em defeitos longos, o tratamento padrão-ouro é o enxerto autólogo, utilizado com sucesso em reparos nervosos clinicamente (5, 6). O enxerto autólogo possui algumas limitações como necessidade de realização de dois procedimentos cirúrgicos em locais distintos, maior morbidade e a escassez de sítios doadores, e déficit sensitivo resultante na área doadora (7, 5). A técnica de tubulização surge como alternativa para substituir o uso de enxerto autólogo. Esta técnica utiliza condutos artificiais visando criar um microambiente ideal para a regeneração nervosa, e a adição de componente celulares dentro destes condutos pode otimizar o processo regenerativo (8, 9). Os concentrados de plaquetas como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido utilizados com sucesso na regeneração tecidual, devido a alta concentração de fatores de crescimento contidos nas plaquetas. Quando ativadas, as plaquetas liberam altas quantidades de fatores de crescimento como, PDGF, TGF- β 1, EGF e VEGF, que promovem proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese otimizando a regeneração (10, 11). O uso do PRP foi testado no reparo nervoso apresentando resultados contrastantes. Sariguney et al. demonstraram que o PRP otimiza o reparo de nervos ciáticos (12). Porém, Piskin et al. não evidenciaram melhora na regeneração axonal com o uso do PRP (13).

Plaqueta rica em Fibrina (Platelet-rich fibrin (PRF)) foi desenvolvida pela primeira vez na França por Choukroun et al. e é definida como um concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com alto potencial regenerativo (14). Assim como o PRP, o uso do PRF

é baseado na liberação de fatores de crescimento pela ativação plaquetária (15). O PRF apresenta além do concentrado de plaquetas, uma matriz de fibrina que suporta tanto as plaquetas como as células imunes circulantes, desempenhando assim mecanismos de defesa e papel importante na reparação tecidual (16, 17). PRF é utilizado com sucesso nas cirurgias orais e maxilofaciais, mostrando que este biomaterial é uma matriz favorável a regeneração dos tecidos (18, 19).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do uso de PRP e PRF no reparo de nervos periféricos, comparando os resultados com o enxerto autólogo considerado tratamento padrão-ouro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, pesando 200 - 250 gramas de massa corporal. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com controle de luz (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com água e alimentação *ad libitum*. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da universidade.

Procedimento Cirúrgico

Quatro animais foram utilizados como doadores de sangue para obtenção de PRP e PRF. Trinta e dois animais foram randomicamente divididos em 4 grupos: Autoenxerto (AE) (n=8), tubulização com adição de solução salina (TS) (n=8), tubulização com adição de PRP (PRP) (n=8), tubulização com adição de PRF (PRF) (n=8).

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião de forma asséptica. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil). Os ratos foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Cetamina (60 mg.kg^{-1}) e meperidina (20 mg.kg^{-1}). As cirurgias foram realizadas com os animais colocados em decúbito lateral e foram

utilizados os nervos ciáticos das patas esquerdas. Uma incisão longitudinal foi realizada 3mm paralela e posterior ao eixo do fêmur esquerdo, desde o tubérculo maior do fêmur até a região postero-lateral do joelho. A pele foi divulsionada, o músculo glúteo e bíceps femoral foram divididos por dissecação e o nervo ciático foi visualizado. No grupo tratado com autoenxerto (grupo I), foi realizada a secção de um segmento de 10 mm no nervo ciático (Figura 1) que foi reparada com o mesmo segmento invertido 180^o graus. O músculo foi suturado com fio polipropileno (Prolene® 6-0, M8306 T, Johnson & Johnson,São Paulo,Brasil) e a pele foi suturada com fio mononylon 4-0(Ethilon® P1667, Johnson & Johnson,São Paulo,Brasil). Nos grupos que foram reparados com sistema de tubulização (grupo II, III e IV), um segmento do nervo ciático de aproximadamente 5 mm foi ressecado, gerando um defeito de 10 mm. Um tubo de silicone de 12 mm foi interposto nas extremidades proximal e distal do nervo através de dois pontos de sutura ao epineuro em cada extremo, utilizando um fio mononylon 9-0 (Ethilon®, BV130-4,Johnson & Johnson Intl., Belgium). O tubo de silicone foi preenchido de acordo com os 3 grupos: grupo TS, no qual foram adicionados 40 µl de solução salina, ; grupo PRP, no qual foram adicionados 20 µl de Plasma rico em plaquetas e 20 trombina bovina e cloreto de cálcio; grupo PRF, no qual foram adicionados pequenos pedaços do coagulo de PRF. O músculo foi suturado com fio polipropileno (Prolene® 6-0, M8306 T, Johnson & Johnson,São Paulo,Brasil) e a pele foi suturada com fio mononylon 4-0(Ethilon® P1667, Johnson & Johnson,São Paulo,Brasil).

Obtenção Plasma Rico em Plaquetas

Utilizaram-se 2 ratos machos adultos doadores de sangue. Seis mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo 1,2 ml de anticoagulante ácido citrato dextrose- A (ACD-A) através de punção aortica para cada rato. O sangue anticoagulado foi centrifugado em centrífuga Hettich-Universal 320 (Universal 320, Buckinghamshire,England) por 10 minutos na velocidade de 1800 rpm. Ao final da centrifugação se formaram três camadas: a camada

inferior onde estão os remanescentes sanguíneos (RBC), camada superior contendo a porção do plasma acelular (PPP), e as plaquetas na camada intermediária. O plasma acelular e as plaquetas foram transferidos para um novo tubo e centrifugados por 10 minutos a velocidade de 3600 rpm. Esta segunda centrifugação separa o sangue em duas camadas: plasma acelular no topo e PRP no fundo do tubo. O plasma acelular foi descartado e aproximadamente 0,6 ml de PRP foram pipetados do fundo do tubo. O PRP e o sangue total dos ratos foram submetidos a contagem plaquetária com contador celular (CC-530; CELM, São Paulo, Brazil). O PRP foi ativado pela adição de 0,02 ml de cloreto de cálcio 6% (CaCl₂) e trombina humana 600U, a 0,02 ml do PRP. Foram inseridos 0,02 ml de PRP e 0,02 ml de Beriplast em cada tubo de silicone. Após ativação, o PRP ativado formou um gel dentro do tubo de silicone. No momento da cirurgia, o PRP e a mistura de ativação foram injetadas dentro dos tubos de silicone formando um gel

Obtenção Plaqueta Rica em Fibrina

O PRF foi obtido utilizando técnica previamente descrita (14). Foram utilizados 2 ratos como doadores de sangue. Seis mililitros de sangue foram obtidos em tubos estéreis sem adição de anticoagulante, através de punção aortica para cada rato. Imediatamente após o sangue ser coletado, os tubos foram centrifugados por 10 minutos na velocidade de 3000 rpm. O sangue formou 3 camadas: a camada inferior com os remanescentes sanguíneos (RBC), a camada intermediária contendo o coágulo de PRF e a camada superior de plasma pobre em plaquetas (PPP). O coágulo de PRF foi retirado do tubo com auxílio de pinça cirúrgica reta e deixado em placa metálica. O coágulo de PRF foi recortado em pequenos pedaços e introduzidos dentro do tubo de silicone no momento da cirurgia. O restante do coágulo foi colocado deixado na placa estéril de metal para liberar o soro contido nele. Após 10 minutos este soro foi coletado e utilizado para contagem de plaquetas PRF. O sangue total e o exsudato de PRF foram submetidos a contagem plaquetária pelo contador celular (CC-530; CELM, São Paulo,

Brazil)

Teste Funcional – Teste de Marcha

Os testes funcionais foram realizados em intervalos regulares através das medias de SFI, de acordo com Bain et al. (20). O teste de marcha foi realizado no período pré-operatório e nos 30^o, 60^o e 90^o dias pós-operatórios (21). As patas traseiras dos ratos foram pintadas com tinta nanking e os animais foram posicionados na passarela para caminharem e deixarem as impressões de suas pegadas. Nas patas experimentais (injurizadas) e normais foram medidos o comprimento da pegada: do calcanhar até o dedo mais longo; a abertura total dos dedos: do primeiro dedo ao quinto dedo; e a abertura dos dedos intermediários: entre o segundo dedo e o quarto dedo, e estes valores foram inseridos na fórmula do IFC.

$$SFI = - 38.3 \times (EPL - NPL) / NPL + 109.5 \times (ETS - NTS) / NTS + 13.3 \times (EIT - NIT) / NIT - 8.8$$

Quando o valor de IFC for igual a menos cem significa disfunção total do nervo e quando o valor for igual a zero significa função normal, ou seja, quanto mais próximo de zero o valor melhor será a capacidade funcional do rato.

Análise Histomorfométrica

Após 90 dias pós-cirúrgicos, os ratos foram eutanasiados para as análises histomorfométricas. Os tubos de silicone foram removidos, os segmentos de nervo ciático operados foram seccionados transversalmente, sendo cada nervo dividido em 3 porções: proximal, mediana e distal. Este mesmo processo foi realizado para nervos utilizados nos autoenxertos. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0.1M (pH 7.4)) por 48h a temperatura ambiente e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. As amostras foram incluídas em resina epoxy em moldes de silicone numerados com cavidades de 5mm de profundidade cada. Este molde oferece orientação adequada e ângulo de corte para as secções do nervo ciático. Posteriormente, as amostras foram seccionadas em ultra-micrótomo (Super

Nova Reichert-Yung, Austria), e foram realizados cortes semi-finos de 1µm de espessura. Estes cortes foram corados com azul de toluidina 1% para observação em microscopia de luz objetivando avaliação da regeneração das estruturas nervosas. As imagens foram digitalizadas e analisadas software analisador de imagens Image Pro Plus, versão 4.1 através de técnicas padrão. O observador estava cegado em relação aos grupos de tratamento. Dez campos representativos foram utilizados para medir diâmetro axonal, diâmetro de fibra nervosa e espessura de bainha de mielina. Os resultados encontrados foram comparados aos encontrados no grupo AE e no grupo TS.

Estatística

Todos os dados foram apresentados com média e desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias confirmadas ao nível de 5% de significância, com auxílio do software SPSS. Os grupos que apresentaram diferenças estatísticas serão submetidos ao teste de comparação de Tukey.

RESULTADOS

Resultado da contagem plaquetária

A média de plaquetas encontradas no sangue total dos ratos utilizados para obtenção do PRP foi de 460.000 plaquetas/ µl e o PRP apresentou média de 2.623.000 plaquetas/µl . A alta concentração plaquetária encontrada demonstra que a técnica de preparação do PRP foi efetiva, obtendo um aumento de 5,7 vezes no número de plaquetas no PRP quando comparado ao sangue total.

A média de plaquetas encontradas no sangue total dos ratos utilizados para obtenção do PRF foi de 423.000 plaquetas/µl e o PRF apresentou média de 35.000 plaquetas/µl (Figura 7). Estes resultados mostram que as plaquetas ficaram contidas dentro do coágulo de PRF, e por isso apresentaram baixas concentrações plaquetárias no exsudato de PRF.

Recuperação da função do nervo ciático

As médias de SFI obtidas no período pré-operatório mostraram função nervosa normal em todos os animais. Após 30 dias pós-operatórios, começaram a existir diferenças estatísticas no grau de melhora funcional entre os grupos ($p = 0,014$). O grupo AE apresentou uma maior melhora funcional quando comparado aos grupos PRP e TS, entretanto o grupo PRF não diferiu do grupo AE mas também não diferiu dos demais grupos (PRP e TS). Os valores de SFI obtidos com 60 dias pós-operatórios demonstraram diferentes níveis de recuperação funcional entre os grupos. Com 90 dias pós-operatórios, o grupo TS obteve uma melhora funcional pobre, possuindo diferença estatística significativa ($p = 0,000$) quando comparado aos grupos AE, PRP e PRF. Os grupos AE, PRP e PRF não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, todos obtendo uma boa melhora funcional. Estes dados podem ser observados através do código de letras na tabela 1.

Análise Histomorfométrica

O grupo AE demonstrou maior diâmetro de fibra nos segmentos proximais quando comparado ao grupo TS ($p = 0,037$). A comparação do diâmetro da fibra dos segmentos nervosos medianos também evidenciou maior diâmetro de fibras nervosas no grupo AE em relação ao grupo PRP ($P = 0,002$) e ao grupo PRF ($P = 0,001$). Nos segmentos nervosos distais, não foram encontradas diferenças significativas no diâmetro das fibras nervosas entre nenhum dos grupos (AE, TS, PRF, PRP) (Figura 1, 2). Observação qualitativa evidencia que as fibras mielinizadas apresentam distribuição regular com pouco tecido conjuntivo entre as fibras. Nos grupos PRF, PRP e TS o espaço endoneural entre as fibras mielinizadas foi maior que no grupo AE, e estes apresentaram presença de processos degenerativos. Quanto ao diâmetro dos axônios, nenhum dos segmentos nervosos mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos AE, TS, PRF e PRP (Figura 3). Os resultados da espessura da

bainha de mielina também não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas nos 3 segmentos nervosos entre nenhum dos grupos comparados (Figura 4).

DISCUSSÃO

Atualmente, o transplante autólogo de nervo periférico é considerado o padrão ouro no reparo de transecções com perda de substância nervosa, porém este demonstra limitações (5, 7). Em substituição ao enxerto autólogo, o uso de condutos nervosos vem demonstrando bons resultados no reparo de nervos periféricos (8, 9). A regeneração de nervos periféricos depende da interação entre diferentes elementos celulares e mediadores químicos que irão guiar o processo regenerativo. Os fatores neurotróficos, que são ativados em situações de traumas, estão fortemente relacionados à regeneração de nervos periféricos (22). A literatura especializada mostra que tanto o PRP, quanto o PRF são fontes abundantes de fatores de crescimento essenciais ao processo de regeneração. O PRF vem sendo utilizado com sucesso em estudos experimentais (23) e clínicos (24, 18, 19), evidenciando a eficiência do mesmo na regeneração de tecidos. O uso de PRP foi testado no reparo de lesões nervosas demonstrando resultados contrastantes (12, 13). Portanto, a utilização de Plasma Rico em Plaquetas e de Plaqueta Rica em Fibrina juntamente com a técnica de tubulização pode se tornar uma alternativa terapêutica promissora no reparo de lesões com perda de substância de nervos periféricos.

A concentração média de plaquetas encontrada no PRP dos ratos foi 5,7 vezes maior quando comparada ao sangue total, porém neste estudo foi utilizada a concentração plaquetária de 1.000.000 plaquetas/ μ l, pois esta é considerada a concentração terapêutica para humanos (25). Em estudo comparativo entre a concentração de fatores de crescimento do PRP de humanos, ratos e cabra foi demonstrado maiores concentrações dos fatores TGF- β 1, e PDGF- $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ no PRP humano, evidenciando diferenças entre espécies (26). Considerando estas diferenças

entre as espécies, e a inexistência da padronização de um protocolo de obtenção de PRP, os níveis terapêuticos de concentração plaquetária e as taxas de fatores de crescimento em animais necessitam ser definidos para a obtenção de melhores resultados com o uso de PRP em animais. A média de plaquetas encontradas no sangue total dos ratos utilizados para obtenção do PRF foi de 423.000 plaquetas/ μ l e o PRF apresentou média de 35.000 plaquetas/ μ l, demonstrando a tendência das plaquetas ficarem contidas dentro do coágulo de PRF, liberando baixas concentrações plaquetárias no seu exsudato. Este achado está de acordo com os resultados encontrados por Ehrenfest et al. nos quais aproximadamente 97% das plaquetas ficam concentradas no coágulo de PRF (27).

Os resultados da análise da marcha indicaram uma melhora significativa nos grupos AE, PRP e PRF com 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. 90 dias pós-cirúrgicos, o grupo TS indicou déficit funcional com diferenças estatísticas significantes quando comparados aos grupos AE, PRP e PRF ($p = 0,000$). Os grupos AE, PRP e PRF não demonstraram diferenças significativas, todos apresentando melhora funcional. Estes achados corroboram os resultados encontrados por Ho et al. que demonstraram melhora nos grupos experimentais em relação ao grupo que utiliza o tubo vazio, nos períodos de 30, 60 e 90 dias (28). O grupo AE apresentou fibras mielinizadas de maior tamanho quando comparadas aos demais grupos, com distribuição regular e pouco tecido conjuntivo entre as fibras. Estes resultados estão de acordo com a recuperação funcional encontrada neste grupo pelo SFI. A análise histológica mostrou que mesmo apresentando recuperação da função motora, o nervo ciático dos ratos dos grupos PRF e PRP permaneceram com a presença de processos degenerativos. No grupo TS também pode se observar a permanência de processos degenerativos, e aumento de tecido conjuntivo entre as fibras nervosas. A análise morfométrica demonstrou pouca diferença entre os 4 grupos analisados, possuindo resultados contrastantes com os encontrados pelo SFI. A análise morfométrica após lesão traumática de nervo evidencia as condições tróficas dos nervos

porém não reproduz a capacidade funcional (29). Diversos autores que pesquisam regeneração de lesões traumáticas de nervos periféricos não encontraram relação entre SFI e análises morfométricas, estando estes de acordo com os achados desta pesquisa (30, 31). Em relação ao diâmetro da fibra, o grupo AE demonstrou os melhores resultados em relação aos demais grupos. Yu et al. utilizou diferentes técnicas para reparar lesão de 10mm no nervo ciático de ratos wistar e constataram um diâmetro de fibra maior que os encontrados na presente pesquisa (32). Tal fato pode ser explicado pela regeneração incompleta encontrada em diversos ratos dos grupos experimentais, e provavelmente os valores encontrados no grupo AE se apresentassem normais se esta variável fosse analisada em um período de tempo maior. Chamberlain et al. demonstrou um aumento no diâmetro das fibras nervosas com o passar do tempo, 30 semanas após a cirurgia o diâmetro de fibra encontrado foi de 3,2 – 3,8 μm e após 60 semanas pós-cirúrgicas estes valores aumentaram para 3,6 – 4,4 μm , ressaltando a necessidade de um maior período de avaliação (33). Os grupos PRF e PRP apresentaram maior diâmetro axonal e maior espessura de bainha de mielina nos segmentos medianos, isto pode ser explicado pela presença dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas contidas no PRF e PRP. Estes fatores de crescimento agem no reparo tecidual aumentando a proliferação e diferenciação celular otimizando o processo regenerativo. Comparando diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina, o fato de não existir diferença estatística entre os grupos AE, PRP e PRF em relação ao grupo TS indica que estes apresentaram uma maturação incompleta do nervo durante o processo de regeneração. Røyttä & Salonen constataram que o diâmetro dos axônios e a espessura da bainha de mielina aumentaram até 50 semanas após o reparo do nervo ciático de ratos (34). O período pós-operatório utilizado nesta pesquisa foi de apenas 12 semanas, o que sugere que as fibras nervosas não tenham alcançado o seu desenvolvimento regenerativo completo, estando o processo de mielinização ainda incompleto. O tempo de 12 semanas de observação utilizado

neste estudo, o mesmo empregado por Braga-silva et al. (35) e Gravvanis et al. (36), parecer ter sido insuficiente para o crescimento e maturação dos axônios não apresentando diferenças estatísticas significantes em relação ao diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina. Porém, como citado anteriormente, a mielinização das fibras nervosas é somente um sinal de maturidade, podendo estas fibras conduzirem impulsos nervosos antes de sua mielinização completa. Contudo, constatamos em nossa pesquisa que mesmo não apresentando diferenças morfométricas significantes, o grupo AE, PRF e PRP otimizaram a recuperação funcional demonstrada no teste de marcha pelo SFI.

CONCLUSÃO

Considerando as limitações do presente estudo e baseado nas análises morfométricas, é possível concluir que os grupos AE, PRP, PRF e TS não apresentam diferença estatística significativa em relação ao diâmetro axonal e espessura de bainha de mielina. Porém, os grupos PRP e PRF possuem efeitos positivos na recuperação funcional de nervos periféricos, assim como o grupo AE. O grupo TS mostrou diferenças estatísticas significantes quando comparado aos demais grupos, demonstrando déficit funcional. Este estudo sugere que tanto o PRP quanto o PRF otimizam a recuperação funcional de lesões de 10mm no nervo ciático de ratos.

REFERÊNCIAS

1. Kelsey J, Praemer A, Nelson L, Felberg A, Rice D. Upper extremity disorders: frequency, impact, and cost. London: Churchill-Livingstone Press, 1997:26-42.
2. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. J Trauma 1998;45:116-22.
3. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. Drug Discovery Today: Disease Models 2004;1(2):177-85.
4. Hart AM, Terenghi G, Wiberg M. Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. Neurol Res 2008;30:999-1011.

5. Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2002 Feb;18(2):97–109.
6. Evans GRD. Peripheral Nerve Injury: A review and approach to tissue engineering constricts. *The Anatomical Record*. 263:396-404, 2001.
7. Hudson TW, Evans GRD, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg*. 1999 Oct;26(4):617–28.
8. Orbay H, Uysal AC, Hyakusoku H, Mizuno H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011 Dec 1.
9. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa da Costa J. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur Vol*. 2008 Aug;33(4):488-93.
10. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002 Apr;30(2):97-102.
11. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
12. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C. Effect of Platelet-Rich Plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 2008 Apr;24(3):159-67.
13. Piskin A, Kaplan S, Aktaş A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt HH, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery*. 2009;29(2):144-53.
14. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001;42:55-62.
15. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, Kim ES, Choung PH. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011 Feb;17(3-4):349-59.
16. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Mar;101(3):E37-44.
17. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Mar;101(3):E56-60.
18. Lee JW, Kim SG, Kim JY, Lee YC, Choi JY, Dragos R, Rotaru H. Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jul 15.
19. Thorat M, Pradeep AR, Pallavi B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011 Oct;38(10):925-32.
20. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989 83:129-36.

21. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982 77:634-43.
22. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14
23. Lee EH, Kim JY, Kweon HY, Jo YY, Min SK, Park YW, Choi JY, Kim SG. A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):e33-8.
24. Kuffler DP, Reyes O, Sosa II, Santiago-Figueroa J. Neurological recovery across a 12 cm long ulnar nerve gap repaired 3.25 years post trauma: case report. *Neurosurgery.* 2011 Dec;69(6):1321-6;
25. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
26. Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 3067–3073.
27. Ehrenfest DMD, Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 2010 Apr;81(4):546-55.
28. Ho PR, Coan GM, Cheng ET, Niell C, Tarn DM, Zhou H, Sierra D, Terris DJ. Repair With Collagen Tubules Linked With Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor in a Rat Sciatic Nerve Injury Model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Jul;124(7):761-6.
29. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods.* 1995 May;58(1-2):29-37.
30. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci. Methods.* 2001 Jul 15;108(1):1-9.
31. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1998 Aug;21(8):1095-7.
32. Yu H, Peng J, Guo Q, Zhang L, Zhao B, Sui X, Wang Y, Xu W, Lu S. Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nervr grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery.* 2009;29(4):330-6.
33. Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Stricharts G, Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol.* 15:315-329, 1998.
34. Roytta M, Salonen V. Long-term endoneurial changes after nerve transection. *Acta Neuropathol. Berlim,* 1988;76:35-45.
35. Braga Silva J, Gehlen D, Javier ARR, Menta C, Atkinson EA, Machado DC. 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 Ortop Bras.* 2006;14(5):273-75
36. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral

nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*. 2004;24(5):408-15.

Figuras

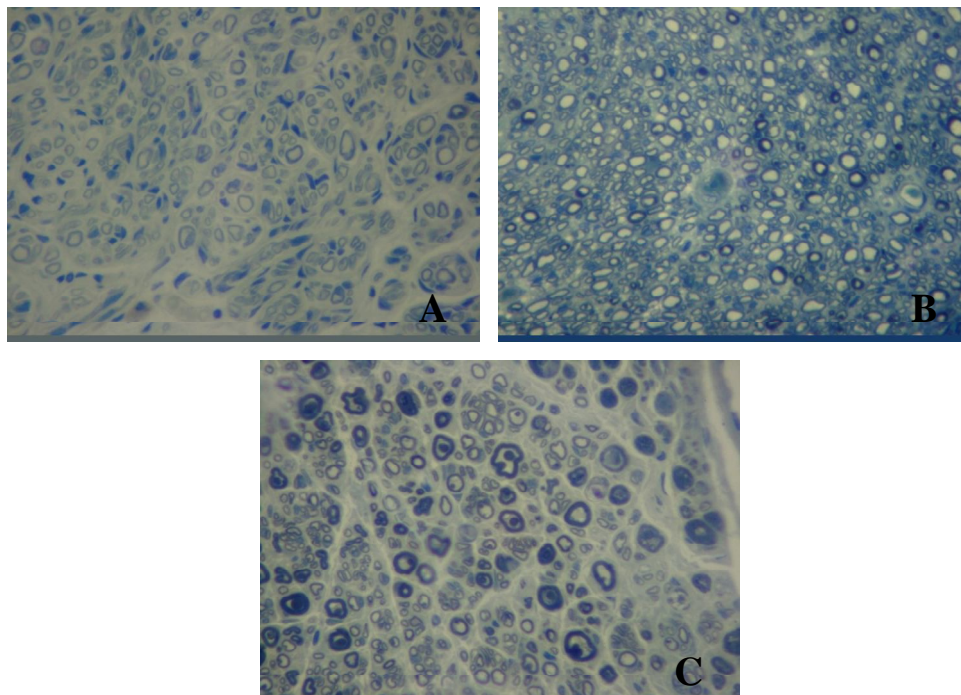


Figura 1. Nervos ciáticos regenerados, segmentos medianos, dos grupos AE (A), PRF (B), e PRP (C), com coloração azul de Toluidina. Aumento de 100X.

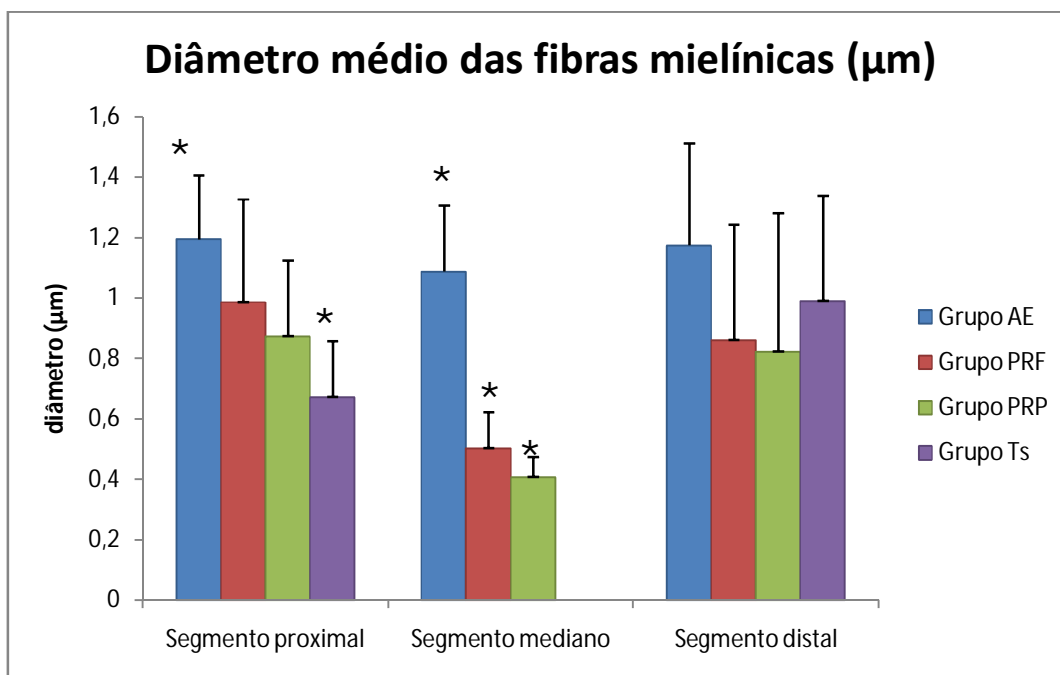


Figura 2. Diâmetro médio das fibras (\pm SEM) de todos os grupos, 3 meses após a injúria, calculados a partir dos cortes semi-finoas dos nervos. Mostra diferença estatística significativa nos segmentos proximais entre os grupos AE e TS. Nos segmentos medianos, os grupos PRP e PRF demonstraram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo AE.

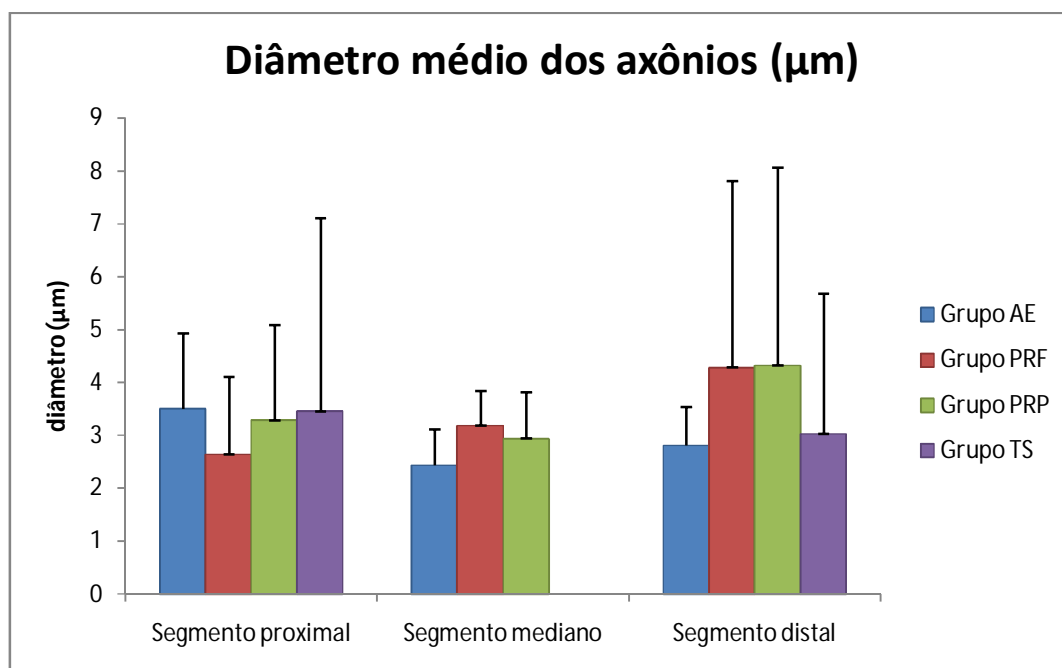


Figura 3. Diâmetro médio dos axônios (\pm SEM) nos três grupos, 3 meses após a injúria, calculados a partir dos cortes semi-finoas dos nervos. Não evidenciando diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

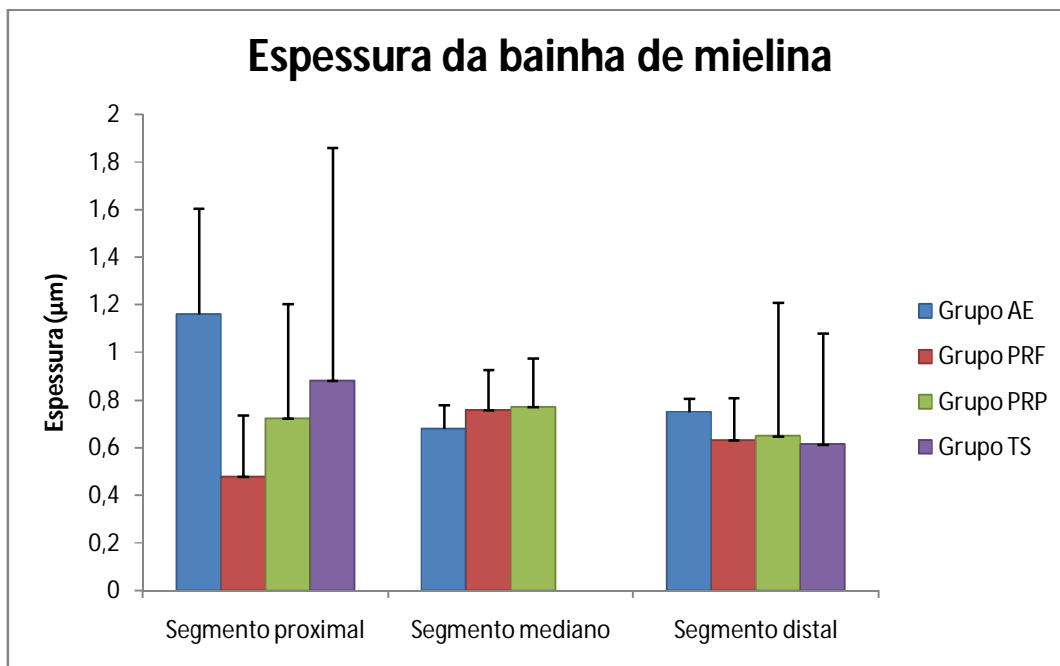


Figura 4. Espessura média da bainha de mielina (\pm SEM) nos três grupos, 3 meses após a injúria, calculados a partir dos cortes semi-finoas dos nervos. Não evidenciando diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

TABELA 1

Índice de Função Ciática (Sciatic Function Index (SFI))

Grupos	Período de observação			
	Pré-operativo	30 dias	60 dias	90 dias
AE	$-5.42^a \pm 6.373$	$-58.32^a \pm 17.835$	$-52.84^a \pm 15.901$	$-42.39^a \pm 10.348$
TS	$-5.6^a \pm 6.661$	$-77.13^b \pm 8.746$	$-71.54^b \pm 5.623$	$-81.02^b \pm 8.298$
PRF	$-5.63^a \pm 7.546$	$-69.63^{ab} \pm 12.951$	$-59.85^{ab} \pm 13.379$	$-53.5^a \pm 11.88$
PRP	$-6.4^a \pm 8.3$	$-76.76^b \pm 4.586$	$-63.67^{ab} \pm 9.217$	$-55.86^a \pm 11.2$

Todos os valores são representados por média e desvio padrão dos ratos de cada grupo. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Submission Confirmation for Effect of Platelet Rich Plasma and Platelet Rich Fibrin on
Sciatic Nerve Regeneration in a Rat Model

De jsr@stellarmed.com

Para martinalichtenfels@hotmail.com

12 de Janeiro de 2012 23:09

Dear MSc Lichtenfels,

Your submission entitled "Effect of Platelet Rich Plasma and Platelet Rich Fibrin on Sciatic Nerve Regeneration in a Rat Model" has been received for consideration in the Journal of Surgical Research.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to EES (<http://ees.elsevier.com/jsurgres/>) as an author.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to the Journal of Surgical Research.

Kind regards,

Editorial Office
Journal of Surgical Research

Effect of Platelet Rich Plasma and Platelet Rich Fibrin on Sciatic Nerve Regeneration in a Rat
Model

Martina Lichtenfels^I, Lucas Colomé^{II}, Alessandra Deise Sebben^{III}, Jefferson Braga-Silva^{IV}

^IMSc. Biologist, Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^{II}MD, PhD. Veterinary, Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^{III}PhD. Biologist, Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^{IV}MD, PhD. Titular Professor, Department of Surgery, and Full Professor in Surgery of the Hand, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Original Article - Experimental Research

To whom correspondence and reprint requests should be addressed at. Laboratory of Medical Abilities and Surgical Research, School of Medicine, University Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, (55 – 51 - 33203500). E-mail: martinalichtenfels@hotmail.com

ABSTRACT

Background: Evaluates the effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Platelet Rich Fibrin (PRF) on peripheral nerve repair, comparing the results to the autologous nerve graft and to the saline solution group.

Materials and Methods: Thirty six Wistar rats were used in the study, and four of these were blood donors. A segment of 10mm long was excised from the sciatic nerve and bridged with one of the treatments: Autologous nerve grafts (ANG); tubulization with saline solution (TS); tubulization with PRP; tubulization with PRF. Walking track analysis were performed periodically and on the 90 postoperative day, the rats were euthanized and performed histomorphometric analysis.

Results: The ANG, PRF and PRP groups presented a significant functional improvement in relation to the SS group ($p = 0.000$), which showing functional deficit. The ANG group achieved a larger nerve fiber diameter at the proximal segment while comparing with the TS ($p = 0.037$), and also comparing with the PRF ($p = 0.001$) and the PRP ($p = 0.002$) while analyzing the medial segments. About the axonal diameter and the myelin sheath thickness, no statistical significant difference has been found between the groups.

Conclusion: This study suggests that PRP and PRF have positive effects on the functional nerve recovery, presenting functional results similar to the ANG group. However, the PRP and PRF don't achieve a significant improvement on the histomorphometric analysis.

Keywords: Sciatic nerve. Platelet rich plasma. Nerve regeneration. Peripheral nervous system. Fibrin.

INTRODUCTION

Peripheral nerve injury (PNI) has a relatively high prevalence causing socio-economic impacts that represents a serious problem to society (1,2,3). The injured nerves rarely presents functional recovery without surgical intervention, and commonly presents unsatisfactory results. Therefore, despite advances in microsurgery, the peripheral nerve repair is still a challenge (4). In short gaps the primary repair is the most effective technique, however, when occur loss of nerve tissue resulting in long gaps the gold standard treatment is the autologous nerve graft, used successfully in bridging peripheral nerve defects in clinical practice (5, 6). Autologous nerve grafts repair implies in disadvantages such the additional surgery, morbidity and sensation loss at the donor site, and limited donor nerve availability (7, 5).

The tubulization technique appears as an alternative to autologous nerve graft method for bridging peripheral nerve injury. These technique use tubular guide aiming to provide a favorable microenvironment for regeneration and the addition of cellular components inside the conduit may enhance nerve regeneration (8, 9).

The platelet concentrates such as platelet-rich plasma (PRP) has been used successfully on tissue regeneration, due the high concentration of growth factors contained in platelets. When activated the platelets release high quantities of growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-b1 (TGF-b1), epidermal growth factor (EGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) , which promote cellular proliferation and differentiation, chemotaxis and angiogenesis optimizing the wound healing process (10, 11).

The use of PRP was tested in nerve repair and show contrasting results. Sariguney et al. demonstrated that PRP enhance sciatic nerve repair (12). However, Piskin et al. evidence that PRP does not enhance axon regeneration in peripheral nerve repair (13).

Platelet-rich fibrin (PRF) was developed in France by Choukroun et al. and is defined as a platelet concentrate on a fibrin membrane with high regenerative potential (14). As well as PRP, the PRF use is based on the growth factors release by platelets activation (15). However, the PRF forms a strong natural fibrin matrix which concentrates platelets and leucocytes that play immunological mechanisms and wound healing (16, 17). PRF is widely used in oral and maxillofacial surgery revealing that this biomaterial is a favorable matrix to enhance tissue repair (18, 19).

The aim of this study was to investigate the effects of PRP and PRF on peripheral nerve regeneration in comparison to the most common peripheral nerve repair methods.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty-six male Wistar rats, weighing 200 g to 250 g, were used in the experiment. The animals were housed in plastic cages (one animal per cage), maintained at 22°C with a 12 h light/dark cycle and allowed free access to food and water. This experimental study was approved by the university animal care committee

Operative Procedure

Four animals were used as blood donor to obtain PRP and PRF. Thirty-two animals were randomly assigned into four groups: autologous nerve graft (ANG) (n=8), tubulization with saline solution (SS) (n=8), tubulization with PRP (PRP) (n=8), tubulization with PRF (PRF) (n=8). All surgical procedures were performed by the same surgeon under aseptic operating conditions. Microsurgical techniques were performed using a Zeiss operating microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Rats were anesthetized by intramuscular injection of Ketamine hydrochloride (60 mg.kg⁻¹) and meperidine (20 mg.kg⁻¹). Surgery was performed with the animal in the side position using the sciatic nerves of the left limbs. An oblique

gluteal skin incision and a muscle-splitting incision were used to expose the sciatic nerve from the sciatic notch to the bifurcation point. In autologous nerve grafts (ANG) the sciatic nerve was transected and a 10 mm segment was excised proximal to the trifurcation of the nerve. This nerve segment was rotated 180° and reimplanted between the nerve stumps using 6-0 prolene epineural suture (Prolene® 6-0, M8306 T, Johnson & Johnson,São Paulo,Brazil). In experimental groups SS, PRP and PRF, the sciatic nerve was transected and a 5 mm segment was excised proximal to the trifurcation of the nerve. The nerve was bridged with a 12 mm silicone conduit and one millimeter of nerve stumps was incorporated into each end of the conduit and fixed with 9-0 mononylon epineural suture (Ethilon®, BV130-4,Johnson & Johnson Intl., Belgium) to create a 10 mm nerve gap. The conduit was filled in accordance with three groups: the SS group, in which 40 µl of saline solution was added to silicone conduit; the PRP group, in which 20 µl of PRP and 20 µl of bovine thrombin and calcium chloride were injected into the conduit, forming a activated PRP; and the PRF group, in which small pieces of PRF were added into the conduit. After surgery, the muscle approximation was achieved with 6-0 prolene suture (Prolene® 6-0, M8306 T, Johnson & Johnson,São Paulo,Brazil) and the skin was closed with 4-0 mononylon (Ethilon® P1667, Johnson & Johnson,São Paulo,Brazil) running silk sutures.

Preparation of Platelet-Rich Plasma

Two rats were used as blood donor. Six milliliters of blood treated with 1,2mL of anticoagulant solution ACD-A was obtained in a sterile tube from aortic puncture of each rat. The blood was subjected to centrifugation in an Hettich-Universal 320 (Universal 320, Buckinghamshire,England) centrifuge for 10 min at 1800 rpm. The blood separated into three layers: red blood cells at the bottom, acellular plasma at the top, and platelets, called buffy coat, in between. The acellular plasma and platelets were transferred with a sterile pipette to another tube and centrifuged for 10 min at 3600 rpm. This second centrifugation separated the

blood into two layers: plasma acellular at the top and platelet rich plasma at the bottom. The acellular plasma was discarded and about 0,6mL of PRP was pipetted from the bottom of the tube. The prepared PRP and whole blood of the rats were subjected to platelet counting with a cell counter (CC-530; CELM, São Paulo, Brazil). To activate the PRP, 0,02mL of 6% calcium chloride and bovine thrombin (600 U/ml in 100 mg/ml calcium chloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to 0,02mL of PRP. Calcium chloride neutralizes the anticoagulant effect of citrate, and bovine thrombin initiates the clotting process. At surgery, the PRP and activator was injected into the silicone conduits forming a gel.

Preparation of Platelet Rich Fibrin

The PRF was produced using the technique previously described (Choukroun et al., 2001). Two rats were used as blood donor. Six milliliters of blood was obtained in a sterile tube, without anticoagulant, from aortic puncture of each rat. Immediately after the blood draw, the tubes were centrifuged for 10 min at 3000 rpm (approximately 400 g). The blood separated into three layers: acellular plasma at the top, red blood cells at the bottom, and the PRF clot in the middle. After centrifugation, the PRF clot was removed from the tube using sterile tweezers, and placed in a sterile metal cup. The PRF clot was cut in few millimeter fragments to adding into the silicone conduits at surgery. The PRF clot exudate, serum released by PRF clot, and whole blood of the rats were subjected to platelet counting with a cell counter (CC-530; CELM, São Paulo, Brazil)

Functional Assessment - Sciatic functional index (SFI)

The functional condition of the animals was assessed at regular intervals through the use of the Sciatic Functional Index (SFI), according to Bain et al., (20). Walking track analysis was performed at preoperative, 30, 60, and 90 days after surgery (21). The rat's hind feet were painted with nankin ink and the animals were placed in a walking pathway to walk down the track, leaving its footprints. The lengths of the third toe to its heel (PL), the first to the fifth

toe (TS), and the second toe to the fourth toe (IT) were measured on the experimental side (E) and the contralateral normal side (N) in each rat. The sciatic function index (SFI) in each animal was calculated by the following formula:

$$\text{SFI} = -38.3 \times (\text{EPL} - \text{NPL}) / \text{NPL} + 109.5 \times (\text{ETS} - \text{NTS}) / \text{NTS} + 13.3 \times (\text{EIT} - \text{NIT}) / \text{NIT} - 8.8$$

In general, the SFI oscillates around 0 for normal nerve function, whereas around -100 SFI represents total dysfunction.

Histomorphometric Analysis

On the 90th postoperative day, under general anesthesia, the regenerated sciatic nerves were removed from the rats and cut in three sections, distal, median and proximal to the injury. The tissues were fixed with 2,5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) for 48 hours at room temperature and post-fixed with 1% osmium tetroxide. For embedding in epoxy resin, were used silicon embedding mold with a depth of 5 mm each. This flat-shaped mold would offer proper orientation and cutting angle for sciatic nerve sections, allowing a properly analyze of number of myelinated axon, cross section area, and myelin sheet thickness. Serial transverse semi-thin sections of 1 μm thickness were cut with an ultramicrotome (Leica, Ultracut, UCT, Austria), stained with 1% toluidine blue for light microscopy examination. Images were digitized with a charge-coupled device camera and analyzed by standard image processing and analysis techniques. The observer was blinded in the evaluation of the different groups. Ten representative fields were measured for axon diameter, fiber diameter and myelin thickness. Morphometric indices from experimental neural specimens were compared to the autologous nerve graft and the tubulization technique with saline solution controls.

Statistics

All data are presented as the mean value and standard deviation (SD). Results were analyzed using a factorial analysis of variance (ANOVA), with the appropriate post-hoc between-groups comparison test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Platelets Count

Platelet count analysis was performed on whole blood, platelet-rich plasma and Platelet-rich Fibrin from each rat used as blood donor in this study. The mean platelet count in whole blood was 460.000 platelet/ μ l and the PRP exhibited average platelet concentration of 2.623.000 platelets/ μ l. These platelet concentration were equivalent to 5,7 fold increases compared with the whole blood platelet count. Blood samples exhibited an original platelet count mean of 423.000 plaquetas/ μ l, while the mean platelet count in the PRF was 35.000 plaquetas/ μ l.

Recovery of Sciatic Nerve Function

Preoperative SFI means showed a normal nerve function in all animals. Thirty days after surgery, the SFI show statistically significant differences between groups ($p = 0.014$). The AE group presented a better functional recovery when compared with SS and PRP groups, however, the PRF group demonstrated similar results to AE group but also has not statistically difference from the others groups (SS and PRP). The SFI values indicated functional recovery of different levels in the groups at sixty days postoperative. 90 days after surgery, the SS group indicated a poor functional recovery with statistically significant differences compared to AE, PRP and PRF groups ($p = 0.000$). The groups AE, PRP and PRF showed no statistically significant differences, all the groups demonstrated a good functional recovery. This data is presented in Table 1.

Histomorphometric Analysis

The diameter of nerve fibers in the proximal stump of the ANG group was significantly higher than in SS group ($p = 0.037$). Also, the ANG group show higher fiber diameter in median stump in comparison to the PRP group ($P = 0.002$) and PRF group ($P = 0.001$) (Figure 1, 2). In the distal stump, no significant difference in fiber diameter was found between any groups. The ANG group showed a regular distribution of myelinated fiber, with little quantity of conjunctive tissue between them. In SS, PRP and PRF groups the endoneurial space between the myelinated fiber were larger than ANG group and these groups demonstrate the presence of degenerative process. No significant differences in axon diameter estimation were found between the ANG, SS PRP and PRF groups (Figure 3). The estimation of myelin thickness show similar results in all groups with no significant difference between them (Figure 4).

DISCUSSION

Nowadays the autologous nerve graft represents the gold-standard in bridging peripheral nerve transections when occurs substance loss, however, this technique implies limitations (5, 7). Tubulization technique is often used in replacement of the autologous nerve grafts, and showed good results in nerve repair (8, 9). Peripheral nerve regeneration depends on the interaction between cellular elements and chemical mediators that guide the regenerative process. The neurotrophic factors, activated in traumas situations, are strongly related to the peripheral nerve regeneration (22). The literature demonstrates that both the PRP and the PRF are abundant sources of growth factors essentials to the wound healing process. The PRF has been used sucessfully in experimental (18) and clinical (24, 18, 19) studies showing the efficiency of this biomaterial. The use of PRP was tested in nerve repair and showed contrasting results (12, 13). Therefore, the tubulization technique added with PRP or PRF may become a promising alternative in peripheral nerve repair with substance loss.

In these study, the mean platelet count in the PRP were equivalent to 5,7 fold increases compared with the whole blood platelet count, however, we used a platelet concentration of 1.000.000 platelets/ μ l considered the therapeutic platelet concentration for humans (25). A comparative study demonstrated that the concentration of growth factors TGF- β 1, and PDGF- $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ in the human PRP was higher when compared with rat and goat PRP (26). Considering these differences between species and the lack of a standard protocol for PRP obtaining, future studies should be designed to found a PRP concentration that enhance the efficacy of PRP in animal nerve repair. The mean platelet count in the PRF was 35.000 platelets/ μ l, demonstrated that the platelets remain contained within the PRF clot, releasing low platelets concentrations in the PRF exsudate. Ehrenfest et al., showed that about 97% of platelets remain contained within PRF clot, in accordance with our results (27).

Walking track tests results indicated a significant functional improvement in ANG, PRP and PRF groups at 30, 60 and 90 days after surgery. 90 days after surgery, the SS group indicated a functional recovery deficit with statistically significant differences compared to AE, PRP and PRF groups ($p = 0.000$). The groups AE, PRP and PRF showed no statistically significant differences, and all groups demonstrated an improvement in functional recovery. These results are consistent with the reports showed by Ho et al. which demonstrated functional improvement in the experimental groups in relation to the control group (sham tube) at 30, 60 and 90 days after the surgery (28).

The ANG group presented larger fiber diameter in comparison to the others groups, with regular distribution and little conjunctive tissue between the fibers. These results agree to the functional recovery founded in this group. Histological assessment showed that even with functional recovery, the sciatic nerves from PRP and PRF groups remained with the presence of degenerative process. In SS group the nerves evidenced the presence of degenerative process and an increase of endoneurial space between the nerve fibers.

The morphometric analysis and the functional recovery demonstrated contrasting results. The morphometric data after nerve transections evidence the trophic conditions of regenerated nerves but does not reflect the functional capacity (29). According to previous works, no relations about the SFI and the morphometric analysis were found, in agreement to the data found in this study (30, 31). The ANG group achieved the best results on the fiber diameter. Yu et al. used different methods to bridge the 10mm sciatic nerve injury on Wistar rats, and indicated a larger fiber diameter than the results found in this study (32). This fact may be related to the incomplete nerve regeneration found in the experimental groups, and probably the data found in the ANG group would be normal if analyzed in a longer term study periods. Chamberlain et al. presented an increase of the nerve fiber diameter during the study. Thirty weeks after the surgery, the authors found a fiber diameter of 3.2 – 3.8 μm , and after sixty weeks these values increased to 3.6 – 4.4 μm , highlighting the need of a longer evaluation period (33). The PRP and PRF groups showed a higher fiber diameter and myelin thickness in the median stump, being explained by the presence of growth factors released by the platelet in the PRP and PRF. These growth factors acts in tissue regeneration increasing the cellular proliferation and differentiation enhancing the wound healing process. The ANG, PRP and PRF groups presented no statistical significant difference in fiber diameter and myelin thickness in relation to the SS group, indicating that these groups demonstrated nerve incomplete maturation during the regeneration process. R ytt  & Salonen indicated that the axonal diameter and the myelin thickness increased during the period of 50 week after sciatic nerve repair in rats (34). The postoperative period used in this research was 12 week, suggesting that the nerve fibers haven't reached the complete regenerative development, and the myelinization process being still incomplete. The observation period of 12 weeks employed in this study, the same observation period of Braga-silva et al. (35) and Gravvanis et al. (36), appears to be insufficient to the axonal maturation and growth. However the nerve

fiber myelination is just a maturity signal, allowing these fibers to conduct nerve impulses before the complete myelination. Although, this study demonstrated that the ANG, PRF and PRP groups improved the functional recovery in 10mm sciatic nerve injuries, however, presenting no significant differences in morphometric analysis.

CONCLUSION

Regarding the limitations of the current study and based in the morphometric analysis, is possible to conclude that the AE, PRP, PRF and SS groups showed no statistical significant differences in axonal diameter and myelin thickness. However, the PRP and PRF groups demonstrated positive effects on peripheral nerve functional recovery, likewise, the ANG group. The SS group showed statistical significant differences in relation to the other groups, with functional deficit. This study suggests that the PRP and PRF improve functional recovery in 10mm sciatic nerve injury.

REFERENCES

1. Kelsey J, Praemer A, Nelson L, Felberg A, Rice D. Upper extremity disorders: frequency, impact, and cost. London: Churchill-Livingstone Press, 1997:26-42.
2. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998;45:116-22.
3. Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2004;1(2):177-85.
4. Hart AM, Terenghi G, Wiberg M. Neuronal death after peripheral nerve injury and experimental strategies for neuroprotection. *Neurol Res* 2008;30:999-1011.
5. Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2002 Feb;18(2):97-109.
6. Evans GRD. Peripheral Nerve Injury: A review and approach to tissue engineering constructs. *The Anatomical Record.* 263:396-404, 2001.
7. Hudson TW, Evans GRD, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg.* 1999 Oct;26(4):617-28.
8. Orbay H, Uysal AC, Hyakusoku H, Mizuno H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011 Dec 1.

9. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Costa da Costa J. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur Vol.* 2008 Aug;33(4):488-93.
10. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 2002 Apr;30(2):97-102.
11. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
12. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C. Effect of Platelet-Rich Plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 2008 Apr;24(3):159-67.
13. Piskin A, Kaplan S, Aktaş A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt HH, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery.* 2009;29(2):144-53.
14. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie.* 2001;42:55-62.
15. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, Kim ES, Choung PH. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2011 Feb;17(3-4):349-59.
16. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):E37-44.
17. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):E56-60.
18. Lee JW, Kim SG, Kim JY, Lee YC, Choi JY, Dragos R, Rotaru H. Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Jul 15.
19. Thorat M, Pradeep AR, Pallavi B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2011 Oct;38(10):925-32.
20. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989 83:129-36.
21. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982 77:634-43.
22. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14
23. Lee EH, Kim JY, Kweon HY, Jo YY, Min SK, Park YW, Choi JY, Kim SG. A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):e33-8.
24. Kuffler DP, Reyes O, Sosa IJ, Santiago-Figueroa J. Neurological recovery across a 12 cm long ulnar nerve gap repaired 3.25 years post trauma: case report. *Neurosurgery.* 2011 Dec;69(6):1321-6;

25. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
26. Van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 3067–3073.
27. Ehrenfest DMD, Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 2010 Apr;81(4):546-55.
28. Ho PR, Coan GM, Cheng ET, Niell C, Tarn DM, Zhou H, Sierra D, Terris DJ. Repair With Collagen Tubules Linked With Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor in a Rat Sciatic Nerve Injury Model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Jul;124(7):761-6.
29. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods.* 1995 May;58(1-2):29-37.
30. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci. Methods.* 2001 Jul 15;108(1):1-9.
31. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1998 Aug;21(8):1095-7.
32. Yu H, Peng J, Guo Q, Zhang L, Zhao B, Sui X, Wang Y, Xu W, Lu S. Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nervr grafts with local release of nerve growth factor. *Microsurgery.* 2009;29(4):330-6.
33. Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Stricharts G, Spector M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol.* 15:315-329, 1998.
34. Roytta M, Salonen V. Long-term endoneurial changes after nerve transection. *Acta Neuropathol. Berlim,* 1988;76:35-45.
35. Braga Silva J, Gehlen D, Javier ARR, Menta C, Atkinson EA, Machado DC. 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 Ortop Bras.* 2006;14(5):273-75
36. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery.* 2004;24(5):408-15.

FIGURES

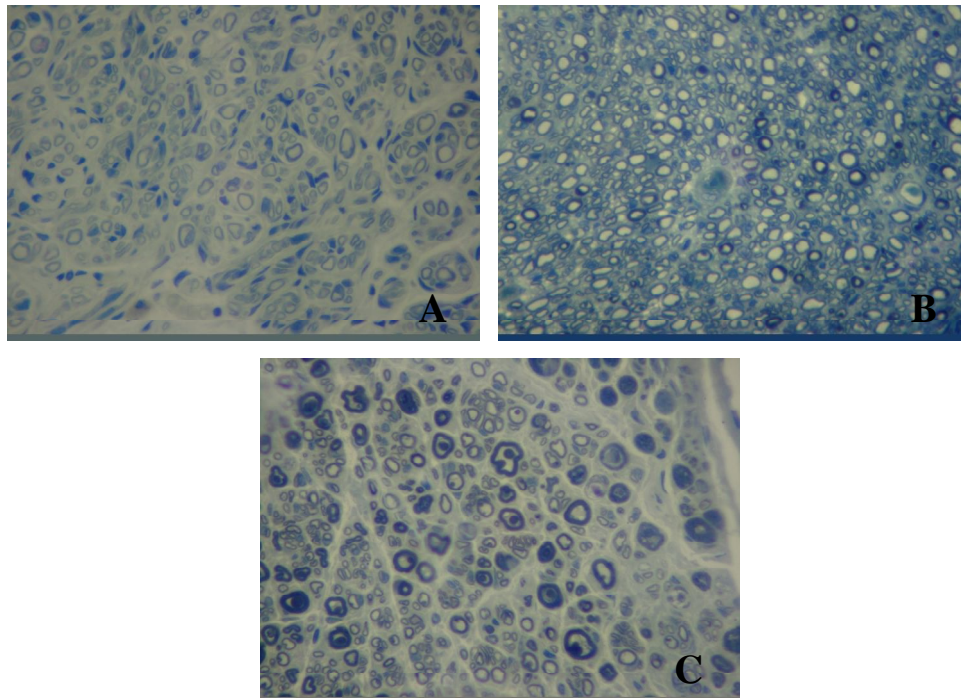


Figure 1. Toluidine blue staining of regenerated sciatic nerve (median segment) in groups ANG (A), PRF (B) and PRP (C). Magnification X100.

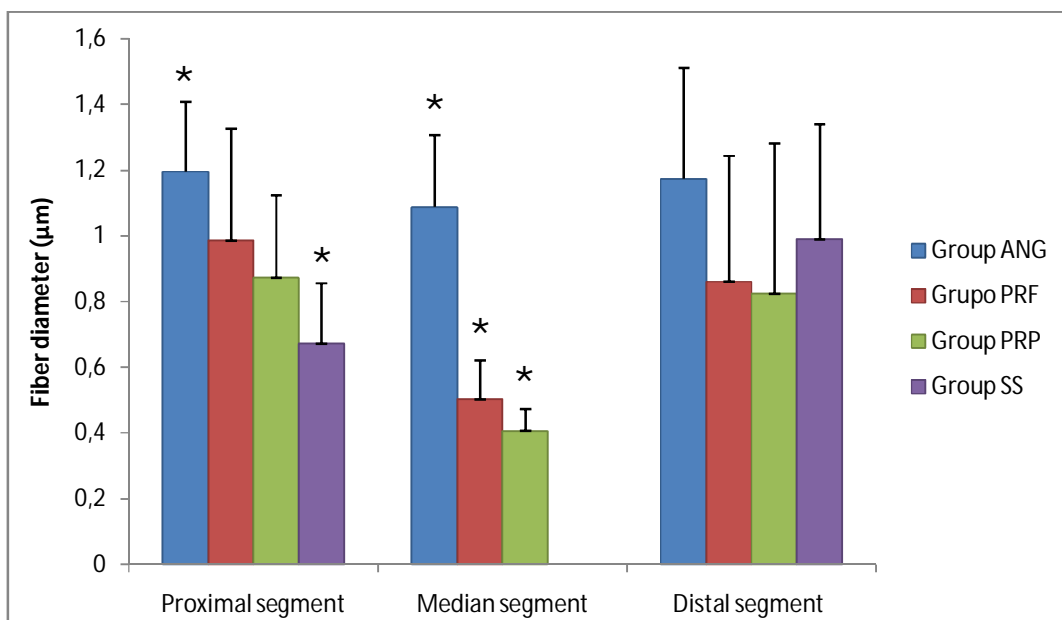


Figure 2. Fiber diameter means (\pm SEM) in all groups, 3 months post-injury, calculated from semi-thin nerve sections. Statistically significant difference between ANG and SS groups in

proximal segment. In median segment, the groups PRP and PRF were statistically different in relation to the group ANG.

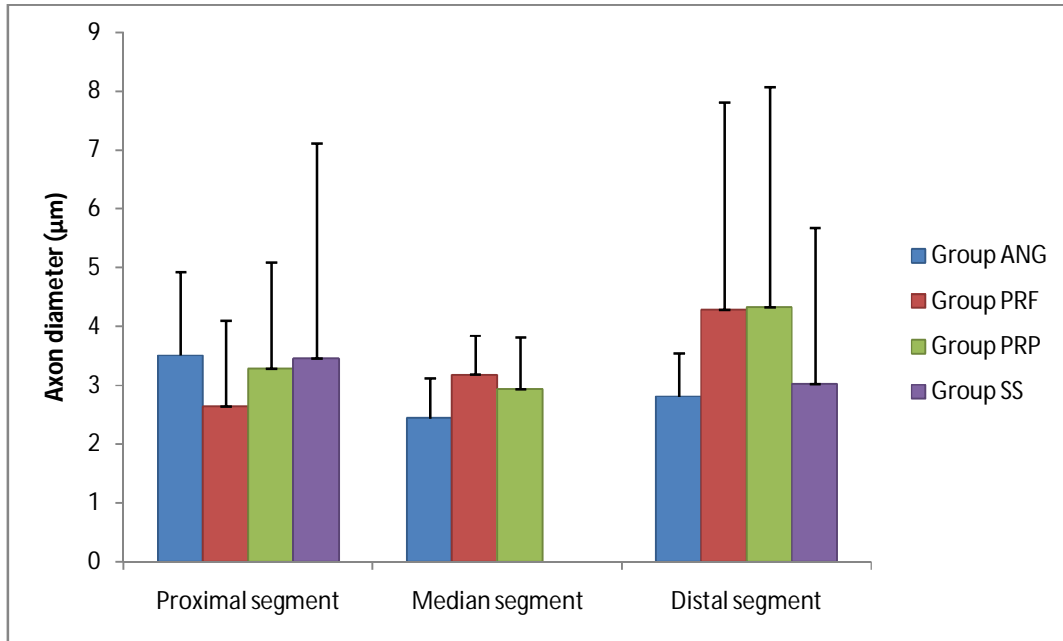


Figure 3. Axonal diameter means (\pm SEM) in all groups, 3 months post-injury, calculated from semi-thin nerve sections.

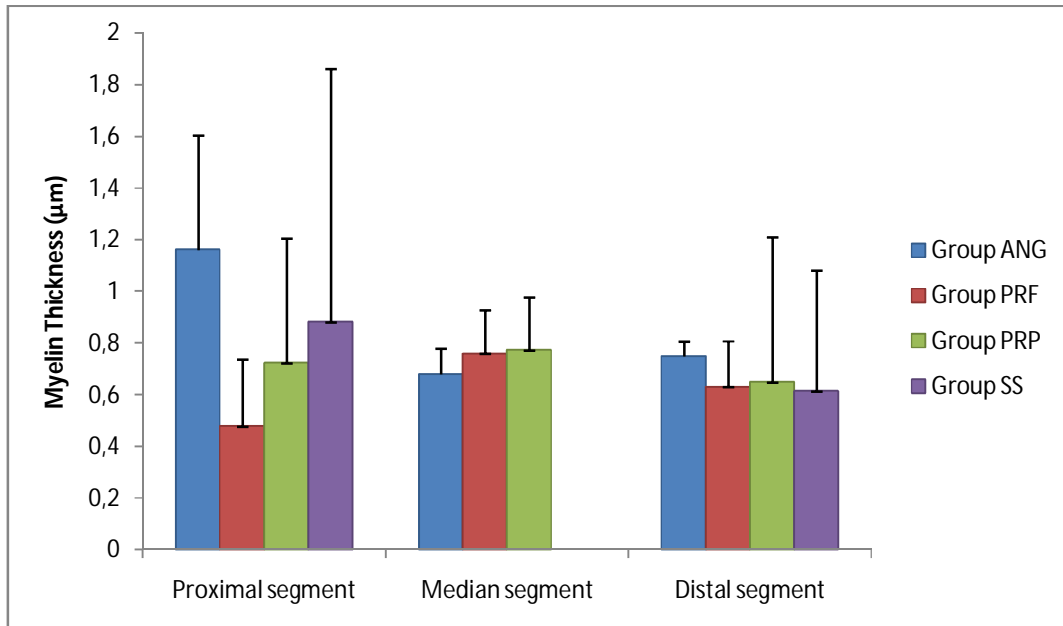


Figure 4. Myelin thickness means (\pm SEM) in all groups, 3 months post-injury, calculated from semi-thin nerve sections.

TABLE 1

Sciatic Function Index (SFI)

Groups	Observation Periods			
	Pre-operative	30 days	60 days	90 days
ANG	-5.42a ± 6.373	-58.32a ± 17.835	-52.84a ± 15.901	-42.39a ± 10.348
SS	-5.6a ± 6.661	-77.13b ± 8.746	-71.54b ± 5.623	-81.02b ± 8.298
PRF	-5.63a ± 7.546	-69.63ab ± 12.951	-59.85ab ± 13.379	-53.5a ± 11.88
PRP	-6.4a ± 8.3	-76.76b ± 4.586	-63.67ab ± 9.217	-55.86a ± 11.2

All values represent the mean value ± standard deviation of rats in each of the four groups. The mean value with the same letter presented no significant differences.

ANEXO A.



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

Ofício 174/10 – CEUA

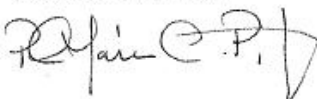
Porto Alegre, 04 de novembro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00173, intitulado: "Efeito do plasma rico em plaquetas e de plaqueta rica em fibrina na regeneração de lesões com perda de substância do nervo ciático em ratos".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

P/ 

Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feljó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br