

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA  
TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DA ERITROPOIETINA NA  
REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR**

LUCAS MARQUES COLOMÉ

PORTO ALEGRE

2012

LUCAS MARQUES COLOMÉ

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DA ERITROPOIETINA NA  
REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Orientador: Dr. Jefferson Luis Braga da Silva

PORTO ALEGRE

2012

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO

C718e Colomé, Lucas Marques

Efeito do plasma rico em plaquetas e da eritropoietina na regeneração do nervo ciático de ratos wistar / Lucas Marques Colomé. Porto Alegre: PUCRS, 2012.

131 f.: gráf.; il. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva.

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

1. PLASMA RICO EM PLAQUETAS. 2. ERITROPOIETINA. 3. REGENERAÇÃO NERVOSA. 4. NERVOS PERIFÉRICOS. 5. NERVO CIÁTICO. 6. FATORES DE CRESCIMENTO. 7. RATOS. 8. RATOS WISTAR. 9. ESTUDO EXPERIMENTAL CONTROLADO E CEGO NA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Título.

CDD 616.548  
CDU 611.83:616-008.852(043.2)  
NLM WL 102

Isabel Merlo Crespo  
Bibliotecária CRB 10/1201

LUCAS MARQUES COLOMÉ

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DA ERITROPOIETINA NA  
REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Aprovada em 29 de agosto de 2012.

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araújo

Prof. Dr. Alexandre Padoin

Prof. Dr. Gustavo Carvalhal

Prof. Dr. Marcus Vinícius Collares

Orientador: Dr. Jefferson Luis Braga da Silva

PORTO ALEGRE

2012

“E outra guerra, e outra guerra, e outra guerra... e eu guerreei todas as guerras!”

*Capitão Rodrigo Cambará*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jefferson pela confiança e pela orientação durante todas as etapas dessa jornada.

A minha equipe de trabalho com quem partilhei muito mais que teorias, hipóteses, resultados e trabalho árduo; em especial, Alessandra, Eduardo e Martina, obrigado meus grandes amigos!

Ao pessoal do laboratório de Habilidade médicas e Pesquisa Cirúrgica, em especial ao Gilmar, pelo imenso auxílio em toda fase experimental.

A meus pais Teodoro e Clara, que sempre me ampararam e incentivaram na carreira acadêmica fazendo com que eu seguisse adiante, vocês fizeram os obstáculos parecer sempre menores... Muito obrigado por sempre acreditarem em mim!

A Letícia minha irmã querida, com quem aprendo cada dia mais. Agradeço do fundo do coração a dedicação em me auxiliar a tratar, interpretar e discutir estatisticamente os resultados.

A minha esposa Carla, por se dedicar de forma incansável com os afazeres da empresa enquanto eu me ausentava para finalizar essa etapa de nossas vidas. Obrigado pelo sacrifício, tu foste fundamental para essa conquista, minha véia! A vitória também é tua!!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram, mesmo que apenas com a força do pensamento, para eu conseguisse chegar até aqui.

Muito obrigado!

## RESUMO

Lesões ao sistema nervoso periférico representam um desafio para a medicina regenerativa. O estudo objetivou conhecer os efeitos do plasma rico em plaquetas (PRP) e da eritropoietina (EPO), isolados ou combinados, na regeneração do nervo periférico de ratos. O trabalho desenvolveu-se em três etapas utilizando 70 ratos. A primeira fase avaliou a concentração plaquetária e produção/liberação de fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF) em três protocolos de obtenção do PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca. A punção cardíaca em associação com protocolo A gerou os melhores resultados. Na segunda fase, usando os métodos com melhores resultados na primeira etapa, produziram-se duas concentrações de PRP (1.000.000 e 2.000.000 plaquetas.  $\mu\text{l}^{-1}$ ; PRP1 e PRP2, respectivamente) para aplicação no nervo ciático tubulizado de ratos. Comparação das concentrações entre si e com grupos auto enxerto (AE) e solução fisiológica (SF) evidenciaram benefícios no uso de PRP2. Na terceira fase (mesmo modelo experimental), foram adicionados os grupos EPO e EPO+PRP2. Os animais das fases 1 e 2 foram avaliados por teste de marcha e histomorfometria (azul de toluidina) e demonstraram que o auto enxerto apresentou benefícios sobre a tubulização (independente do fator regenerativo utilizado). Para os animais tubulizados, o estudo demonstrou melhores resultados para o uso simultâneo de PRP e EPO, seguido do grupo EPO. Finalizando, observou-se que a aplicação de PRP na concentração de 2.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$  em comparação com 1.000.000 platelets. $\mu\text{l}^{-1}$  apresentou vantagens para neuroregeneração periférica de ratos.

**Palavras-Chave:** Plasma rico em plaquetas. Eritropoietina. Regeneração nervosa. Nervo ciático. Fatores de crescimento. Ratos.

## **ABSTRACT**

Injuries to the peripheral nervous system present a challenge for regenerative medicine. The study investigated the effects of platelet-rich plasma (PRP) and erythropoietin (EPO), alone or in combination, in the regeneration of peripheral nerve in rats. The work was developed in three phases using 70 rats. The first phase, evaluated the platelet concentration and growth factors production/release (TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF and  $\alpha\beta$ ) in three protocols for obtaining PRP (A, B and C) obtained by aortic or cardiac puncture. Cardiac puncture in association with A protocol showed the best results. In the second stage, using best results methods at the first stage, was produced two PRP concentrations (1,000,000 and 2,000,000 platelets. $\mu\text{l}^{-1}$ ; PRP1 and PRP2, respectively) for applying in the rats sciatic nerve. Comparison of concentrations with autologous nerve graft (ANG) and saline solution (SS) groups showed benefits in the use of PRP2. In the third phase (same experimental model) were added PRP2 + EPO and EPO groups. The animals of phases 1 and 2 were evaluated by walking track test and histomorphometric analysis (toluidine blue) and showed benefits in autologous nerve graft (ANG) with respect to tubulization (independent of regenerative factor). For tubularized animals, the study showed advantages for PRP and EPO simultaneous use followed by EPO group. Finally, it was observed that PRP 2,000,000 platelets. $\mu\text{l}^{-1}$  has beneficial effects when compared to PRP 1,000,000 platelets. $\mu\text{l}^{-1}$  for peripheral neuroregeneration rats.

**Keywords:** Platelet-rich plasma. Erythropoietin. Nerve regeneration. Sciatic nerve. Growth factors. Rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática das estruturas nervosas demonstradas em corte transeccional de nervo periférico. Observar a disposição e ordenamento dos feixes e fascículos nervosos.....17
- Figura 2** – Representação esquemática das estruturas nervosas demonstradas em corte transeccional de nervo periférico. Observar a disposição e ordenamento dos feixes e fascículos nervosos conforme a região anatômica.....18
- Figura 3** – Representação esquemática da microvasculatura demonstrada em corte transeccional e sagital de nervo periférico. Observar a disposição vascular e suas microanastomoses.....19
- Figura 4** - Representação esquemática da extremidade do axônio e seu cone de crescimento. Observar a presença dos brotamentos e projeções (lamelipódios e filopódios).....32
- Figura 5** – Representação esquemática dos eventos sequenciais á auto fosforilação da Janus quinase 2 pela EPO.....38
- Figura 6** – Sequência de eventos realizados desde a coleta sanguínea até o processamento dos diferentes protocolos de obtenção de PRP e mensuração dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF (sangue basal e sangue tratado).....42

<b>Figura 7</b> – Metodologias empregadas na obtenção do PRP com a velocidade (força G) e tempo (minutos) de centrifugação dos três protocolos de obtenção do PRP.....	43
<b>Figura 8</b> – Valores plaquetários (concentração no PRP/ valor basal) considerando dois métodos de punção sanguínea (aórtica e cardíaca) e três protocolos de obtenção de PRP (A, B e C). .....	52
<b>Figura 9</b> – Valores de TGF- $\beta$ 1 (PRP / valor basal) nos três protocolos de separação de PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca. ....	53
<b>Figura 10</b> – Valores de PDGF- $\alpha\beta$ (PRP / valor basal) nos três protocolos de separação de PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca. ....	54
<b>Figura 11</b> – Valores de VEGF (PRP / valor basal) nos três protocolos de separação de PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca. ....	54
<b>Figura 12</b> – Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo PRP+EPO).....	55
<b>Figura 13</b> – Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo EPO).....	56

<b>Figura 14</b> – Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo PRP2).....	56
<b>Figura 15</b> – Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo SS).....	57
<b>Figura 16</b> – Segmentos proximal e distal de nervo ciático apresentando ausência de regeneração a partir de técnica de tubulização (grupo PRP1). ....	57
<b>Figura 17</b> - Diâmetro da fibra nervosa após período de 90 dias de evolução pós-operatória. ....	59
<b>Figura 18</b> – Espessura da bainha de mielina após período de 90 dias de evolução pós-operatória. ....	60
<b>Figura 19</b> – Diâmetro axonal após período de 90 dias de evolução pós-operatória. ....	60
<b>Figura 20</b> – Índice de função ciática segundo o período de avaliação (90 dias de pós-operatório). ....	63

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Média ( $\pm$ DP) dos fatores de crescimento ( $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) no sangue basal e a partir de três diferentes protocolos de PRP (A, B e C) obtidos através de punção aórtica ou cardíaca.....53

**Tabela 2.** Média ( $\pm$  DP) da densidade axonal ( $\text{axonios}\cdot\mu\text{m}^{-2}$ ) após período de 90 dias de evolução pós-operatória. ....61

**Tabela 3.** Média ( $\pm$  DP) de degeneração Walleriana após período de 90 dias de evolução pós-operatória. ....62

**Tabela 4.** Média ( $\pm$  DP) da relação axônios mielinizados/amielinizados após período de 90 dias de evolução pós-operatória. ....62

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 Estrutura do sistema nervoso periférico.....	15
2.2 Lesões em nervos periféricos.....	20
2.3 Técnicas de reparo em nervos periféricos.....	22
2.4 Cicatrização em nervos periféricos.....	27
2.5 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	33
2.6 Eritropoietina (EPO) .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	40
5.1 Objetivo geral.....	40
5.2 Objetivos específicos.....	40
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
5.1 Fase 1.....	41
5.2 Fase 2.....	44
5.3 Fase 3.....	44
5.4 Protocolo anestésico.....	45
5.5 Modelo experimental de lesão do nervo ciático.....	45
5.6 Administração da eritropoietina (EPO).....	46
5.7 Processamento e obtenção do PRP.....	47
5.8 Teste de marcha ( <i>walking track test</i> ).....	47
5.9 Eutanásia.....	48
5.10 Análise macroscópica.....	48

5.11 Análise histomorfométrica.....	49
5.12 Análise Estatística.....	49
5.13 Aspectos Bioéticos.....	50
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
6.1 Concentração plaquetária.....	51
6.2 Fatores de crescimento.....	52
6.3 Resultados da observação macroscópica.....	55
6.4 Resultados Histomorfométricos.....	58
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A.</b> Carta de aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais.....	87
<b>ANEXO B.</b> Carta de submissão do artigo científico.....	88
<b>ANEXO C.</b> Manuscrito de trâmite no periódico.....	89
<b>ARTIGOS ORIGINAIS .....</b>	<b>90</b>
<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>91</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>111</b>

## 1.INTRODUÇÃO

Lesões em nervos periféricos são comuns na rotina hospitalar e causam incapacitação permanente de indivíduos. Podem ocorrer como resultado de acidentes de trabalho, ferimento por projétil, degeneração, lesões vasculares e compressão aguda ou crônica<sup>1,2,3</sup>.

O trauma por transecção de um nervo periférico invariavelmente resulta em déficit do órgão inervado<sup>4</sup>. Nervos periféricos transecionados raramente apresentam recuperação sem a intervenção cirúrgica<sup>5</sup>. Apesar dos avanços na regeneração de nervos periféricos como o emprego de novos biomateriais e a melhor precisão das técnicas microcirúrgicas, recuperação funcional completa raramente é alcançada.

Experimentalmente, diversos modelos vêm sendo empregados com o objetivo de estudar a regeneração do nervo ciático e suas ramificações. Dentre estes, ressaltam-se as lesões por esmagamento (compressão), transecção, ressecção, estiramento e congelamento<sup>6,7,8</sup>.

O manejo da lesão em um nervo periférico exige domínio e entendimento dos eventos celulares que ocorrem no microambiente celular após o trauma. O conhecimento desses acontecimentos são críticos para um adequado diagnóstico e tratamento<sup>7</sup>.

Estudos recentes vêm mostrando benefícios na utilização da eritropoietina com o objetivo de interação com a lesão neural<sup>9,10</sup>. Em algumas pesquisas, foi possível observar que a produção local de eritropoietina (EPO) e seus receptores (EPO-r) aumentaram após lesão cerebral e espinhal, principalmente em neurônios motores e seus axônios mielinizados<sup>11,12</sup>.

Outro componente que vem demonstrando boa aplicação em regeneração tecidual é o plasma rico em plaquetas (PRP), que é definido como um volume de plasma autólogo com uma concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos (Marx, 2001). Estudos com PRP iniciaram há pelo menos 30 anos<sup>13</sup>, e desde então ele vem sendo utilizado visando promover a regeneração tecidual precoce<sup>14</sup>. Sua ação remete a um aumento local das concentrações de múltiplos fatores de crescimento e proteínas secretórias<sup>14,15</sup>.

## 2.REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ESTRUTURA DO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

O tecido nervoso acha-se distribuído pelo organismo interligando-se como uma rede de comunicação. Anatomicamente o sistema nervoso é dividido em central (SNC) e periférico (SNP), sendo que esse último se divide ainda em sistema nervoso somático e sistema nervoso autônomo<sup>4,16</sup>. Nessas duas subdivisões, encontramos estruturas que incluem as raízes nervosas (dorsais e ventrais), gânglios espinhais, nervos cranianos, raquidianos, específicos, suas ramificações e os gânglios acessórios, além dos componentes periféricos do sistema nervoso autônomo<sup>17,18</sup>. O SNP tem por função integrar o SNC com os órgãos periféricos, constituindo ligações motoras, sensitivas e autonômicas<sup>19</sup>.

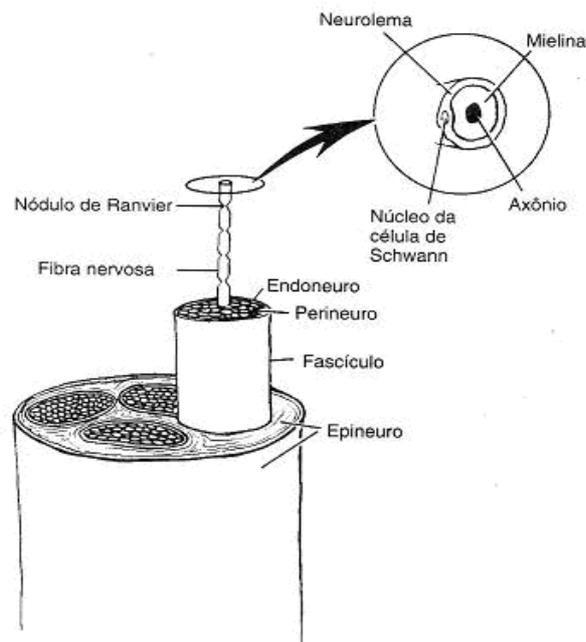
Os nervos periféricos são formados por axônios, células não neurais e componentes da matriz extracelular (MEC) como o colágeno (COL), a laminina (LAM), o heparan sulfato (HS) e a fibronectina (FN)<sup>20</sup>. O axônio, também denominado de fibra nervosa, representa a unidade básica do SNP e constitui-se na extensão do corpo celular situado no SNC ou suas proximidades<sup>20,21</sup>. As fibras nervosas consistem de axoplasma líquido no interior da membrana celular e podem apresentar-se mielinizadas ou amielinizadas<sup>21</sup>. No SNP a célula responsável pela produção desse envoltório isolante denominado de bainha de mielina é a célula de Schwann<sup>16</sup>. Muitos axônios amielinizados podem estar envolvidos por uma única célula de Schwann, mas a bainha de mielina para cada axônio mielinizado é formada por uma série de células de Schwann<sup>21</sup>. Áreas juncionais existentes entre essas células recebem o nome de nódulos de Ranvier, que estão localizados ao longo de cada axônio mielinizado. Nessas fibras

nervosas o potencial de ação salta de um nodo para o outro, resultando em rápida velocidade de condução. Nas fibras amielinizadas o potencial de ação é mais lento, pois o estímulo é transmitido de forma contínua ao longo da fibra<sup>22,23</sup>.

As fibras nervosas com suas bainhas de mielina apresentam-se classificadas em três categorias baseadas na velocidade de condução do impulso nervoso: fibras A, B e C. Fibras do grupo A possuem bainha de mielina de 2 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura e são ainda subdivididas em fibras  $A\alpha$  e  $A\delta$ . As fibras  $A\alpha$  são as maiores e conduzem os impulsos a uma velocidade de 30 a 120 m/segundo. Elas incluem as fibras motoras somáticas e grandes fibras aferentes proprioceptivas. As fibras  $A\delta$  são menores, envolvidas com a nocicepção, medem cerca de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e transmitem os impulsos a uma velocidade de 5 a 30 m/segundo. As fibras B são mielinizadas, autônomas, pré-ganglionares, com 1 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro e velocidade de condução de 14 m/segundo. As fibras C por sua vez são amielínicas e incluem fibras autônomas pós-ganglionares e fibras termosensitivas. Essas estruturas têm em torno de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro e conduzem os impulsos com velocidade de 2 m/segundo ou menos<sup>18</sup>.

Observando a anatomia transeccional do nervo periférico (Figura 1), pode-se entender melhor a histofisiologia nervosa. Cada nervo contém grupos múltiplos de axônios dispostos em três camadas de tecido conjuntivo. Circundando as fibras nervosas e apresentando-se como a camada mais externa encontra-se o epineuro, formado de tecido conjuntivo frouxo com fibras de colágeno tipo I, vasos e fibroblastos. A camada média de tecido conjuntivo, denominada de perineuro, apresenta células pavimentosas fortemente unidas por junções íntimas e dispostas em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas fornecendo assim sustentação interna. Entre as sucessivas camadas celulares são encontradas fibras de COL tipo I e tipo III. Esta camada é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois atua como uma barreira seletiva no trânsito

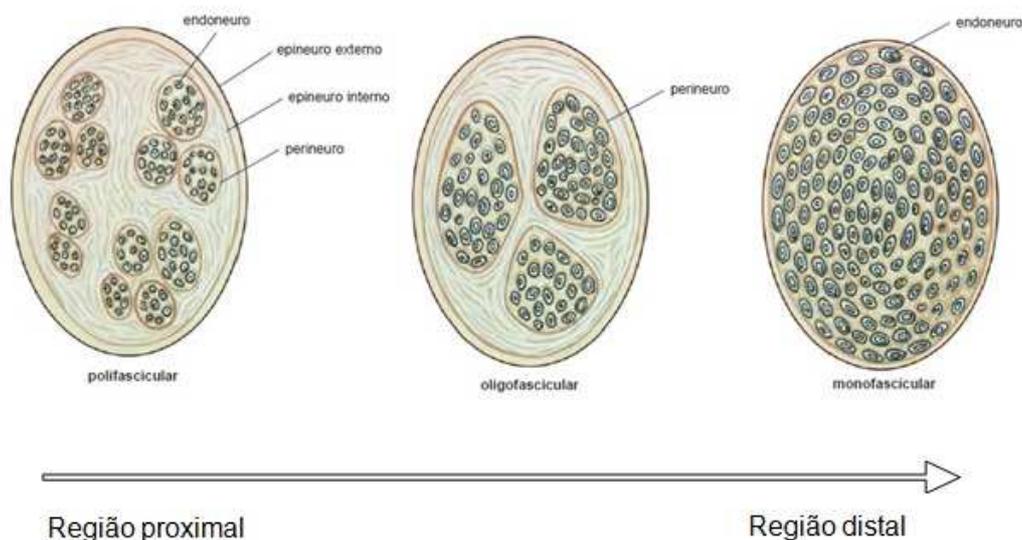
de substâncias com alto peso molecular. A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro, apresentando uma rede capilar em íntimo contato com as fibras nervosas e por isso garantindo-lhe nutrição. O endoneuro é composto por fibras de colágeno reticular tipo III, dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa. Nesse tecido conjuntivo podem residir macrófagos, fibroblastos (de forma bastante dispersa) e eventualmente mastócitos<sup>21-24</sup>.



**Figura 1-** Representação esquemática das estruturas nervosas demonstradas em corte transeccional de nervo periférico. Observar a disposição e ordenamento dos feixes e fascículos nervosos. Fonte: Shores<sup>23</sup>.

É importante ressaltar que estas estruturas de tecido conjuntivo que “envelopam” as camadas no nervo periférico apresentam variação ao longo da fibra. Assim, nas regiões proximais ao longo do comprimento do nervo encontra-se geralmente uma estrutura monofascicular (contendo fibras nervosas motoras e sensitivas misturadas),

enquanto nas regiões mais distais, próximo ao órgão ou região terminal, observa-se um arranjo polifascicular (subunidades motoras e sensitivas separadas)<sup>4,21</sup>(Figura 2).

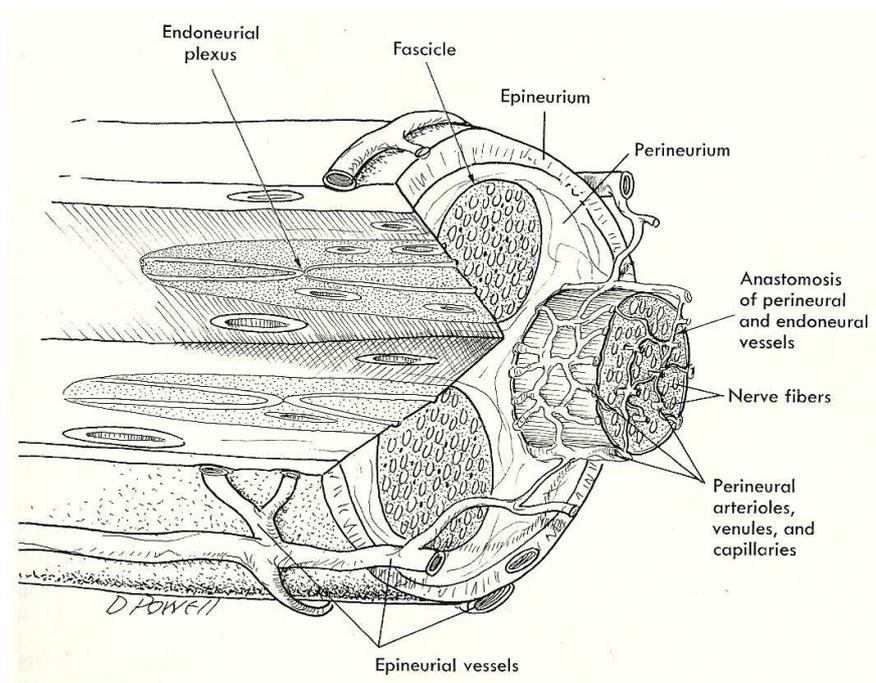


**Figura 2-** Representação esquemática das estruturas nervosas demonstradas em corte transecional de nervo periférico. Observar a disposição e ordenamento dos feixes e fascículos nervosos conforme a região anatômica. Fonte: Mattar Júnior e Azze<sup>25</sup>.

O suprimento sanguíneo microvascular para os nervos periféricos apresenta-se bem desenvolvido e se origina a partir de veias e artérias vizinhas de grande calibre, bem como dos vasos periosteais e musculares adjacentes. Os ramos desses vasos dividem-se em ascendentes e descendentes e quando alcançam o epineuro fazem anastomose com o sistema intrínseco. Esse sistema é composto por plexos epineurais, perineurais e endoneurais juntamente com seus vasos comunicantes<sup>4,23</sup>. Esse sistema microvascular possui uma grande capacidade de reserva para compensar a mobilização ou lesão dos vasos regionais locais. No epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas epineurais, bem como entre os feixes fasciculares e camadas profundas do nervo (Figura 3). A importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato dos axônios

dos nervos periféricos serem vulneráveis a isquemia pela grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio<sup>6,26</sup>.

Dentre as estruturas que compõe o SNP, o ciático apresenta-se como o maior nervo em diâmetro. É um nervo misto (sensitivo e motor) formado pela união das raízes ventrais dos segmentos L4 a S3 em humanos (variações anatômicas nas outras espécies) emergindo da pelve através do forame isquiático maior e continuando seu trajeto entre o trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática ao longo da face dorsal da coxa (cranial aos músculos bíceps femoral e semitendinoso)<sup>1,22,28</sup>. Continua seu trajeto até o terço femoral distal onde se divide em dois grandes ramos denominados tibial e fibular comum<sup>28,29</sup>. Lesão nessa localização acomete os músculos bíceps femoral, semitendinoso e semimembranoso, levando a perda da sensibilidade na região lateral abaixo do joelho<sup>30</sup>.



**Figura 3-** Representação esquemática da microvasculatura demonstrada em corte transeccional e sagital de nervo periférico. Observar a disposição vascular e suas microanastomoses. Fonte: Durán e Mariscano<sup>26</sup>.

## 2.2 LESÕES EM NERVOS PERIFÉRICOS

Lesões em nervos periféricos são comuns na rotina hospitalar. Podem resultar de degeneração, lesões vasculares e compressão aguda ou crônica. Tração excessiva, presença de massa, cistos ou aprisionamento são algumas das causas de lesão, entretanto, ocorrem mais frequentemente por traumatismos em acidentes automobilísticos, contusões, fraturas, ferimentos por projéteis, lacerações, interação violenta entre indivíduos e injeção de agentes diretamente ou ao redor do nervo<sup>1,2,19,31-33</sup>.

Essas lesões caracterizam-se clinicamente por um grupo de sinais conhecido como síndrome neuropática, resultando na perda parcial ou completa de funções motoras, sensoriais ou autônomas nas áreas supridas pelo nervo lesionado<sup>4,34</sup>. Fazem parte desta síndrome, os reflexos reduzidos ou ausentes (hiporreflexia ou arreflexia), tônus muscular reduzido ou ausente (hipotonia, atonia ou flacidez) debilidade (paresia) ou paralisia dos músculos dos membros e/ou cabeça (consequente atrofia muscular neurogênica)<sup>35</sup>.

Lesões em nervos periféricos são classificadas de duas formas. Seddon<sup>36</sup> determinou três graus de lesão aos nervos periféricos: neuropraxia (classe 1), axonotmese (classe 2) e neurotmese (classe 3). Existe neuropraxia quando há interrupção temporária da condução do estímulo devido à lesão da bainha de mielina. A recuperação provavelmente se processa sem a ocorrência de degeneração, caracterizando-se principalmente por lesão bioquímica<sup>1,37</sup>. A axonotmese é caracterizada pela perda de continuidade de um ou mais axônios, porém, com a membrana epineural intacta<sup>1</sup>. Finalmente, neurotmese é o rompimento completo do nervo (transecção), sendo este o tipo mais grave de lesão. Nesse caso, é improvável o retorno da função sem intervenção cirúrgica para reorientar as extremidades<sup>1</sup>.

Sunderland<sup>38</sup> estabeleceu outra forma de categorizar as lesões em nervos periféricos. Para ele, existem 5 graus de severidade. O primeiro e segundo graus são compatíveis com neuropraxia e axonotmese, respectivamente. No terceiro grau de lesão temos o endoneuro sendo afetado com preservação do perineuro e epineuro. Nesses casos, tratamento conservador pode ser útil, mas a cirurgia também pode ser requerida. Na quarta classificação, apenas o epineuro permanece intacto e é sempre indicada cirurgia. E por fim, no caso mais grave (lesão de Sunderland grau V), quando existe transecção completa do nervo, necessitando cirurgia para que ocorra regeneração<sup>4,39</sup>. Um fato na patogenia do trauma ao SNP é a emissão de melhor prognóstico quanto mais próximo à lesão estiver do músculo inervado<sup>1</sup>.

O entendimento dos eventos biológicos no nervo periférico após o trauma são críticos para um adequado diagnóstico e tratamento. Também são importantes: histórico, exame físico e eletrofisiologia (eletromiografias e exames de condução nervosa)<sup>33</sup>.

A ocorrência de lesão em um nervo periférico resulta em alterações significantes e complexas nos segmentos proximal e distal do nervo, no corpo celular, no local de lesão, bem como no órgão-alvo<sup>40,41,42</sup>. Os axônios sofrem processo de degeneração seguido de tentativa de regeneração<sup>4</sup>. A degeneração consequente à lesão em um nervo periférico ocorre de duas formas. No coto proximal, há rarefação da substância nervosa de forma retrógrada até chegar ao próximo nódulo de Ranvier. As fibras distais à lesão sofrem degeneração com início imediato<sup>4</sup>, podendo demorar de 48 a 96 horas após o dano<sup>43</sup>. A esse último fenômeno, que representa a remoção e reciclagem axonal do material mielínico pela formação de câmaras de digestão, preparando o ambiente para o crescimento da fibra, chamamos de degeneração Walleriana<sup>3,43</sup>.

Após denervação, o tecido muscular sofre alterações histológicas já a partir da terceira semana. A atrofia e a falência muscular tornam-se cada vez mais evidentes com o passar do tempo. Continuando esse processo, com a ausência do movimento ocorre fibrose em dois a três anos e o tecido muscular pode ser substituído por tecido cicatricial e gordura<sup>37</sup>.

Experimentalmente, diversos modelos vêm sendo empregados com o objetivo de estudar a regeneração do nervo ciático e suas ramificações. Dentre estes, ressaltam-se as lesões por esmagamento (através de compressão), transecção, ressecção, estiramento e congelamento<sup>6,7</sup>.

### 2.3 TÉCNICAS DE REPARO EM NERVOS PERIFÉRICOS

O trauma por transecção de um nervo periférico invariavelmente resulta na perda completa ou parcial da função motora, sensorial e autonômica do órgão inervado<sup>4</sup>. Esta estrutura quando lesada raramente apresenta recuperação espontânea, tornando a intervenção cirúrgica, na grande maioria das vezes, a única opção terapêutica aplicável<sup>40,44</sup>. Adicionalmente, mesmo com os avanços tecnológicos e o grande desenvolvimento das técnicas de microcirurgia, a recuperação funcional completa do nervo dificilmente é conseguida<sup>4</sup>.

Estudos envolvendo reparo para cicatrização de nervos periféricos datam de muito tempo. De acordo com Grecco<sup>44</sup>, o método de sutura epineural foi descrito primeiramente por Heuter no ano de 1873 e o primeiro enxerto nervoso experimental por Philipeau e Vulpian em 1886. Mais tarde, graças à evolução das técnicas e materiais microcirúrgicos é que se conseguiu reparar de forma mais minuciosa as estruturas nervosas lesadas com nítida melhora da recuperação funcional.

O manejo da lesão nervosa periférica exige domínio e entendimento da fisiopatologia do trauma tecidual local. Fatores como a idade do paciente, as forças envolvidas no evento da lesão e o dano vascular aos tecidos vizinhos definem o prognóstico para a recuperação funcional<sup>37</sup>.

A literatura especializada descreve uma grande gama de técnicas cirúrgicas passíveis de serem empregadas no reparo de nervo periférico. Dentre elas ressaltam-se a neurorrafia epineural, a neurorrafia fascicular, a neurorrafia epineural-fascicular combinada, os enxertos nervosos<sup>23</sup>, a aplicação de adesivos de fibrina, a aplicação de laser de CO<sub>2</sub><sup>39</sup> e as técnicas de tubulização com câmaras de diferentes materiais<sup>39,5,45-52</sup>.

Avanços no campo da engenharia tecidual têm gerado grande expectativa na melhoria da recuperação funcional de pacientes com perda de substância nervosa. Atualmente, estão disponíveis comercialmente diferentes materiais que podem ser usados como ponte no tratamento dessas condições<sup>4</sup>.

### 2.3.1 Neurorrafia término-terminal

Reparo por anastomose término-terminal livre de tensão é o primeiro método cirúrgico a ser considerado (um dos métodos mais comumente realizados)<sup>4</sup>. Deve ser executado o mais rápido possível, preferencialmente nas primeiras 6 horas após o trauma<sup>37</sup>. Quando esse procedimento primário torna-se impossível devido à perda de substância do nervo, o uso de enxerto autólogo representa o atual padrão ouro<sup>4</sup>.

Protocolos pré-estabelecidos definem a tomada de decisão em algumas situações de trauma. Lesões simples, com perda de substância de até 3 cm devem ser reparadas por mobilização do tronco neural e aplicação de microsutura perineural ou epineural com náilon 9-0 ou 10-0 (de acordo com o calibre da estrutura)<sup>53-54</sup>. Pode-se ainda

combinar as duas técnicas citadas<sup>43</sup>. É importante salientar que em casos de contaminação da lesão de grau moderado a severo, deve-se realizar o debridamento dos tecidos atingidos e o reavivamento das bordas das estruturas nervosas antes de proceder a sutura. Em determinadas situações é recomendado adiar o procedimento de reparo, aguardando a redução do edema local.

Em casos onde o “gap” entre os cotos é superior a 3 cm, deve-se utilizar enxerto autólogo fascicular ou interfascicular<sup>37</sup>. Para Siqueira<sup>43</sup>, não há necessidade de realizar enxertia nervosa com espaço entre cotos de até 5 cm.

### 2.3.2 Neurorrafia término-lateral

A técnica de neurorrafia término-lateral consiste na anastomose nervosa através da criação de uma janela no nervo doador sem neurectomia. Surgiu como uma alternativa para situações em que as técnicas habituais não poderiam ser usadas, entretanto, ainda hoje apresenta resultados bastante controversos. São mais rotineiramente empregadas nas transferências do nervo hipoglosso para o nervo facial.

### 2.3.3 Enxerto de nervo periférico

O enxerto de nervo periférico é atualmente considerado o padrão ouro na reparação de nervos em que há perda de substância. Em casos negligenciados de transecção nervosa, recomenda-se reparar o nervo com até no máximo um ano após o trauma. Nesses casos normalmente são necessários enxertos neurais devido à retração e grandes perdas de substância<sup>37</sup>. Em geral são usados como segmentos doadores o nervo sural ou o nervo cutâneo lateral do antebraço (homo ou contralateral)<sup>43</sup>.

#### 2.3.4 Tubulização

Os condutos de nervos podem exercer um papel importante no reparo de nervos periféricos pequenos (geralmente menores que 3 cm)<sup>4</sup>. Em lesões que cursem com perda de substância maior, apesar da grande capacidade regenerativa do SNP, a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos. Uma técnica de reparo empregada nessa situação é a tubulização ou entubulação, que pode ser otimizada com acréscimo de fatores de crescimento (neurotróficos), componentes da matriz extracelular ou células como as de Schwann internamente ao conduto<sup>6,37</sup>. Esta técnica consiste em fixar os cotos nervosos seccionados dentro de uma prótese tubular, objetivando propiciar um ambiente favorável à regeneração. Proporciona ainda o direcionamento do crescimento das extremidades seccionadas<sup>5</sup> protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e da formação de neuromas<sup>20</sup>.

Avanços na reparação de nervos periféricos em substituição a aloenxertos e auto enxertos têm sido conseguidos através da técnica de tubulização<sup>50</sup>. Na opinião desse autor, muitas técnicas cirúrgicas aceitas tradicionalmente para reparação nervosa periférica, como por exemplo, as neurorrafias, alongações e enxertos, produziram escassa aplicação na rotina devido às limitações de seus resultados. A partir de então, cada vez mais foram testados novas matérias para servir de condutos ou câmara nervosas. Para Torres<sup>55</sup>, o emprego de suturas epineurais e perineurais tem sido questionado devido à maior possibilidade de dano tecidual neural com o material de sutura e conseqüentemente resultando na formação de neuromas. Para este autor, essas técnicas resultam em compressão nervosa pelo fio de sutura e mau direcionamento do tecido endoneural.

Diversos materiais vem sendo usados como câmara de tubulização. Dentre eles relata-se o uso do silicone<sup>3,31,37,48,56</sup> como o primeiro material sintético a ser usado<sup>4</sup>. São referenciados ainda a celulose liofilizada<sup>49</sup>, os envelopes venosos e arteriais<sup>4,45,51</sup> e outros materiais biológicos como a quitosana<sup>50</sup>. Também se refere a utilização de tubos de ácido poliglicólico no reparo de nervos mediano, ulnar e digitais em humanos<sup>5,37</sup>. No passado, condutos de origem biológica (artérias, veias, osso descalcificado, dura-máter e peritônio) foram bastante estudados, no entanto, falharam em propiciar um bom mecanismo de suporte que guiasse o crescimento axonal, apresentando dificuldades adicionais como a necessidade de segunda cirurgia e dificuldade de encontrar um nervo doador com diâmetro adequado<sup>5</sup>.

Para tubulização, o material usado deve satisfazer uma variedade de critérios. A substância escolhida deve ser biocompatível para não induzir resposta imune que possa interferir com o processo de regeneração, permanecer o menor tempo possível para completar a regeneração e fornecer sustentação para guiar o crescimento axonal. Deve ainda estimular a migração de células, a vascularização e o acúmulo de fatores neurotróficos entre os cotos, aumentando assim a velocidade de regeneração. Sob o ponto de vista cirúrgico deve ainda ser flexível e apresentar parede fina e transparente, facilitando o procedimento de fixação<sup>5</sup>.

A regeneração através de tubulização está na dependência da formação precoce de uma ponte não celular conectando as duas extremidades nervosas (Figura 4). Esta conexão consiste de uma matriz de fibrina que provém substrato para a migração de células não neuronais<sup>5,20</sup>. A matriz é posteriormente degradada e substituída por fibrilas de colágeno (orientação longitudinal) que servirão de substrato para o brotamento axonal a partir da extremidade proximal. A ocorrência destes eventos depende do tamanho do (“gap”) e da dimensão da área de secção transversal do tubo<sup>5</sup>. Estudando a

regeneração do nervo ciático de camundongos por tubulização com prótese de silicone (“gap” de 2, 4, 6 e 8 mm), Buti<sup>57</sup> observaram melhora significativa dos reparos realizados em pequenos espaços (2 e 4 mm). No entanto, a melhora obtida com o processo de tubulização não foi tão marcante em intervalos maiores (6 e 8 mm).

### 2.3.5 Nervos artificiais

Recentemente, tem sido reportado na mídia estudos promissores que usam “nervos artificiais” como substitutos de estruturas nervosas gravemente lesionadas. Esse método, investigado através de uma parceria entre a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e a Universidade de Montpellier, conta com a degradação lenta e controlada de um materiais sintético usados como arcabouço para crescimento do nervo, ao mesmo passo que proporciona a liberação fatores neurotróficos no sítio da anastomose<sup>58</sup>.

## 2.4 CICATRIZAÇÃO DOS NERVOS PERIFÉRICOS

O SNP apresenta notável capacidade de regeneração. Entretanto, a recuperação funcional completa após reparo ainda é raramente conseguida. Dessa forma, o restabelecimento da funcionalidade em lesões nervosas depende de fatores como a severidade e distância entre o local de lesão e o órgão final, o mecanismo gerador do trauma, a duração do intervalo lesão-reparo cirúrgico, a idade e a condição geral do paciente e a técnica cirúrgica empregada (qualidade e a orientação do crescimento axonal)<sup>22,37</sup>. Ainda estão relacionados fatores como a formação de neuromas e a administração de fatores tróficos<sup>39</sup>.

Relacionados à regeneração do meio interno, os fatores neurotróficos foram descritos como fundamentais na manutenção e regulação da função neuronal<sup>22</sup>. No SNP, as células de Schwann são as responsáveis por sua produção e reagem em resposta a denervação. Esses fatores fornecem suporte à sobrevivência celular, promovendo orientação e estimulando o crescimento axonal. Como exemplo, podemos citar o fator de crescimento neural (NGF), o fator de crescimento neurotrófico cerebral (BDNF), fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento derivado da insulina e fator de crescimento fibroblástico (FGF)<sup>59</sup>. Além desses pode-se citar ainda a neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5) e neurotrofina 6 (NT-6)<sup>37</sup>.

Outra observação de vital importância é o cuidado com o alinhamento anatômico das extremidades nervosas e a atenção a detalhes cirúrgicos, assegurando que os axônios em regeneração encontrem seu caminho ao longo do tubo neurilematoso até seu destino final. Com relação à natureza ou mecanismo gerador do trauma, pode-se observar que lacerações agudas e limpas geralmente recuperam-se melhor e mais rapidamente que lesões por avulsão, esmagamento, abertas e/ou crônicas<sup>22</sup>.

O traumatismo por secção de um nervo acarreta modificações no corpo celular, nos segmentos proximal, distal, nos órgãos inervados e no próprio local de lesão<sup>37,40</sup>.

Batista e Araújo<sup>37</sup> e Almeida<sup>60</sup> referem que o processo de regeneração ocorre a uma taxa de 1mm/dia, principalmente em enxertos. Entretanto, a maturação das fibras e a recuperação do volume axonal com posterior espessamento mielínico pode durar até 5 ou 6 anos (dependendo da localização da lesão)<sup>37</sup>.

Em animais, devido às diferenças de metabolismo, a velocidade de regeneração nervosa é ainda maior. Caninos e felinos apresentam índice de crescimento do nervo ao redor de 4mm/dia<sup>22</sup>. Devido ao metabolismo extremamente acelerado de pequenos

roedores como o rato, infere-se que a taxa de crescimento nervoso seja ainda maior, entretanto, a informação sobre seu volume de crescimento não se apresenta disponível.

A seguir serão descritos detalhadamente os principais eventos que ocorrem nas diferentes regiões envolvidas com o trauma de nervo periférico.

#### 2.4.1 Modificações na região proximal a lesão

Proximalmente à lesão, os axônios sofrem um processo de degeneração semelhante ao que ocorre no coto distal, porém geralmente estendendo-se apenas até o nódulo de Ranvier mais próximo<sup>40</sup>. Na porção distal do coto proximal, devido ao transporte anterógrado de moléculas sinápticas e estruturais do citoesqueleto, observa-se acúmulo de material citoplasmático pode vazar em virtude do rompimento da membrana celular desses axônios<sup>61,62</sup>.

Todas as células do organismo necessitam de fatores tróficos para sobreviver, prevenindo a apoptose celular. Fator neurotrófico é a substância que regula e mantém a função do neurônio promovendo seu crescimento. No processo de regeneração nervosa, receptores específicos são expressos em maior quantidade na região do cone de crescimento, aos quais se unem fatores neurotróficos específicos. Esses fatores são transportados retrogradamente ao corpo celular e atuam modulando a interação entre enzimas denominadas caspases e proteínas pró-apoptóticas mediante a ocorrência de reações de fosforilação. Conseqüentemente, é a inibição dessas enzimas, consideradas as principais efectoras da morte celular, que possibilitarão a manutenção da fisiologia normal da célula. Geralmente, os fatores neurotróficos exercem seus efeitos diretamente sobre o metabolismo celular, no entanto, outra forma destes fatores atuarem é

indiretamente pela ação no metabolismo de células de suporte, cujo representante principal é a célula de Schwann<sup>40</sup>.

Várias substâncias produzidas no local da lesão atuam como fatores neurotróficos, dentre as quais se destacam o brain-derived neurotrophic factor (BDNF), o nerve growth factor (NGF), o glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF), o ciliar neurotrophic factor (CNF)<sup>61</sup>, o transforming growth factor- $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), o insulin-like growth factor (IGF), o platelet-derived growth factor (PDGF) e as neurotrofinas (NF)<sup>40</sup>.

O padrão de produção de NGF alcança sua concentração máxima rapidamente 24 horas após o estabelecimento de uma lesão nervosa. Com relação ao BDNF, sua produção inicia-se um pouco mais tardiamente, cerca de quatro dias após uma axoniotomia, apresentando sua concentração máxima em quatro semanas após a lesão. O BDNF é mais eficaz em promover a sobrevivência de axônios motores em crescimento, em comparação a manutenção da sobrevivência dos neurônios sensoriais e simpáticos. Desta forma, esses dois fatores neurotróficos exercem suas atividades de maneira complementar, o que também provavelmente se repita com outros fatores no processo de regeneração<sup>40</sup>.

#### 2.4.2 Modificações no corpo celular

Logo nas primeiras horas após a lesão axonal o corpo celular apresenta algumas modificações chamadas de cromatólise, que se caracterizam histologicamente por inorgitamento da célula, degeneração da substância de Nissl e migração nuclear do centro para a periferia<sup>20</sup>. As alterações presentes no corpo celular são interpretadas como um incremento do metabolismo celular visando produção de proteínas

relacionadas à regeneração do citoesqueleto axonal em detrimento da produção de neurotransmissores. Essas proteínas, representadas principalmente pela actina e tubulina, estão relacionadas ao transporte intracelular e a movimentação do cone de crescimento<sup>40</sup>.

#### 2.4.3 Modificações na região distal a lesão

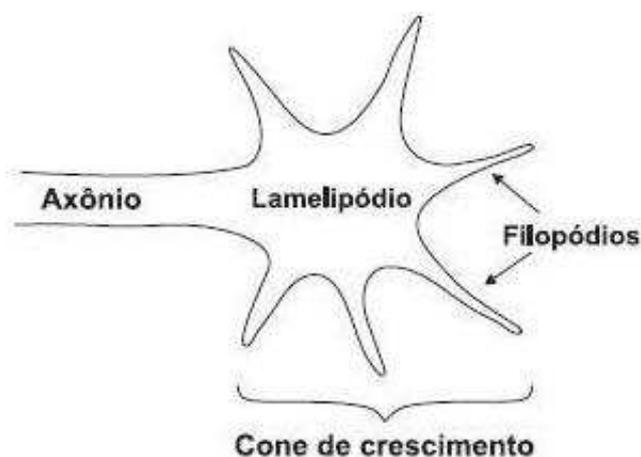
As alterações que ocorrem na extremidade distal do axônio iniciam com a degeneração axonal, denominada de degeneração Walleriana<sup>63</sup>. Durante este evento, o citoesqueleto e o axoplasma se degeneram deixando o correspondente tubo endoneural vazio. A destruição da bainha de mielina estimula a atividade dos macrófagos e células de Schwann resultando na remoção da maioria dos seus fragmentos. As células de Schwann desempenham importância fundamental na regeneração, atuando como condutores físicos que possibilitam o direcionamento dos axônios durante o crescimento em direção ao órgão-alvo. Essas células ainda apresentam a propriedade de produzir elementos da matriz extracelular como proteoglicanas, colágeno e fatores neurotróficos<sup>20,40</sup>.

A regeneração que ocorre no sistema nervoso periférico está diretamente relacionada à possibilidade de manutenção das células de Schwann independentemente da degeneração do axônio. Essa sobrevivência, que pode atingir meses no coto distal de animais submetidos à axonotomia. Ocorre pela existência de uma série de sinais celulares produzidos pelas próprias células de Schwann independente do contato com os axônios<sup>40</sup>.

#### 2.4.4 Modificações no local da lesão

Nervos periféricos lesionados de forma suficiente a causar axonotmese e neurotmese sofrem degeneração imediatamente no local de lesão. Este evento pode ser observado já nas primeiras 24 horas após o trauma<sup>22</sup>. Ao rompimento do nervo, a primeira nítida alteração que se observa é a retração do mesmo<sup>20</sup>. O intervalo formado entre os cotos é preenchido por sangue formando-se um coágulo de fibrina. Na extremidade do coto proximal, os axônios formam protrusões axoplasmáticas que são denominadas de brotos de crescimento. Por este processo, cada axônio pode originar vários outros axônios delimitados pelo perineuro. Este brotamento axonal está presente precocemente, podendo ser observado em apenas três horas após a ocorrência da lesão nervosa<sup>40</sup>.

Logo após a formação dos brotamentos axonais observa-se um aumento na presença de mitocôndrias e vesículas e estas estruturas passam a ser denominadas cones de crescimento. Um cone de crescimento possui marcadamente duas porções: a região do lamelipódio e os filopódios (Figura 4).



**Figura 4-** Representação esquemática da extremidade do axônio e seu cone de crescimento. Observar a presença dos brotamentos e projeções (lamelipódios e filopódios). Fonte: Martins<sup>40</sup>.

A região do lamelipódio é definida como a área central da extremidade do cone, apresentando constante remodelamento pela formação e retração dos filopódios. Os filopódios por sua vez, caracterizam-se por expansões em forma de espículas que se estendem e se retraem a partir da superfície do lamelipódio, movimentados pela contração dos filamentos de actina e formando uma rede poligonal complexa no seu interior. Por meio desta disposição, o cone de crescimento atua de forma semelhante ao movimento amebiano, explorando o microambiente extracelular e buscando interação de receptores de superfície com estímulos adequados (tais como fatores de crescimento), fornecendo reorientação apropriada para o crescimento axonal em direção ao coto distal e órgão-alvo<sup>40</sup>.

## 2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como um volume de plasma autólogo com uma concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos<sup>64,65</sup>. Apesar de existirem divergências quanto à correta nomenclatura, encontramos ainda na literatura as seguintes terminologias: gel de plaquetas, concentrado plaquetário e plasma rico em fatores de crescimento<sup>64,65</sup>.

Os estudos com PRP iniciaram há aproximadamente 30 anos<sup>13</sup>, e desde então vem sendo utilizado clínica e experimentalmente visando beneficiar a regeneração óssea e de tecidos moles em humanos e animais<sup>14</sup>.

Algumas características peculiares desse tipo de terapia celular tem resultado em um crescente interesse da comunidade científica: são de fácil processamento, são autólogas e, portanto seguras (biocompatíveis) e apresentam baixo custo

operacional<sup>14,15,66</sup>. Sua ação remete a um aumento local das concentrações de múltiplos fatores de crescimento e proteínas secretórias<sup>14,15</sup>.

Fatores de crescimento são uma classe de mediadores biológicos naturais que regulam eventos celulares ligados a reparação tecidual através da ativação de receptores específicos na membrana celular. O mecanismo de atuação inclui proliferação, quimiotaxia e produção/diferenciação de matriz celular<sup>67</sup>.

Dentre os fatores de crescimento derivados das plaquetas incluímos os três isômeros dos fatores plaquetários (PDGF- $\alpha\alpha$ , PDGF- $\beta\beta$  e PDGF- $\alpha\beta$ ), dois dos numerosos fatores de crescimento transformadores (TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I e IGF-II), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento epitelial (EGF)<sup>14,64,68</sup>. Nesses concentrados plaquetários encontramos ainda três moléculas de adesão, conhecidas como fibrina, fibronectina e vitronectina, responsáveis por atuar na osteocondução, promover migração epitelial e servir como matriz para o tecido ósseo e conjuntivo. Segundo Sierra<sup>69</sup>, os principais fatores envolvidos com a regeneração tecidual são: TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF e IGF.

O PDGF apresenta-se como uma família de fatores de crescimento polipeptídicos, constituída por 2 subunidades ligadas por pontes dissulfídicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), podendo aparecer de três formas: PDGF- $\alpha\alpha$ , PDGF- $\beta\beta$ , e PDGF- $\alpha\beta$ . É encontrado principalmente em plaquetas, monócitos, macrófagos, células musculares lisas e células endoteliais<sup>70</sup>. O PDGF é o primeiro fator de crescimento a agir no processo de regeneração e seu efeito depende da presença de outros fatores de crescimento, atuando como um quimioatraente para fibroblastos, leucócitos, células musculares lisas e macrófagos. Age ainda como um potente fator mitogênico para células tronco mesenquimais, incluindo fibroblastos e células musculares lisas.

O TGF- $\beta$  é um polipeptídeo de duas cadeias que existe como produto de três diferentes genes: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. O TGF- $\beta$ 1 é encontrado em altas concentrações nas plaquetas e nos ossos<sup>70</sup>. O TGF- $\beta$ 2 é uma molécula regulatória fundamental que atua por mecanismos parácrinos e autócrinos, não ficando limitada ao microambiente das células que o produzem<sup>71</sup>. O TGF possui também efeitos adversos, ele possui habilidade de antagonizar os efeitos mitógenos (ação anti-proliferativa) de outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas (PDEGF) e o PDGF<sup>72</sup>.

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/migração celular e angiogênese<sup>73,74</sup>. O EGF é um potente mitógeno para fibroblastos, células epiteliais e endoteliais estimulando a epitelização e também estimulando a angiogênese<sup>70,75</sup>.

O PRP deve ser obtido a partir de sangue com anticoagulante, pois a formação de coágulo promove retenção plaquetária<sup>14</sup>. A preparação do PRP tem início com a adição de citrato ao sangue coletado, promovendo dessa forma a ligação do cálcio ionizado e inibindo a cascata de coagulação<sup>14</sup>. O ACD-A é considerado o melhor anticoagulante para a obtenção de concentrados de plaquetas, pois mantém a viabilidade plaquetária por um período mais longo<sup>65</sup>. Técnica de dupla centrifugação é necessária para um processamento efetivo do concentrado plaquetário<sup>65</sup>. A primeira centrifugação, denominada “*hard spin*” separa as células vermelhas do plasma (que contém plaquetas, células brancas e os fatores de coagulação). Células vermelhas (7  $\mu$ m diâmetro), células brancas (7 a 15 $\mu$ m diâmetro) e plaquetas (2  $\mu$ m diâmetro) apresentam grande diferença no tamanho o que torna fácil a separação durante o processo de centrifugação<sup>65</sup>. A segunda centrifugação, chamada “*soft spin*” concentra as plaquetas formando assim

duas camadas: o PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP). Após essas duas fases de processamento o PRP necessita ser ativado pela adição de ativadores, visando reverter a ação do anticoagulante e promover a coagulação induzindo a ativação plaquetária<sup>64</sup>.

## 2.6 ERITROPOETINA (EPO) OU ERITROPOIETINA RECOMBINANTE HUMANA (EPO-rh)

A descoberta da eritropoietina (EPO) deu-se em 1906, quando Carnot, ao administrar uma injeção de soro de coelhos anêmicos em coelhos normais, verificou que estes tinham a produção de hemácias aumentada. O principal sítio de síntese renal foi descoberto por Jacobson em 1957, sendo que mais tardiamente, especificou-se com maior precisão o local de produção: as células peritubulares renais<sup>76,77</sup>.

Em 1983 o gene da molécula foi identificado e clonado, permitindo sua produção em laboratório para utilização clínica (em 1985). Sua produção laboratorial se dá a partir do ovário do hamster chinês, do rim de filhotes de hamsters ou de células humanas a partir de tecnologia de DNA recombinante<sup>76,77</sup>.

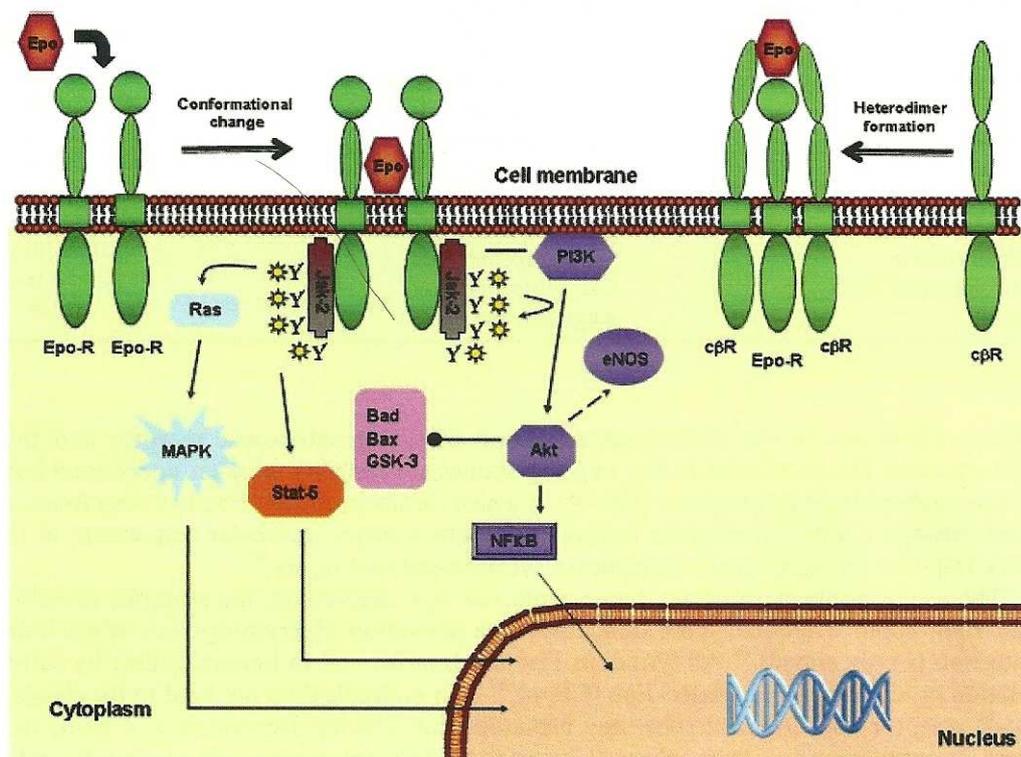
A EPO é uma glicoproteína pleiotrófica de baixo peso molecular (30,4 kDa), formada por 165 aminoácidos que desencadeia uma rota hormonal de estimulação e manutenção da eritropoiese, bem como de diferenciação de eritrócitos<sup>78-80</sup>. É produzida principalmente pelos rins, mas também é secretada por uma série de células do sistema nervoso central, atuando via ativação dos receptores de membrana (EPO-r) encontrados tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central<sup>81</sup>.

Trabalhos recentes vêm mostrando um efeito positivo na utilização da EPO com o objetivo de interação com a lesão neural<sup>9,10</sup>. Em alguns estudos, foi possível observar que a produção local de EPO e seus EPO-r aumentaram após lesão cerebral e espinhal,

principalmente em neurônios motores e seus axônios mielinizados<sup>11,12</sup>. Como exemplo das evidências de benefício do uso da EPO em lesões ao sistema nervoso, citam-se os resultados promissores do seu emprego em estudos experimentais de trauma cerebral focal e difuso<sup>82</sup>, isquemia e lesão traumática do cordão espinhal<sup>83</sup> e lesões do sistema nervoso periférico<sup>84-86</sup>. Na opinião de McPherson e Juul<sup>82</sup>, a EPO representa um dos mais promissores agentes neuroprotetores sob investigação na atualidade. Ehrenreich<sup>87</sup> cita que essas evidências representam uma nova fronteira para a neurociência translacional.

Os EPO-r pertencem à superfamília de receptores de citocinas classe I, onde encontramos ainda os receptores de interleucina 3 (IL-3r), interleucina 4 (IL-4r), interleucina 6 (IL-6r), prolactina, hormônio de crescimento e o receptor do fator estimulador de colônia macrófaga granulocítica (GM-CSFr)<sup>88</sup>. A ligação da EPO com seu receptor específico desencadeia nele uma mudança conformacional levando a ativação sequencial de duas rotas bioquímicas em forma de cascata que promovem sua sobrevivência<sup>88</sup>.

A auto fosforilação da Janus quinase 2 envia um sinal transdutor ativando dois componentes; um deles pertence a família STAT, chamado fosfatidilinositol 3 quinase e outra proteína quinase ativada por RAS-mitose<sup>88</sup>. A sequência desses eventos encontra-se representada na Figura 5.



**Figura 5-** Representação esquemática dos eventos sequenciais á auto fosforilação da Janus quinase 2 pela EPO. Fonte: Murua<sup>88</sup>.

Como parte de um sistema neuroprotetor endógeno, a EPO atua como substância anti-apoptótica, anti-inflamatória, antioxidante, de efeito neurotrófico, angiogênico e com atividade modulatória das células tronco, alterando assim sua plasticidade<sup>87</sup>.

Pesquisas têm afirmado que a EPO tem a capacidade de proteger culturas de neurônios contra a atividade tóxica do glutamato, reduzindo o dano de isquemia neuronal e disfunção neurológica em modelos experimentais de trauma *in vivo*<sup>89</sup>.

### **3.JUSTIFICATIVA**

O interesse pelo estudo da regeneração nervosa periférica aumentou muito nas últimas décadas. Fatores como o progressivo impacto socioeconômico causado pelo trauma e suas diferentes formas de incapacitação, aliado ao exponencial crescimento da engenharia tecidual elevaram muito o número de pesquisas nessa área. Mesmo com o desenvolvimento de novos biomateriais e o aperfeiçoamento das técnicas microcirúrgicas de reparo nervoso, ainda hoje, a recuperação funcional apresenta índices bastante indesejáveis em muitos casos.

Diversas substâncias adjuvantes e fatores tróficos vêm sendo estudados com o objetivo de melhorar a regeneração nervosa e elucidar seus mecanismos de atuação. Nesse contexto insere-se a terapia celular, que através dos concentrados plaquetários promove modulação do ambiente, estimulando a quimiotaxia e ativando diferentes rotas metabólicas que beneficiam a atividade regenerativa precoce.

Com o objetivo de tratar lesões no sistema nervoso periférico, a literatura vem creditando a mesma expectativa para a eritropoietina, demonstrando notável atividade neuroprotetora e neuroregenerativa.

## 4.OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do PRP e da EPO, de forma isolada ou em associação, na lesão aguda experimental com perda de substância em nervo ciático de ratos Wistar reparado por tubulização com prótese de silicone.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se existe diferença na concentração plaquetária e mensuração de FC (TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF) obtidos através de 2 formas de punção sanguínea e 3 diferentes protocolos experimentais de obtenção de PRP.
2. Verificar se existe diferença na regeneração do nervo ciático de ratos, obtida através de duas concentrações plaquetárias (1.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$  e 2.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$ ) administradas por tubulização pelo período pós-operatório de 90 dias.
3. Avaliar quantitativa e qualitativamente as diferenças entre o grupo autoenxerto e os grupos tubulização na regeneração de nervo ciático de ratos Wistar pelo período pós-operatório de 90 dias.
4. Avaliar quantitativa e qualitativamente as diferenças entre os grupos experimentais (PRP1, PRP2, PRP+EPO e EPO) e controles (autoenxerto e solução salina) na regeneração de nervo ciático de ratos Wistar pelo período pós-operatório de 90 dias.

## 5.MATERIAIS E MÉTODOS

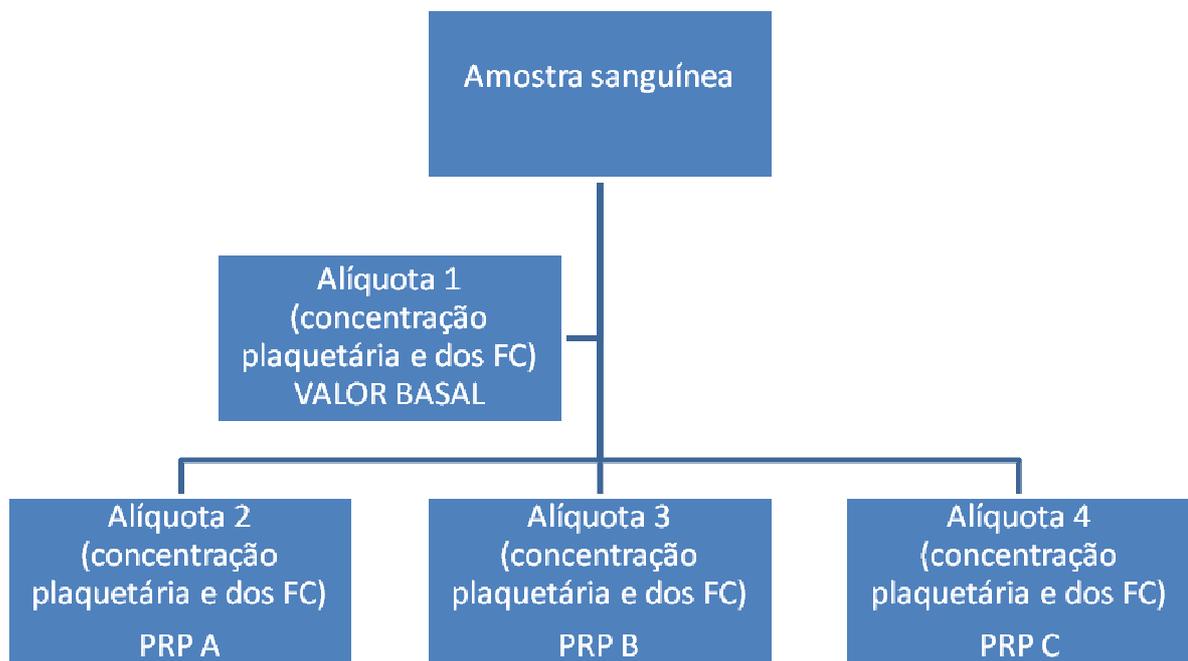
O referido estudo foi desenvolvido em três fases sequenciais utilizando um total de 70 animais (*Rattus norvegicus*) provenientes do vivário do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS (LHMPC-PUCRS). Os animais foram mantidos individualmente em caixas plásticas, sob controle de ciclo de luz (período claro-escuro de 12h), à temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e com água e alimentação *ad libitum*.

### 5.1 FASE 1

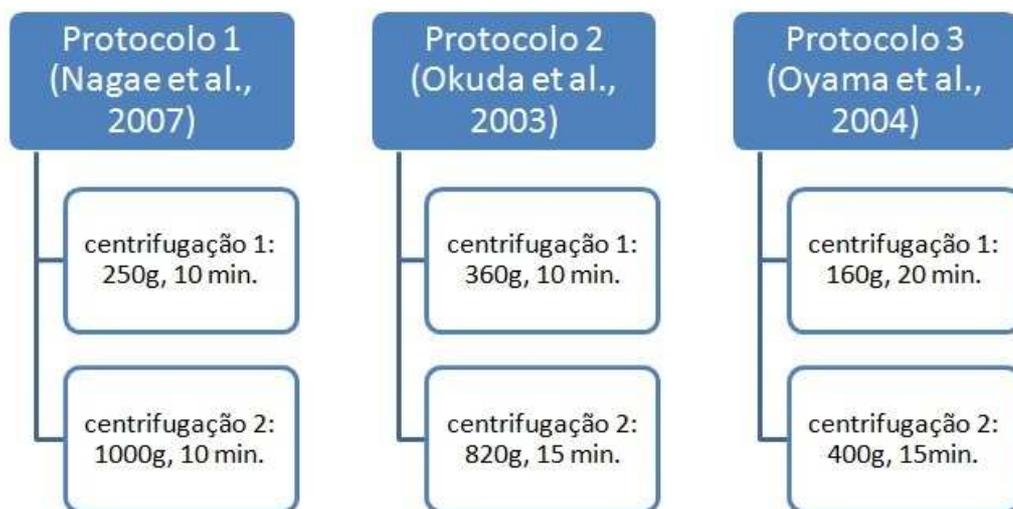
Foram utilizados 16 ratos Wistar, machos adultos com 3 meses de idade e aproximadamente 250 gramas. A primeira fase avaliou a diferença na concentração plaquetária e produção/liberação de fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF) obtidos entre dois métodos de coleta sanguínea (punção aórtica e punção cardíaca) e três protocolos diferentes de obtenção do PRP (protocolos A, B e C).

Na punção aórtica, realizou-se celiotomia na linha média ventral e após promover afastamento das alças intestinais e lobos hepáticos promoveu-se punção da aorta abdominal com cateter periférico 24G. Para coleta intra-cardíaca, realizou-se toracotomia (esternotomia) e puncionou-se o ventrículo esquerdo até exsanguinação (agulha 25x7mm e seringa de 10 ml com aproximadamente 1,2 ml de citrato de sódio A [ACD-A]). O conteúdo sanguíneo total (aproximadamente 7 ml) foi transferido para um tubo de onde foi separado uma amostra (200 $\mu$ l) para contagem plaquetária e quantificação de fatores de crescimento TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF (valor basal de plaquetas). O volume sanguíneo restante foi dividido em três alíquotas iguais,

submetidas ao processo de obtenção do PRP de acordo com 3 diferentes protocolos selecionados da literatura (protocolo de A<sup>90</sup>, B<sup>91</sup> e C<sup>92</sup>). Ressalta-se que as metodologias foram escolhidas em virtude da grande citação desses estudos em periódicos com alto índice de impacto. O organograma apresentado na Figura 6 demonstra a sequência dos procedimentos realizados após a coleta sanguínea. Os métodos de obtenção de PRP apresentam-se detalhados na Figura 6.



**Figura 6:** Sequência de eventos realizados desde a coleta sanguínea até o processamento dos diferentes protocolos de obtenção de PRP e mensuração dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF (sangue basal e sangue tratado).



**Figura 7:** Metodologias empregadas na obtenção do PRP com a velocidade (força G) e tempo (minutos) de centrifugação dos três protocolos de obtenção do PRP.

As amostras sanguíneas (exceto a fração de mensuração basal) foram submetidas à dupla centrifugação em temperatura ambiente (Hettich-Universal 320, Buckinghamshire, Inglaterra). A primeira centrifugação separou as células vermelhas do plasma (que contém plaquetas, células brancas e fatores de coagulação). A segunda centrifugação separou as plaquetas e as células brancas (e um eventual resquício de células vermelhas) do plasma. Posteriormente as frações de PRP e o sangue basal foram submetidos à contagem plaquetária automática (ABC Vet-Horiba, São Paulo, Brasil) no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para mensuração dos fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1, PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF), foi realizado ensaio imunoenzimático (Quantikine, R&D Systems, Minnesota, USA) no sangue basal e nas frações de PRP (Laboratório de Imunodiagnóstico da PUCRS). Dessa forma, foi possível comparar a concentração

plaquetária e os fatores de crescimento obtidos a partir do sangue basal e dos três métodos de produção de PRP.

## 5.2 FASE 2

A partir dos melhores resultados obtidos na fase 1, produziram-se duas concentrações de PRP (1.000.000 e 2.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$ , PRP1 e PRP2, respectivamente) para aplicação no nervo ciático de ratos Wistar submetidos a tubulização (gap de 10mm). Essa etapa de experimentação utilizou 36 ratos Wistar, machos, adultos de 3 meses de idade e aproximadamente 250 gramas. Trinta e dois animais foram distribuídos aleatoriamente nos dois grupos experimentais (PRP1 e PRP2) e dois grupos controle: auto enxerto autólogo (AE) e solução salina (SS). Outros quatro ratos foram utilizados como doadores de sangue para obtenção do PRP.

Após estabelecimento do modelo experimental, as duas concentrações foram administradas internamente ao tubo. O PRP foi ativado mediante administração de trombina bovina e cloreto de cálcio (20  $\mu\text{l}$  de PRP e 20  $\mu\text{l}$  de ativador). No grupo SS, solução fisiológica 0,9% (40  $\mu\text{l}$ ). foi administrada internamente no tubo de silicone visando padronizar o estímulo gerado com o tratamento. Os resultados obtidos nessa fase serviram para definir os grupos da etapa posterior.

## 5.3 FASE 3

Na terceira e última fase do estudo foram criados dois novos grupos experimentais (tratados com EPO), objetivando comparar seus resultados com os valores obtidos na fase anterior (mesmo modelo experimental de lesão).

Nessa fase, foram utilizados 16 ratos Wistar adultos com aproximadamente 3 meses de idade e 250 gramas, aleatoriamente divididos em dois grupos de experimentação: EPO+PRP2 (2.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$ ) e EPO. Outros 2 animais foram utilizados como doadores de sangue.

#### 5.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Os procedimentos anestésico-cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da PUCRS. Os animais foram anestesiados através de associação de cloridrato de cetamina (60mg.kg<sup>-1</sup>) e meperidina (10mg.kg<sup>-1</sup>) administrados na mesma seringa via intraperitoneal (IP).

#### 5.5 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO DO NERVO CIÁTICO

##### 5.5.1 Procedimento de tubulização do nervo ciático

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito para acesso à região craniolateral da coxa. Na antibioticoprofilaxia foi empregada ampicilina sódica (40 mg.kg<sup>-1</sup>, IM). Os animais foram tricotomizados e colocados sobre bolsa térmica aquecida de forma a evitar hipotermia transoperatória. Todos os procedimentos operatórios foram desenvolvidos de forma asséptica e executados pelo mesmo cirurgião. Após incisão da pele, tecido subcutâneo e fáscia lata os músculos vasto lateral e bíceps femoral foram afastados e o nervo ciático esquerdo liberado de suas inserções. Sob visibilização auxiliada por microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil) com magnificação de 25 a 40x, um segmento do nervo de 10 mm (defeito crítico) foi

criado com tesoura microcirúrgica (antes da trifurcação do ciático em ramos tibial, sural e fibular comum). Posteriormente, um tubo de silicone (diâmetro interno de 2 mm) foi fixado com fio de polipropileno 7-0 (Prolene®, BV 1, Ethicon, São Paulo, Brasil) em pontos epineurais nas extremidades criadas (um ponto proximal e outro distal). Para fechamento da incisão de acesso, a fáscia lata e a pele foram suturadas separadamente em padrão contínuo simples e interrompido simples, respectivamente (náilon monofilamentar 5-0, Ethilon®, Ethicon, São Paulo, Brasil).

#### 5.5.2 Procedimento de auto enxerto no nervo ciático

Sob visualização por meio de microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil) com magnificação de 25 a 40x, um segmento de 10 mm do nervo ciático (mesma localização anatômica do modelo experimental anterior), será ressecado e enxertado no mesmo sítio usando pontos isolados epineurais com fio de polipropileno 7-0 (Prolene®, BV 1, Ethicon, São Paulo, Brasil). O fechamento da incisão de acesso foi realizado da mesma forma anteriormente descrita.

#### 5.5.3 Período pós-operatório

No pós-operatório imediato foi administrado cetoprofeno ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , SC, cada 24 horas, durante 2 dias) e cloridrato de tramadol ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , SC, cada 12 horas, durante 2 dias) como medicação analgésica/anti-inflamatória.

### 5.6 ADMINISTRAÇÃO DA ERITROPOETINA (EPO)

Nos grupos EPO+PRP2 e EPO a eritropoietina (Hemoprex®, Bergamo, São Paulo, Brasil), foi administrada via subcutânea (SC), na dose de 1.000 UI.kg<sup>-1</sup> imediatamente após o término do procedimento cirúrgico (uma vez ao dia, durante 14 dias). Os animais dos outros grupos receberam solução salina 0,9%, na mesma posologia.

## 5.7 PROCESSAMENTO E OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Da fração sanguínea total (aproximadamente 7ml com 20% de ACD-A) foi separado 200 µl para contagem plaquetária (concentração basal). A fração restante foi submetido à dupla centrifugação em temperatura ambiente (Hettich-Universal 320, Buckinghamshire, Inglaterra). A primeira centrifugação (250g por 10min.) separou as células vermelhas do plasma (que contém plaquetas, células brancas e fatores de coagulação). A segunda centrifugação (100g por 10 min.) separou as plaquetas e as células brancas (e eventual resquício de células vermelhas) do plasma. Posteriormente as frações de PRP foram submetidas à contagem plaquetária (contador automático ABC Vet-Horiba) no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Através de diluição do PRP com plasma pobre em plaquetas (PPP) foi possível ajustar a concentração desejada para aplicação no experimento.

## 5.8 TESTE DE MARCHA (*Walking Track Test*)

Os animais foram submetidos ao teste de marcha em passarela em períodos pré-determinados (0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias)<sup>93,94</sup>. O Índice de Função do Ciático (IFC) foi calculado através da mensuração das pegadas de cada animal<sup>95</sup>.

Tiras de papel brancas foram inseridas sobre passarela de madeira (43x 8,7x 5,5 cm), fechada nas laterais e dotada de abrigo para o rato no final do trajeto. Os animais tiveram a superfície plantar dos membros pélvicos pintadas com tinta nanking preta e foram posicionados na passarela para caminhar impregnando o papel.

Foram feitas as seguintes mensurações para cálculo do IFC: comprimento total da pegada (calcanhar até o 3º dedo); distância entre primeiro e quinto dedo; e distância entre segundo e quarto dedo. Na interpretação, valores negativos próximos de cem (-100) indicaram disfunção severa do nervo e valores negativos próximos à zero (0) significaram disfunção leve ou função normal.

## 5.9 EUTANÁSIA

Os animais foram submetidos à eutanásia através de associação de cloridrato de cetamina (180mg.kg<sup>-1</sup>) e meperidina (20mg.kg<sup>-1</sup>) administrados na mesma seringa via IP.

## 5.10 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após a eutanásia, a coxa do animal foi novamente acessada para retirada do nervo ciático dos animais (grupo AE ou grupos tubulização). Nesse momento foi realizada avaliação macroscópica constando-se a existência ou ausência de nervo neoformado dentro do tubo de silicone (*gap*).

## 5.11 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Depois de retirado, o nervo foi seccionado transversalmente gerando três segmentos: proximal, medio e distal. As amostras de cada segmento foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (tampão fosfato 0.1M) por 48h a temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram lavados em tampão fosfato (pH 7.4) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. Seguindo, as amostras foram incluídas em resina epóxi (moldes de silicone numerados com cavidades de 5 mm de profundidade). Este molde oferece orientação e ângulo de corte adequados para as secções do nervo. Posteriormente, as amostras foram clivadas (cortes semi-finos de 1 $\mu$ m) em ultra-micrótomo (SuperNova, Reichert-Yung, Áustria) e coradas com azul de toluidina 1% para observação em microscopia de luz. As lâminas foram analisadas por especialista cegado em relação ao delineamento do estudo.

Os parâmetros morfométricos avaliados foram: diâmetro do nervo, diâmetro axonal, espessura da bainha de mielina, densidade axonal e presença de degeneração Walleriana. Para contagem celular foi utilizado software analisador de imagens Image Pro Plus, versão 4.1. Os parâmetros foram avaliados através da média, selecionando de forma randomizada 10 campos em aumento de 400x.

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos com o experimento foram expressos pela média e desvio padrão. A avaliação estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) com o software estatístico Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies, Georgia,

USA) usando nível de significância de 5%. Comparações múltiplas foram realizadas usando o teste LSD (Least Significance Difference).

### 5.13 ASPECTOS BIOÉTICOS

O presente estudo foi realizado respeitando os preceitos para minimizar a dor e o sofrimento dos animais, em conformidade com a resolução 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Também está de acordo com a lei que regulamenta o uso de animais na experimentação (Lei Arouca, n. 11.794, de 08.10.2008). Todos os procedimentos que de alguma forma pudessem causar dor, angústia ou sofrimento (incluindo os procedimentos cirúrgicos e a eutanásia) por parte dos animais foram realizados sob anestesia geral (descrita anteriormente).

A pesquisa em questão foi aprovada 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 10/00155 (Anexo A).

## **6.RESULTADOS**

### **6.1 CONCENTRAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Os resultados foram expressos pela razão concentração plaquetária no PRP/sangue basal (concentração relativa).

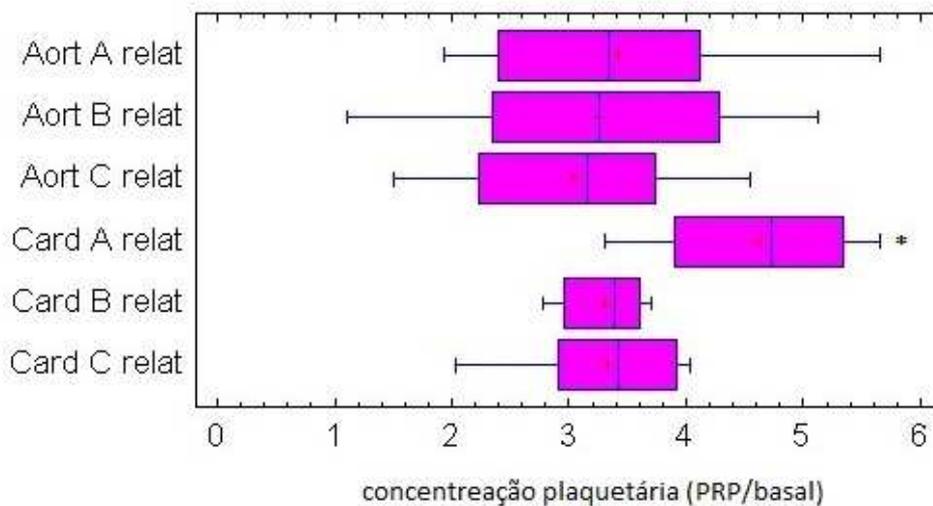
#### **6.1.1 Punção cardíaca**

Os valores de contagem plaquetária no sangue basal foram  $404,88 \pm 55,85$ ; enquanto que os valores de PRP foram  $1756,63 \pm 354,24$ ;  $1418,75 \pm 403,34$  e  $1322 \pm 236,43$  para os protocolos A, B e C, respectivamente.

#### **6.1.2 Punção aórtica**

Os valores de contagem plaquetária no sangue basal foram  $463,63 \pm 97,6$ ; enquanto que os valores de PRP foram  $1507,63 \pm 346,26$ ;  $1444,50 \pm 501,50$  e  $1355 \pm 333,39$  para os protocolos A, B e C, respectivamente.

A análise de variância mostrou diferença significativa ( $p = 0,0331$ ) entre os tratamentos aplicados. Concentração de plaquetas obtida por punção cardíaca em combinação com o protocolo A apresentou o melhor resultado. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os valores de plaquetas sem contar a forma de coleta sanguínea (Figura 8).



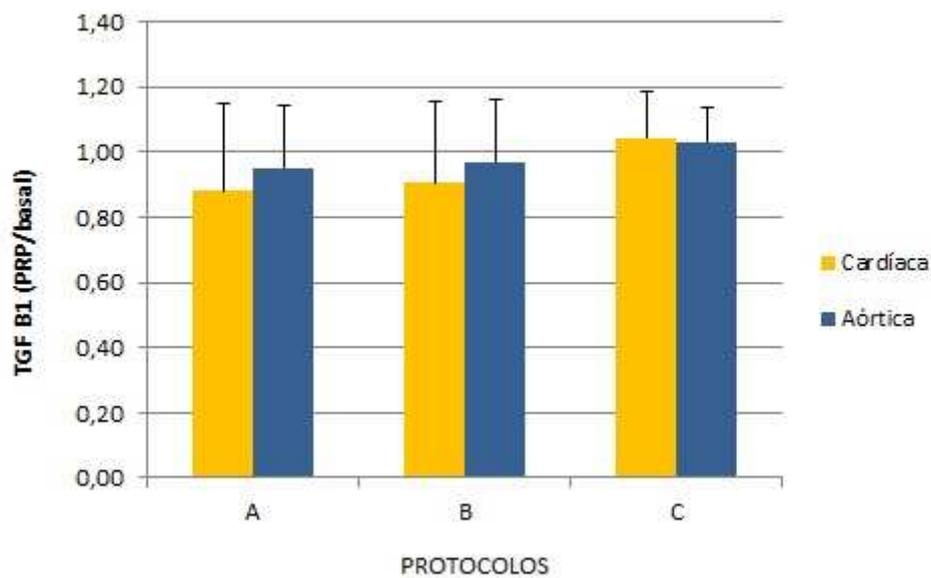
**Figura 8:** Valores plaquetários (concentração no PRP/ valor basal) considerando dois métodos de punção sanguínea (aórtica e cardíaca) e três protocolos de obtenção de PRP (A, B e C).

## 6.2 FATORES DE CRESCIMENTO

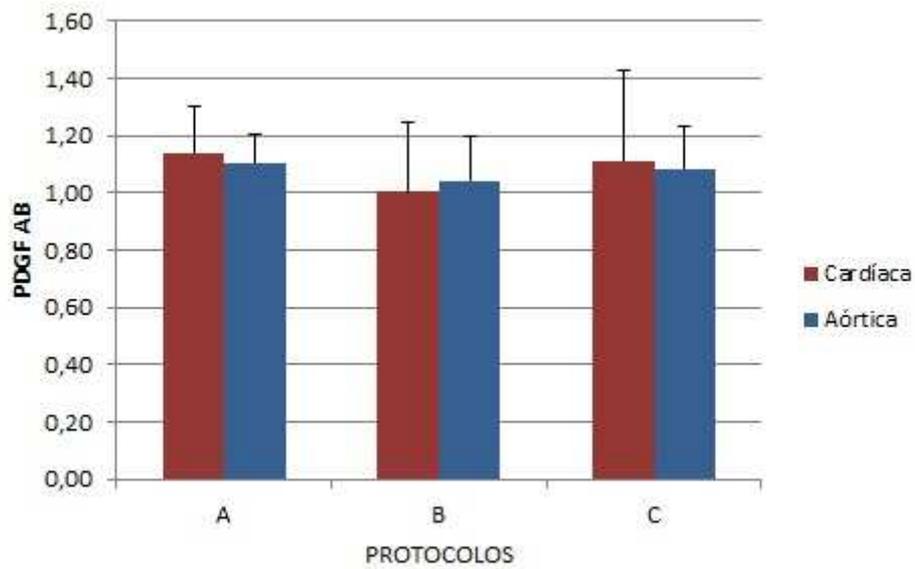
Os valores dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1, PDGF  $\alpha\beta$  e VEGF no sangue total e nos três diferentes protocolos de obtenção de PRP (protocolo A, B e C) (Tabela 1). Os resultados obtidos a partir da avaliação dos fatores de crescimento aparecem nas Figuras de 9 a 11. Nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa nos valores de TGF- $\beta$ 1 ( $p = 0,8262$ ), PDGF- $\alpha\beta$  ( $p = 0,9359$ ) e VEGF ( $p = 0,9995$ ).

**Tabela 1:** Média ( $\pm$ DP) dos fatores de crescimento ( $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) no sangue basal e a partir de três diferentes protocolos de PRP (A, B e C) obtidos através de punção aórtica ou cardíaca.

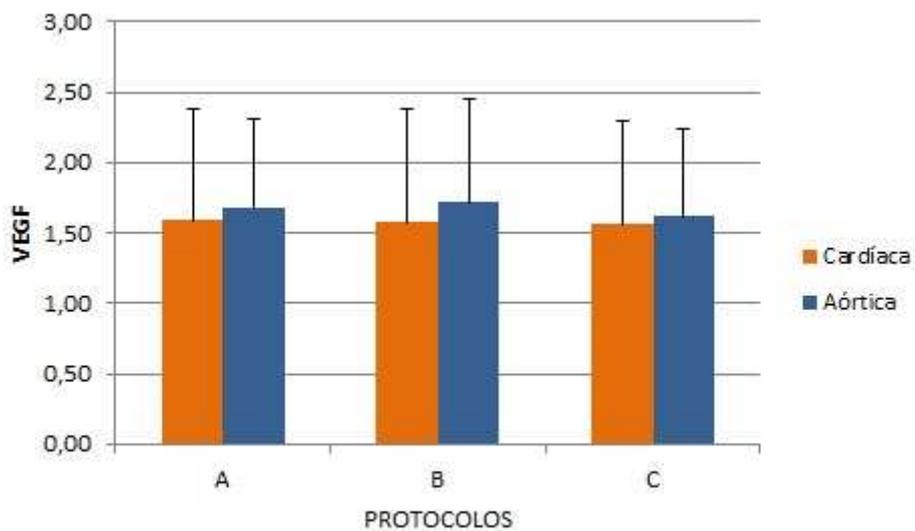
		Sangue basal	PRP A	PRP B	PRP C
Cardíaca	TGF- $\beta$ 1	38,17 $\pm$ 11,81	31,50 $\pm$ 3,78	32,61 $\pm$ 3,78	39,56 $\pm$ 12,41
	PDGF- $\alpha\beta$	11,41 $\pm$ 2,42	12,91 $\pm$ 2,68	11,10 $\pm$ 1,84	12,14 $\pm$ 1,74
	VEGF	48,75 $\pm$ 22,29	65,00 $\pm$ 2,36	64,17 $\pm$ 3,97	64,58 $\pm$ 2,50
Aórtica	TGF- $\beta$ 1	36,78 $\pm$ 6,82	34,28 $\pm$ 4,57	35,11 $\pm$ 5,95	37,89 $\pm$ 7,93
	PDGF- $\alpha\beta$	12,66 $\pm$ 1,47	13,95 $\pm$ 1,72	13,04 $\pm$ 1,20	13,60 $\pm$ 1,02
	VEGF	47,08 $\pm$ 20,34	69,58 $\pm$ 4,59	70,00 $\pm$ 4,08	67,08 $\pm$ 3,70



**Figura 9:** Valores de TGF- $\beta$ 1 (PRP / valor basal) nos três protocolos de separação de PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca.



**Figura 10:** Valores de PDGF- $\alpha\beta$  (PRP / valor basal) nos três protocolos de separação de PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca.



**Figura 11:** Valores de VEGF (PRP / valor basal) nos três protocolos de separação de PRP (A, B e C) obtidos por punção aórtica ou cardíaca.

### 6.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Sobre a aplicação clínica do PRP, observamos índice macroscópico de neuroregeneração (crescimento visível do segmento médio dentro do tubo) bastante variável (100, 71, 71, 57, 14 e 33% para os grupos AE, EPO+PRP, EPO, PRP 2, PRP1 e SS). Observou-se ainda espessuras macroscópicas variáveis de nervo neoformado, sendo que em alguns animais, constatou-se apenas a presença de líquido amarelo claro na cavidade interna do tubo. Em virtude da subjetividade de avaliação estas observações não foram mensuradas. As Figuras de 12 a 15 demonstram alguns exemplares de nervos (de grupos variados) imediatamente após fixação (notar a variabilidade de espessura do nervo neoformado ou a ausência de regeneração).



**Figura 12:** Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo EPO+PRP).



**Figura 13:** Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo EPO).



**Figura 14:** Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo PRP2).



**Figura 15:** Segmento de nervo ciático regenerado a partir de técnica de tubulização (grupo SS).



**Figura 16:** Segmento de nervo ciático apresentando ausência de regeneração a partir de técnica de tubulização (grupo PRP1).

## 6.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

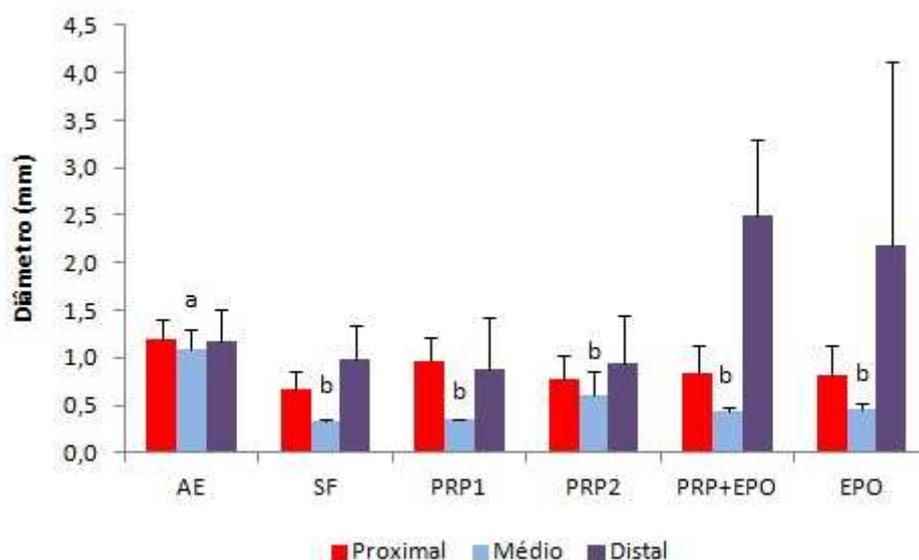
Análise histomorfométrica foi realizada em cada um dos segmentos dos nervos ciático: proximal, médio e distal. Foram avaliados parâmetros como diâmetro do nervo, espessura da bainha de mielina e diâmetro axonal. Também se comparou entre os grupos as variáveis densidade axonal, degeneração Walleriana e relação de axônios mielinizados/amielinizados.

### 6.4.1 Segmento proximal

O diâmetro do nervo no segmento proximal foi  $1,19 \pm 0,21$ ;  $0,67 \pm 0,18$ ;  $0,95 \pm 0,25$ ;  $0,78 \pm 0,24$ ;  $0,85 \pm 0,27$  e  $0,81 \pm 0,33$  mm para os grupos AE, SS, PRP1, PRP2 e PRP+EPO e EPO, respectivamente. Sobre essa variável, os grupos estudados não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 12).

Entretanto, a espessura da bainha de mielina foi maior ( $p = 0,014$ ) nos grupos AE e SS ( $1,61 \pm 0,44$  e  $1,32 \pm 0,87$   $\mu\text{m}$ , respectivamente) em comparação com os grupos PRP2, PRP+EPO e EPO ( $0,44 \pm 0,35$ ;  $0,54 \pm 0,08$  e  $0,49 \pm 0,28$   $\mu\text{m}$ , respectivamente). O grupo PRP1 ( $0,76 \pm 0,58$   $\mu\text{m}$ ) demonstrou valores similares aos do grupos AE e PRP2 (Figura 13).

A exemplo do diâmetro do nervo, o diâmetro axonal ( $3,50 \pm 1,42$ ;  $3,72 \pm 3,64$ ;  $3,52 \pm 2,10$ ;  $2,55 \pm 1,78$ ;  $2,84 \pm 0,46$  e  $2,70 \pm 1,32$   $\mu\text{m}$  para AE, SS, PRP1, PRP2, PRP+EPO e EPO, respectivamente) não apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figure 14).



**Figura 17.** Diâmetro da fibra nervosa após período de 90 dias de evolução pós-operatória.

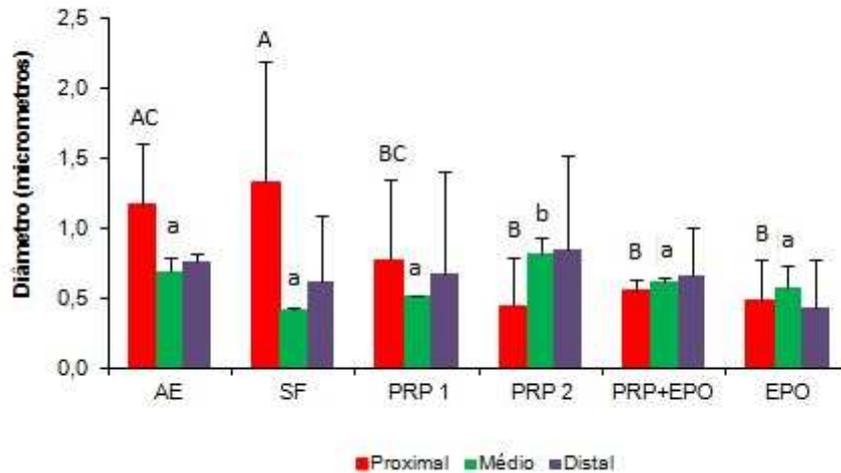
## 6.2 Segmento médio

No segmento médio, os valores para diâmetro do nervo foram  $1,09 \pm 0,22$ ;  $0,33 \pm 0,03$ ;  $0,35 \pm 0,01$ ;  $0,61 \pm 0,24$ ;  $0,44 \pm 0,03$  e  $0,45 \pm 0,08$  mm para os grupos AE, SS, PRP1, PRP2, PRP+EPO e EPO respectivamente. O diâmetro foi maior ( $p < 0,001$ ) no grupo AE em comparação aos outros grupos (Figura 12).

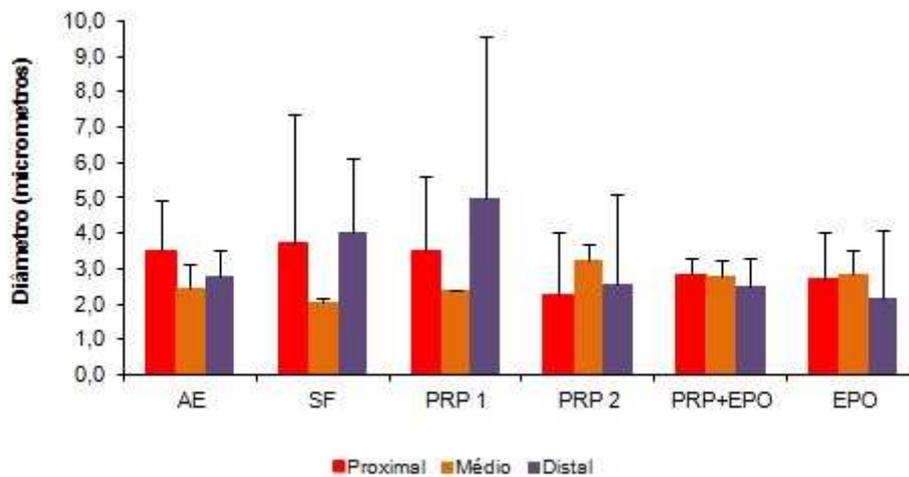
Os valores para espessura da bainha de mielina foram  $0,68 \pm 0,10$ ;  $0,42 \pm 0,01$ ;  $0,51 \pm 0,01$ ;  $0,82 \pm 0,12$ ;  $0,61 \pm 0,03$  e  $0,58 \pm 0,14$   $\mu\text{m}$  para os grupos AE, SS, PRP1, PRP2, PRP+EPO e EPO respectivamente. A espessura da bainha de mielina no segmento médio do nervo foi maior no grupo PRP2 em comparação aos demais grupos ( $p = 0,003$ ) (Figura 13).

Os valores para diâmetro axonal foram  $2,44 \pm 0,67$ ;  $2,06 \pm 0,08$ ;  $2,40 \pm 0,01$ ;  $3,25 \pm 0,46$ ,  $2,78 \pm 0,46$  e  $2,83 \pm 0,71$   $\mu\text{m}$  para os grupos AE, SS, PRP1, PRP2,

PRP+EPO e EPO, respectivamente (Figura 14). A análise entre os grupos não demonstrou diferença significativa ( $p>0,05$ ).



**Figura 18.** Espessura da bainha de mielina após período de 90 dias de evolução pós-operatória.



**Figura 19.** Diâmetro axonal após período de 90 dias de evolução pós-operatória.

### 6.3 Segmento distal

No segmento distal o diâmetro do nervo foi  $1,17 \pm 0,33$ ;  $0,99 \pm 0,34$ ;  $0,88 \pm 0,54$  e  $0,94 \pm 0,50$ ;  $2,50 \pm 0,79$  e  $2,19 \pm 1,92$  para os grupos AE, SS, PRP1 e PRP2, PRP+EPO e EPO, respectivamente (Figura 12).

Os valores para espessura da bainha de mielina foram  $0,75 \pm 0,05$ ;  $0,61 \pm 0,46$ ;  $0,68 \pm 0,72$  e  $0,85 \pm 0,66$ ;  $0,65 \pm 0,34$  e  $0,43 \pm 0,34$   $\mu\text{m}$  para os grupos AE, SS, PRP1 e PRP2, PRP+EPO e EPO, respectivamente (Figura 13).

Os valores para diâmetro axonal foram  $2,81 \pm 0,73$ ;  $4,03 \pm 2,1$ ;  $4,93 \pm 4,59$  e  $2,60 \pm 2,49$ ;  $2,50 \pm 0,79$  e  $2,19 \pm 1,92$   $\mu\text{m}$  para os grupos AE, SS, PRP1 e PRP2, PRP+EPO e EPO, respectivamente (Figure 14). Na avaliação dos grupos não foi encontrada diferença significativa considerando diâmetro do nervo ( $p > 0,05$ ), espessura da bainha de mielina ( $p > 0,05$ ) e diâmetro axonal ( $p > 0,05$ ).

Os parâmetros densidade axonal, degeneração Walleriana e relação de axônios mielinizados/amielinizados seguem tabulados abaixo (Tabelas 2, 3 e 4). Não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos na avaliação estatística desses parâmetros.

**Tabela 2.** Média ( $\pm$  DP) da densidade axonal (axonios.  $\mu\text{m}^{-2}$ ) após período de 90 dias de evolução pós-operatória.

Grupos	Segmentos		
	Proximal	Medial	Distal
<b>AE</b>	$0,012 \pm 0,005$	$0,027 \pm 0,008$	$0,015 \pm 0,010$
<b>SS</b>	$0,016 \pm 0,021$	$0,011 \pm 0,018$	$0,011 \pm 0,017$
<b>PRP1</b>	$0,013 \pm 0,010$	$0,005 \pm 0,013$	$0,005 \pm 0,021$
<b>PRP2</b>	$0,021 \pm 0,017$	$0,028 \pm 0,028$	$0,021 \pm 0,019$
<b>PRP+EPO</b>	$0,037 \pm 0,020$	$0,049 \pm 0,020$	$0,024 \pm 0,015$
<b>EPO</b>	$0,024 \pm 0,015$	$0,034 \pm 0,005$	$0,012 \pm 0,017$

**Tabela 3.** Média ( $\pm$  DP) de degeneração Walleriana após período de 90 dias de evolução pós-operatória.

Grupos	Segmentos		
	Proximal	Medial	Distal
<b>AE</b>	0,80 $\pm$ 0,44	2,67 $\pm$ 0,82	1,0 $\pm$ 0,71
<b>SS</b>	0	0	0,25 $\pm$ 0,50
<b>PRP1</b>	1,00 $\pm$ 1,22	0	0,50 $\pm$ 0,58
<b>PRP2</b>	0,40 $\pm$ 0,55	0	0,40 $\pm$ 0,54
<b>PRP+EPO</b>	0,50 $\pm$ 0,54	0	0,43 $\pm$ 0,53
<b>EPO</b>	0,29 $\pm$ 0,48	0	0,17 $\pm$ 0,41

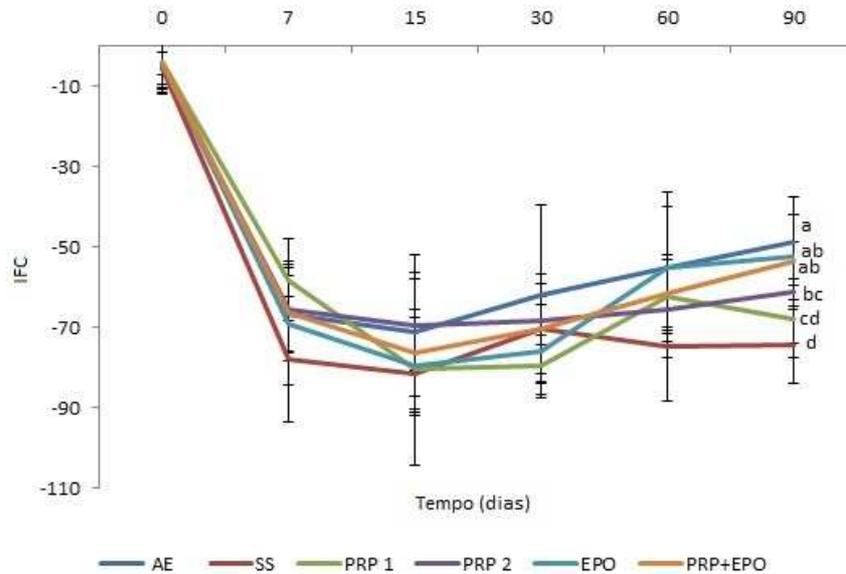
**Tabela 4.** Média ( $\pm$  DP) da relação axônios mielinizados/amielinizados após período de 90 dias de evolução pós-operatória.

Grupos	Segmentos		
	Proximal	Medial	Distal
<b>AE</b>	5,27 $\pm$ 4,12	3,58 $\pm$ 2,37	2,04 $\pm$ 0,86
<b>SS</b>	52,50 $\pm$ 19,09	30,74 $\pm$ 5,75	26,84 $\pm$ 20,03
<b>PRP1</b>	20,62 $\pm$ 28,92	22,20 $\pm$ 2,02	3,31 $\pm$ 0,63
<b>PRP2</b>	22,13 $\pm$ 11,78	24,88 $\pm$ 18,53	16,13 $\pm$ 0,18
<b>PRP+EPO</b>	17,78 $\pm$ 16,38	16,40 $\pm$ 10,33	12,57 $\pm$ 14,02
<b>EPO</b>	8,26 $\pm$ 4,15	13,38 $\pm$ 16,16	5,51 $\pm$ 8,83

#### 6.5 ANÁLISE FUNCIONAL POR TESTE DE MARCHA (*Walking track test*)

A função ambulatoria dos animais foi avaliada por teste de marcha em passarela antes da cirurgia e nos dias 7, 15, 30, 60 e 90 do período pós-operatório. Os valores do índice de função ciática (IFC) aos 90 dias foram melhores ( $p=0,0001$ ) no grupo AE (-48.62  $\pm$  10.87), seguido dos grupos EPO, PRP+EPO, PRP2, PRP1 e SS (-52,47  $\pm$  10,52;

-53,63± 11,84; -61,28 ± 12,42; -67,71 ± 9,96; -74,19 ± 9,49), respectivamente (Figura 15).



**Figura 20.** Índice de função ciática segundo o período de avaliação (90 dias de pós-operatório).

## 7.DISCUSSÃO

A concentração de plaquetas e conseqüente produção de fatores de crescimento é um fator decisivo na terapia pelo PRP, podendo acelerar ou retardar a regeneração tecidual<sup>65,96,97</sup>. A aplicação do PRP pode otimizar a migração e proliferação de células mesenquimais ou limitar a diferenciação de células da linhagem adequada pela sobre-exposição local das células aos fatores de crescimento<sup>97</sup>.

A contagem de plaquetas e produção dos factores de crescimento está sob influência direta do método de obtenção de PRP utilizado<sup>98,99</sup>. Muitos protocolos

experimentais e comerciais são citados na literatura como sendo altamente eficazes em produzir PRP com alta concentração plaquetária<sup>98,100-103</sup>. Diversos estudos avaliam a eficácia do PRP na regeneração tecidual em variadas áreas da medicina. Entretanto, algumas pesquisas relatam resultados bastante variados e às vezes até antagonicos na conclusão sobre sua efetividade. Ao traçar um paralelo sobre estes trabalhos, chama atenção a falta de padronização nas técnicas de coleta de sangue e preparo de PRP, o que dificulta muito uma avaliação coerente.

Muitos estudos têm comparado os efeitos da aplicação clínica do PRP em estudos experimentais controlados ou no tratamento de pequenos grupos de pacientes<sup>98</sup>. Encontramos poucos estudos que objetivem avaliar especificamente os métodos de concentração plaquetária em humanos ou espécies animais experimentais (caninos, felinos, bovinos, equinos, suínos, caprinos, ovinos, suínos e lagomorfos)<sup>98,104-106</sup>. Entretanto, investigações comparativas de métodos de obtenção de PRP em ratos, uma das espécies experimentais mais utilizadas na pesquisa básica, ainda não estão disponíveis. Em virtude da considerável diferença entre plaquetas humanas e animais (grande diferença de metabolismo) a extrapolação dos resultados entre as duas espécies deve ser feito com muito cuidado<sup>107</sup>.

A escolha dos protocolos de obtenção de PRP foi baseada na ampla citação bibliográfica dos métodos e a necessidade de avaliação de parâmetros com consideráveis diferenças no tempo e velocidade de centrifugação (poder de comparação).

Partindo do princípio que os fatores de crescimento são liberados a partir dos  $\alpha$ -grânulos plaquetários, infere-se que grandes concentrações plaquetárias devam gerar alta produção de fatores de crescimento. No entanto, alguns estudos não demonstram correlação entre a contagem de plaquetas e a produção de fatores de crescimento<sup>98,99</sup>.

Exemplificando, determinados fatores de crescimento, como o PDGF e o TGF- $\beta$ , têm sido identificados em preparações PRP com taxas de produção bastante variadas (amplo desvio padrão)<sup>103</sup>.

Revisando a literatura, encontramos inúmeros elementos passíveis de estarem causando essa discrepância: estresse celular na manipulação de plaquetas (velocidade e tempo de centrifugação), utilização de diferentes anticoagulantes, presença de leucócitos na preparação final e a utilização de diferentes tipos de ativadores para produzir o coágulo de PRP<sup>108</sup>. O contato do sangue com biomateriais como enxertos vasculares podem evocar inflamação e efeitos trombogênicos<sup>109</sup>. A energia de superfície dos materiais também pode iniciar uma importante rota trombogênica<sup>110</sup>. Após o primeiro contato do sangue com a superfície dos biomateriais, as proteínas são adsorvidas formando um filme que promove aderência plaquetária<sup>109</sup>. Nesse evento, a principal proteína adsorvida é o fibrinogênio, que sabidamente tem importante função na aderência das plaquetas<sup>111</sup>. No presente estudo, o ACD-A foi utilizado como solução anticoagulante, pois melhora a eficácia do PRP e estimula a proliferação celular<sup>112</sup>.

Plaquetas são extremamente sensíveis a qualquer tipo de processo que possa induzir estresse celular, tanto durante a coleta quanto na produção do PRP. Dessa forma, a quantidade de fatores de crescimento derivado das plaquetas que ficará disponível ao final do processo, depende dos efeitos cumulativos sobre as plaquetas, iniciados na inserção da agulha ou cateter até o fim do processo de formação do coágulo de PRP<sup>98</sup>.

Realizando experimentos precedentes em nosso laboratório (utilizando ratos), observou-se uma ampla variação de valores de contagem plaquetária obtidas de diferentes formas de coleta sanguínea. Adiante, verificando a ausência de publicações com roedores sobre essa constatação, (uma das principais espécies experimentais) decidiu-se iniciar uma investigação.

Durante o delineamento experimental do estudo, a escolha pelos métodos de colheita de sangue central (aorta abdominal e do ventrículo esquerdo) objetivou minimizar a possibilidade de agregação/ativação plaquetária (presença de fibrina na amostra, formação de coágulos e liberação precoce de factores de crescimento). Em nossa rotina laboratorial (experimentação com ratos), observamos que durante a coleta sanguínea, facilmente se formam microcoágulos ou grumos de fibrina na amostra, mesmo com o animal anestesiado e com técnica realizada por pessoa experiente.

Em relação à concentração plaquetária, foi encontrada diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p=0,0331$ ), observando maior contagem usando punção cardíaca em combinação com o protocolo A. Outro importante achado é a observação de que o protocolo A é o mais breve e com maior força (rotações por minuto) considerando as duas centrifugações (250 g, 10 min. e 1000 g, 10 min). Esta constatação vai ao encontro do reportado por Clemmons<sup>105</sup> que observou máximo volume plaquetário proveniente de protocolo com curto tempo de duração e alta força gravitacional (sangue de caninos, equinos e suínos). Além disso, salienta-se que no uso clínico, o PRP é produzido durante o procedimento cirúrgico, o que reforça a necessidade de um preparo rápido não interferindo no tempo anestésico.

Sobre os factores de crescimento, não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os três protocolos de separação de PRP obtidos através de punção aórtica ou cardíaca. Com este resultado, foi possível observar que existe discrepância entre os valores de contagem plaquetária e factores de crescimento obtidos pelos três protocolos de separação de PRP. A incoerência entre a produção de factores de crescimento e a concentração plaquetária também foi relatada por outros autores<sup>96,98,99</sup>. Dessa forma, compartilha-se da opinião de outros autores, de que essa falta de correlação entre a contagem plaquetária, a produção/liberação de factores de crescimento e a efetividade

clínica com o uso do PRP pode explicar a ausência de resultados positivos em muitos estudos experimentais<sup>8,99</sup>. Baseado em observações como essa, referida pelo presente estudo, Mazzuco<sup>98</sup>, conclui que a relação entre concentração plaquetária, produção de fatores de crescimento e efetividade clínica parece longe de estar compreendida. Adicionalmente, Mazzuco<sup>98</sup>, ainda refere que a maioria dos estudos não enfatiza de forma suficientemente clara o manejo plaquetário, incluindo forma de ativação e outros fatores que interferem com a liberação dos fatores de crescimento<sup>98</sup>. Visando a certificação dos valores obtidos com o experimento, foi realizada dupla contagem plaquetária (contagem manual e automática) e leitura das amostras com fatores de crescimento em triplicata.

Sobre a aplicação clínica do PRP, o índice macroscópico de neuroregeneração (segmento médio) é um parâmetro extremamente importante e deve sempre ser levado em conta para a avaliação de qualquer outro parâmetro histomorfométrico.

São inúmeras as abordagens que podem trazer benefícios à regeneração nervosa<sup>114</sup>. Atualmente, a engenharia tecidual, considerada uma biotecnologia relativamente nova, vem ganhando espaço e sendo cada vez mais investigada na busca de um melhor entendimento de seus mecanismos de ação. Muitos autores tem mostrado otimização da regeneração tecidual com a utilização de PRP<sup>64,104</sup>. Segundo essas publicações, esse efeito se dá pela utilização de muitos fatores de crescimento como por exemplo, o PDGF, TGF- $\beta$  and VEGF que agem localmente estimulando a proliferação celular.

Adicionalmente, várias outras pesquisas tem mostrado efeitos vantajosos na utilização da eritropoietina na regeneração de nervo periférico. Essa citocina atua através de um mecanismo neuroprotetor endógeno que confere atividade anti-

apoptótica, anti-inflamatória, antioxidante, angiogênica e modulatória para células tronco, influenciando a plasticidade neural<sup>87</sup>.

Em nosso estudo, considerando a porcentagem de regeneração macroscópica, encontramos o auto enxerto (controle positivo) como o melhor tratamento em relação aos demais grupos (tubulização), provocando regeneração em todos os animais do grupo. Esse resultado é justificado em virtude da técnica de auto enxerto não deixar “*gap*” entre os cotos para posterior crescimento nervoso. Portanto, ao compararmos os resultados do grupo AE com os demais, devemos fazê-lo com essa ressalva.

Avaliando os tratamentos dentro da mesma técnica de reparo (tubulização), observamos claramente um benefício no uso combinado dos dois fatores (PRP e EPO), sendo este, um dos grupos com melhores resultados na regeneração do nervo periférico

Em uma primeira análise, a adição do plasma rico em plaquetas no grupo EPO parece não fornecer suporte adicional para uma melhor taxa regenerativa, uma vez que a EPO, mesmo que utilizada isoladamente, gerou resultados iguais na regeneração macroscópica àqueles encontrados no grupo PRP+EPO. Contudo, na tentativa de diferenciar esses dois grupos, observa-se que o grupo PRP+EPO apresenta melhores resultados para a variável espessura da bainha de mielina. Essa observação pode ser justificada pela ação neuroprotetora e neuroregenerativa atribuída a EPO somado ao efeito conferido pelo uso do PRP. Além disso, é importante ressaltar que a EPO foi utilizada sistemicamente por um período de 14 dias, enquanto que o PRP foi administrado localmente apenas durante a cirurgia. Assim, de um modo geral a neuroregeneração nos diferentes grupos pode ser expressa como: PRP+EPO > EPO > PRP2.

A concentração plaquetária e conseqüente produção dos fatores de crescimento é um fator decisivo na terapia por PRP, podendo acelerar ou retardar a regeneração

tecidual<sup>65,96,97,114,115</sup>. Marx<sup>65</sup>, cita em sua publicação que a concentração ideal de PRP para provocar benefícios na regeneração óssea e de tecidos moles é 1.000.000 plaquetas /5 ml<sup>-1</sup> de plasma. Entretanto, salienta-se que esta recomendação de concentração refere-se à utilização em humanos. Em nosso estudo com ratos, quando comparamos separadamente as duas concentrações plaquetárias de PRP (1.000.000 e 2.000.000 plaquetas/ $\mu\text{l}^{-1}$ ), observamos maior índice de regeneração macroscópica com o emprego da maior concentração. Observamos ainda que a concentração de 1.000.000 plaquetas/ $\mu\text{l}^{-1}$  apresentou os piores resultados do estudo para o quesito regeneração macroscópica, sendo inclusive menos eficiente que o grupo SS (controle negativo). Essa constatação nos leva a inferir que a concentração de 1.000.000 plaquetas/ $\mu\text{l}^{-1}$  exerce efeito inibitório na regeneração de nervos periféricos em ratos (PRP2>SS>PRP1).

Existem controvérsias em relação ao benefício de utilização de PRP. Muitos estudos não evidenciam vantagens no seu uso<sup>8,116</sup>. Uma possível explicação para esses resultados ruins seria a superexposição ou opostamente níveis baixos/ausência de fatores de crescimento (concentrações de PRP inadequadas). Desta forma, acredita-se que enquanto as concentrações ideais de PRP não forem definidas para cada espécie, e o mecanismo de ação dos vários componentes celulares não for entendido, resultados inexpressivos continuarão a existir.

Avaliando os três primeiros parâmetros histomorfométricos (diâmetro do nervo, espessura da bainha de mielina e diâmetro axonal) nos três segmentos do nervo observamos diferença estatística em três situações: espessura da bainha de mielina no segmento proximal ( $p=0,014$ ) e diâmetro do nervo e espessura da bainha de mielina no segmento medial ( $p=0,001$  e  $p=0,003$ ), respectivamente. Salienta-se que essas observações são de fundamental importância para a avaliação refinada de grupos com resultados semelhantes para o quesito regeneração macroscópica.

As variáveis densidade axonal e degeneração Walleriana apresentaram os melhores índices com os grupos tratados por eritropoietina, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre esses e o demais os grupos de estudo em função do grande desvio padrão encontrado (alta variabilidade intra-grupo).

Em relação à análise funcional da regeneração nervosa (índice de função ciática), podemos observar um comportamento cinético do traçado de evolução que acompanha as demais avaliações. Os resultados evidenciam uma melhor evolução no grupo AE ( $-48.62 \pm 10.87$ ), seguido dos grupos EPO, PRP+EPO, PRP2, PRP1 e SS ( $-52.47 \pm 10.52$ ;  $-53.63 \pm 11.84$ ;  $-61.28 \pm 12.42$ ;  $-67.71 \pm 9.96$ ;  $-74.19 \pm 9.49$ , respectivamente) ( $p=0,0001$ ).

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com o estudo e levando em conta as limitações do mesmo, pode-se concluir que:

Existe diferença na concentração plaquetária produzida a partir das duas formas de coleta sanguínea e dos três protocolos de obtenção de PRP. A punção cardíaca e o protocolo A geraram as maiores concentrações. Entretanto, de forma contraditória, os fatores de crescimento avaliados (TGF- $\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$  e VEGF) não diferiram em seu índice de produção/liberação.

Existe diferença na regeneração nervosa ao final dos 90 dias de avaliação, obtida através das duas concentrações de PRP testadas. A concentração de PRP de 2.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$  forneceu maior índice de regeneração macroscópica aliada a uma maior organização estrutural das estruturas histomorfométricas. A concentração de PRP de 1.000.000 plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$  forneceu índice de regeneração macroscópica inferior ao grupo controle negativo (solução salina), podendo-se inferir que exerce efeito inibitório na regeneração do nervo periférico.

Ao fim do período de estudo, o grupo auto enxerto apresentou vantagem sobre qualquer um dos tratamentos usados na técnica de tubulização para regeneração do nervo ciático de ratos.

Grupos experimentais submetidos à administração de EPO apresentaram vantagem na regeneração nervosa sobre os grupos com administração de PRP

(isoladamente) em qualquer das concentrações testadas. Verificou-se também que a aplicação conjunta de EPO e PRP apresenta vantagens sobre qualquer outro grupo que utilize técnica de tubulização no reparo nervoso. De forma geral, a conclusão do estudo em relação aos tratamentos, visando regeneração nervosa pode ser expressa: ANG>PRP+EPO>EPO>PRP2>SS>PRP1.

## REFERÊNCIAS

- [1]. Pabari A, Yang SU, Seifalian, A.M.; Mosahebi, A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J. Plas. Recon. Aesth. Surg.* 2010; 63: 1941-1948.
- [2]. Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido Nervoso. In: *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 154-183.
- [3]. Fernández VL, Bernardini M. Neuroanatomia. In: *Neurologia de cães e gatos*. São Paulo: Medvet; 2010. p. 01-31.
- [4]. Summers BA, Cummings JF, De Lahunta A. *Veterinary neuropathology*. Saint Louis: Mosby; 1995. p. 402-483.
- [5]. Da Silva CK, Camargo EA. Mecanismos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas. *Rev. Saúde Pesq.* 2010; 3 (1): 93-99.
- [6]. Pierucci A. Influência do Agrecam sobre a migração das células de Schwann *in vitro* e regeneração nervosa periférica *in vivo* após transecção do nervo ciático. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.
- [7]. Rodkey WG, Sharp NJH. Cirurgia do sistema nervoso periférico. In: Slatter, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 3.ed. v.1. São Paulo: Manole; 2007. p. 1218-1226.
- [8]. Seim III, Cirurgia dos nervos periféricos. In: Fossum TW. *Cirurgia de pequenos animais*. São Paulo: Roca; 2005. p.1336-1350.
- [9]. Shores A. Sistema nervoso periférico. In: Bojrab MJ. *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*. São Paulo: Roca; 1996. p. 49-60.

- [10]. Toop KS, Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys. Ther.* 2006; 86 (1): 92-109.
- [11]. Mattar Júnior R, Azze RJ. Lesão dos nervos periféricos. In: Atualização em Traumatologia do Aparelho Locomotor. São Paulo: Publicação Oficial do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC FMUSP; 1999 (Fascículo).
- [12]. Pachioni CAS. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: um estudo da vascularização. *Acta Ortop. Bras.* 2006; 14 (4):203-207.
- [13]. Duran WN, Mariscano TH, Anatomy of the microcirculation. In: Serafin D, Buncke Jr. HJ. Microsurgical composite tissue transplantation. St. Louis: Mosby Company, 1979. p. 17-30.
- [14]. Shell, LG. Afecções de nervos periféricos. In: Birchard SJ, Sherding RG. Manual Saunders clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca; 2008. p.1329-1340.
- [15]. Vicente EJD, Viotto MJS, Barbosa CAA. Estudo das relações anatômicas e suas variações entre o nervo ciático e o músculo piriforme. *Rev. Bras. Fisioter.* 2007; 11 (3): 227-232.
- [16]. Vloka JD, Hadzic A, April E, Thys DM, The division of the sciatic nerve in the popliteal fossa: anatomical implications for popliteal nerve blockade. *Anesth. Analg.* 2001; 92:215-217.
- [17]. Fonseca. Abordagem simplificada do nervo ciático por via posterior, no ponto médio do sulco gluteofemoral com o uso de neuroestimulador. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2002; 52(6): 764-773.
- [18]. Taylor SM. Distúrbios neuromusculares. In: Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de pequenos animais. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.1013-1025.

- [19]. Braga-Silva JL, Gehlen D, Padoin AV, Machado DC, Garicochea B, Da Costa JC. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human medial and ulnar nerves? *J. Hand Surg.* 2008; 33(1): 488-493.
- [20]. Colomé LM. Avaliação do envolvimento de células tronco autólogas de medula óssea em associação com técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos. Dissertação de mestrado, Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.
- [21]. Mazzer PYCN, Barvbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Avaliação qualitativa e quantitativa das lesões agudas por esmagamento do nervo isquiático do rato. *Acta Ortop. Bras.* 2006; 14(4): 220-225.
- [22]. Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery.* 1999;44(4):825-839.
- [23]. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. *Acta Ortop. Bras.* 2006; 14(3): 133-136.
- [24]. Braga-Silva JL, Guarise-Silva P, Gazzelle A. Lesões do plexo braquial. *Rev. AMRIGS.* 2010; 54 (3): 344-349.
- [25]. Seedon HJ. Surgical disorders of the peripheral nerves. 2ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975.
- [26]. Batista KT, Araújo HJ. Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo periférico do membro superior. *Rev. Bras. Cir. Plas.* 2010; 25 (4): 708-714.
- [27]. Sunderland S. Nerves and nerve injuries. 2ª ed. New York: Churchill Livingstone, 1978.
- [28]. Dourado E. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. *Rev. Cir. Traum. Buco-maxilo-facial.* 2003; 3(2): 49-54.

- [29]. Martins RS. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. *Arq. Bras. Neurocir.* 2005; 24(1): 20-25.
- [30]. Rowshan K, Jones NF, Gupta R. Current surgical techniques of peripheral nerve repair. *Oper. Tech. Orthop.* 2004; 14(1): 163-170.
- [31]. Garibaldi L. Exame Neurológico. In: Pellegrino F, Suranti A, Garibaldi L. Síndromes neurológicas em cães e gatos: avaliação clínica, diagnóstico e tratamento. São Paulo: Interbook; 2003. p.40-79.
- [32]. Siqueira R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. *Rev. Neuroc.* 2007; 15(3): 226-232.
- [33]. Colomé LM, Gomes C, Crosignani N. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Cien. Rur;* 2008;38(9): 2529-2534.
- [34]. Bloch J. Nerve growth factor and neurotrophin -3 releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. *Experim. Neur.* 2001; 172(1): 425-432.
- [35]. Oliveira ALR, Pierucci A, Pereira KB. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. *Braz. J. Morphol. Sci.* 2004; 21(4): 225-231.
- [36]. Grecco MAS. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o Fluro-Gold® como marcador neuronal. *Acta Ortop. Bras.* 2003; 11(4): 225-229.
- [37]. Ely JB, Calteux N. Envelope venoso, contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. *Rev. AMRIGS.* 1983; 27(4): 454-461.
- [38]. Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Experim. Neur.* 1998; 149: 243-252.

- [39]. Stopiglia AJ. Avaliação morfométrica de fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto enxerto e prótese tubular em cães. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 1998; 35(2): 80-83.
- [40]. Daza CHM. Câmaras de silicona como injerto nervioso, análisis de la especialidad de regeneración del nervio peroneal o tibial: estudio experimental em ratas. *Rev. Colom. Ortop. Traum.* 1999; 13(3): 285-292.
- [41]. Mello, LR. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arq. Neuropsiq.* 2001; 59(2): 372-379.
- [42]. Pinedo UG. Utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. *Arch. Neuroc. Mex.* 2004; 6(4): 184-193.
- [43]. Allet MA. Enxerto “versus” enxerto coberto com tubo de veia nas reparações nervosas. *Rev. Bras. Ortop.* 2003; 38(4): 193-200.
- [44]. Delistoianov N. Comparação de duas técnicas de neurorrafia do digital palmar em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 2006; 58(1): 41-51.
- [45]. Kline DG. Mechanisms and pathology of injury. In: Kline DG, Hudson AR. Nerve injuries: operative results for major nerve injuries, entrapments and tumors. Philadelphia: WB Saunders; 1995.
- [46]. Portincasa A, Gozzo G, Parisi D, Annacontini L, Campanale A, Basso G, Microsurgical treatment of injury to peripheral nerves in upper and lower limbs: a critical review of the last 8 years. *Microsurgery.* 2007; 27(5): 455-462.
- [47]. 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. Zoot.* 2003; 55(5): 557-561.

- [48]. Contesini EA, Pippi NL, Witz, MI. Avaliação clínico-morfológica da regeneração nervosa periférica mediante alinhamento por tubo de silicone em caninos. *Cien. Rur.* 1992;22(1):65-71.
- [49]. Buti M. Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Experim. Neur.* 1996; 137(1): 26-33.
- [50]. Braga-Silva JL. Parceria abre caminho para nervo artificial. *PUCRS Informação.* 2009;146:17-17.
- [51]. Madduri S, Summa P, Papaloizos M, Kalbermatten D, Gander B. Effect of controlled co-delivery of synergistic neurotrophic factors on early nerve regeneration in rats. *Biomaterials.* 2010; 31:8402-8409.
- [52]. Almeida DF. Trauma de nevo periférico. EMGLab. Disponível em: <[http://www.emglab.com.br/html/trauma\\_de\\_nervos.html](http://www.emglab.com.br/html/trauma_de_nervos.html)>. acesso em: 22 jul. 2012.
- [53]. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle & Nerve.* 2000; 23:33-38.
- [54]. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999; 194:1-14.
- [55]. Fenrich K, Gordon T. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems – current issues and advances. *Canadian J Neuro Sci* 2004; 31(2):142-156.
- [56]. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 62:489-496.
- [57]. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10(4):225-228.
- [58]. Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains platelet-derived transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1982;79:5312-5316.

- [59]. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-Rich Plasma. *Am. J. Sports Med.* 2009; 37:2259-2272.
- [60]. Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, Shinomiya K, Okawa A. Subcutaneous injection of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012; 129: 858-866.
- [61]. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009; 90:1262-1263.
- [62]. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1998; 85: 638-646.
- [63]. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-Rich Plasma: A literature review. *Implant Dent.* 2009;18(4):303-310.
- [64]. Sierra ALP, Aranegui RO, Ares, MM, Martinez JLQ, Gonzales JMM. Quantification of growth factors by using a new system for obtaining platelet-rich plasma. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2011; 16 (4):e614-618.
- [65]. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):93-103.
- [66]. Canalis E, Pash J, Varghese S. Skeletal growth factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1993;3(3):155-66.
- [67]. 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;237(4820):1333-6.

- [68]. 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; 80(1):171–175.
- [69]. 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;39(6):1028–1035.
- [70]. Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol.* 1990;94(5):624–629.
- [71]. Koury ST, Boundurant MS, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 1988;71:524-537.
- [72]. Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S Erythropoietin (EPO) production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol.* 1996; 95:27-32.
- [73]. Kontogeorgakos VA, Voulgaris S, Korompilias AV, Vekris M, Polyzoidis KS, Bourantas K, Beris AE. The efficacy of erythropoietin on acute spinal cord injury. An experimental study on a rat model. *Arch. Ortop. Trauma Surg.* 2009;129:189-194.
- [74]. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel regulators of angiogenesis. *Pharmacol. Rev* 2007;59:185–205.
- [75]. Lykissas MG, Korompilias AV, Vekris MD, Mitsionis GI, Sakellariou E, Beris AE. The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury. *Clin. Neurol. Neurosur.* 2007; 109:639-644.
- [76]. Yin ZS, Zhang H, Gao W. Erythropoietin promotes functional recovery and enhances nerve regeneration after peripheral nerve injury in rats. *Am. J. Neuroradiol.* 2010;31:509-515.
- [77]. Yazihan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A. Erythropoietin

improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. *Int. J. Care Injured*. 2008;39:1408-1413.

[78]. Munro K, Rees S, O'dowd R, Tolcos M. Developmental profile of erythropoietin and its receptor in guinea pig retina. *Cell Tissue Res*. 2009;336:21-29.

[79]. Ning B, Zhang A, Song H, Gong W, Ding Y, Gou S, Zhao Y, Jiang J, Jia T. Recombinant human erythropoietin prevents motor neuron apoptosis in a rat model of cervical sub-acute spinal cord compression. *Neurosci Lett*. 2001; 490:57-62.

[80]. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99:2258-2263.

[81]. Mcpherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2008;26:103-111.

[82]. Genc S, Koroglu TF, Genk K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*. 2004; 1000:19-31.

[83]. Zhang W, Sun B, Wang X. Erythropoietin enhances survival of facial motor neurons by inhibiting expression of inducible nitric oxide synthase after axotomy. *J. Clin. Neurosci*. 2010; 17:368-371.

[84]. Zhang W, Sun B, Yu Z. High dose erythropoietin promotes functional recovery of rats following facial nerve crush. *J. Clin. Neurosci*. 2009;16:554-556.

[85]. Ahn M, Moon C, Jeong C. Up regulation of erythropoietin in rat peripheral nervous system with experimental autoimmune neuritis. *Brain Res*. 2010;1333:82-90.

[86]. Ehrenreich H. Erythropoietin and neuroprotection. *Eur. Neuropsychopharm*. 2010; 20(S3):202-203.

[87]. Murua A, Orive G, Hernández R.M. et al. Emerging technologies in the delivery of erythropoietin for therapeutics. *Med. Res. Rev*. 2011;31(2):284-309.

- [88]. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S. et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2000;97:10526-10531.
- [89]. Naggae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, Sakamoto H, Tabata Y, Kwata M, Kubo T Intervertebral Disc regeneration Using Platelet-Rich Plasma and Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres. *Tissue Eng.* 2007. 13(1):147-158.
- [90]. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Larry F. Yoshie H. Platelet-rich Plasma Contains High Levels of Platelet-Derived Growth Factor and transforming Growth Factor- $\beta$  and Modulates the Proliferation of Periodontally Related Cells In Vitro. *J. Periodontol.* 2003; 74(6):849-857.
- [91]. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F, Efficacy of Platelet-Rich Plasma in Alveolar Bone Grafting. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 62:555-558.
- [92]. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Experim. Neurol.* 1982; 77: 634-643.
- [93]. Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of De Medinaceli. *J Neurosc. Meth.* 1998; 24:279-281.
- [94]. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast. Recons. Surg.* 1989; 83:129-136.
- [95]. Fréchet JP, Martineu I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J. Dent. Res.* 2005; 84(5):434-439.
- [96]. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of

platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J. Surg. Res.* 2012; 173:258-266.

[97]. 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; 97:110-118.

[98]. 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; 30(2):97-102.

[99]. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, Kormocki GF, Buchta C. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006; 91: 135-139.

[100]. Appel TR, Potzsch B, Muller J, von Lindern JJ, Bergé S, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin. Oral Impl. Res.* 2002; 13:522-528.

[101]. Eby BW. Platelet-rich plasma: harvesting with a single-spin centrifuge. *J. Oral Implantol.* 2002; 28(6):297-301.

[102]. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2000; 58:297-300.

[103]. 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; 34:665-671.

[104]. Clemmons RM, Bliss EL, Dorsey-Lee MR, Seachord CL, Meyers KM. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using

differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb. Haemost.* 1983; 50(4):838-843.

[105]. Whittle BJ, Moncada S, Vane JR. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), prostaglandin E<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins.* 1978; 16(3):373-388.

[106]. Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J. Surg. Res.* 1999; 82(2):180-187.

[107]. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009; 90:1262-1263.

[108]. Spijker HT, Bos R, Busscher HJ, van Kooten TG, van Oeveren W. Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Biomaterials.* 2002; 23:757-766.

[109]. Baier RE. The role of surface energy on thrombogenesis. *Bull. NY Acad. Med.* 1968; 48:257-272.

[110]. Tsai WB, Grunkemeier JM, Horbett TA. Human plasma fibrinogen absorption and platelet adhesion to polystyrene. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 44:130-139.

[111]. Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* 2009; 42:1452-1460.

[112]. Piskin A, Kaplan S, Aktas A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt H, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery.* 2008; 29:144-153.

[113]. Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, et al. Use of erythropoietin therapy in nerve reconstruction. *Langenbecks Arch. Surg.* 2008; 393:317-323.

[114]. Valeri R, Batool S, Ragno G. Release of platelet-derived growth factors and

proliferation of fibroblasts in the releasates from platelets stored in the liquid state at 22°C after stimulation with agonists. *Transfusion*. 2006; 46:225-229.

[115]. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2005; 20:118-123.

[116]. Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, Arnoczky SP. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am. J. Sports Med*. 2012; 40(6):1274-1281.

# **ANEXOS**

**ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS**



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

Ofício 187/10 – CEUA

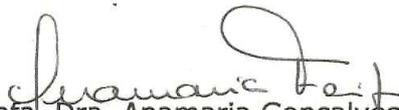
Porto Alegre, 02 de dezembro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00155, intitulado: **"Efeito da eritropoietina e do plasma rico em plaquetas na regeneração do nervo ciático de ratos Wistar após neurotmesa experimental e reparo por enxertia autóloga e técnica de tubulização"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Prof.ª Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
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](mailto:ceua@pucrs.br)

## **PRS Submission Confirmation for COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR PLATELET-RICH PLASMA OBTENTION EMPLOYING ABDOMINAL AORTIC OR CARDIAC PUNCTURE IN WISTAR RATS**

De: **em.prs.0.2c4f04.c16de789@editorialmanager.com** em nome de **Plastic and Reconstructive Surgery** (prs@plasticsurgery.org)

Enviada: segunda-feira, 9 de julho de 2012 23:21:47

Para: Lucas Marques Colomé (lucascolome@hotmail.com)

Dear Dr. Colomé,

Your submission entitled "COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR PLATELET-RICH PLASMA OBTENTION EMPLOYING ABDOMINAL AORTIC OR CARDIAC PUNCTURE IN WISTAR RATS" has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to PRS' enkwel as an author.

<http://prs.edmgr.com/>

username:

password:

YOUR MANUSCRIPT WILL BE GIVEN A REFERENCE NUMBER ONCE AN EDITOR HAS BEEN ASSIGNED.

Thank you for submitting your work to this journal. We will notify you as soon as it is reviewed.

Kind Regards,

Rod J. Rohrich, M.D.

Editor

Plastic and Reconstructive Surgery



## ANEXO C: MANUSCRITO DE TRÂMITE NO PERIÓDICO

### Plastic and Reconstructive Surgery

#### COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR PLATELET-RICH PLASMA OBTENTION EMPLOYING ABDOMINAL AORTIC OR CARDIAC PUNCTURE IN WISTAR RATS

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR PLATELET-RICH PLASMA OBTENTION EMPLOYING ABDOMINAL AORTIC OR CARDIAC PUNCTURE IN WISTAR RATS
<b>Article Type:</b>	Experimental
<b>Keywords:</b>	platelet-rich plasma; growth factors; rats; blood puncture
<b>Corresponding Author:</b>	Lucas Marques Colomé, MSc. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Lucas Marques Colomé, MSc.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Lucas Marques Colomé, MSc. Martina Lichtenfels, MSc. Alessandra Deise Sebben, MSc. Eduardo Goldani, MSc. Luisa Avena Letícia Marques Colomé, PhD, Professor Jefferson Braga da Silva, MD, PhD, Professor
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> Researchs about comparison of platelet-rich plasma (PRP) protocols in rats, an important species in basic research, have not yet been published. The lack of a standardized method for processing blood prevent accurate comparison of this kind of cell therapy and can be the reason for contradictory experimental results. The present work aimed to compare two forms of blood collection and three PRP protocols in rats.</p> <p><b>Methods:</b> Sixteen animals divided into two groups according to the method of puncture blood (aortic or cardiac) were submitted to blood collection. The blood samples were divided in four aliquots for the quantification of platelets and growth factors (TGF-<math>\beta</math>1, PGDF-<math>\alpha</math><math>\beta</math> and VEGF) in the baseline blood and three PRP methods.</p> <p><b>Results:</b> Significant difference (ANOVA, <math>p &lt; 0.05</math>) was observed in platelet values obtained using different protocols. The results showed higher concentration of platelets by use of cardiac puncture in combination with A protocol. Regarding to growth factors, there was no significant difference between the groups.</p> <p><b>Conclusion:</b> The A protocol for cardiac puncture showed advantageous for concentrating platelets. There is no difference between the growth factors values obtained by different PRP preparation methods. Further studies are needed to elucidate the mechanism of growth factors production/release and the reason for the lack of proportionality between platelet concentration and growth factors production in rats.</p>

## **ARTIGOS ORIGINAIS**

## ARTIGO 1

### COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR PLATELET-RICH PLASMA OBTENTION EMPLOYING ABDOMINAL AORTIC OR CARDIAC PUNCTURE IN WISTAR RATS

Lucas M. Colomé, MVD, MSc<sup>1</sup>

Martina Lichtenfels, MSc<sup>1</sup>

Alessandra D. Sebben, MSc<sup>1</sup>

Eduardo Goldani, MSc<sup>1</sup>

Luísa Avena,<sup>1</sup>

Letícia M. Colomé, PharmD, PhD<sup>2</sup>

Jefferson B. Silva, MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>From the Health Science and Medicine Post-Graduate Program, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>From the Pharmaceutical Science Post-Graduated Programa, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Uruguaiana, Brazil.

**RUNNING HEAD:** The present work compared two forms of blood collection and three platelet-rich plasma protocols in rats. The named A protocol and cardiac puncture showed advantageous for concentrating platelets.

**Corresponding author:**

**Lucas Marques Colomé**, Av. João Telles, 196, Bom Fim, 90035120, Porto Alegre-RS, Brazil, e-mail address: [lucascolome@hotmail.com](mailto:lucascolome@hotmail.com)

**DISCLOSURE**

The authors has no financial interest in the products, devices or drugs mentioned in this article.

**LIST OF PRODUCTS, DEVICES AND DRUGS:**

1. Growth Factors (TGF- $\beta$ 1, PGDF- $\alpha\beta$  and VEGF): Quantikine ELISA kits- R&D Systems, USA.
2. Acid Citrate Dextrose A solution (ACD-A): BD Vacutainer™ tube (8.5ml), BD-Becton, Dickinson and Company, Brazil.
3. Plastic syringe, 10 ml- BD-Becton, Dickinson and Company, Brazil.
4. Peripheral Venous Catheter: 24 G x 0.75 in. (0.7 mm x 19 mm) Angiocath™, BD-Becton, Dickinson and Company, Brazil.
5. Ketamine: Ketamin<sup>®</sup>, Cristália, Brazil.
6. Meperidine: Dolosal<sup>®</sup>, Cristália, Brazil.
7. Automatic cell counter: ABC vet-Horiba, Northampton, UK.
8. Centrifuge: Hettich-Universal 320, Universal, Buckinghamshire, England.

**Background:** Researchs about comparison of platelet-rich plasma (PRP) protocols in rats, an important species in basic research, have not yet been published. The lack of a standardized method for processing blood prevent accurate comparison of this kind of cell therapy and can be the reason for contradictory experimental results. The present work aimed to compare two forms of blood collection and three PRP protocols in rats.

**Methods:** Sixteen animals divided into two groups according to the method of puncture blood (aortic or cardiac) were submitted to blood collection. The blood samples were divided in four aliquots for the quantification of platelets and growth factors (TGF- $\beta$ 1, PGDF- $\alpha\beta$  and VEGF) in the baseline blood and three PRP methods.

**Results:** Significant difference (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ) was observed in platelet values obtained using different protocols. The results showed higher concentration of platelets by use of cardiac puncture in combination with A protocol. Regarding to growth factors, there was no significant difference between the groups.

**Conclusion:** The A protocol for cardiac puncture showed advantageous for concentrating platelets. There is no difference between the growth factors values obtained by different PRP preparation methods. Further studies are needed to elucidate the mechanism of growth factors production/release and the reason for the lack of proportionality between platelet concentration and growth factors production in rats.

## INTRODUCTION

The tissue regeneration has been widely studied in the surgery areas and its specialties. Several cell therapy has been optimized to achieve early recovery, improving the function and aesthetics to the patients.<sup>1-4</sup> The platelet-rich plasma has

stood out for being a biocompatible cell therapy, easy availability, low cost and safe for use in surgery, especially plastic and reconstructive surgery.<sup>2,5,6</sup>

Platelet-rich plasma is a volume of autologous plasma that has a platelet concentration above baseline.<sup>7,8</sup> Normal platelet count in human blood range between  $140.000.\mu\text{l}^{-1}$  and  $400.000.\mu\text{l}^{-1}$  and average about  $200.000.\mu\text{l}^{-1}$ .<sup>8,9</sup> Normal platelet counting in Wistar rats blood range between  $150.000.\mu\text{l}^{-1}$  and  $1.500.000.\mu\text{l}^{-1}$ .<sup>10</sup>

The growth factors include three isomers of platelet derived growth factor (PDGF- $\alpha\alpha$ , PDGF- $\beta\beta$ , PDGF- $\alpha\beta$ ), two transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2), vascular endothelial growth factor (VEGF), epithelial growth factor (EGF), and insulin-like growth factor (IGF).<sup>3,8</sup> However the main growth factors involved in tissue regeneration are: TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF and IGF.<sup>11</sup> Platelet-rich plasma also contains cell adhesion molecules such as fibrin, fibronectin, and vitronectin which act in basic aspects of wound healing.<sup>2,3</sup>

The PRP regenerative capacity depends on the level of growth factors released by platelets, thus the platelets number and its viability will define the PRP quality.<sup>12</sup> Therefore, it is essential that the process of obtaining the PRP is performed according to a protocol of proven efficiency to ensure the capability of the PRP.

Many authors have reported that the PRP can potentially enhance healing of soft tissues and bone neoformation by delivery of several growth factors, cytokines and others proteins from the alfa-granules contained in platelets.<sup>13-15</sup> These molecules play important roles in cell proliferation, chemotaxis, cell differentiation, and angiogenesis.<sup>2,16</sup> Otherwise, several studies have shown no benefit in the use of PRP in the regeneration of soft tissues and bone.<sup>17-19</sup> Advantageous biological effects seem to occur in PRP platelet concentration of approximately  $1.000.000.\mu\text{l}^{-1}$ .<sup>8,17</sup> At lower concentrations, the effect is suboptimal, while higher concentrations might have a

paradoxically inhibitory effect.<sup>17</sup> For example, a study showed that the effect of platelet concentrate was not beneficial to accelerate the osseointegration of dental implants<sup>17</sup>.

The literature reveals lack of standardization in the preparation of PRP and it is problematic to compare data from different studies. The lack of a standard protocol for PRP production and evaluation explains the discrepancies and inconsistent results in experimental and clinical research.<sup>2, 12, 20</sup>

Different protocols and methods of blood collection are used to prepare PRP aiming to achieve a high number and yield of platelets.<sup>20-24</sup> The protocols are different in terms of speed and number of centrifugations, kind of anticoagulant, leukocytes presence in the preparation and kind of activators.<sup>25</sup> These features must be taken into account to decide which protocol to use. Protocols that results in high platelet quantity can be not necessarily better, because the growth factors contained in platelets vary among individuals and in some of cases it is not proportional to the number of platelets.<sup>26, 27</sup>

Several studies have compared the effects of PRP clinical application to treating small groups of patients or performing controlled experimental studies.<sup>21</sup> Few studies aimed specifically to assess platelet concentrations in humans or experimental animal species (cattle, dogs, goats, horses, cats, sheep, pigs and rabbits).<sup>17, 21, 28, 29</sup> Besides, studies comparing methods of PRP obtaintion in rats, a specie commonly used in basic research, are not yet available. Because of the considerable differences between the human and animal platelets, the extrapolation of the results is difficult and must be done very carefully.<sup>30</sup> Taking into account, the purpose of this study was to evaluate the blood cellular features obtained by two kinds of methods for blood collection and three kinds of techniques for PRP obtention in Wistar rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

This study was carried out at Laboratory of Medical and Surgical Research of PUCRS. All of the procedures were approved by the PUCRS Ethics Committee (#10/00155).

### **Animals and experimental design**

Sixteen adult male Wistar (250-300 g) were divided in two groups according to the blood collection method (G1: cardiac puncture and G2: aortic puncture). To compare the platelet count and the growth factors production (TGF- $\beta$ 1, PGDF- $\alpha\beta$  and VEGF), the blood of each animal was separated into four parts: basal blood and three different protocols to PRP production (protocol A<sup>31</sup>, B<sup>32</sup> and C<sup>13</sup>). Previously to experiments, animals were kept in a temperature-controlled room ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and free access to water and food. Experiments were performed between 8:00 and 12:00 a.m.

### **Anesthesia**

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection using ketamine ( $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and meperidine ( $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

### **Blood Collection**

The access was done via ventral midline celiotomy for the abdominal aortic puncture employing peripheral catheter 24G x 0.75 in. Cardiac puncture was done by

sternal thoracotomy access and direct left ventricular puncture. In both punctures, approximately seven milliliters of blood were transferred to a sterile tube containing 1.2 ml acid citrate dextrose A (ACD-A). All experiments were performed aseptically.

#### **Obtaining and processing of the blood sample**

For the PRP obtention, three different protocols described in the literature were used (Table 1).

[Insert Table 1 here]

The blood samples (except basal blood) was subjected to centrifugation (Hettich-Universal 320) at room temperature. The first spin separates the red blood cells from plasma, which contain platelets, white blood cells and clotting factors. The second spin separates the platelets and white blood cells - and a few red blood cells - from the plasma. The prepared PRP and the whole blood were subjected to platelet counting in an automatic cell counter (ABC vet-Horiba) at Veterinary Clinical Analysis Laboratory (LACVET) of Federal University of Rio Grande do Sul. The growth factors (TGF- $\beta$ 1, PDGF- $\alpha\beta$  and VEGF) in basal blood and samples undergo to PRP treatments were determined by enzyme-linked immunosorbent assay method (Quantikine ELISA kits-R&D Systems) from the Immunodiagnostic Laboratory of PUCRS.

#### **Statistical analysis**

The results of all of experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics

Plus 5.1 (Statpoint Technologies, USA). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Multiple comparisons were performed using LSD (Least Significance Difference) method.

## **RESULTS**

### **Platelet concentration**

The baseline platelet values in the cardiac puncture group was  $404.88 \pm 55.85 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ . In the same group, the PRP were  $1756.63 \pm 354.24 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ;  $1418.75 \pm 403.34 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$  and  $1322 \pm 236.43 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$  for A, B and C protocols respectively. In the aortic puncture group, the baseline platelet value was  $463.63 \pm 97.6 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ . In the aortic group, PRP presented values of  $1507.63 \pm 346.26 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ;  $1444.50 \pm 501.50 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$  and  $1355 \pm 333.39 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$  for A, B and C protocols respectively. The results were expressed in terms of ratio to PRP platelet values and basal blood values (relative concentration). The analysis of variance showed significant difference ( $p=0.0331$ ) between the applied treatments. Platelet concentration obtained by cardiac puncture using protocol A presented the best result. There was no statistical difference between the other groups in terms of platelet values (Figure 1).

[Insert Figure 1 here]

### **Growth factors**

Table 2 shows values of the growth factors TGF- $\beta$ 1, PGDF- $\alpha\beta$  and VEGF in the whole blood and in samples from three different techniques for PRP obtention (protocol

A, B and C). Figures 2 to 4 shows the results obtained from the growth factors evaluation. None of the treatments presented significant difference in values of TGF- $\beta$ 1 ( $p=0.8262$ ), PDGF- $\alpha\beta$  ( $p=0.9359$ ) and VEGF ( $p=0.9995$ ).

[Insert Table 2 here]

[Insert Figure 2 here]

[Insert Figure 3 here]

[Insert Figure 4 here]

## **DISCUSSION**

A comparative study was carried out to investigate differences in the platelets concentration obtained from two puncture methods and three different protocols to PRP obtention. The ACD-A anticoagulant was used in all samples because it improves the efficacy of PRP stimulating cell proliferation.<sup>33</sup> Platelets concentration analysis were performed using automatically and manual method (certification). All measurements of growth factors were performed in triplicate using validated commercially available ELISA kits.

In the experimental model planning, blood central collection (abdominal aortic and left ventricle) was carried out to minimize the possibility of platelet aggregation and activation (clot formation and growth factors release) during this procedure. The choice of PRP protocols obtaining was based on extensive literature report and the recognition of the need to evaluate other parameters e.g. different centrifugation speed and different processing times (power of comparison).

The concentration of platelets and consequent production of growth factors is a decisive factor in therapy by PRP, which may accelerate or retard the regeneration of tissues.<sup>6, 8, 34</sup> The application of PRP can optimize mesenchymal stem cells migration and proliferation or limit the appropriate cell lineage differentiation by local overexposure of cells to growth factors.<sup>6</sup>

The platelet count and growth factors measurement is under the influence of PRP protocol used.<sup>21,27</sup> Many commercial and experimental protocols are cited in the literature as being highly effective in producing PRP.<sup>16, 21-23, 35</sup> However, some studies did not demonstrate correlation between platelet count and growth factors production.<sup>21,27</sup> The PDGF and TGF- $\beta$  has been identified in PRP preparations with varied rates.<sup>35</sup> Several features are possible causes of this discrepancy: the handling of platelets (speed and centrifugation cycles), the use of various anticoagulants, the presence of leukocytes in the preparation and the use of different kinds of activators to produce the clot.<sup>25</sup>

Contact of blood with biomaterials, such as vascular grafts, may evoke inflammation and thrombotic effects.<sup>36</sup> The surface energy of materials plays an important role in thrombogenesis.<sup>37</sup> Upon the first contact of blood with a biomaterial surface, the proteins are adsorbed to form a conditioning film where platelets adhere.<sup>36</sup> Especially adsorbed fibrinogen has an important platelet adhesive function.<sup>38</sup> Platelets are extremely sensitive to any kind of process-induced stress, from blood extraction to PRP gel production. Thus the amount of platelet-derived factors available at the end of the manipulation process depends on cumulative effects over platelets, starting from phlebotomy and ending with gel formation.<sup>21</sup>

Performing experiments in our laboratorial routine, a large variations of values was observed for platelet count using different forms of blood collection. Thus,

verifying the absence of experimental studies in rats on this field, we decided to initiate an investigation. The lack of correlation among platelet count, the growth factors production/release and the clinical effects with the use of PRP could explain the absence of positive results in many experimental studies.<sup>27,39</sup>

In the present study, we observed a wide variation in platelet values and growth factors production obtained from the three employed processing methods. There was a statistical difference ( $p=0.0331$ ) between the evaluated groups with a higher platelet concentration obtained using cardiac puncture and A protocol. Another important finding is that the A protocol is the fastest and the most practical method considering two centrifugations techniques (250 g, 10 min and 1000 g, 10 min). This finding agrees with ones reported by Clemmons<sup>28</sup> who observed maximum platelet volume in the blood of dogs, horses and pigs subjected to short spin and high gravitational force.

About the growth factors, no difference was observed for the three protocols used to obtain PRP. The variability of growth factors concentration among individuals has also been shown by other authors<sup>6,21,27</sup>.

The relationship among platelet concentration, growth factor concentration and clinical effectiveness is far from being clear. Additionally, the majority of the studies do not emphasize so insightful the handling processes of platelet activation and other relevant factors that interfere with the release of growth factors<sup>21</sup>.

## **CONCLUSION**

This work highlighted that there is difference between the puncture blood forms and the methods of obtaining PRP evaluated in this study. The results showed that the cardiac puncture and the A protocol used to platelet concentration are advantages

techniques in comparison to other methods here studied. Besides, the A protocol provides a higher concentration of the platelets and is the fastest and most practical method considering different centrifugation parameters. Additionally there is no difference between the evaluated growth factors (TGF- $\beta$ 1, and PDGF- $\alpha\beta$  and VEGF) submitted to different PRP preparation methods. Further studies are needed to elucidate the mechanism of growth factors production and the reason for the lack of proportionality between platelet concentration and growth factors production in rats.

## REFERENCES

- [1] Drago JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, Arnoczky SP. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am. J. Sports Med.* 2012; Jul 5 [Epub ahead of print].
- [2] Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-Rich Plasma. *Am. J. Sports Med.* 2009; 37:2259-2272.
- [3] Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 62:489-496.
- [4] Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D, Martins P. The role of platelet-rich plasma growth factors in male pattern baldness surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 118: 1458-1466.
- [5] Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, Shinomiya K, Okawa A. Subcutaneous injection of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012; 129: 858-866.

- [6] Fréchette JP, Martineu I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J. Dent. Res.* 2005; 84 (5) 434-439.
- [7] Plachokova AS, van den Dolder J, van den Beucken JJJP, Jansen JA. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009; 38: 861-869.
- [8] Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10(4):225-228.
- [9] Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 114:1502-1508.
- [10] Sharp PE, La Regina MC. The Laboratory Rat. 1998, *CRC Press*, United Kingdom.
- [11] Sierra ALP, Aranegui RO, Ares, MM, Martinez JLQ, Gonzales JMM. Quantification of growth factors by using a new system for obtaining platelet-rich plasma. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2011; 16 (4): e614-618.
- [12] Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-Rich Plasma: A literature review. *Implant Dent.* 2009;18(4):303-310.
- [13] Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F, Efficacy of Platelet-Rich Plasma in Alveolar Bone Grafting. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 62: 555-558.
- [14] Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2002; 17: 86-94.
- [15] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1998; 85: 638-646.
- [16] Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, Kormocki GF, Buchta C. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006; 91: 135-139.

- [17] 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; 34:665-671.
- [18] Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2002; 60:1176-1181.
- [19] Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effects of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int. J. Periodont Restor Dent.* 2002; 22: 45-53.
- [20] Su CY, Kuo YP, Kieh HL, Tseng YH, Burnouf T. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. *Transfusion.* 2008; 48:2414-2420.
- [21] 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; 97:110-118.
- [22] Appel TR, Potzsch B, Muller J, von Lindern JJ, Bergé S, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin. Oral Impl. Res.* 2002; 13:522-528.
- [23] Eby BW. Platelet-rich plasma: harvesting with a single-spin centrifuge. *J. Oral Implantol.* 2002; 28(6):297-301.
- [24] Hoff, J. Methods of blood collection in the mouse. Technique, *Lab. Animal.* 2000; 29 (10): 47-53
- [25] Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009; 90:1262-1263.

- [26] Borzini P, Mazzucco L. Tissue regeneration and in-loco administration of platelet derivatives. Clinical outcome, heterogeneous products, heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion*. 2005; 35:1759-1767.
- [27] Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex and platelet count. *J. Cranio Maxill. Surg.* 2002; 30:97-102.
- [28] Clemmons RM, Bliss EL, Dorsey-Lee MR, Seachord CL, Meyers KM. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb. Haemost.* 1983; 50(4)838-843.
- [29] Whittle BJ, Moncada S, Vane JR. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), prostaglandin E<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins*. 1978; 16(3)373-388.
- [30] Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J. Surg. Res.* 1999; 82(2):180-187.
- [31] Naggae M, Ikeda T, Mikami Y, Hase H, Ozawa H, Matsuda K, Sakamoto H, Tabata Y, Kwata M, Kubo T Intervertebral Disc regeneration Using Platelet-Rich Plasma, and Biodegradable Gelatin Hydrogel Microspheres. *Tissue Eng.* 2007, 13(1):147-158.
- [32] Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Larry F. Yoshie H. Platelet-rich Plasma Contains High Levels of Platelet-Derived Growth Factor and transforming Growth Factor- $\beta$  and Modulates the Proliferation of Periodontally Related Cells In Vitro. *J. Periodontol.* 2003; 74(6):849-857.
- [33] Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.* 2009, 42:1452-1460.

- [34] Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J. Surg. Res.* 2012; 173:258-266.
- [35] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2000; 58:297-300.
- [36] Spijker HT, Bos R, Busscher HJ, van Kooten TG, van Oeveren W. Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Biomaterials.* 2002; 23:757-766.
- [37] Baier RE. The role of surface energy on thrombogenesis. *Bull. NY Acad. Med.* 1968; 48:257-272.
- [38] Tsai WB, Grunkemeier JM, Horbett TA. Human plasma fibrinogen absorption and platelet adhesion to polystyrene. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 44:130-139.
- [39] Piskin A, Kaplan S, Aktas A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt H, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery.* 2008; 29:144–153.

## LEGENDS

**Figure 1:** Comparison of the three protocols to PRP obtention with abdominal aortic and cardiac puncture (PRP values / basal platelet concentration).

**Figure 2:** Comparison of growth factor TGF- $\beta$ 1 in the three protocols with abdominal aortic and cardiac puncture from values of PRP / basal platelet concentration (fold increase).

**Figure 3:** Comparison of growth factors PDGF- $\alpha\beta$  and VEGF in the three protocols with abdominal aortic and cardiac puncture from values of PRP / basal platelet concentration (fold increase).

**Figure 4:** Comparison of growth factors VEGF in the three protocols with abdominal aortic and cardiac puncture from values of PRP / basal platelet concentration (fold increase).

**Table 1:** Centrifugation parameter (time and speed) used in different protocols for PRP obtention.

**Table 2:** Mean and standard deviation of growth factors ( $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) in the baseline blood and in three different treatments (PRP A, PRP B and PRP C) of the sample blood obtained from aortic or cardiac puncture.

Figure 1

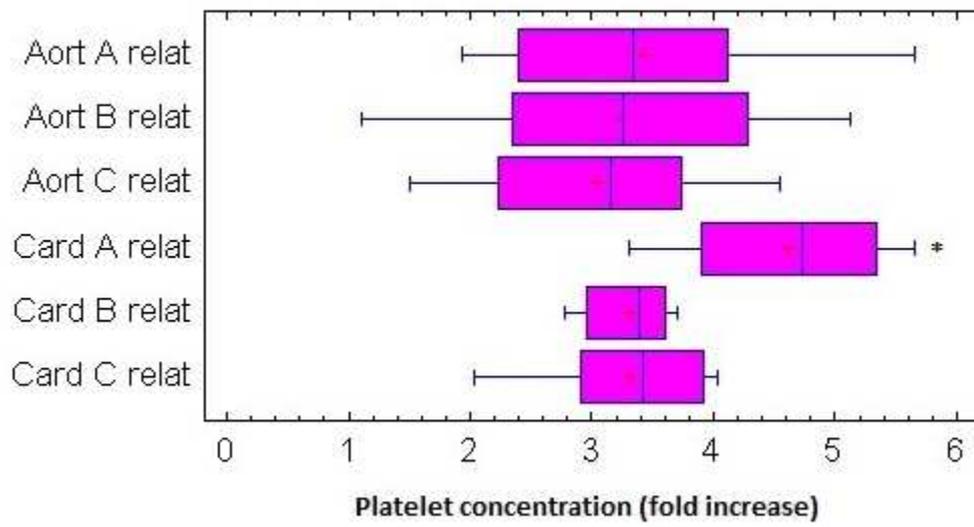


Figure 2

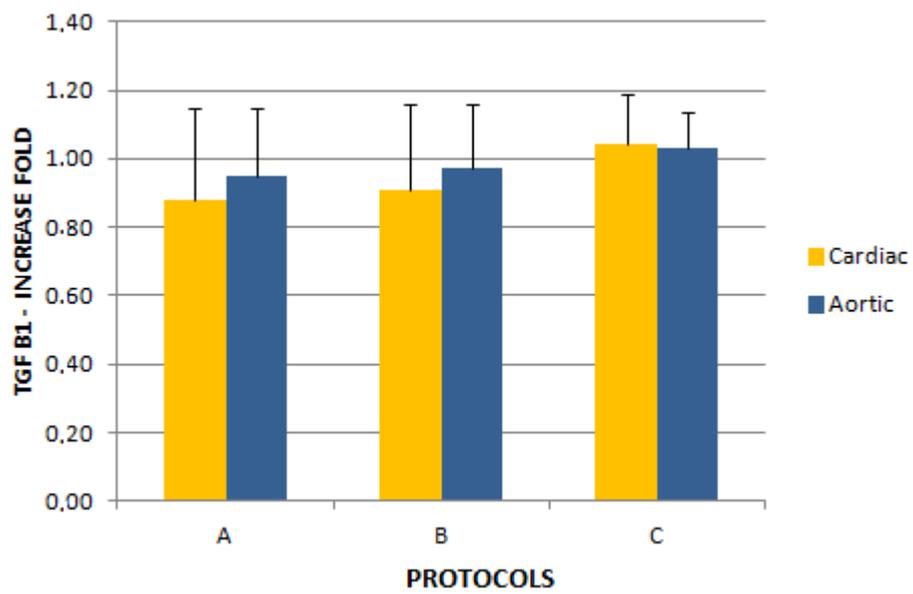


Figure 3

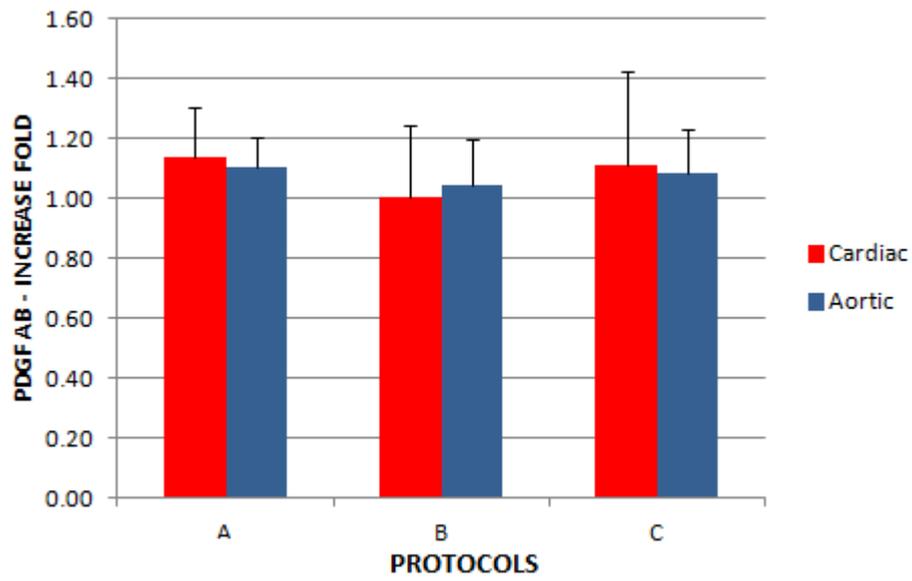
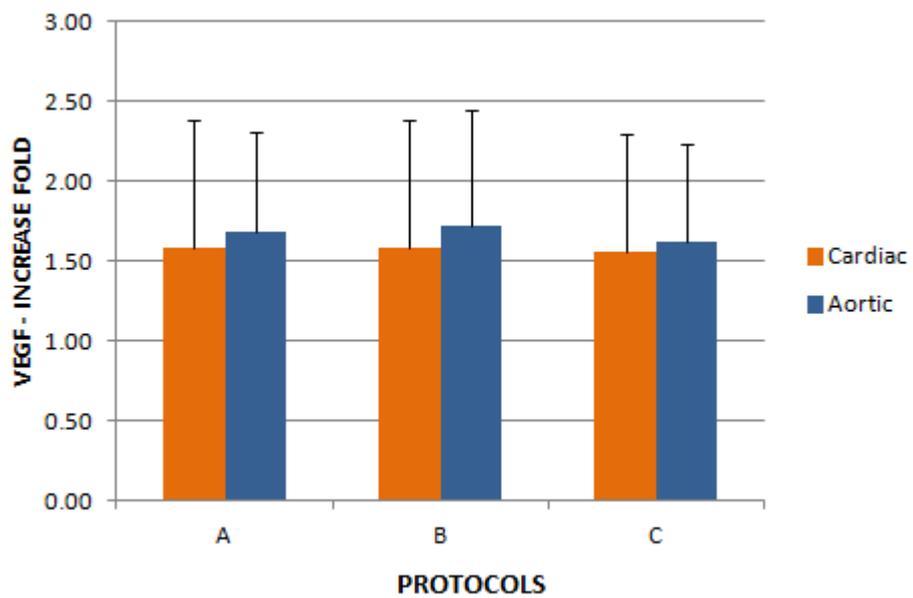


Figure 4



**Table 1:** Centrifugation parameter (time and speed) used in different protocols for PRP obtention.

Centrifugation parameter	A Protocol	B Protocol	C Protocol
1	250 g, 10 min.	360 g, 10 min.	160 g, 20 min.
2	1000 g, 10 min	820 g, 15 min	400 g, 15 min

**Table 2:** Mean and standard deviation of growth factors ( $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) in the baseline blood and in three different treatments (PRP A, PRP B and PRP C) of the sample blood obtained from aortic or cardiac puncture.

		Baseline blood	PRP A	PRP B	PRP C
Cardiac	TGF- $\beta$ 1	38.17 $\pm$ 11.81	31.50 $\pm$ 3.78	32.61 $\pm$ 3.78	39.56 $\pm$ 12.41
	PDGF- $\alpha\beta$	11.41 $\pm$ 2.42	12.91 $\pm$ 2.68	11.10 $\pm$ 1.84	12.14 $\pm$ 1.74
	VEGF	48.75 $\pm$ 22.29	65.00 $\pm$ 2.36	64.17 $\pm$ 3.97	64.58 $\pm$ 2.50
Aortic	TGF- $\beta$ 1	36.78 $\pm$ 6.82	34.28 $\pm$ 4.57	35.11 $\pm$ 5.95	37.89 $\pm$ 7.93
	PDGF- $\alpha\beta$	12.66 $\pm$ 1.47	13.95 $\pm$ 1.72	13.04 $\pm$ 1.20	13.60 $\pm$ 1.02
	VEGF	47.08 $\pm$ 20.34	69.58 $\pm$ 4.59	70.00 $\pm$ 4.08	67.08 $\pm$ 3.70

## ARTIGO 2

### PLATELET-RICH PLASMA IN TWO CONCENTRATIONS AND/OR ERYTHROPOIETIN FOR SCIATIC NERVE REGENERATION IN A RODENT MODEL

Lucas M. Colomé, MVD, MSc<sup>1</sup>

Martina Lichtenfels, MSc<sup>1</sup>

Alessandra D. Sebben, MSc<sup>1</sup>

Eduardo Goldani, MSc<sup>1</sup>

Patrícia Dineck,<sup>1</sup>

Clarissa Albuquerque <sup>1</sup>

Letícia M. Colomé, PharmD, PhD<sup>2</sup>

Jefferson B. Silva, MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>From the Health Science and Medicine Post-Graduate Program, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>From the Pharmaceutical Science Post-Graduated Programa, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Uruguaiana, Brazil.

## ABSTRACT

This study evaluated comparatively the effect of two concentrations of PRP and erythropoietin in nerve regeneration in rats. Fifty four rats were divided into six groups: ANG (autogenous nerve graft), SS (saline solution), PRP1 (1,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ), PRP2 (2,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ), EPO+PRP2 and EPO (erythropoietin). The study was conducted in two stages. Firstly, the PRP groups were compared between themselves and with the control groups. From the results was performed the second phase of the study (EPO groups). The macroscopic neuroregeneration evaluation showed high variability among ANG, EPO+PRP, EPO, PRP2, PRP1 and SS groups (100, 71, 71, 57, 14 and 33%, respectively). Regarding histomorphometric analysis, thickness of proximal and medial myelin sheath and medial nerve diameter presented significant difference among the evaluated groups. Additionally, walking track test showed the better clinical evolution in ANG group ( $-48.62 \pm 10.87$ ), followed by EPO, PRP+EPO, PRP2, PRP1 and SS groups ( $-52.47 \pm 10.52$ ,  $-53.63 \pm 11.84$ ,  $-61.28 \pm 12.42$ ,  $-67.71 \pm 9.96$ ,  $-74.19 \pm 9.49$ , respectively). In conclusion, this work showed the simultaneous use of PRP and EPO as an advantageous alternative for neuroregeneration. Besides, the study demonstrated that PRP2 is superior in comparison to PRP1 for peripheral neuroregeneration.

**Keywords:** platelet-rich plasma, erythropoietin, regeneration, sciatic nerve, platelet concentration, growth factors

## INTRODUCTION

Cytokines and growth factors are a varied group of polypeptides produced by different cell types and showing overlapping actions<sup>1</sup>. During the last decades, the fields of tissue engineering and wound healing has received significant homage<sup>2,3</sup>. Platelet-rich plasma (PRP) as growth factors<sup>4,5</sup> and erythropoietin source has received attention due to neuroprotective and neuroregenerative effects. There is evidence that platelets have positive effects on local tissue repair, based on secretion of platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin like growth factor (IGF), and epithelial growth factor (EGF)<sup>6,5</sup>.

Preparations enriched in platelets have been studied and applied with different scientific and therapeutic purposes including the treatment of chronic ulcers, bone and soft tissue regeneration in dentistry and oral implantology, treatment of musculoskeletal conditions and nerve regeneration<sup>7,8</sup>. The concentration of platelets and consequent production of growth factors is a decisive factor in therapy by PRP, which may accelerate or retard the regeneration of tissues<sup>5,9-12</sup>. The application of PRP can optimize mesenchymal stem cells migration and proliferation or limit the appropriate cell lineage differentiation by local overexposure of cells to growth factors<sup>12</sup>.

Several clinical and experimental studies in humans, showed that a platelet-rich plasma with a platelet concentration of at the least 1,000,000 platelets. $\mu\text{l}^{-1}$  in 5ml of plasma was associated with the enhancement of healing<sup>4,5</sup>. However, studies comparing PRP concentrations in rats, specie commonly used in basic research, are not yet available. Because of the considerable differences between the human and animal platelets, the extrapolation of the results is difficult and must be done very carefully<sup>13</sup>.

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone that plays a central role in erythropoiesis but also has neuroprotective properties<sup>14,15</sup>. EPO induced neuroprotection has been associated with processes such as anti-inflammation, anti-apoptosis, modulation of excitability and neuroregeneration by mobilization and proliferation of neural stem cells<sup>15,16</sup>. EPO is synthesized by renal peritubular cells and hepatic cells (small amount)<sup>17,18</sup>. EPO is secreted also by cells of the central nervous system<sup>19</sup>, including the bodies and the axons of normal ganglions in the dorsal root. Besides increased erythropoietin levels are seen in Schwann cells after peripheral nerve injury<sup>20</sup>.

Erythropoietin receptors (EPO-r) is expressed on the red cell surface, in bone marrow cells, lymphocytes, megakaryocytes, endothelial cells, myocardial cells, smooth muscle cells, prostatic cells, and peripheral and central nerve cells<sup>18</sup>. EPO-r is found in certain axons and neuron bodies of the dorsal root ganglion, in endothelial cells, and in Schwann cells of the normal peripheral nerve<sup>18</sup>.

Although mechanism of action is poorly understood, some hypotheses are referred such as neuroprotection by enhancing cellular redox defense brought about by cellular glutathione<sup>21</sup>. The pleiotropic effects of EPO are exerted through the EPO-r by three distinct pathways. The common link in these three pathways is the phosphorylation of Janus tyrosine kinase 2 (JAK2). Afterwards, there is activation of signal transducer and activator of transcription (STAT-5), the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-serinethreonine kinase AKT and nuclear factor kappa B (NFκB) pathway<sup>15</sup>.

Taking into account, the purpose of this study was to evaluate comparatively the effect of two concentrations of PRP and PRP with or without the simultaneous administration of erythropoietin in sciatic nerve regeneration in Wistar rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

All experiments were carried out at Laboratory of Medical and Surgical Research of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS). This study was carried out in accordance with the Resolution of the Federal Board of Veterinary Medicine and Animal Care Committee of the PUCRS. Every effort was made to minimize the number of animals and their suffering.

### **Animals and experimental design**

Forty eight male Wistar rats aged 12 weeks and weighing 250 g were randomly divided into six groups (n=8): PRP1 (1,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ), PRP2 (2,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ), SS (saline solution), ANG (autogenous nerve graft), EPO (erythropoietin) and EPO + PRP2. Six animals were used as blood donor to obtain PRP. The study was conducted in two stages. First, the PRP groups were compared between themselves and with the control groups. From the results, the second phase of the experiment was performed (added EPO groups).

Animals were kept in a temperature-controlled room ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and free access to water and food. Experiments were performed by the same surgeon under aseptic operating conditions between 8:00 and 12:00 a.m. This study was carried out at Laboratory of Medical and Surgical Research of PUCRS. All of the procedures were approved by the PUCRS Ethics Committee (#10/00155).

## **Preparation of platelet-rich plasmas (PRP)**

Cardiac puncture was performed for the blood obtention. Approximately seven millimeters of blood (containing 20% ACD-A solution) was subjected to double centrifugation (Hettich-Universal 320, Buckinghamshire, England) at room temperature. The first spin (250 g, 10 min.) separated the red blood cells from plasma, which contain platelets, white blood cells and clotting factors. The second spin (1,000 g, 10 min.) separates the platelets and white blood cells - and a few red blood cells - from the acellular plasma. The preparations of PRP were subjected to platelet counting in an automatic cell counter (ABC vet-Horiba) at Veterinary Clinical Analysis Laboratory (LACVET) of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The predetermined concentrations of platelet-rich plasma (1,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$  and 2,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ) were obtained by dilution with acellular plasma.

## **Anesthesia and surgical techniques**

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection (IP) of ketamine (60 mg.kg<sup>-1</sup>) and meperidine (10 mg.kg<sup>-1</sup>). The microsurgical techniques were performed using a DF Vasconcellos operating microscope (DF Vasconcellos, São Paulo, Brazil). Surgery was performed with the animal in the right lateral position accessing the left sciatic nerve. The nerve was exposed and a 10 mm segment was excised. A 2 mm x 12 mm silicone tube (Medicone, Cachoeirinha, Brazil) was sutured on its place, using BV-1, 9-0 prolene suture (Ethicon, Somerville, USA). The inside of the tube was filled with platelet-rich plasma preparations (20  $\mu\text{l}$  of PRP and 20 $\mu\text{l}$  of bovine thrombin and calcium chloride) in the PRP 1 and PRP 2 group. The inside of the tubes in the SS and

EPO groups were filled with saline solution (40µl). In EPO+PRP 2 and EPO groups was administrated EPO (Hemoprex, São Paulo, Brazil) by subcutaneous injection (SC) (1,000 UI.kg<sup>-1</sup>, once daily for 14 days). All animals in the other groups (ANG, SS, PRP1 and PRP2) was submitted to injection of saline solution 0.9% SC by the same method described for EPO, for standardization of the stimulus.

In the rats of ANG group, a 10 mm nerve segment was removed and replaced using BV-1, 9-0 prolene epineural suture (Ethicon, São Paulo, Brazil). The wounds were closed in layers with vycril 5-0 and nylon 5-0 (Ethicon, São Paulo, Brazil). Ketoprofen (5 mg.kg<sup>-1</sup>, SC, once daily for 2 days) and tramadol (5 mg.kg<sup>-1</sup>, SC, third daily for 2 days) was administred in the two post-operative days. The animals were allowed unrestricted movement after the anesthesia.

After 90 days the animals were submitted to euthanasia by intraperitoneal injection of ketamine (180 mg.kg<sup>-1</sup>) and the sciatic nerve was carefully dissected and marked with blue prolene (distal segment) and black nylon (proximal segment) sutures. After, were subjected to histomorphometric analysis using toluidine blue staining 1%.

### **Walking track test**

The functional condition of the animals was assessed at regular intervals through the use of the Sciatic Functional Index (SFI)<sup>22</sup>. Walking track analysis was performed before the surgery and at 15, 30, 60, and 90 days after the surgery<sup>23</sup>. The hind feet of the animals were painted with nankin ink and the rats 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 Equation (1):

$$SFI = \frac{-38.3 \times (EPL - NPL)}{NPL} + \frac{109.5 \times (ETS - NTS)}{NTS} + \frac{13.3 \times (EIT - NIT)}{NIT - 9.9} \text{ Eq. (1)}$$

### **Statistical analysis**

The results of all of experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Plus 5.1 (Statpoint Technologies, USA). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Multiple comparisons were performed using LSD (Least Significance Difference) method.

## **RESULTS**

### **Macroscopic Analysis**

The macroscopic neuroregeneration (visible growth up into the silicon tube) showed high variability (100, 71, 71, 57, 14 and 33%) for the animals belonging to the groups ANG, EPO+PRP, EPO, PRP2, PRP1 and SS, respectively. It was also observed macroscopic variable thicknesses of neofomed nerve. In some animals, it found only the presence of light yellow liquid into tube (subjective observation).

### **Histomorphometric Analysis**

The histomorphometric analysis was performed in the proximal, medial and distal segment of sciatic nerve. The diameter/thickness of nerve, myelin sheath and axon were considered.

#### Proximal stump

The diameters of nerve in the proximal stump were  $1.19 \pm 0.21$ ,  $0.95 \pm 0.25$ ,  $0.85 \pm 0.27$ ,  $0.81 \pm 0.33$ ,  $0.78 \pm 0.24$  and  $0.67 \pm 0.18$  mm for ANG, PRP1, PRP+EPO, EPO, PRP2 and SS groups, respectively. The diameter of the proximal stump in the evaluated groups presented no significant difference ( $p>0.05$ ) (Fig. 1).

On the other hand, the thickness of myelin sheaths were higher ( $p=0.014$ ) in the SS and ANG ( $1.32 \pm 0.87$  and  $1.16 \pm 0.44$   $\mu\text{m}$ , respectively) in comparison to PRP 1, PRP+EPO, EPO and PRP2 groups ( $0.76 \pm 0.58$ ,  $0.54 \pm 0.08$ ,  $0.49 \pm 0.28$  and  $0.44 \pm 0.35\mu\text{m}$ , respectively) (Fig. 2).

Similarly to the nerve, the axon diameters ( $3.72 \pm 3.64$ ,  $3.52 \pm 2.10$ ,  $3.50 \pm 1.42$ ,  $2.84 \pm 0.46$ ,  $2.70 \pm 1.32$  and  $2.55 \pm 1.78$   $\mu\text{m}$  for SS, PRP1, ANG, PRP+EPO, EPO and PRP2 groups, respectively) presented no difference among the groups ( $p>0.05$ ) (Fig. 3).

[Insert Fig. 1 here]

#### Medial segment

In the medial segment, the diameters of nerve were  $1.09 \pm 0.22$ ,  $0.33 \pm 0.03$ ,  $0.35 \pm 0.01$ ,  $0.61 \pm 0.24$ ,  $0.44 \pm 0.03$  and  $0.45 \pm 0.08$  mm for ANG, PRP 2, EPO,

PRP+EPO, PRP 1 and SS groups, respectively. The diameter was higher ( $p<0.001$ ) in the ANG in comparison to the other groups (Fig. 1).

The thickness of myelin sheaths were  $0.68 \pm 0.10$ ,  $0.42 \pm 0.01$ ,  $0.51 \pm 0.01$ ,  $0.82 \pm 0.12$ ,  $0.61 \pm 0.03$  and  $0.58 \pm 0.14$  for PRP2, ANG, PRP+EPO, EPO, PRP1 and SS groups, respectively. The thickness of myelin sheaths were higher ( $p=0.003$ ) in the PRP 2 than other groups (Fig. 2).

The axon diameters ( $3.25 \pm 0.46$ ,  $2.83 \pm 0.71$ ,  $2.78 \pm 0.46$ ,  $2.44 \pm 0.67$ ,  $2.40 \pm 0.01$  and  $2.06 \pm 0.08$  for PRP2, EPO, PRP+EPO, ANG, PRP1 and SS groups, respectively) presented no significant difference ( $p>0.05$ ) (Fig. 3).

[Insert Fig. 2 here]

[Insert Fig. 3 here]

### Distal stump

In the distal stump, the diameters of nerve presented similar values ( $p>0.05$ ) which were  $2.50 \pm 0.79$ ,  $2.19 \pm 1.92$ ,  $1.17 \pm 0.33$ ,  $0.99 \pm 0.34$ ,  $0.94 \pm 0.50$  and  $0.88 \pm 0.54$  mm for PRP+EPO, EPO, ANG, SS, PRP2 and PRP1 groups, respectively (Fig. 1).

The thickness of myelin sheaths were  $0.85 \pm 0.66$ ,  $0.75 \pm 0.05$ ,  $0.68 \pm 0.72$ ,  $0.65 \pm 0.34$ ,  $0.61 \pm 0.46$ , and  $0.43 \pm 0.34$   $\mu\text{m}$  for PRP2, ANG, PRP1, PRP+EPO, SS and EPO groups, respectively (Fig. 2).

The axon diameters were  $4.93 \pm 4.59$ ,  $4.03 \pm 2.1$ ,  $2.81 \pm 0.73$ ,  $2.60 \pm 2.49$ ,  $2.50 \pm 0.79$  and  $2.19 \pm 1.92$   $\mu\text{m}$  for PRP1, SS, ANG, PRP2, PRP+EPO and EPO groups, respectively (Fig. 3). The values of the evaluated groups presented no difference considering nerve ( $p>0.05$ ), myelin sheaths ( $p>0.05$ ) and axon ( $p>0.05$ ) diameter.

Additionally, axon density and Wallerian degeneration also were evaluated in the different segments of the nerve (Tables 1 and 2). However, these values present not significant difference among the several groups.

[Insert Table 1 here]

[Insert Table 2 here]

### **Functional analysis**

The functional condition of the animals was assessed by the walking track analysis before the surgery and at 15, 30, 60, and 90 days after the surgery. The values of Sciatic Functional Index (SFI) at 90 days were better ( $p=0,0001$ ) in the ANG group ( $-48.62 \pm 10.87$ ), followed to EPO, PRP+EPO, PRP2, PRP1 e SS groups ( $-52.47 \pm 10.52$ ,  $-53.63 \pm 11.84$ ,  $-61.28 \pm 12.42$ ,  $-67.71 \pm 9.96$ ,  $-74.19 \pm 9.49$ , respectively (Fig. 4).

[Insert Fig. 4 here]

### **DISCUSSION**

Nowadays there are numerous approaches to improve nerve regeneration<sup>24</sup>. In this field several authors have shown beneficial effect in the use of PRP for improvement of tissue regeneration<sup>26</sup>, this effect is due to the growth factors presence, e.g. PDGF, TGF- $\beta$  and VEGF, which act locally stimulating cell proliferation. Additionally, works had shown benefits from the use of EPO in the peripheral nerve regeneration. As part of an endogenous neuroprotective system, EPO acts as anti-

apoptotic, anti-inflammatory, anti-oxidant, neurotrophic, angiogenic, stem cell modulatory and influences neural plasticity<sup>25</sup>.

Taking into account the macroscopic regeneration, in our study the ANG group (positive control) demonstrated neuroregeneration in all animals of the group (100%). This finding is due to the autogenous nerve graft surgical technique, which does not leave a gap between the stumps for later nerve growth. Therefore, it is necessary to have caution for comparing the results of the ANG with other groups.

Considering the repair techniques that use tubulization, it was observed a clear benefit of the simultaneous use of the factors PRP and EPO, that presented the best result in the peripheral nerve regeneration (PRP+EPO = EPO > PRP2 > SS > PRP1). Besides the macroscopic neuroregeneration values (medial segment growth) is an important parameter and should always be taken into account to evaluate any histomorphometric parameter.

Evaluating tubulization treatments, observed a benefit in the use of PRP and EPO together, which is one of the best performing groups in the regeneration of peripheral nerve. In a first analysis, the addition of PRP in the EPO group does not seem to benefit from regeneration, since the EPO used alone, yielded results similar to those found in PRP + EPO group. However, was observed that the group PRP+EPO is the best for the myelin sheath thickness. This can be explained by neuroprotective and neuroregenerative action of EPO addition to the effect of the PRP. Additionally, EPO was used systemically for 14 days, while only the PRP was administered just during surgery. Thus, the neuroregeneration can be expressed as: + PRP EPO > EPO > PRP2

The platelets concentration and consequent growth factors production is a decisive factor in therapy by PRP and could accelerate or retard the tissue regeneration<sup>5,9-12</sup>. It is reported in the literature that the concentration of PRP suitable

for promoting the bone and soft tissues regeneration is 1,000,000 platelets/5ml of plasma<sup>5</sup>, however this concentration refers to the use in humans. In the present work using rats, it was observed higher macroscopic regeneration with the use of PRP 2 (2,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ) in comparison to PRP 1 (1,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$ ). Besides it was also observed that the concentration of 1,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$  showed the worst result in terms of macroscopic regeneration, being even less efficient than the SS group (negative control) (PRP2>SS>PRP1). Thus, it can infer that the concentration of 1,000,000 platelets/ $\mu\text{l}^{-1}$  exerts an inhibitory effect on regeneration of peripheral nerves in rats.

Contrary this finding, some studies have not shown beneficial effects with PRP using<sup>2,7</sup>. A possible explanation would be the overexposure or lack of growth factors by administration of PRP in inadequate concentrations. Thus, it is believed that while the narrow PRP concentrations are not set for each species and the mechanisms of action of various cellular components remains understand, unreliable results can occur.

The axon density and Wallerian degeneration showed the best results in the groups treated with erythropoietin, however, no significant differences were observed between the study groups due to the large standard deviation.

The values of Sciatic Functional Index (SFI) at 90 days were better in the ANG group, followed to EPO, PRP+EPO, PRP2, PRP1 e SS groups. Thus, in these test it was observed that a behavior of clinical evolution that corroborated with the other analysis carried out in the present study.

## CONCLUSION

This work showed the simultaneous use of PRP and EPO as an advantageous alternative for neuroregeneration. Besides, the study demonstrated that PRP2 is superior in comparison to PRP1 for peripheral neuroregeneration.

## REFERENCES

- [1] Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14.
- [2] Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, Arnoczky SP. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am. J. Sports Med.* 2012; 40(6):1274-1281
- [3] Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-Rich Plasma: A literature review. *Implant Dent.* 2009;18(4):303-310.
- [4] Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 62:489-496.
- [5] Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? *Implant Dent.* 2001; 10(4):225-228.
- [6] Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, Kormocki GF, Buchta C. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006; 91: 135-139.
- [7] Piskin A, Kaplan S, Aktas A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt H, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery.* 2008; 29:144–153.

- [8] Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009; 90:1262-1263.
- [9] Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J. Surg. Res.* 2012; 173:258-266.
- [10] Valeri R, Batool S, Ragno G. Release of platelet-derived growth factors and proliferation of fibroblasts in the releasates from platelets stored in the liquid state at 22°C after stimulation with agonists. *Transfusion.* 2006; 46:225-229.
- [11] Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2005; 20:118-123.
- [12] Fréchette JP, Martineu I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J. Dent. Res.* 2005; 84 (5) 434-439.
- [13] Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J. Surg. Res.* 1999; 82(2):180-187.
- [14] Lykissas MG, Korompilias AV, Vekris MD, Mitsionis GI, Sakellariou E, Beris AE. The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury. *Clin. Neurol. Neurosur.* 2007; 109:639-644.
- [15] Sola A. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus Kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr. Res.* 2005; 57:481-487.
- [16] Ning B, Zhang A, Song H, Gong W, Ding Y, Gou S, Zhao Y, Jiang J, Jia T. Recombinant human erythropoietin prevents motor neuron apoptosis in a rat model of cervical sub-acute spinal cord compression. *Neurosci Lett.* 2001; 490:57-62.
- [17] Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, et al. Use of erythropoietin therapy in

nerve reconstruction. *Langenbecks Arch. Surg.* 2008; 393:317-323

[18] Lykissas MG, Sakellariou E, Vekris MD, Kontogeorgakos VA, Batistatou AK, Mitsionis GI, Beris AE. Axonal regeneration stimulated by erythropoietin: an experimental study in rats. *J. Neurosci. Methods.* 2007; 164:107-115.

[19] Yin ZS, Zhang H, Gao W. Erythropoietin promotes functional recovery and enhances nerve regeneration after peripheral nerve injury in rats. *Am. J. Neuroradiol.* 2010;31:509-515.

[20] Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J.* 2001; 15:1804-1806.

[21] Sims B, Charke M, Njah W, Hopkins ES, Sontheimer H. Erythropoietin-induced neuroprotection requires cystine glutamate exchanger activity. *Brain Res.* 2010; 1321:88-95.

[22] 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.

[23] 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.

[24] Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, Hagel C, Egana JT, Condurache A, Ganske P, Sculz K, Mailander P, Machens HG.. Use of erythropoietin as adjuvant therapy in nerve reconstruction. *Langenbecks Arch Surg.* 2008; 393:317-323.

[25] Ehrenreich H. Erythropoietin and neuroprotection. *European Neuropsychopharmacol.* 2010;20(3):5202-5203.

[26] 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; 34:665-671.

**Table 1.** Mean ( $\pm$  SD) of axon density (axons. $\mu\text{m}^2$ ) 90 postoperative days.

<b>Groups</b>	<b>Segments</b>		
	<b>Proximal</b>	<b>Medial</b>	<b>Distal</b>
<b>ANG</b>	0.012 $\pm$ 0.005	0.027 $\pm$ 0.008	0.015 $\pm$ 0.010
<b>SS</b>	0.016 $\pm$ 0.021	0.011 $\pm$ 0.018	0.011 $\pm$ 0.017
<b>PRP 1</b>	0.013 $\pm$ 0.010	0.005 $\pm$ 0.013	0.005 $\pm$ 0.021
<b>PRP 2</b>	0.021 $\pm$ 0.017	0.028 $\pm$ 0.028	0.021 $\pm$ 0.019
<b>PRP+EPO</b>	0.037 $\pm$ 0.020	0.049 $\pm$ 0.020	0.024 $\pm$ 0.015
<b>EPO</b>	0.024 $\pm$ 0.015	0.034 $\pm$ 0.005	0.012 $\pm$ 0.017

**Table 2.** Mean ( $\pm$  SD) of Wallerian degeneration after 90 postoperative days.

<b>Groups</b>	<b>Segments</b>		
	<b>Proximal</b>	<b>Medial</b>	<b>Distal</b>
<b>ANG</b>	0.80 $\pm$ 0.44	2.67 $\pm$ 0.82	1.0 $\pm$ 0.71
<b>SS</b>	0	0	0.25 $\pm$ 0.50
<b>PRP 1</b>	1.00 $\pm$ 1.22	0	0.50 $\pm$ 0.58
<b>PRP 2</b>	0.40 $\pm$ 0.55	0	0.40 $\pm$ 0.54
<b>PRP+ EPO</b>	0.50 $\pm$ 0.54	0	0.43 $\pm$ 0.53
<b>EPO</b>	0.29 $\pm$ 0.48	0	0.17 $\pm$ 0.41

Fig. 1. Nerve diameter means ( $\pm$  SD) 90 days post-injury. Dissimilar letter indicate a significant difference at  $p < 0.05$  using LSD test.

Fig. 2. Thickness of myelin sheaths means ( $\pm$  SD) 90 days post-injury. Dissimilar letter indicate a significant difference at  $p < 0.05$  using LSD test.

Fig. 3. Axonal diameter means ( $\pm$  SD) 90 days post-injury

Fig. 4. Index of sciatic function performed during the evaluation period (90 days of postoperative). Dissimilar letter indicate a significant difference at  $p < 0.05$  using LSD test.

Figure 1

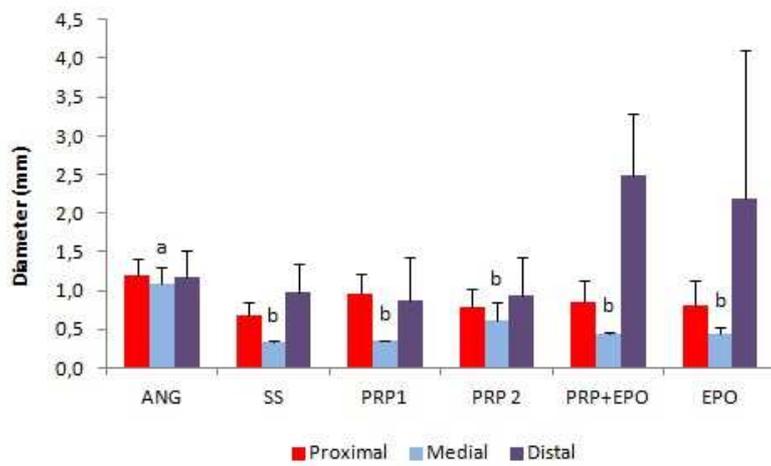


Figure 2

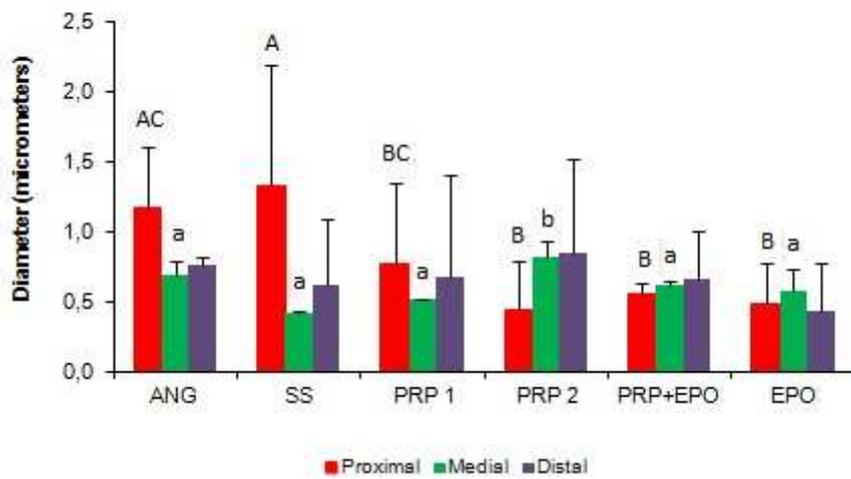


Figure 3

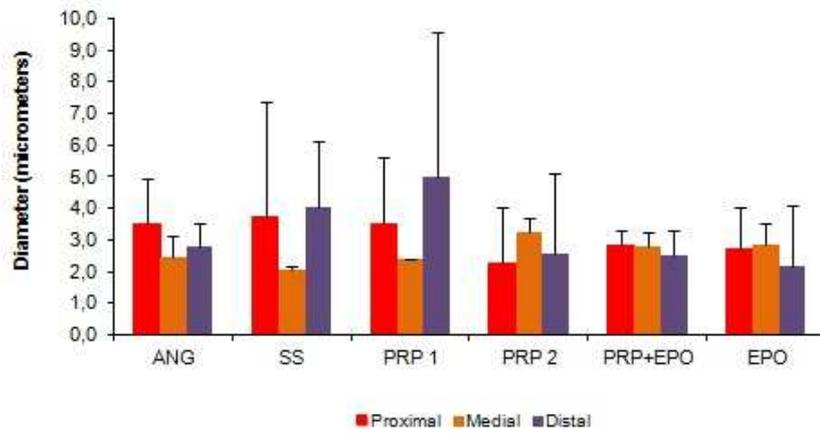


Figure 4

