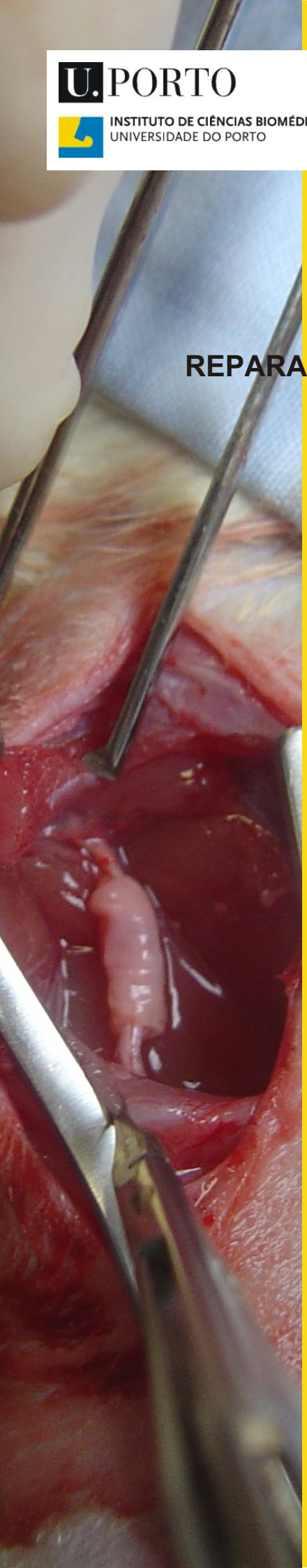


U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

REPARAÇÃO DE LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO NUM MODELO ANIMAL

ANA LÚCIA EMIDIA DE JESUS LUÍS

Dissertação de doutoramento
em Ciências Veterinárias

2008

ANA LÚCIA EMIDIA DE JESUS LUÍS

REPARAÇÃO DE LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO NUM MODELO ANIMAL

Dissertação da Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador:
Professor Doutor António José Ferreira,
Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Co-orientadores:
Professora Doutora Ana Colette Maurício, Professora Associada do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.
Professora Doutora Maria Ascensão Lopes, Professora Auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
Professor Doutor António Veloso, Professor Associado da Faculdade de Motricidade Humana da Universidade Técnica de Lisboa.

DECLARAÇÃO:

As conclusões apresentadas nesta dissertação são baseadas nos artigos científicos:

ARTIGOS PUBLICADOS OU EM PUBLICAÇÃO, NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO, EM REVISTAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS COM ARBITRAGEM CIENTIFICA:

JM Rodrigues, AL Luís, JV Lobato, MV Pinto, MA Lopes, M Freitas, S Geuna, JD Santos, AC Maurício (**2005 a**). *Determination of the Intracellular Ca^{2+} Concentration in the N1E-115 Neuronal Cell Line used in the Peripheric Nerve Regeneration.* ***Journal Bio-Medical Materials and Engineering*** 15: 455-465.

JM Rodrigues, AL Luís, JV Lobato, MV Pinto, A Faustino, NS Hussain, MA Lopes, AP Veloso, M Freitas, S Geuna, JD Santos, AC Maurício (**2005 b**). *Intracellular Ca^{2+} Concentration in the N1E-115 Neuronal Cell Line and its use for Peripheric Nerve Regeneration*. **Acta Médica Portuguesa** 18: 323-328.

AL Luís, JM Rodrigues, JV Lobato, MA Lopes, S Amado, AP Veloso, PAS Armada-da-Silva, S Raiomondo, S Geuna, A Ferreira, ASP Varejão, JD Santos, AC Maurício (**2007 a**). *Evaluation of Two Biodegradable Nerve Tube-guides used in the Reconstruction of the Rat Sciatic Nerve.* ***Bio-Medical Materials and Engineering*** 17: 39-52.

AL Luís, S Amado, S Geuna, JM Rodrigues, MJ Simões, JD Santos, F Fregnan, S Raimondo, AP Veloso, AJ Ferreira, PA Armada-da-Silva, AS Varejão, AC Maurício (**2007 b**) *Long-term Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a Non-serrated Clamp.* ***Journal of Neuroscience Methods*** 163: 92-104.

AL Luís, JM Rodrigues, S Amado, A P Veloso, PAS Armada-da-Silva, S Raimondo, F Fregman, AJ Ferreira, MA Lopes, JD Santos, S Geuna, ASP Varejão, AC. Maurício (**2007 c**). *PLGA 90/10 and Caprolactone Biodegradable Nerve Guides for the Reconstruction of the Rat Sciatic Nerve.* ***Microsurgery*** 27: 125-137.

AL Luís, JM Rodrigues, S Geuna, S Amado, Y. Shirosaki, JM Lee, F. Fregnan, MA Lopes, AP Veloso, AJ Ferreira, JD Santos, P.AS Armada-da-Silva, ASP Varejão, AC Maurício (**2008**). *Use of PLGA 90:10 Scaffolds Enriched with In vitro-Differentiated Neural Cells for Repairing Rat Sciatic Nerve Defects.* ***Tissue Engineering*** 14 (6) (*in press*)

AL Luís, JM Rodrigues, S Geuna, S Amado, MJ Simões, F Fregnan, AJ Ferreira, AP Veloso, PAS Armada-da-Silva, ASP Varejão, AC Maurício (**2008**) *Functional and Morphological Assessment of Sciatic Nerve Regeneration Associated to a Cellular System after a Standardized Crush Injury with a Non-serrated Clamp.* ***Microsurgery*** *(in press*).

COMUNICAÇÕES E PAINÉS EM REUNIÕES NACIONAIS E INTERNACIONAIS

J Rodrigues, AL Luís, JV Lobato, MV Pinto, A Faustino, A Veloso, MA Lopes, AC Maurício, JD Santos (**2004**). *Study of the peripheric nerve regeneration using an animal model.* BioÉvora 2004, II Congresso Ibérico de Biomateriais, Portugal (**Painel**).

J Rodrigues, AL Luís, JV Lobato, MV Pinto, A Faustino, A Veloso, AC Maurício, JD Santos (**2004**). Estudo da regeneração de um nervo periférico utilizando um modelo animal. X Jornadas Portuguesas de Informação em Saúde. Hospital Geral de Santo António. Porto. Portugal (**Comunicação oral**).

AL Luis, JM Rodrigues, JV Lobato, PP Cortez, MV Pinto, S Geuna, S Amado, A Veloso, APAS Armada-da-Silva, A Ferreira, MA Lopes, ASP Varejão, JD Santos, AC Maurício (**2005**). *Functional and Histological Assessment of the Peripheral Nerve Regeneration in Rat Model*. III Seminário Sobre Prótesis Maxilofacial: La necesidad del Equipo Multidisciplinario. Vigo, Espanha. (**Comunicação oral**).

AL Luis, J Rodrigues, JV Lobato, PP Cortez, MV Pinto, S Geuna, S Amado, A Veloso, APAS Armada-da-Silva, A Ferreira, MA Lopes, ASP Varejão, JD Santos, AC Maurício (**2005**). Reconstrução Cirúrgica do Nervo Periférico no Modelo Animal. Congresso Ciências Veterinárias 2005, EZN, Fonte Boa, Portugal. (**Comunicação oral**).

AL Luís, J Rodrigues, JV Lobato, MV Pinto, S Geuna, A Veloso, PAS Armada-da-Silva, A Ferreira, MA Lopes, ASP Varejão, JD Santos, AC Maurício (**2005**). *Functional Assessment of the Peripheral Nerve Regeneration in Rat model when Reconstructed with two Types of Tube-guides and in the presence of a Cellular System. Materiais*. Aveiro, Portugal. (**Painel**).

AL Luís, JM Rodrigues, JV Lobato, S. Geuna, JD Santos, AC Maurício (**2005**). Reconstrução de Nervo Periférico: Técnicas Cirúrgicas e Avaliação das Recuperações

Funcional e Morfológica. Laboratório de Genética Humana. Hospital de S. João. Porto. Portugal. (**Comunicação oral**).

JV Lobato, JM Rodrigues, AL Luis, AC Maurício, JD Santos (**2005**). Cirurgia Plástica Periodontal. Curso Avançado de Microcirurgia e Biomateriais: do Conceito à Prática. Campus Agrário de Vairão, Portugal. (**Comunicação oral**).

AL Luis, J Rodrigues, JV Lobato, MV Pinto, S Geuna, A Veloso, PAS Armada-da-Silva, A Ferreira, MA Lopes, ASP Varejão, JD Santos, AC Maurício (**2005**). *Functional and Histologic Assessment of Peripheral Nerve Regeneration in Rat Model. ESB2005, 19th European Conference on Sorrento, Italy* (**Painel**).

JV Lobato, N Sooraj Hussein, JM Rodrigues, AL Luis, PP Cortez, AC Maurício, MA Lopes, JD Santos (**2005**). *Assessment of Bonelike® Graft Paste using a Rabbit Model. ESB2005, 19th European Conference on Sorrento, Italy.* (**Painel**).

AL Luís, J Rodrigues, S Amado, MJ, Simões, P Cortez JV Lobato, P Armada –da-Silva, A Veloso, S Geuna A Ferreira, A Varejão, MA Lopes JD Santos, AC Maurício (**2006)**. *Biomateriais Usados para Reconstrução do Nervo Periférico. 36ª Reuniaõ de Sociedade Portuguese de Cirurgia Plástica Reconstrutiva e Estética e EPRAS Appointed Meeting for 2006 combined with British Association of Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgeons,* Luso, Portugal. (**Comunicação oral**).

AL Luís, J Rodrigues, S Amado, MJ Simões, P Cortez, J Lobato, P Armada-da-Silva, A Veloso, S Geuna, A Ferreira, A Varejão, MA Lopes, JD Santos, AC Maurício (**2006**). Biomateriais na Reconstrução do Nervo Periférico. BioEng'2006. 8ª Conferência Portuguesa de Engenharia Biomédica (SPEB). Reitoria da UNL, Lisboa, 9 e 10 de Junho de 2006. (**Comunicação oral**).

AL Luís, JM Rodrigues, S Geuna, Y Shirosaki, JM Lee, F Fregnan, MA Lopes, S Amado, AP Veloso, PAS Armada-da-Silva, AL Ferreira, JD Santos, ASP Varejão, AC Maurício (**2007**). *PLGA 90:10 Tubes-Guides Associated to Neural cells Differeneciated in vitro used in Neurotmesis Injury of Rat Sciatic Nerve. NanoSMat 2007, International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials*. Algarve, Portugal. (**Comunicação oral**).

AL Luís, S Amado, S Geuna, S Raimondo, AP Veloso, PAS Armada-da-Silva, AL Ferreira, JD Santos, ASP Varejão, AC Maurício (**2007***). Functional and Morphological Assessment of Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a Non-Serrated Clamp Reconstructed with Collagen Membranes Associated to a cellular System. NanoSMat 2007, International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials*. Algarve, Portugal. (**Comunicação oral**).

MJ Simões, Y Shirosaki, RM Gil da Costa, AL Luís, PP Cortez, K Tsuru, S Hayakawa, A Osaka, F Gartner, ASP Varejão, JD Santos, AC Maurício (**2007**). *Chitosan Membranes Tested in Rats for Nerve Reconstruction. NanoSMat 2007, International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials*. Algarve, Portugal. (**Comunicação oral**).

MJ Simões, S Amado, S Geuna, AL Luís, JM Rodrigues, JD Santos, Y Shirosaki, MA Lopes, F Fregman, S Raimondo, A Prieto Veloso, PAS Armada-da-Silva, ASP Varejão, AC Maurício (**2007**). *Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a non-Serrated Clamp Reconstructed with chitosan and Collagen Membranes Associated to a Cellular System. 10th Meeting Portuguese Society for Neurosciences*. Ofir, Esposende, Portugal. (**Comunicação oral**).

No cumprimento do disposto no n.2 do Artigo 8º do Decreto-lei n.º 388/70, como autora desta dissertação, declaro que participei na concepção, execução e interpretação dos resultados que estiveram na base destes artigos. Retenho todos os direitos de autor relativos a esta dissertação e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos e livros).

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho apenas foi possível ao apoio de todos a quem desde já agradeço. Um especial agradecimento aos meus orientadores e co-orientadores que desde o 1º dia se mostraram sempre disponíveis. Um agradecimento destacado à Professora Doutora Ana Colette Maurício, que foi a responsável pela minha entrada no mundo da investigação, que depositou em mim a confiança imprescindível, que é autora da formação deste grupo de investigação e que soube desde o 1º dia impulsiona-lo sempre cada vez mais. É sem duvida a responsável por este trabalho. Ao Professor Doutor António Ferreira, com a sua sabedoria e bom senso, desde sempre se mostrou disponível para me ajudar e me fez ter a estranha sensação de "protecção científica". Também agradeço à Professora Doutora Ascensão Lopes e Professor Doutor António Veloso pela disponibilidade de ajudar uma veterinária que se encontrava perdida no mundo dos materiais e da motricidade.
Os meus agradecimentos às Instituições que me apoiaram: Faculdade de Medicina Veterinárias (FMV- UTL), Faculdade de Motricidade Humana (FMH- UTL)), Faculdade de Engenharia (FEUP) e muito especialmente ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS-UP) que me acolheu desde 1998 e especialmente os anos últimos, durante a realização deste trabalho.

Um agradecimento ao Professor Artur Varejão, que tendo uma carreira científica notável no mundo da regeneração nervosa, foi a fonte de inspiração deste trabalho e que desde o 1º dia se mostrou disponível para o esclarecimento de inúmeras duvidas que foram surgindo ao longo destes anos. Se não fosse o seu trabalho anterior, este não teria sido possível.

Também agradecimento ao Professor Doutor Stefano Geuna, pelo incansável apoio e a disponibilidade para qualquer esclarecimento, mesmo quando era preciso uma deslocação a Portugal. Um agradecimento ao seu árduo trabalho e ao exemplo que deu de dedicação, ao trabalho a que se propõe.

Muito obrigada também ao Professor Doutor Paulo Armada, em tudo o que fez, mas muito especialmente naquilo que parecia (e ainda parece, mas menos) um bicho-de-sete-cabeças, a estatística.

Também os meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor José Domingos, foi também graças a ele que surge este trabalho. O seu trabalho, sabedoria, exemplo, orientação e boa disposição foram indispensáveis.

Uma palavra de Muito Obrigada a algumas pessoas que nunca esquecerei e que espero ter criado laços de amizade que nunca mais acabem:
A Sandra Amado, àquelas horas infindáveis de filmagens, a paciência, a angústia, mas também as fofocas que nos ajudavam a alegrar o tempo e chegar ao fim com um saldo positivo. Ainda estou à espera do fim-de-semana lá em casa com o Francisco.
Ao Dr. Jorge Rodrigues, nem sei o que dizer, fiquei muito feliz de o conhecer, pois pensava que já não existiam pessoas tão bem formadas e tão boas pessoas. Para além da sua perícia cirúrgica imprescindível para este trabalho, é bom saber que o mundo não está perdido.
Ao agora Professor Doutor Lobato antes o Dr. Lobato, também companheiro de cirurgias até altas horas da noite, a sua boa disposição e a sua sabedoria foram indispensáveis. Foi o 1º a acabar. Parabéns.
Ao Sorage, à Sofia, à Yuki, à Maria João, enfim…..

Gostaria de agradecer ao Instituto Ricardo Jorge e todos os seus funcionários pela forma desinteressada e dedicada como cederam as instalações, acolheram e trataram os nossos animais e na forma amistosa como nos acolheram no Biotério, para a realização das cirurgias e durante todo os procedimentos que se seguiam (não foram nada poucos).

Agradeço por fim a todos os meus amigos e companheiros de trabalho que tiveram a paciência de me aturar nos momentos mais difíceis. A todos os meus colegas e pessoal do ICBAS que não consigo enumerar, que me apoiaram e me ajudaram na minha presença e nas minhas ausências.
Ao Augusto (Professor Doutor Augusto Matos), colegas de curso e de trabalho, é ele o responsável pela minha entrada para este mundo académico.
Ao Professor Doutor Luís Baldaia pela ajuda no Francês e nas coisas de ultima hora.

Por fim agradeço à minha família, pelo o apoio incondicional e compreensão ao longo destes anos, constituindo uma importante motivação para a realização deste projecto.
Em especial ao Fernando e à Ritinha, que foram os mais sacrificados pelas minhas indisponibilidades, foi por eles que o fiz, e é a eles que dedico este trabalho.

A todos, o meu sincero Obrigada.

ÍNDICE GERAL

RESUMO ---------- 15

ABSTRACT ---------- 19

Résumé ---------- 23

Capitulo I – Introdução – Revisão Bibliográfica

1. HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DO NERVO PERIFÉRICO ---------- 29
   1.1. NEURÓNIO ---------- 30
   1.2. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO ---------- 32
      1.2.1. FIBRA NERVOSA ---------- 32
      1.2.2. ESTRUTURA DO NERVO PERIFÉRICO ---------- 33
      1.2.3. TRANSPORTE AXONAL ---------- 35
      1.2.4. SINAPSES ---------- 35
      1.2.5. CLASSIFICAÇÃO DAS FIBRAS ---------- 36
2. FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO ---------- 39
   2.1. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO ---------- 39
      2.1.1. NEURAPRAXIA OU LESÃO DE SUNDERLAND TIPO I ---------- 40
      2.1.2. AXONOTMESE OU LESÃO DE SUNDERLAND TIPO II ---------- 40
      2.1.3. NEUROTMESE OU LESÃO DE SUNDERLAND TIPO III-V ---------- 40
   2.2. LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO ---------- 41
   2.2.1. DEGENERESCÊNCIA E REGENERAÇÃO DAS FIRBRAS NERVOSAS ---------- 41
      2.2.1.1. DEGENERESCÊNCIA WALLERIANA ---------- 41
      2.2.1.2. REGENERAÇÃO AXONAL ---------- 46
         2.2.1.2.1. REINERVAÇÃO MOTORA PREFERENCIAL ---------- 48
   2.2.2. FACTORES QUE INFLUENCIAM A DEGENERESCÊNCIA E REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO ---------- 52
      2.2.2.1. FACTORES ENDÓGENOS ---------- 54
      2.2.2.2. FACTORES EXÓGENOS ---------- 62

3. CONSIDERAÇÕES CIRÚRGICAS ---------- 67
3.1. TENSÃO ---------- 72
3.2. ÁREA DE CONTACTO ---------- 74
3.3. ENXERTOS/TUBULAÇÃO ---------- 75
4. ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS ---------- 81
4.1. CONDUTO NEURONAL ---------- 83
4.2. CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS ---------- 89
5. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO NEUROLÓGICA ---------- 93
5.1. TESTES DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL ---------- 95
5.1.1. REACÇÃO POSTURAL DE EXTENSÃO (RPE) ---------- 95
5.1.2. AVALIAÇÃO SENSORIAL (WRL) ---------- 96
5.1.3. ESTUDO DAS PEGADAS (*WALKING TRACK ANALYSIS*) (SFI E SSI) ---------- 98
5.1.3.1. IMPRESSÃO DAS PEGADAS ---------- 98
5.1.3.2. ANÁLISE DA IMPRESSÃO DAS PEGADAS – CÁLCULO DO SFI ---------- 100
5.1.3.3. LARGURA DAS PEGADAS – CÁLCULO DO SSI ---------- 102
5.1.3.4. LIMITAÇÕES DO SFI ---------- 102
5.1.4. AVALIAÇÃO CINEMÁTICA ---------- 104
5.1.4.1. ERROS MAIS COMUNS NA ANÁLISE DO MOVIMENTO ---------- 108
5.1.4.2. DESLOCAMENTO ANGULAR DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-TÁRSICA DURANTE A FASE DE SUPORTE ---------- 109
5.1.4.3. VELOCIDADE ANGULAR ---------- 109
5.1.4.4. PARÂMETROS TEMPORAIS DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-TÁRSICA DURANTE A FASE DE SUPORTE ---------- 110
5.1.4.5. FACTOR DE SUPORTE (*SF*) ---------- 111
5.1.4.6. VELOCIDADE DA MARCHA ---------- 111
5.1.4.7. DURAÇÃO DA FASE DE SUPORTE ---------- 111
5.1.4.8. DURAÇÃO DE CADA FASE DA MARCHA ---------- 112
5.1.4.9. COMPRIMENTO DA PASSADA ---------- 112
5.1.4.10. ÂNGULO DE ROTAÇÃO EXTERNO DO DEDO (*TOE OUT ANGLE*) ---------- 112
5.1.5. AVALIAÇÃO ELECTROFISIOLÓGICA ---------- 112
5.1.6. OUTROS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL ---------- 113
5.2. TESTES DE AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA ---------- 114

CAPITULO II – ESTADO DA ARTE E OBJECTIVOS DO ESTUDO ---------- 117

CAPITULO III – RESULTADOS ---------- 131

1. LESÕES DE AXONOTMESE

1.1. INTRODUÇÃO ---------- 135

1.2. *LONG-TERM FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF A STANDARDIZED RAT SCIATIC NERVE CRUSH INJURY WITH A NON-SERRATED CLAMP*. ---------- 137

1.3. *FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF SCIATIC NERVE REGENERATION ASSOCIATED TO A CELLULAR SYSTEM AFTER A STANDARDIZED CRUSH INJURY WITH A NON-SERRATED CLAMP.* ---------- 153

1.4. CONCLUSÕES. ---------- 169

2. LESÕES DE NEUROTMESE

2.1. INTRODUÇÃO ---------- 173

2.2. *PLGA 90/10 AND CAPROLACTONE BIODEGRADABLE NERVE GUIDES FOR THE RECONSTRUCTION OF THE RAT SCIATIC NERVE*. ---------- 175

2.3. *USE OF PLGA 90:10 SCAFFOLDS ENRICHED WITH IN VITRO-DIFFERENTIATED NEURONAL CELLS FOR REPAIRING RAT SCIATIC NERVE DEFECTS.* ---------- 191

2.4. CONCLUSÕES ---------- 209

CAPITULO IV – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS FUTURAS ---------- 211

CAPITULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 227

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se estudar possibilidades de aplicação de técnicas cirúrgicas no tratamento de lesões do nervo que se apresentam na prática clínica de Medicina Veterinária ou de Medicina Humana, nomeadamente: axonotmese, neurotmese e ainda neurotmese com perda de tecido nervoso e afastamento dos topos nervosos. Foram então realizadas as técnicas cirúrgicas *standard* e recorrendo a biomateriais associados ou não a um sistema celular de fácil obtenção, multiplicação e diferenciação *in vitro* e com a capacidade de produzir factores neurotróficos no local da lesão. O sistema celular testado *in vitro* e *in vivo* serviu para se adequarem as técnicas cirúrgicas para a futura aplicação de outros sistemas celulares, nomeadamente o uso de células estaminais autólogas ou heterólogas. Deste modo, recorreu-se à linha celular imortalizada N1E-115 de ratinho, na qual foi induzida a diferenciação *in vitro* recorrendo à adição de 1,5% de DMSO ao meio de cultura. Foi determinado o tempo de diferenciação adequado através da medição da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) pelo método de epiflurescência. Após o período de diferenciação de 48 horas os neuroblastomas de ratinho demonstravam características morfológicas e funcionais de células neuronais e ainda não tinham iniciado o processo de morte celular (apotose) . Após a diferenciação, as células neuronais formam uma monocamada sobre a membrana de biomaterial, mantendo-se viáveis e com capacidade de produzir *in locu*, factores neurotróficos em concentrações próximas daquelas fisiológicas, durante o período de regeneração de 12 e 20 semanas, em lesões de axonotmese e de neurotmese.

Foi testado um biomaterial, o co-polímero poli(D,L-láctico-co-glicólico), na relação nunca antes testada de 90:10 (PLGA 90:10). O PLGA 90:10 apresentou, após testes *in vitro* e *in vivo*, capacidade de suportar e manter o referido sistema celular no local da lesão do nervo, durante o tempo requerido para a sua regeneração.

O modelo animal escolhido para a experimentação *in vivo*, foi o rato *Sasco Srapgue-Dawley*. Foi realizado um estudo experimental longitudinal no rato, onde definimos como principal objectivo avaliar a regeneração do nervo periférico em lesões de axonotmese e neurotmese, onde se recorreu à utilização de técnicas cirúrgicas standard assim como a biomateriais associados a um sistema celular produtor de factores neurotróficos. Os ratos foram agrupados segundo o tipo de lesão e a respectiva correcção cirúrgica em grupos de 6 a 10 animais: i) em **axonotmese** foram testados 18 animais divididos em 3 grupos, (lesão de axonotmese sem reparação – grupo1, axonotmese envolvida com uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina - grupo 2 e axonotmese com a referida biomembrana forrada de células neuronais diferenciados *in vitro* - grupo 3); ii) em

neurotmese sem afastamento dos topos nervosos foram testados 23 animais (neurotmese com uma sutura clássica topo-a-topo epineural - grupo 4, neurotmese com uma sutura clássica topo-a-topo epineural envolvida por uma membrana de colagénio equino tipo III - grupo 5 e uma sutura clássica topo-a-topo epineural envolvida no mesmo tipo de membrana forrada com células neuronais diferenciadas *in vitro* - grupo 6, trabalho experimental ainda não publicado); iii) em **neurotmese com afastamento dos topos nervosos** foram testados 40 animais (tubulação com um tubo-guia de um co-poliéster de poli(DL-lactico-ε-caprolactona), denominado comercialmente de Neurolac® - grupo 7, tubulação com um tubo-guia de PLGA 90:10 - grupo 8, autoenxerto de 10 mm - grupo 9, tubo-guia de PLGA 90:10 forrado com células neuronais diferenciadas *in vitro* - grupo 10 e ainda um grupo de controlo negativo em que foi provocada a lesão de neurotmese mas não foi realizada qualquer cirurgia reconstrutiva - grupo 11).

A recuperação funcional dos animais foi avaliada, semanalmente, durante 12 semanas no grupo de axonotmese e quinzenalmente durante 20 semanas para o grupo de neurotmese. Utilizando para tal um conjunto de técnicas analíticas que visam avaliar a recuperação dos índices de força e sensibilidade sendo respectivamente o Índice de Funcionalidade do Ciático (SFI), o Índice de Funcionalidade do Ciático em Condições Estáticas (SSI), a percentagem de Deficit Motor avaliada a partir do Reflexo de Reacção Postural de Extensão (RPE), a Latência do Reflexo Flexor (LRF) e ainda para uma avaliação integrada da função locomotora, a análise cinemática da articulação tíbio-társica durante o andamento do rato. A avaliação morfológica foi realizada em todos os grupos após eutanásia ao fim de 12 semanas ou 20 semanas respectivamente para os grupos de axonotmese e neurotmese.

Os resultados obtidos confirmam que quando mais grave é a lesão, mais demorada e menor será a recuperação funcional e morfológica, daí a grande importância em recorrer a técnicas cirúrgicas com biomateriais e adjuvantes da regeneração, como sistemas celulares produtores de factores neurotróficos. Em lesões de axonotmese, o tempo de 12 semanas para avaliação da recuperação parece-nos mais apropriado do que o de 8 semanas, quando comparado com estudos anteriores. De notar que mesmo ao fim deste maior período, apesar da recuperação funcional parecer estar concluída, a análise morfológica bem como a avaliação cinemática apontarem para que alguns parâmetros ainda não tenham atingido os valores considerados normais. Parece-nos portanto, que para este tipo de lesão poderia ainda ser útil prolongar o tempo de recuperação, no sentido de se poder avaliar uma possível evolução para além das 12 semanas.

Em lesões de neurotmese a realização de sutura topo-a-topo sem tensão é sempre a técnica preferida ou o *gold-standard* (trabalho experimental ainda não publicado), no entanto, em lesões em que haja afastamento dos topos nervosos, a técnica considerada

mais apropriada seria a utilização de um autoenxerto, desde que avaliadas todas as consequências relativas à colheita do autoenxerto, o que muitas vezes confere a esta técnica um conjunto de efeitos secundários, cujo resultado final é ainda mais desastroso do que a lesão inicial. Para estas situações impõe-se a utilização da técnica de tubulação utilizando para isso tubos-guia, fabricados com biomateriais inertes, biocompatíveis e capazes de promover a regeneração axonal.

Na técnica da tubulação os biomateriais testados, nomeadamente o PLGA 90:10 e o Neurolac®, mostraram-se capazes de promover a regeneração entre os dois topos nervosos. Os tubos-guia de PLGA 90:10 devido às suas características físico-químicas e à sua maior porosidade, mostraram ser um suporte muito adequado para o sistema celular produtor de factores neurotróficos durante todo o período de recuperação avaliado em lesões graves de neurotmese. O sistema celular testado constituído por células neuronais com 48 horas de diferenciação *in vitro* obtidas a partir de uma linha celular imortalizada de origem neoplásica (neuroblastomas de ratinho), parece não apresentar grandes vantagens na recuperação após lesões de axonotmese e de neurotmese, relativamente a alguns parâmetros avaliados em termos de análise cinemática da articulação tíbio-társica, assim como de alguns parâmetros medidos por histomorfometria. No entanto, parece-nos ter sido um passo importante e indispensável para adequar e testar biomateriais como suporte a sistemas celulares mais válidos em clínica, nomeadamente, células estaminais de origem autóloga ou heteróloga, numa perspectiva de Engenharia de Tecidos e de Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

The main goal of this experimental work was to test surgical techniques that could improve the treatment and the recovery of peripheral nerves after injury. Three types of injuries that are often seen in clinics were studied: axonotmesis, neurotmesis with and without loss of nerve fragments. Several surgical techniques were tested, including two types of biomaterials and a cellular system capable of producing important neurotrophic factors in the local of the regenerative process. The present study permitted to develop an economical and also an easy way for culturing a neural cell line which is capable of growing, differentiating and producing locally nerve growth factors that are otherwise extremely expensive. For this purpose the authors have chosen the N1E-115 cell line from mouse. These cells proliferate in normal culture medium but undergo neuronal differentiation in response to DMSO. The results of the quantitative assessment of the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) by means of the epifluorescence technique, revealed that N1E-115 cells which undergo neuronal differentiation for 48 hours in the presence of 1.5% DMSO are best qualified to be used to cover the interior of the nerve guides since the $[Ca^{2+}]_i$ was not found to be elevated indicating thus that the onset the cell death processes was not occurred. These cells after differentiation were transferred over equine collagen type III membranes and inside PLGA 90:10 tube-guides to reconstruct axonotmesis and neurotmesis lesions and were able to maintain viability and the production of neurotrophic factors in the local of the regenerative process for 12 and 20 weeks, respectively. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nerve tube guides, made of a novel proportion (90:10) of the two polymers, poly(l-lactide):poly(glycolide) alone and covered with the neural cell line differentiated *in vitro*, were tested *in vivo* for promoting nerve regeneration across a 10-mm gap of the rat sciatic nerve. For the *in vivo* testing, the animal model chosen was the Saco Sprague adult rat. This longitudinal study using the rat sciatic nerve implied that the animals used were divided according to the type of lesion and to the type of surgical treatment in groups of six animals each: i) in axonotmesis, 18 animals were tested and divided in three groups (axonotmesis injury without any surgical treatment - group 1, axonotmesis lesion enwrapped with a equine type III collagen membrane - group 2, and axonotmesis lesion enwrapped with the collagen membrane covered with the cellular system - group 3); ii) in neurotmesis without loss of nerve fragment, were tested 23 animals divided into three groups, (neurotmesis reconstructed by means of a end-to-end suture - group 4, neurotmesis where the end-to-end suture was enwrapped with the collagen membrane - group 5, and neurotmesis where the end-to-end suture was enwrapped with the collagen membrane covered with the cellular system - group 6, results not published yet); iii) neurotmesis with a 10 mm-gap, where 40 animals

were divided into 4 groups (neurotmesis reconstructed with a Neurolac® tube-guide - group 7, neurotmesis reconstructed with PLGA 90:10 tube-guide - group 8, autologous graft of 10 mm - group 9, neurotmesis reconstructed with PLGA 90:10 tube-guide covered inside with the cellular system - group 10, and neurotmesis injury, with a gap of 10 mm without surgical treatment – group 11). Motor and sensory functional recovery after axonotmesis and neurotmesis injuries was evaluated throughout a healing period of 12 and 20 weeks, respectively, using sciatic functional index (SFI), static sciatic index (SSI), extensor postural thrust (EPT), withdrawal reflex latency (WRL), and ankle kinematics. Stereological analysis was carried out on regenerated nerve fibers and compared to normal sciatic nerve fibers.

Our research group has recently described the sequence of functional and morphologic changes occurring after a standardized sciatic nerve crush injury. An 8-week post-injury time was used because this end point is the far most used. Unexpectedly, both functional and morphological data revealed that animals had still not recovered to normal pre-injury levels. Therefore, this study concerning axonotmesis was designed in order to prolong the observation up to 12 weeks. A full functional recovery was predicted by SFI/SSI, EPT and WRL but not all ankle kinematics parameters. Moreover, only two morphological parameters returned to normal values. Data presented in this work provided a baseline for selecting the adequate end-point and methods of recovery assessment for a rat sciatic nerve crush study. Afterwards, it was assessed whether *in vitro*-differentiated N1E-115 cells supported by a collagen membrane would enhance rat sciatic nerve regeneration after a crush injury. Based on results of the EPT and of some of the ankle locomotor kinematic parameters analyzed, the hypothesis that N1E-115 cells might enhance nerve regeneration was partially supported although histomorphometry disclosed no significant difference in nerve fiber regeneration between the different experimental groups. Therefore, results suggested that enrichment of equine type III collagen membrane with the N1E-115 cellular system in the rat sciatic nerve crush model may support recovery, at least in terms of motor function. The discrepancy between functional and morphological results also suggested that the combined use of functional and morphological analysis should be recommended for an overall assessment of recovery in nerve regeneration studies.

In what concerns neurotmesis injury groups, both motor and sensory functions improved significantly in all experimental nerve repair groups, although the rate and extent of recovery was significantly higher in the end-to-end group. No significant differences were detected in the comparison between the two types of tubes, PLGA 90:10 and Neurolac®. Compatible with results of functional tests, morphological analysis showed that axon regeneration occurred in both PLGA and Neurolac® experimental groups but disclosed a

different pattern of degradation of the two types of tubes with larger biodegradation of PLGA material by the end of 20 weeks. These results suggested that both types of biomaterial are a good substrate for preparing tubular nerve guides and the different pattern of degradation does not seem to influence the degree of nerve regeneration. In neurotmesis study where the cellular system was tested associated to the PLGA 90:10 tube guides, both motor and sensory functions improved significantly in the three experimental nerve repair groups, although the rate and extent of recovery was significantly higher in the group where the gap was reconstructed using the 10 mm autologous graft. The presence of neural cells covering the inside of the PLGA tube guides did not make any difference in the functional recovery. By contrast, morphometric analysis showed that the introduction of N1E-115 cells inside PLGA 90:10 tube guides led to a significant lower number and size of regenerated nerve fibers, suggesting thus that this approach is not adequate for promoting peripheral nerve repair. Further studies are warranted to assess the role of other cellular systems as a foreseeable therapeutic strategy in peripheral nerve regeneration.

As a final conclusion, the association of biomaterials to cellular systems like autologous stem cells capable of producing neurotrophic factors and of differentiation into neural and Schwann cells are a promising future in what concerns Regenerative Medicine of peripheric nerve.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail était l'application des techniques chirurgicales au traitement des lésions du nerf périphérique. Pour cela, les principales lésions qui peuvent atteindre le nerf périphérique ont été considérées, soit dans la pratique routinière de la Médicine Vétérinaire, soit dans celle de la Médicine Humaine: l'axonotmesis, la neurotmesis et la neurotmesis avec perte de tissue et écartement des bouts nerveux.

Face à ce type de lésions, des techniques chirurgicales standard ont été utilisées et aussi un système cellulaire facile à obtenir, qu'on a crée et testé, capable d'être utilisé pas seulement come source de facteurs neurotrophiques à l'endroit de la régénération mais aussi capable de servir comme étude préliminaire pour la future application d'autres systèmes cellulaires comme l'utilisation des cellules souches autologues où hétérologues.

Le système cellulaire utilisé était constitué par des cellules immortalisées N1E-115 de souris auxquelles on a induit la différentiation *in vitro* avec l'addition de DMSO au moyen de culture. Le temps de différentiation correct a été déterminé par la mesure de la concentration du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]$), en utilisant la méthode de l'épifluorescence, moment où les neuroblastomes présentaient des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de cellules et où le processus de mort cellulaire (apoptosis) n'avait pas encore commencé. La détermination du ($[Ca^{2+}]$) a permet de conclure que 48 heures de différentiation était le temps idéal pour son utilisation. Après cette période, les cellules neuronales, ayant formé une monocouche homogène sur la membrane de biomatériel, se présentaient totalement viables et étaient capables de produire, *in loco*, les facteurs neurotrophiques à concentrations proches à celles qui sont observées pendant la période de régénération des lésions d'axonotmesis (12 semaines) et de neurotmesis (20 semaines).

Nous avons testé un biomatériel, le copolymère poly (D,L-lactique-co-glicocolique) dans un rapport jamais testé de 90 :10 (PLGA 90 :10). Après des essais *in vitro* et *in vivo*, ce biomatériel a démontré, la capacité de support et maintenance du système cellulaire jusqu'á l'endroit de la lésion.

Le modèle animal choisit pour l'essai *in vivo*, d'accord avec une révision bibliographique exhaustive, a été le rat *Sasco Srapgue-Dawley*. Des tests d'évaluation de la récupération fonctionnelle ont été conduits (récupération de motricité, nociceptive et de la locomotion), bien comme des altérations morphologiques après 12 ou 20 semaines de la lésion d'axonotmesis ou de neurotmesis, respectivement.

Une étude expérimentale longitudinale sur le rat, ayant l'objectif d'analyser la régénération du nerf d'après lésions d'axonotmesis et de neurotmesis, a été conduit,

suivit d'une comparaison des résultats avec ceux des techniques chirurgicales *standard*. Les rats furent groupés, selon le type de lésion et la technique chirurgicale utilisée, créant des groupes de 6 animaux : i) 18 animaux avec des lésions d'axonotmesis, distribués en trois groupes, soit lésion d'axonotmesis sans réparation (groupe 1), lésion d'axonotmesis enveloppée par une bio membrane de collagène du type III d'origine équine (groupe 2) et lésion d'axonotmesis avec la même membrane tapissée avec des cellules neuronales différenciées *in vitro* (groupe 3) ; ii) Deux groupes avec lésions de neurotmesis, soit lésion de neurotmesis sans écart des bouts nerveux et lésion de neurotmesis avec écart des bouts nerveux, ont été crées. Le premier groupe (neurotmesis sans écart des bouts) a été sous-divisé en trois sous-groupes d'accord avec la procédure de réparation, à savoir, suture classique bout-à-bout de l'épinerf (groupe 4), suture classique bout-à-bout de l'épinerf enveloppée par une bio membrane de collagène du type III d'origine équine (groupe 5) et suture classique bout-à-bout de l'épinerf enveloppée par une bio membrane de collagène du type III d'origine équine tapissée avec des cellules neuronales différenciées *in vitro* (groupe 6). Le deuxième groupe (neurotmesis avec écart des bouts nerveux) a été sous-divisé en cinq sous-groupes selon les procédures de réparation : tubulation avec tube-guide d'un co-polyester de poli(DL-lactique-ε-caprolactone) (Neurolac®)(groupe 7); tubulation avec tube-guide de PLGA 90 :10 (groupe 8) ; greffe autologue de 10 mm (groupe 9) ; tubulation avec tube-guide de PLGA 90 :10 imbu avec des cellules neuronales différenciées *in vitro* (groupe 10) et un groupe-contrôle négatif sans traitement (groupe 11).

La récupération fonctionnelle des rats a été évaluée hebdomadairement pendant 12 semaines (groupe d'axonotmesis) et tous les quinze jours pendant 20 semaines (groupe de neurotmesis). L'évaluation s'est basée sur l'indice de fonctionnalité du sciatique (SFI), l'indice de fonctionnalité du sciatique sur des conditions statiques (SSI), le pourcentage de déficit moteur évaluée avec le reflexe de réaction posturale d'extension (RPE), la latence du reflexe de flexion (LRF) et encore l'analyse cinématique de l'articulation tibio-tarsique pendant la marche. L'évaluation morphologique a été réalisée en tous les groupes après l'euthanasie à 12 ou 20 semaines pour les groupes d'axonotmesis et de neurotmesis.

Les résultats obtenus mettent en évidence une relation entre la sévérité de la lésion et la durée de la récupération fonctionnelle et morphologique, ce qui justifie la nécessité du recours aux techniques chirurgicales en utilisant des biomatériaux et des adjuvants de la régénération, comme les systèmes cellulaires producteurs de facteurs neurotrophiques. Dans le cas de lésions d'axonotmesis, l'évolution au but de 12 semaines nous semble plus appropriée que celle de 8 semaines, utilisée à des études antérieures. Néanmoins, à la fin de cette période, quoique la récupération fonctionnelle semble être atteinte,

l'évaluation morphologique et cinématique met en évidence quelques paramètres qui n'ont pas encore atteint les valeurs de normalité. Il nous semble, par conséquence, que pour ce type de lésion il pourrait d'être utile le prolongement de cette période pour qu'on puisse démontrer une potentielle évolution favorable après les 12 semaines.

Sur lésions de neurotmesis, la suture bout-a-bout sans tension est considérée le *gold-standard* par notre groupe (résultats non publiés). Néanmoins, sur les lésions avec écart des bouts nerveux, la technique la plus efficace serait l'utilisation d'une greffe autologue, ce qui est accompagné d'effets secondaires conduisant parfois à des résultats encore plus désastreux que ceux de la lésion initiale. Pour ces cas, il devient nécessaire l'utilisation de la technique de tubulation avec des tubes-guide, fabriqués avec des biomatériaux inertes et capables de favoriser la régénération axonalle.

Pour la technique de tubulation, les biomatériaux testés, à savoir le PLGA 90 :10 et le Neurolac® ont démontré une capacité de favoriser la régénération entre les bouts nerveux. Les tubes guide de PLGA 90 :10, grâce à ses caractéristiques physico-chimiques et sa porosité, ont démontré d'être un support très adéquat pour le système cellulaire producteur de facteurs neurotrophiques pendant toute la période de récupération évaluée sur des lésions graves d'axonotmesis et de neurotmesis.

Le système cellulaire testé, constitué par des cellules neuronales avec 48 h. de différentiation *in vitro* obtenues d'une ligne cellulaire immortalisée d'origine tumorale (neuroblastome de souris), semble ne pas avoir des avantages sur la récupération des lésions d'axonotmesis et de neurotmesis, en ce qui concerne des aspects d'analyse cinématique et d'histomorphométrie. Pourtant il nous semble que ces expériences représentent une avance importante et indispensable pour l'adaptation et évaluation des biomatériaux comme support de systèmes cellulaires plus utiles à la pratique médicale, notamment des cellules souches, d'origine autologue ou hétérologue, dans une perspective de médicine régénérative et de génie de tissues.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DO NERVO PERIFÉRICO

Torna-se importante, antes de iniciar o estudo da regeneração do nervo periférico, quando na utilização de técnicas que tenham como objectivo melhorar a recuperação funcional dos órgãos alvo, fazer uma revisão bibliográfica sobre a estrutura e o funcionamento do Sistema Nervoso em especial do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Só no início do século passado, surge a primeira geração de neurobiólogos que reconheceram a natureza unitária da célula nervosa, com a ajuda dos microscópios e técnicas de coloração disponíveis. Assim surge uma teoria defendida pelo neuropatologista italiano Camilo Golgi, que defendia que as células nervosas se encontravam conectadas com as células vizinhas através de uniões protoplasmáticas, formando uma malha contínua de neurónios, chamada *retículo*. Esta teoria acaba rapidamente por ser contrariada pelas investigações do neuroanatomista espanhol, Santiago Ramón y Cajal, que defendia que os neurónios comunicavam entre si através de contactos especializados e que finalmente viriam a ser chamados de *sinapses*. Baseado nas teorias contraditórias destes dois investigadores surgem os primeiros debates das neurociências modernas. Neste trabalho, iniciado por Golgi e Cajal, que marcou a neurociência, foram reconhecidos pela entrega do Prémio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1906, a ambos os investigadores. Nesta altura, juntamente com outros investigadores torna-se consensual que o sistema nervoso era constituído por duas classes de células: células nervosas ou **neurónios** e células de apoio, de suporte ou **neuroglia**. As células neurogliais do Sistema Nervoso Central (SNC) são os astrócitos, oligodendritos e as células microgliais, enquanto que as células do Sistema Nervoso Periférico (SNP) são as células de Schwann (Dale Purves *et al.*, 2005).

O sistema nervoso funcional e estruturalmente é dividido em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC representa a maior parte de todo o sistema nervoso e corresponde ao cérebro e medula espinhal. O SNP corresponde aos ramos dos nervos cranianos, espinhais e nervos autónomos. Sendo que o SNP tem como função a comunicação entre o SNC e o ambiente (Seeley *et al.*, 1995). A unidade motora é formada pelo corpo celular do neurónio motor, o seu axónio, a fibra muscular que enerva e as conexões entre eles (junção neuromuscular) (Figura 1). Os corpos celulares das fibras sensoriais aferentes encontram-se localizados no gânglio de raiz dorsal fora da medula espinhal. A combinação entre as vias ventral e dorsal forma o nervo espinhal (Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2004). O SNP é assim um complexo sistema de ramos nervosos que viajam entre o canal espinhal e todos os músculos e órgãos do corpo.

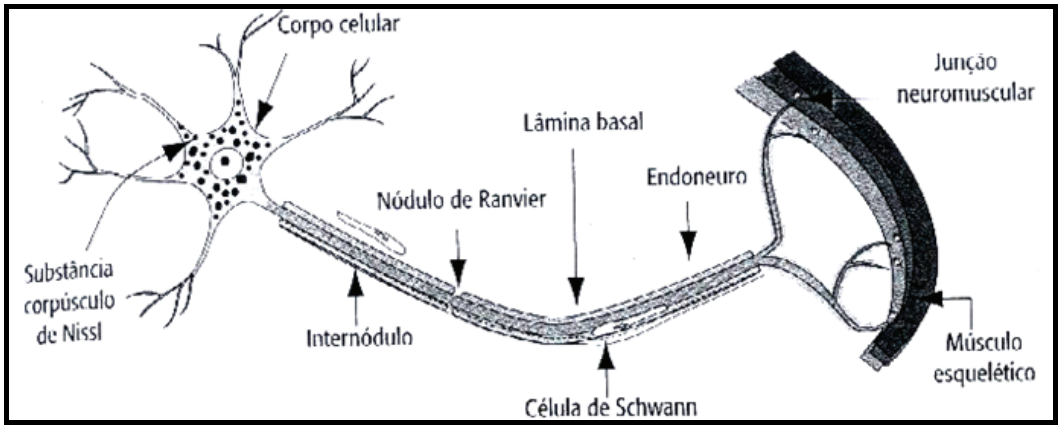


Figura 1: Neurónio motor intacto com uma terminação axonal na junção neuromuscular. O neurónio está envolvido por uma bainha de mielina e uma lâmina basal produzida pelas células de Schwann – endoneuro. O corpo celular do neurónio contém os corpúsculos de Nissl (agregados de ribossomas aderentes ao retículo endoplasmatico e poloribossomas livres). (Adaptada de Kierszenbaum, 2004).

1.1. NEURÓNIO

A unidade funcional do sistema nervoso é uma célula excitável e altamente especializada, o **neurónio**. O sistema nervoso central (SNC) é formado pelo encéfalo e medula espinhal e o sistema nervoso periférico (SNP) é formado pelos nervos e por agregados de corpos celulares de neurónios chamados gânglios nervosos (Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2004).

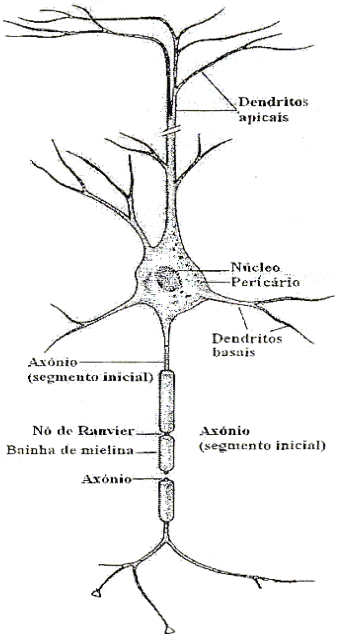


Figura 2 – Representação esquemática de um neurónio típico dos vertebrados (Adaptada de Varejão, 2003).

O neurónio é constituído pelos seguintes componentes principais (Figura 2):

- O Corpo celular, soma ou pericário que contém o núcleo e o citoplasma;
- Os Dendritos que são prolongamentos citoplasmaticos especializados em receber os estímulos do meio ambiente, de células epiteliais sensoriais ou de outros neurónios. Estes dendritos aumentam muito a superfície receptora dos neurónios, possibilitando a captação de uma grande variedade de impulsos;
- O Axónio que é um prolongamento único, especializado na condução de impulsos que transmitem informações do neurónio para outras células;
- Os Telodendritos são as porções terminais dos axónios nos quais existem umas pequenas dilatações designados por botões terminais ou sinápticos através dos quais o axónio estabelece comunicação com dendritos, axónios e corpo celular de outros neurónios - sinápse (Varejão, 2003).

Os neurónios podem ser classificados segundo a sua morfologia, isto é, em número de processos que emergem do seu corpo celular, por:

- Neurónios multipolares com mais de dois prolongamentos e que são os mais abundantes no sistema nervoso central;
- Neurónios Bipolares com dois prolongamentos, um dendrito e um axónio e que são típicos do sistema visual, auditivo e vestibular;
- Neurónios pseudomultipolares com apenas um prolongamento curto e que logo se divide em dois, dirigindo-se um para a periferia e outro para o SNC e cujo corpo celular se encontra localizado nos gânglios sensitivos e espinhais (Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2004).

Os neurónios podem ainda ser classificados segundo a sua função em (Junqueira e Carneiro, 1999):

- Neurónios Motores que controlam órgãos efectores (glândulas exócrinas e endócrinas e fibras musculares) e que se encontram localizados na substância cinzenta ventral da medula espinhal;
- Neurónios Sensoriais que recebem estímulos sensoriais provenientes do meio ambiente e do próprio organismo e que se encontram localizados nos gânglios de raiz dorsal;
- Interneurónios que fazem conexões com outros neurónios e formam circuitos complexos.

1.2. SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO (SNP)

No SNP um grupo de neurónios forma um gânglio. O gânglio pode ser sensitivo – gânglio de raiz dorsal e gânglio do trigémio – ou motor – gânglio visceromotor ou autónomo. Os axónios derivados de um gânglio organizam-se em **nervos**, ramos ou raízes (Kierszenbaum, 2004). O SNP inclui todos os neurónios externos ao cérebro e à medula espinhal. Os nervos periféricos são os nervos cranianos e espinhais (Kierszenbaum, 2004).

1.2.1. FIBRA NERVOSA

Para além dos neurónios, o Sistema Nervoso contém um conjunto de células de sustentação e que no SNP incluem as **células de Schwann**. Fibra Nervosa é a denominação dada ao conjunto formado pelo axónio, bainha de mielína e células de Schwann que se agrupam em diferentes dimensões, número e padrão, para dar origem a fascículos, que por sua vez se organizam em nervos (Sunderland, 1978; Junqueira e Carneiro, 1999).

As fibras nervosas individuais do SNP são envolvidas pelas células de Schwann formando as fibras mielínicas e amielínicas. Nas **fibras mielínicas** uma célula de Schwann envolve apenas um axónio e um axónio é envolvido por mais do que uma célula de Schwann. Estas células de Schwann são responsáveis pela formação de um conjunto de camadas concêntricas em torno do axónio que é denominada por bainha de mielina. Nas **fibras amielínicas** uma célula de Schwann é capaz de envolver mais do que um axónio, que normalmente são de menor diâmetro que os anteriores e que são envolvidos apenas por uma dobra de célula envolvente (Junqueira e Carneiro, 1999).

A bainha de mielina é um complexo lipoproteico que é normalmente removido pelas técnicas histológicas de rotina, mas que pode ser demonstrada quando fixada e impregnada pelo tetróxido de ósmio, conferindo-lhe uma coloração negra. Os lipídos que a constituem, incluem principalmente fosfolípidos, glicolípidos e colesterol, e representam cerca de 70% dos seus constituintes. Cerca de 60% das proteínas pertencem ao grupo das glicoproteínas (Wolman, 1992). As proteínas mais relevantes do SNP são: a proteína básica mielinica (MBP) e a proteína zero (P_0). A proteína P_0 projecta-se para o espaço extracelular a fim de estabelecer interacção homofílica com uma molécula P_0 semelhante, a fim de estabilizar as membranas adjacentes. As proteínas da mielina são antigénios fortes com participação forte em doenças auto-imunes (Kierszenbaum, 2004). A decisão de uma célula de Schwann produzir maior ou menor quantidade de mielina é determinada pelo axónio, isto é, o axónio é responsável pelo sinal que envia à célula de Schwann, no

sentido de produção de uma quantidade detectável de glicolípidos e glicoproteínas que formam a bainha de mielina (Mirsky *et al.*, 1980).

Durante a formação da bainha de mielina, um prolongamento citoplasmático da célula de Schwann, vai-se enrolando em torno do axónio e após uma volta completa, as superfícies internas da membrana unem-se e formam o **mesaxónio interno**. Como o processo de espiralização da célula de Schwann continua em torno do axónio, as faces externas das membranas citoplasmáticas ligam-se e formam uma **linha intraperiódica**. É possível observar uma linha central de densidade mais elevada e que delimita a face interna da membrana plasmática – linha principal densa. As **fendas** ou **incisuras de Schimith-Lanterman** são observadas em cortes longitudinais das fibras nervosas mielínicas e correspondem às áreas de citoplasma residual das células de Schwann (Losinger *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2004).

A bainha de mielína, dos axónios mielinizados, estende-se desde o segmento inicial do axónio até aos seus ramos terminais. Os segmentos de mielina formados pelos processos individuais de células de Schwann são os **internódulos**. Os pontos de contacto entre dois internódulos são os **nódulos de Ranvier** e que surgem como pequenas constrições com cerca de 1µm e desprovidos de mielina, que correspondem a zonas de contacto entre duas células de Schwann (Varejão, 2003; Kierszenbaum, 2004). Os nódulos de Ranvier são locais com alta concentração de canais de sódio dependentes da voltagem e que desta forma suportam rápidos processos de despolarização e repolarização, necessários para a génese de potenciais de acção. Esta propriedade permite, aos axónios mielinizados, uma condução rápida dos impulsos nervosos chamada **condução saltatória** (Kierszenbaum, 2004).

1.2.2. ESTRUTURA DO NERVO PERIFÉRICO

Além das células de Schwann, os nervos possuem três envolucros de tecido conjuntivo (Figura 3): i) o epineuro, ii) o perineuro, iii) o endoneuro.

O **epineuro** (Figura 3) é formado por colagénio do tipo I e por fibroblastos e traduz-se na camada fibrosa mais externa que reveste todo o nervo, preenchendo os espaços entre os feixes de fibras nervosas. Contém também tecido adiposo e vasos sanguíneos – os *vasa nervorum*. Estes formam um plexo vascular bem desenvolvido, com numerosos vasos longitudinais, cuja função é suprimir os capilares do endoneuro (Sunderland, 1978; Kierszenbaum, 2004; Junqueira e Carneiro, 1999). Os ***vasa nervorum*** são os vasos sanguíneos dos nervos através dos quais se dão as trocas de nutrientes que caracterizam qualquer tecido vivo.

O **perineuro** (Figura 3) separa os axónios em fascículos e é constituído por camadas concêntricas de fibroblastos, que se encontram unidos entre si por junções de oclusão para formar uma barreira de protecção à passagem de macromoléculas – **barreira hemato-neural**. O isolamento criado pelas células do perineuro não é completo do ponto de vista estrutural, na verdade, existem pequenos vasos sanguíneos que o penetram, acompanhados por algumas fibras de colagénio, dispostas longitudinalmente, que contribuem para a resistência do perineuro. A força mecânica do perineuro é de tal forma que torna-se necessária uma pressão intrafascicular de cerca de 750 mmHg para que possa vir a ocorrer a rotura do nervo (Selander e Sjőstrand, 1978). É portanto, ao perineuro que cabe a tarefa de responder em termos de resistência elástica aos possíveis acidentes de estiramento (Sunderland e Bradley, 1961).

O **endoneuro** (Figura 3) envolve os axónios individuais e as células de Schwann associadas. É composto por colagénio de tipo III e alguns fibroblastos, e contem ainda os capilares do endoneuro. Os capilares do endoneuro derivam dos *vasa nervorum*, são revestidos por células endoteliais unidas por junções de oclusão e também fazem parte integrante da barreira hemato-neural (Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2004).

A barreira hemato-neural tem propriedades funcionais idênticas à barreira hemato-encefálica do SNC. É formada especialmente pelas junções de oclusão formadas entre as células endoteliais que revestem os capilares (Hafer-Macko *et al.*, 2002). Existem diferenças na permeabilidade desta barreira, por exemplo no epineuro, as proteínas ultrapassam a barreira com alguma facilidade, enquanto que no caso de endoneuro esta permeabilidade é mínima (Mackinnon, 2002).

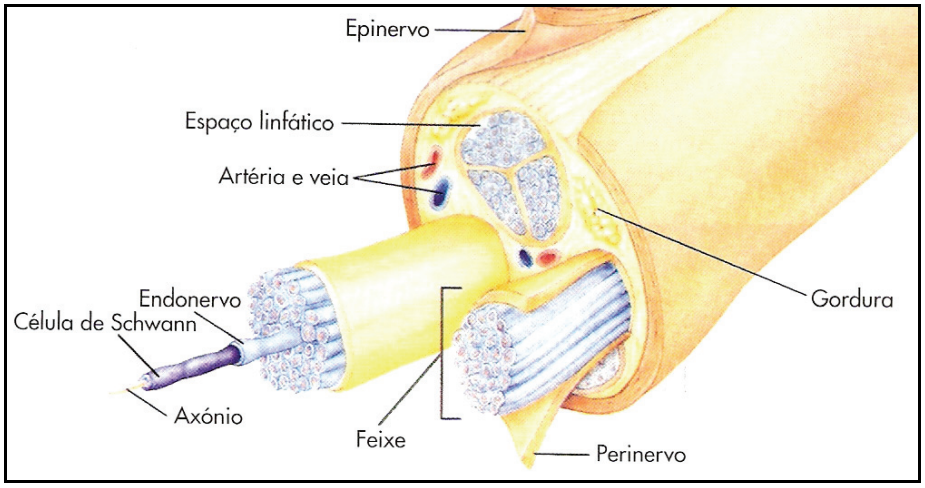


Figura 3 - Representação da estrutura do nervo periférico (Adaptado de Junqueira e Carneiro, 1999).

1.2.3. TRANSPORTE AXONAL

Cada neurónio possui apenas um único axónio, que é um cilindro de comprimento e diâmetros variáveis conforme o tipo de neurónio. Na maioria dos casos, o axónio é mais longo do que os dendritos, e por exemplo no homem, os axónios das células motoras da medula espinhal que enervam o pé, poderão ter cerca de 1 metro de comprimento (Junqueira e Carneiro, 1999).

O citoplasma do axónio é muito pobre em mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e microtúbulos, porém é muito rico em neurofilamentos. O centro de produção de proteínas é o corpo celular ou pericário. Existe um movimento bidireccional muito activo de proteínas, neurotransmissores, lipidos, mitocôndrias e outras organelas ao longo dos axónios – **transporte axonal** (Junqueira e Carneiro, 1999; Varejão, 2003; Kierszenbaum, 2004). O transporte axonal é um transporte activo que implica gasto de energia, mediado pelas ATPases (cinesina e dineína) que rompem uma ligação da molécula de adenosina tri-fosfáto (ATP), libertando energia (Junqueira e Carneiro, 1999).

O **transporte anterógrado** é o movimento de substâncias no sentido do corpo celular em direcção às terminações axonais e é mediado pela cinesina (Kierszenbaum, 2004). Este transporte existe, em duas correntes principais: uma rápida (20-410mm/dia) que inclui vesículas sinápticas, enzimas de síntese e precursores de neurotransmissores, e ainda uma corrente lenta (0.1-30 mm/dia) que transporta uma maior variedade e quantidade de elementos, nomeadamente proteínas (Grafstein e Forman, 1980; Wang e Browon, 2002).

O **transporte retrógrado** é o movimento de substâncias no sentido do axónio em direcção ao corpo celular e é mediado pela dineína (Kierszenbaum, 2004). Tem como principal função a transmissão de informação do estado de funcionamento de axónio e das suas células alvo para o corpo do neurónio (Grafstein, 1975). Este fluxo retrógrado transporta diversas moléculas para serem recicladas pelo corpo celular, factores de crescimento e transporta também material captado por endocitose, incluindo vírus e toxinas. O transporte retrógrado é utilizado em neurofisiologia para estudar o trajecto das fibras nervosas, utilizando para tal marcadores que se injectam nas regiões terminais dos axónios (por exemplo a peroxidase) (Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2004).

1.2.4. SINAPSES

A transmissão do impulso nervoso de um neurónio para outro depende de estruturas altamente especializadas que são as **sinapses**. A terminação sináptica é especializada na transmissão química em resposta a um potencial de acção. A sinápse é portanto, a

junção entre a terminação **pré-sinaptica** de um axónio e a superfície receptora da membrana **pós-sinaptica**, normalmente de um dendrito (sinapses axodendriticas). Existem no entanto, outros tipos de sinapses menos frequentes: axosomáticas (axónio e corpo celular), dendrodendríticas (entre dendritos) e axoaxónicas (entre axónios). As membranas entre os dois neurónios que estabelecem uma sinápse encontram-se separadas por um espaço de cerca de 20 a 30 nm – **fenda sináptica** (Junqueira e Carneiro, 1999).

Os mensageiros químicos dos neurónios - **neurotransmissores** (acetilcolina, glutamato, ácido δ-aminobutírico –GABA, entre outros) são armazenados em **vesículas sinápticas** e transportados até à terminação sináptica por transporte anterógrado (mediado pela cinesina). A membrana da vesícula sináptica contém proteínas de ancoragem vesicular que se ligam às proteínas de ancoragem de membrana, da membrana pré-sináptica. A condução axonal do impulso é da responsabilidade de modificações nos canais iónicos da membrana do axónio, o que ocasiona a entrada de sódio e saída de potássio com dispêndio de energia (ATP). Como a entrada de sódio é maior que a saída de potássio, ocorre uma acumulação de iões positivos na superfície interna e consequentemente a membrana externa torna-se carregada negativamente. Quando o axónio está em repouso, existe uma diferença de potencial de –90 mV entre o interior e o exterior da membrana (potencial de repouso). Na fase de despolarização, a diferença de potencial é de +35 mV (Junqueira e Carneiro, 1999).

A despolarização da terminação do axónio resulta de uma alta concentração de Ca^{2+}, transportado para dentro da terminação do axónio, através de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O aumento da concentração de Ca^{2+} conduz à exocitose da vesícula sináptica. O mensageiro químico é libertado na fenda sináptica e liga-se por sua vez a um receptor (colinérgico ou adrenérgico) na membrana pós-sináptica para transmitir a informação. O mensageiro químico é degradado enzimaticamente na fenda sináptica (acetilcolina pela acetilcolonesterase) ou é captado por endocitose mediada pelo receptor (norepinefrina) e mais tarde degradado pela enzima mitocontrial monoamina oxidase (MAO) (Kierszenbaum, 2004). A união do neurotransmissor com o receptor pode ter um efeito de excitação (**sinapses excitatórias**) ou um efeito de inibição (**sinapses inibitórias**) (Junqueira e Carneiro, 1999).

1.2.5. CLASSIFICAÇÃO DAS FIBRAS

Os nervos ou fibras nervosas estabelecem comunicação entre os centros nervosos e os órgãos da sensibilidade e efectores (músculos, glândulas). Assim as **fibras aferentes** transportam as informações desde o meio ambiente e órgãos internos até aos centros

nervosos, são chamados **nervos sensitivos** e são normalmente nervos com maior densidade de fibras e menor diâmetro (Ghalib *et al.*, 2001). As **fibras eferentes** transportam informação dos centros nervosos até aos órgãos efectores, são chamados **nervos motores** e que são normalmente nervos com menor densidade de axónios e com maior diâmetro (Ghalib *et al.*, 2001). A maioria dos nervos, no entanto, é composta por estes dois tipos de fibras e são denominados **nervos mistos** (Junqueira e Carneiro, 1999).

A onda de polarização e despolarização progride até às porções terminais do axónio, onde promove a libertação de neurotransmissores para o espaço sináptico, pelo processo já descrito anteriormente. Nas fibras mielinizadas, as alterações de membrana ocorrem somente nos nódulos de Ranvier. Os internódulos de mielína funcionam como um isolante à propagação do impulso. Desta forma a sua propagação dá-se de nódulo de Ranvier para nódulo de Ranvier, chamada **condução saltatória.** Em contraste com as fibras amielinicas que têm uma propagação continua, mais lenta e com maior dispêndio de energia. Com base na capacidade de condução, as fibras nervosas podem ser classificadas em 3 categorias (Junqueira e Carneiro, 1999):

i) Fibras de tipo A – têm maior diâmetro, são mielinizadas e têm nódulos de Ranvier espaçados, sendo portanto, as mais rápidas na condução do impulso nervoso, cerca de 15 a 100 metros por segundo;

ii) Fibras do tipo B – são também mielinizadas mas mais finas que as anteriores e com nódulos de Ranvier menos espaçados o que implica uma condução do impulso mais lenta que nas fibras do tipo A, cerca de 3 a 14 metros por segundo;

iii) Fibras do tipo C – são fibras amielinicas, mais finas e conduzem o impulso a uma velocidade mais lenta, cerca de 0,6 a 2 metros por segundo.

2. FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO

2.1. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES DO NERVO PERIFÉRICO

Tal como todas as estruturas anatómicas, o sistema nervoso periférico está sujeito a lesões provenientes de acidentes quer de origem externa (acidentes de viação, quedas, lacerações, queimaduras, etc.) quer de origem interna (neoplasias, lesões iatrogénicas, compressões, etc.). O SNC encontra-se mais protegido, anatomicamente, do que o SNP daí que as lesões do nervo periférico sejam bem mais frequentes. Empiricamente, parece que este tipo de lesões será o esmagamento ou compressão, a secção e a secção acompanhada de perca de substância. Algumas classificações têm sido propostas especialmente por Seddon e Sunderland, dois investigadores considerados de grande importância, para o estudo da cirurgia do nervo periférico (Seddon, 1947; Seddon, 1972¸ Sunderland, 1978;Sunderland, 1951; Sunderland, 1990) (Figura 4).

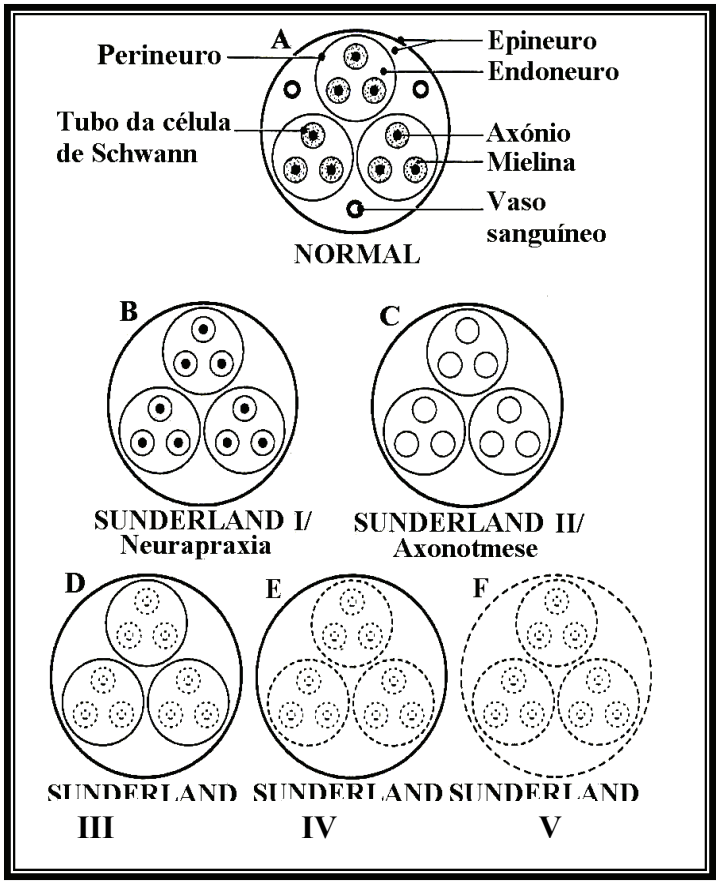


Figura 4 - Classificação das lesões do nervo periférico.

(A) Nervo Normal.

(B) Lesão de Sunderland tipo I ou Neuropraxia (Seddon) - em que os fascículos ainda se mantêm intactos e apenas desaparece a bainha de mielina;

(C) Lesão de Sunderland tipo II ou Axonotmese (Seddon) – em que apenas são preservados os tubos do endoneuro, desaparecem os axónios e a bainha de mielina;

(D) Lesão de Sunderland tipo III – desaparece o endoneuro e é preservado o perineuro;

(E) Lesão de Sunderland tipo IV – desaparece o perineuro e é preservado o epineuro;

(F) Lesão de Sunderland tipo V ou Neurotmese (Seddon) – em que há secção completa de todo o nervo.

(Adaptado de Lundborg e Danielsen, 1991)

A classificação segundo Seddon inclui três categorias: Neurapraxia, Axonotmese e Nerurotmese (Seddon, 1947; Seddon, 1972).

A classificação segundo Suderland inclui cinco categorias: Tipo I até Tipo V de acordo com níveis superiores de gravidade de lesão (Sunderland, 1978; Sunderland, 1951; Sunderland, 1990).

2.1.1. NEURAPRAXIA OU LESÃO DE SUNDERLAND TIPO I

Neste caso existe apenas uma compressão ou estiramento da fibra nervosa, em que a continuidade axonal é mantida e cuja lesão resulta normalmente apenas numa danificação das bainhas de mielina (Figura 4 B). Em termos clínicos, traduz-se numa paralisia motora e em que geralmente as fibras sensitivas são poupadas. A recuperação da condução nervosa ocorre normalmente de forma espontânea ao fim de poucas semanas. É portanto, a forma menos grave de lesão do nervo periférico. A preservação da continuidade do nervo preserva também o óptimo alinhamento dos axónios, daí a óptima recuperação (Spiegel *et al.*, 1993). Em Medicina Humana os exemplos clássicos desta lesão são as mononeuropatias compressivas agudas, como a paralisia de Sábado à noite (paralisia radial no sulco espiral do úmero) e a paralisia da perna cruzada (paralisia fibular na cabeça da fíbula), cuja recuperação ocorre dentro de semanas e o prognóstico é favorável.

2.1.2. AXONOTMESE OU LESÃO DE SUNDERLAND TIPO II

Trata-se neste caso de uma lesão idêntica à anterior, mas em que a compressão ou tracção da fibra nervosa, implica uma perda de continuidade axonal e portanto degenerescência Walleriana, mas permanece ainda intacto o tubo do endoneuro (Figura 4 C). A recuperação destas lesões é normalmente mais morosa que a lesão anterior, no entanto, é ainda de prognóstico bastante favorável. Não implica intervenção cirúrgica, pelo facto de a estrutura do endoneuro manter toda a estrutura da fibra nervosa perfeitamente orientada, o que permite que os axónios se direccionem de forma correcta até aos órgãos alvo. Contudo, é possível haver danos clínicos irreversíveis por várias razões, entre elas e em primeiro lugar uma possível lesão do órgão alvo (atrofia muscular) durante um período mais longo de regeneração axonal ou ainda por deficits relacionados com a morte de corpos celulares que poderão ocorrer após a lesão axonal.

2.1.3. NEUROTMESE OU LESÃO DE SUNDERLAND TIPO III-V

O termo neurotmese segundo a classificação de Seddon implica perda de continuidade de todas as estruturas da fibra nervosa, isto é, axónios e elementos periféricos

constituintes do nervo (Figura 4 D, E e F). Esta lesão implica intervenção cirúrgica de reparação, no sentido de facilitar a orientação dos axónios do topo proximal e topo distal com vista à recuperação funcional dos órgãos alvo, o mais rapidamente possível, evitando desta forma, a formação não só de neuromas no local da lesão, como lesões irreversíveis dos órgãos alvo, por falta prolongada de funcionamento (atrofia). Sunderland classifica ainda a neurotmese em três grupos de acordo com as estruturas lesadas:

i) Lesão de Sunderland tipo III – em que a única estrutura preservada é o perineuro.

ii) Lesão de Sunderland tipo IV – em que a única estrutura que permanece intacta é o epineuro.

iii) Lesão de Sunderland tipo V – em que nenhuma estrutura do nervo é preservada e em que o nervo é completamente seccionado resultando daí maiores ou menores graus de separação dos topos do nervo. Esta classificação segundo Sunderland (1978) é portanto, a lesão mais grave da fibra nervosa e é aquela em que uma intervenção cirúrgica se torna imprescindível.

2.2. LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO

Devido à sua grande distribuição por todo o corpo, as lesões do nervo periférico são relativamente frequentes, quer por esmagamento, isquémia, inflamação, quer ainda por secção completa com ou sem perda de substância e são normalmente resultantes de acidentes, patologias várias ou ainda lesões iatrogénicas.

Os neurónios não sofrem mitoses, o que quer dizer que a sua destruição representa uma perca definitiva. No entanto, dentro de certos limites, os seus prolongamentos citoplasmáticos têm a capacidade de se regenerarem. Daí o nervo periférico ter, apesar de alguma dificuldade, capacidade de regeneração, desde que lhes sejam mantidas ou adicionadas algumas condições para que tal fenómeno possa acontecer.

Em contraste, as células da neuróglia (células de Schwann e células satélites dos gânglios nervosos), são dotadas de grande capacidade de regeneração e têm um papel essencial em todo o fenómeno de regeneração do nervo periférico.

2.2.1. DEGENERESCÊNCIA E REGENERAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS

2.2.1.1. DEGENERESCÊNCIA WALLERIANA

Quando o nervo é danificado de tal forma que haja interrupção da integridade dos axónios deve distinguir-se a porção da fibra nervosa que se destacou do neurónio – **porção distal** e a porção que continua unida ao corpo celular – **porção proximal**. No

segmento distal logo após a lesão surge um fenómeno denominado por **degenerescência Walleriana**, que pode levar o segmento distal até à degenerescência total e à sua reabsorção. Esta degenerescência Walleriana é algo similar à degenerescência que ocorre em determinadas neuropatias do nervo periférico de humanos (Glass, 2004). No segmento proximal, por manter contacto com o centro trófico e apesar de ser mais facilmente regenerado, surge também um fenómeno de tipo degenerativo, com reacção do corpo celular (Junqueira e Carneiro, 1999).

A degenerescência Walleriana foi descrita pelo fisiologista inglês Augustus Volney Waller em 1816-1870 (Waller, 1850; Stoll *et al.*, 2002; Koeppen, 2004), como o conjunto de fenómenos que se seguem após uma lesão grave do axónio e que se iniciam pela degradação do axoplasma, acompanhados pela destruição da mielina que é removida pelas células de Schwann e por macrófagos que invadem o local. Recentemente, define-se degenerescência Walleriana como um processo intrínseco activo do axónio associado a alguns princípios de apoptose (Beirowski *et al.*, 2005). A degenerescência Walleriana ocorre nos axónios do SNP e no SNC, no entanto, no SNC é mais lenta que no SNP e aqui a idade do animal tem grande importância (Koeppen, 2004). Por exemplo no mamífero neonatal, a degenerescência Walleriana é tão rápida no SNC como no SNP (Koeppen, 2004). Desde a investigação pioneira de Waller sobre este fenómeno, muito se tem investigado sobre degenerescência nervosa ao longo de dois topos nervosos separados, nomeadamente se ocorre na direcção anterógrada, retrógrada ou em ambas as direcções simultaneamente, dos factores que a influenciam, como por exemplo os animais de laboratório usados para estudo, a idade, a neuroanatomia do local (SNC ou SNP), do tipo de fibras em análise (mielinizadas, não mielinizadas, espessura do axónio) do tipo de lesão (axonotomia, ligadura, secção, etc.), do comprimento do topo distal, de factores ambientais (temperatura) e outros (Beirowski *et al.*, Chaudhry *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 2004). A velocidade da degenerescência Walleriana depende da espessura da fibra nervosa e foi calculada em cerca de 45.6 mm/24 h para as fibras mais grossas e de cerca de 252 mm/24 h para as fibras mais finas (Koeppen, 2004). Sob temperaturas mais altas verificam-se velocidades de degenerescência Walleriana mais altas, talvez devido à estimulação de enzimas e depleção em factores de crescimento. Merzbacher demonstrou que não foi encontrada degenerescência Walleriana no SNC em animais que foram mantidos a temperaturas baixas (Koeppen, 2004). Também o tipo de lesão interfere na direcção da degenerescência, quando em lesões de transsecção é no sentido de proximal para distal enquanto que em lesões de esmagamento é no sentido inverso (Beirowski *et al.*, 2005). Também a capacidade regenerativa do nervo se encontra cerca de 66% mais baixa numa axonotomia de longo termo quando comparada com lesões de transsecção reparada de imediato (Gordon e Fu, 1997; Dhillon *et al.*, 2004). Há

estudos que sugerem, que um atraso na sutura de um nervo lesado pode ser benéfico para a regeneração axonal, no entanto, tal atraso é simultaneamente prejudicial devido ao prolongamento do período de desinervação muscular (Gordon, 2003).

Os principais acontecimentos durante este processo são resumidos nas Figuras 5, 6 e 7.

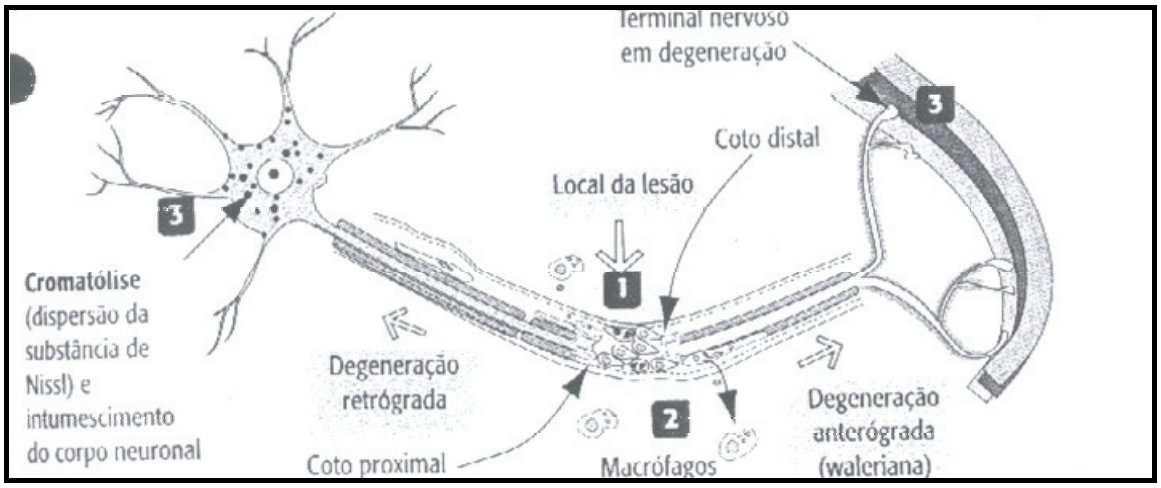


Figura 5: A lesão danifica a fibra nervosa. As células de Schwann sofrem mitose e preenchem o espaço entre o topo proximal e distal (seta 1). As células de Schwann fagocitam a mielina, que é excretada e fagocitada de seguida pelos macrófagos tecidulares (seta 2). Cromatólise acontece no corpo celular (seta 3) e degenerescência das terminações dos axónios e nos segmentos proximal e distal (seta 3). (Adaptado de Kierszeubaun, 2004).

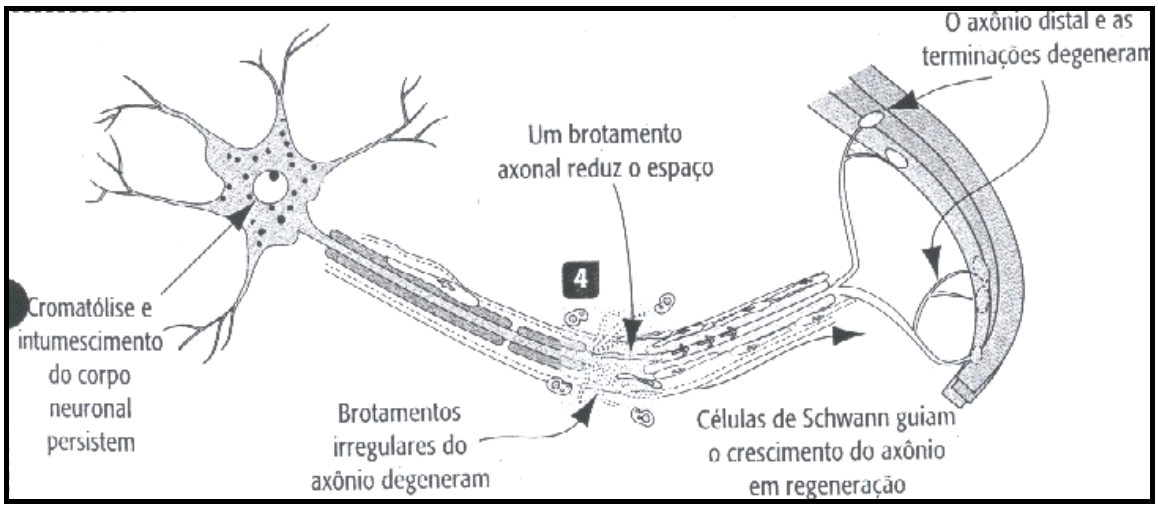


Figura 6: Do segmento proximal surgem múltiplos brotamentos que avançam por entre as células de Schwann. O processo de regeneração inicia-se, mas é suspenso pela ausência do endoneuro. (Adaptado de Kierszeubaun, 2004).

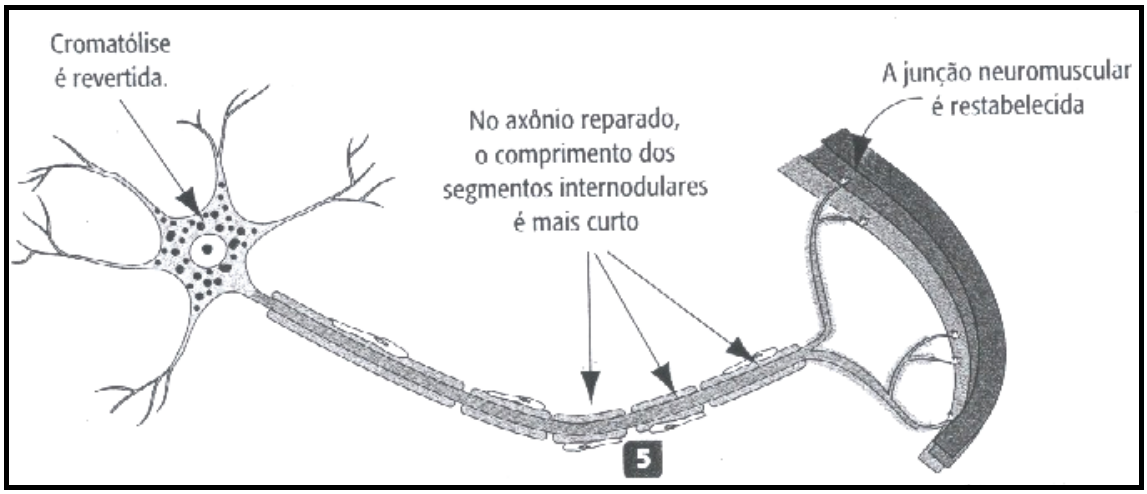


Figura 7: Uma vez que o axónio regenerado atinge o órgão alvo, as células de Schwann começam a produzir mielina (Adaptado de Kierszeubaun, 2004).

Para facilitar a nossa compreensão sobre este processo de degenerescência Walleriana podemos dividi-lo em cinco estádios que nem sempre se apresentam tão bem definidos entre si (Varejão, 2003):

i) Estádio I: Sobrevivência do segmento distal separado do soma. Corresponde ao momento que se segue logo após a lesão e corresponde ao início da fragmentação do axónio e da bainha de mielina. É possível observar, no topo distal, edema na região do endoneuro, por alteração da barreira hemato-nervosa e acumulação no local, de organelas e mitocôndrias. No SNP a degradação da mielína inicia-se logo 24 a 48 horas após a lesão (Koeppen, 2004). Alguns autores consideram que a zona mais vulnerável é nas fendas de Schimith-Lanterman, no entanto, estudos ultra-estruturais não o têm confirmado (Koeppen, 2004). No segmento proximal, dá-se também início a um processo de degenerescência que se estende até ao nó de Ranvier mais próximo. No núcleo começam também a esboçarem-se alterações, como dissolução dos corpúsculos de Nissl (cromatólise), aumento de volume do pericário e deslocamento do núcleo para a periferia (Junqueira e Carneiro, 1999). Esta fase varia com a espécie animal, com o comprimento (quanto maior o comprimento mais longa será esta fase), com a temperatura (será mais longa quando a temperatura é menor) e possivelmente também com o tipo de fibra nervosa (sensitiva ou motora), (Chaudhry *et al.*, 1992);

ii) Estádio II: Desintegração do axoplasma e fragmentação axonal. Corresponde à fase de desintegração granular do citoesqueleto que converte abruptamente o axoplasma em pequenas partículas e detritos. Esta fase, tem uma duração de apenas poucas horas após a lesão. A degenerescência dos segmentos distal e proximal progride de forma centrífuga – degenerescência anterógrada e retrógrada, (Kierszenbaum, 2004). Neste mecanismo de desintegração granular do citoesqueleto há a considerar o papel da calpaína, que é uma proteínase activada pelo cálcio, responsável pela clivagem das

proteínas que constituem os neurofilamentos (Glass e Griffin, 1994; Varejão, 2003). Numerosos trabalhos têm sido realizados, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, no estudo da degenerescência Walleriana e também em neuropatias periféricas experimentais, tendo em conta a dependência das concentrações de cálcio intracelular que inibem a activação da protease calpaína e dessa forma funcionar como inibidor da degeneração axonal (Glass, 2004);

iii) Estádio III: Resposta primária por parte de outros elementos celulares. Após a fase anterior inicia-se a fase limpeza da zona e para tal cerca de três dias após a lesão são recrutados monócitos da corrente sanguínea que se transformam em macrófagos hematogénios, macrófagos tecidulares e as células de Schwann que fagocitam estes restos celulares (Avelino *et al.*, 2004; Griffin *et al.*; Stoll *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2003; Koeppen, 2004). Os macrófagos têm grande importância na preparação do espaço que futuramente será o local de regeneração, através da grande variedade de moléculas que sintetizam para a matriz envolvente, tal como o factor de crescimento dos fibroblastos (bFGF), factor de crescimento transformante alfa (TGF-α), factor de crescimento similar à insulina-1 (IGF-1), factor beta de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e interleucina 8 (Varejão, 2003). Com a degenerescência axonal, as células de Schwann deixam de produzir mielina e entram numa fase de multiplicação. Esta proliferação das células de Schwann é mais intensa nos axónios mielinizados e nos axónios de maior diâmetro. Sabe-se também, que os macrófagos têm um papel muito importante na libertação de agentes indutores da mitose das células de Schwann (Varejão, 2003). Também nesta fase surge a abertura da barreira hemato-neural, cerca das 24 a 48 horas após a lesão do nervo que se pensa estar relacionada com a acção de citoquinas bem como com a libertação de histamina resultante da desgranulação dos mastócitos (Griffin *et al.*, 1992);

iv) Estádio IV: Resposta secundária por parte das células de Schwann e da linhagem macrofágica. No segmento distal, as células de Schwann proliferam sob a forma de cordões orientados sobre o eixo longitudinal e que são chamadas bandas de Büngner (Cajal, 1928). O número de macrófagos aumenta até ao seu máximo nos primeiros cinco dias e vai diminuindo em paralelo com a remoção de mielina durante o primeiro mês (Gordon, 2003) Nesta fase, regista-se um aumento da síntese de neurotrofinas, com especial destaque para o factor de crescimento do nervo (NGF), com o qual existem alguns trabalhos experimentais realizados (Varejão, 2003; Gordon, 2003). O NGF exprime a sua regulação muito mais rapidamente do que o Factor Neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e Factor de crescimento derivado das células da glia (GDNF) (Gordon, 2003). No segmento proximal ocorre também e proliferação das células de

Schwann que migram até ao segmento distal tentando estabelecer o contacto entre os dois topos (Cheng e Zochodne, 2002); e

v) Estádio V: Resposta final com o estabelecimento de uma trama e um ambiente capaz de suportar o acrescimento axonal (Cheng e Zochodne, 2002).

2.2.1.2. REGENERAÇÃO AXONAL

Ao mesmo tempo que está acontecer todo este processo de degenerescência inicia-se um processo de regeneração axonal. Se o corpo celular sobrevive à lesão no axónio, na fase final, o processo de cromatólise é revertido (Kierszenbaum, 2004). No segmento proximal, nas primeiras 3 horas após lesão, podem começar a surgir os primeiros sinais de degenerescência com a formação de filamentos (brotamentos) que progridem em direcção às colunas de células de Schwann, no entanto, somente as fibras que penetram nessas colunas têm possibilidade de alcançar um órgão efector (Sunderland, 1978; Junqueira e Carneiro, 1999). O sucesso da regeneração depende da formação desses brotamentos, do seu número e qualidade e da sua habilidade de progredirem correctamente em direcção ao seu órgão alvo (Millesi, 2006). No caso de ser muito grande o espaço entre os topos proximal e distal, ou mesmo quando este último é perdido, as fibras nervosas crescem desordenadamente, formando uma dilatação muito dolorosa na extremidade do nervo, a que se chama neuroma de amputação (Junqueira e Carneiro, 1999). Estes brotamentos dos axónios ocorrem especialmente a partir dos nódulos de Ranvier, localizados até uma distância de 6 mm proximal à lesão (Cajal, 1928; Varejão, 2003). Um filamento persiste e cresce distalmente, cerca de 1 a 1,5 mm/dia em humanos (Seddon *et al.*, 1943), e cerca de 3 mm/dia em ratos, para reinervar o órgão alvo (Kierszenbaum, 2004; Gordon *et al.*, 2003). A taxa de regeneração, no entanto, não é exactamente igual para todos os nervos, em todo o comprimento do nervo e após cada tipo de lesão (axonotmese ou após uma sutura) (Seddon *et al.*, 1943). A taxa de regeneração do nervo começa assim, por ser lenta logo no momento após a lesão, e também é mais lenta após uma sutura, comparativamente a uma lesão de axonotmese (Seddon *et al.*, 1943). O conhecimento da taxa de regeneração aproximada em determinadas situações é uma ferramenta de grande importância para o clínico, visto permitir avançar com possíveis prognósticos e permitir também monitorizar a progressão da recuperação. A presença de endoneuro é essencial para a proliferação das células de Schwann, e estas essenciais para direccionar o brotamento axonal, o que quer dizer que o processo de regeneração é suspenso quando na ausência de endoneuro e de células de Schwann (Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2004). Outro factor importante na regeneração axonal e no seu alongamento, é o material fornecido pelo corpo celular,

incluindo também importantes factores neurológicos, já que os axónios em regeneração são incapazes de fornecer todo a material necessário para esta fase e que por sua vez é transportado via transporte anterógrado para o local da lesão (Thanos *et al.*, 1998).

A eficiência funcional de regeneração depende das fibras ocuparem as colunas de células de Schwann destinadas aos locais correctos (Sunderland, 1978; Brushart, 1988). Daí que em lesões de estiramento ou neurapraxia em que é preservado o alinhamento das fibras, a recuperação é espontânea e total (Spiegel *et al.*, 1993). Num nervo misto, por exemplo, se as fibras sensitivas regeneradas ocuparem colunas destinadas às placas motoras do músculo estriado e que antes estavam ocupadas por fibras motoras, a função do músculo não será restabelecida (Junqueira e Carneiro, 1999).

A especificidade dos tecidos foi demonstrada por Lundborg e colaboradores (1986) e Mackinnon e colaboradores (1986), e demonstra que os axónios crescem em direcção a outro nervo em vez de um tendão, músculo ou tecido de granulação. Seckel e seus colaboradores, em 1986 demonstraram uma teoria que explica o crescimento preferencial dos axónios em direcção aos órgãos alvo, que originalmente enervavam – **teoria da especificidade**. A especificidade de reinervação resulta da interacção de dois factores importantes: factores mecânicos e factores biológicos (Dubový, 2004): Os factores mecânicos correspondem à experiência do cirurgião através da execução de uma correcta coaptação entre os dois topos. Parece que existe clínica e experimentalmente evidência de que um pequeno espaço entre os dois topos poderá ser benéfico, no sentido de que poderá facilitar a regeneração selectiva dos axónios motores e sensitivos até ao órgão alvo (Dubový, 2004). Os factores biológicos correspondem aos factores neurotróficos e neurotrópicos produzidos no local da lesão. De uma forma geral poderemos afirmar que o mecanismo de brotamento e especificidade é causado pelas diferenças do microambiente de endoneuro, seguintes à degenerescência Walleriana de fibras nervosas motoras e sensitivas (Dubový, 2004).

No entanto, também é sabido que uma quantidade significativa de brotamentos não atinge o segmento distal e são destruídas precocemente por falta de sinais quimiotáticos provenientes da zona distal, sob a forma de factores neurotróficos (Brushart, 1993, Varejão, 2003).

Com base nestes conhecimentos, alguns investigadores recomendam a utilização de tubos-guia com a finalidade de orientar os referidos brotamentos até ao segmento distal e ao mesmo tempo poder criar um microambiente no interior do tubo-guia, capaz de facilitar a regeneração do nervo (Lundborg *et al.*, 1982; Gibson *et al.*, 1991; Madison *et al.*, 1992; Hundson *et al.*, 2000; Lee e Wolfe, 2000; Heijke *et al.*, 2001; Meek e Coert, 2002).

Normalmente o axónio regenerado tem um diâmetro mais reduzido do que o seu diâmetro original o que explica que nestas situações a velocidade de condução do

impulso nervoso também seja mais lenta (Kierszenbaum, 2004). Outra explicação para esta diminuição da velocidade de condução do impulso nervoso é a diminuição de distância entre os nódulos de Ranvier, isto é, da distância internodal, que se observa no segmento distal, e que está intimamente relacionada com o processo de mielinização (Terenghi, 1999).

2.2.1.2.1. REINERVAÇÃO MOTORA PREFERENCIAL

A recuperação funcional das lesões do nervo periférico requer uma grande precisão da regeneração dos axónios do nervo lesionado até ao seu órgão alvo original. Infelizmente, após reparação cirúrgica do nervo, a regeneração dos axónios motores é muitas vezes dirigida para órgãos alvo sensoriais e vice-versa, o que poderá ser a explicação para os maus resultados obtidos (Brushart, 1991). O conhecimento deste mecanismo é de extrema importância para os avanços da Neurociência Clínica.

A **Reinervação Motora Preferencial** (**RMP**) é a tendência que têm os axónios motores de nervos mistos, de reinervarem selectivamente o músculo (Brushart, 1988) ou o nervo muscular (Madison *et al.*, 1996; Brushart, 1988, 1993; Brushart *et al.*, 1998). A regeneração de axónios proximais que penetram, no segmento distal na via incorrecta, isto é, axónios motores que vão ocupar tubos endoneurais distais sensitivos ou vice-versa, é reconhecido como um possível mecanismo para a falha de recuperação funcional (Brushart, 1988), no entanto, a extensão em que ocorre este fenómeno ainda não está bem determinada (Lundborg *et al.*, 1986).

Muitos autores, neste âmbito, têm investigado em animais de laboratório e utilizando para tal o modelo do nervo femoral, visto este se dividir em duas vias distintas – nervo safeno, ramo cutâneo e sensitivo cujo órgão alvo é a pele e nervo quadricípede femoral, ramos muscular e motor cujo órgão alvo é o musculo quadricípede femoral. Demonstraram, que após lesão do nervo periférico, existe uma preferência para a reinervação das vias motoras em relação às vias sensitivas, à qual Brushart e seus colaboradores em 1998 chamaram de Reinervação Motora Preferencial (RMP) (Brushart, 1988; Madison *et al.*, 1996; Brushart *et al.*, 1998; Al-Majed *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 2004; Robinson e Madison, 2004, 2005, 2006; Lloyd *et al.*, 2007).

Foi observado que desde que seja mantido o contacto com os órgãos alvo normais, inicialmente os axónios motores podem crescer em direcção a ambas as vias, no entanto, ao fim de algum tempo acabam por mostrar preferência pelo ramo terminal do músculo (Robinson e Madison, 2004). Os axónios motores que correspondem correctamente com as vias motoras parecem receber sinais positivos que suportam a sua regeneração, enquanto que, quando esta correspondência não existe parece haver uma perturbação

efectiva (Brushart, 1993). Este fenómeno parece não ser único para os axónios motores, mas também para os axónios sensoriais (Madison *et al.*, 1996). Também surpreendentemente, mais tarde Robinson e Madison entre 2003 e 2006 demonstram que este fenómeno de RMP, não é tão linear como parecia, apresentando estudos que contradizem tais pressupostos. Estes autores testam diferentes espécies (Robinson e Madison, 2005), diferentes técnicas cirúrgicas (Robinson e Madison, 2003) e diferentes idades (Robinson e Madison, 2006) entre outras variáveis. Utilizando diferentes animais, de experimentação, demonstraram que, quando não é mantido o contacto com o órgão alvo, não há preferência para a reinervação motora mas sim preferência dos axónios motores seguirem as vias sensitivas (Robinson e Madison, 2005).

A **idade** tem grande influência na especificidade regenerativa observada na teoria da RMP (Brushart, 1991; Le *et al.*, 2001; Robinson e Madison, 2006), isto é, a RMP, no nervo femoral de rato, decresce com o aumento da idade (Le *et al.*, 2001). Utilizando ratos em diferentes idades (3 e 6 semanas) e desde que não haja contacto com o tecido alvo, a teoria de RMP é confirmada em ratos neonatais, mas existe um desvio em direcção à via sensitiva quando a reparação é realizada mais tarde (Robinson e Madison, 2006). Talvez por os animais jovens terem um número mais elevado de axónios motores ou porque a área de axoplasma dos axónios motores ser maior do que nos axónios sensitivos (Brushart, 1988; Robinson e Madison, 2004). O que corresponde à diferença arquitectónica entre axónio motor e axónio sensitivo é o facto das fibras do axónio motor terem maior diâmetro. Tal como também existe uma menor densidade de fibras quando comparadas com uma imagem de um nervo sensitivo (Ghalib *et al.*, 2001). A mesma explicação é válida quando foi observado por Robinson e Madison em 2004 e 2005 em ratos, que o tamanho (ou volume) do ramo cutâneo em contacto com a pele, faz aumentar significativamente o número de axónios motores que inervam o ramo nervoso. É sabido também que a interacção entre o corpo celular e o axónio é comprometido pelo decréscimo do transporte axonal anterógrado (Brunetti *et al.*, 1987) e retrógrado (Jacob e Robbins, 1990), tal como há um decréscimo da produção de receptores de factores neurotróficos em neurónios velhos (Johnson *et al.*, 1996). Também lesões do nervo numa idade mais jovem, podem diminuir a morte do corpo celular do motoneurónio lesionado e dessa forma contribuir para a especificidade da regeneração observada na RMP (Le *et al.*, 2001). É geralmente aceite, que idades mais jovens têm um maior potencial de produzir brotamentos axonais, quando comparados com pacientes mais velhos e portanto maior capacidade de regeneração.

Utilizando em ratinhos, como método de reparação cirúrgica, a cola de fibrina, em comparação com sutura clássica com monofilamento de nylon 11-0, foi possível demonstrar a teoria de RMP (Robinson e Madison, 2003). O que pode levantar algumas

hipóteses em relação aos componentes desde produto, como por exemplo fibronectina, factor XIII, plasminogénio, trombina, aprotinina de origem bovina, cloreto de cálcio (Robinson e Madison, 2003). No entanto este mesmo achado não foi confirmado em ratos (Robinson e Madison, 2004).

A **gravidade da lesão** do nervo, incluindo a distância e a presença de algum tipo de material que possa estabelecer a ponte entre os dois topos do nervo, poderá também influenciar a maior ou menor ocorrência do fenómeno de RMP (Madison *et al.*, 1999). Em suturas topo-a-topo directas e em enxertos de nervo, os axónios em regeneração encontram-se imediatamente em contacto com o microambiente da linha de sutura, enquanto que, quando é utilizada a técnica de tubulação, os axónios inicialmente regeneram para um espaço vazio, resultando num menor número de axónios motores que eventualmente contactem com o músculo (Madison *et al.*, 1999). Por outro lado, sabendo que a lâmina basal das células de Schwann (tubos de células de Schwann) servem de guia aos axónios em regeneração, sempre que esta estrutura é preservada, como no caso do simples esmagamento, prevê-se portanto que os axónios atinjam os seus órgãos alvo com maior precisão (Witzel *et al.*, 2005). Também o **local da lesão** poderá ter importância, tal como foi demonstrado por Maers *et al.*, 2003 e Madison *et al.*, 1996, que utilizando diferentes locais de lesão do nervo femoral, obtiveram diferentes resultados, isto é, a RMP no rato é melhor quando a transsecção e reparação do nervo ocorre mais perto da bifurcação do nervo femoral (Madison *et al.*, 1996). Possivelmente, por haver diferenças moleculares muito subtis nos diferentes locais (Franz *et al.*, 2005). Muitos estudos têm vindo a ser realizados numa tentativa de explicação para este facto. Das primeiras explicações que surgem são a influência de **factores tróficos** produzidos pelos órgãos alvo (músculo e/ou pele), visto muitas das experiências em que não é demonstrada teoria da RMP, usarem modelos em que não é mantido o contacto com o órgão alvo. Parece que quando é mantido o contacto com o músculo há mais suporte trófico para a regeneração dos axónios motores (Brushart, 1993; Robinson e Madison, 2004; Madison *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2005). O mesmo parece acontecer aos neurónios motores quando é mantido o contacto com a pele e retirado o contacto como músculo, isto é, os neurónios motores mostram preferência pela inervação das vias cutâneas (Robinson e Madison, 2004; Redett *et al.*, 2005). Por exemplo, o epítopo de carbohidratos L2/HNK-1 é produzido em quantidades significativas pelas células de Schwann somente quando os axónios motores interagem com as vias motoras (Martini *et al.*, 1994; Mears *et al.*, 2003; Robinson e Madison, 2004; Nichols *et al.*, 2004). Por outro lado, também parece que o tamanho do ramo cutâneo e/ou em contacto com a pele aumenta significativamente o número de neurónios motores que enervam esse ramo (Robinson e Madison, 2004). De uma forma geral, parece que o volume do nervo alvo e/ou em

contacto com a pele aumenta o número de axónios que se projectam até esse alvo (Robinson e Madison, 2005). É de notar que existem estudos que confirmam que alguns factores neurotróficos como: o factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), o factor de crescimento do nervo (NGT) e a neurotrofina-3, são produzidos pela pele e que poderão ou não ter alguma influência na capacidade que a pele tem de facilitar a recuperação fisiológica em neurónios espinhais axotomizados (Robinson e Madison, 2004).

Como temos vindo a demonstrar a especificidade de reinervação sensitiva/motora parece não ser absoluta (Brushart, 1988). Esta especificidade poderia ser também ajudada por um **alinhamento dos topos** o mais perfeita possível, com o objectivo de evitar a dispersão das fibras motoras e sensoriais no local de secção do nervo. No entanto, parece que o mecanismo de reinervação motora preferencial é independente deste alinhamento, tal como Brushart em 1988 demonstra, através da realização de uma experiência em que provoca um desalinhamento de 90º entre os topos, em animais adultos e jovens. Mais recentemente, foi demonstrado que apesar de haver uma certa RMP, a vantagem que é conferida ao enxerto de nervo motor parece vir a perder-se quando é utilizado nervo fragmentado, o que vem dar uma grande importância à preservação da arquitectura do nervo (Lloyd *et al.*, 2007).

O mecanismo de **RMP** foi explicado por Brushart em 1988 por 3 mecanismos: i) Neurotropismo, em que a regeneração axonal até aos tubos de células de Schwann é mediada por factores difusos (Cajal, 1928); ii) Reconhecimento especifico em que a lâmina basal das células de Schwann preserva pistas para que possam ser reconhecidas pelos axónios em regeneração (Lundborg *et al.*, 1986) especialmente as diferenças de glicoconjugados de superfície em axónios sensoriais e motores; iii) Actividade neurotrófica, que corresponde à existência de vários factores de crescimento encontrados no local, já bem documentada por vários autores. No entanto, tais mecanismos podem, sem dúvida, ser alterados e influenciados de tal forma, que em determinadas condições não se manifeste como RMP, mas sim de forma contraditória.

De uma forma geral, pode afirmar-se que, em certas condições os neurónios motores podem ter preferência para as vias cutâneas ou sensoriais em relação à sua via muscular original (Robinson e Madison, 2006). Fala-se especialmente de um mecanismo molecular de regulação da RMP (Franz *et al.*, 2005).

Estes conhecimentos, poderão ajudar na prática clínica e representar um potencial de pressupostos, capazes de melhorar o prognóstico em determinadas lesões de nervos motores ou sensoriais e ainda, poder seleccionar melhor, possíveis transplantes. Na prática clínica, em autotransplantes, é muitas vezes utilizado enxertos de nervo sensorial para reparar defeitos de nervo motor o que poderá ser prejudicial. Não obstante, permanece ainda por esclarecer os possíveis efeitos deletérios que as vias impróprias

têm, sobre a regeneração axonal e está ainda também, por confirmar todos estes mecanismos de RMP em humanos. No entanto, Madison *et al.* em 1999 demonstram que a teoria da RMP também tem lugar em primatas não humanos, utilizando macacos nas suas experimentações. Visto já terem sido confirmadas as diferenças entre ratos e ratinhos (Robinson e Madison, 2005), esta confirmação em primatas representa grande importância, a fim de tornar possível a aplicabilidade destes conhecimentos na prática clínico-cirurgica, quer em animais de companhia quer em humanos. Pelo que acabamos de constatar, pensamos que este seja um tema ainda muito confuso e ainda pouco claro, pelo que, venha no futuro, a ser alvo intensas investigações.

2.2.2. FACTORES QUE INFLUENCIAM A DEGENERESCÊNCIA E REGENERAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

A insuficiente e/ou muito prolongada recuperação funcional de lesões do nervo periférico, tem levado os investigadores ao longo destes últimos anos ao estudo sobre este tema. Muito se tem estudado e avançado com o desenvolvimento da biologia celular e molecular. No entanto, há que não esquecer determinados factores que influenciam a regeneração do nervo periférico, alguns deles já falados em 2.2.1.2., e que estão inerentes ao **tipo de lesão do nervo** que temos em causa, isto é, de estiramento (neurapraxia) (Spiegel *et al.*, 1993), de esmagamento (axonotmese) (Witzel *et al.*, 2005), secção ou secção com perca de subtância (neurotmese), e dentro destes últimos interessa saber a distância entre os topos do nervo **(**Madison *et al.*, 1999). O **local da lesão** é importante, ou seja, a maior ou menor proximidade com o corpo celular (Maers *et al.*, 2003; Madison *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 2005, Pfister *et al.*, 2007), sendo que, quanto mais distal pior é o prognóstico (Hudson *et al.*, 2000). O **local da lesão em relação à distância da medula espinhal** parece também ter importância, visto quanto mais distais forem as lesões melhor é o prognóstico, talvez devido ao facto de quanto mais distal mais delineada está a divisão entre nervo motor e sensitivo (Chalfoun *et al.*, 2006). Deste modo, os nervos sensitivos parecem responder melhor à regeneração do que os nervos motores (Evans, 2003). A **distância entre os dois topos** é um factor crucial para determinar a capacidade de regeneração do nervo em causa e como tal de extrema importância para se poder determinar qual o prognóstico clínico (Pfister *et al.*, 2007). Um outro factor importante a ter em conta e ainda pouco esclarecido, é o período que decorre entre a lesão e realização da cirurgia, bem como estabelecer o **período crítico** durante o qual não ocorram alterações irreversíveis capazes de comprometer a reparação cirúrgica (Peker *et al.*, 2005). No caso de reparação de lesões agudas tal problema não se coloca, no entanto, na prática clínica nem sempre há possibilidade de actuar imediatamente,

pelas mais variadíssimas razões. É sabido que, quanto mais precoce for a reparação cirúrgica melhores são os resultados (Peker *et al.*, 2005). Sabe-se mais especificamente, que se a reparação cirúrgica ocorre dentro das primeiras 4 semanas obtemos melhor recuperação funcional (Sulaiman e Gordon, 2000; Sulaiman *et al.*, 2002). A **técnica de microcirurgia,** bem como a **experiência do cirurgião,** incluindo materiais utilizados (de que falaremos mais tarde) são também factores importantes a ter em atenção (Robinson e Madison, 2004).

O **pós-operatório** instituído durante o período de recuperação, nomeadamente técnicas de fisioterapia e/ou de exercício físico, com a finalidade de contrariar uma das principais razões que têm vindo a ser descritas por vários autores, como uma razão de extrema importância para a má recuperação funcional, que é o longo tempo de inactividade do músculo desinervado. Pensamos que este é um tema ainda pouco documentado, isto é, a influência que o exercício físico, nomeadamente em associação com outros métodos, tem na regeneração do nervo periférico.

Uma vez esgotados os refinamentos das técnicas de microcirurgia, bem como o conhecimento do neurologista, o melhoramento dos resultados clínicos, em lesões do nervo periférico, que têm vindo a ser obtidos, parecem ser à custa do maior conhecimento da **biologia celular e molecular** da regeneração do nervo (Dubový, 2004). Quanto maior for o conhecimento acerca dos factores celulares e moleculares que modulam o processo após a lesão de um nervo periférico, mais estratégias e terapêuticas poderemos protagonizar com o objectivo de minimizar as lesões e promover a recuperação. Nos últimos anos e com métodos de biologia molecular, tem sido amplamente investigado a degenerescência Walleriana, o grande número de substâncias produzidas nesta fase e da importância dos factores de crescimento e citoquinas, bem como também de substâncias farmacológicas com capacidade intervir na regeneração do nervo periférico.

Quando comparado com o SNC, o SNP tem grande capacidade de regeneração, o que lhe confere um prognóstico favorável em algumas neuropatias axonais. Assim iremos fazer uma revisão sobre alguns destes factores de crescimento e citoquinas com os quais existem já conhecimentos e experiências realizados por muitos investigadores. Para melhor sistematização e compreensão deste assunto chamámos de **factores endógenos (quimiotropismo),** todos aqueles que são produzidos pelo próprio organismo, mas que no entanto, também podem ser suplementados e administrados; e os **factores exógenos** os que não sendo produzidos pelo próprio organismo apenas poderão ser administrados ou expostos a partir do ambiente externo.

2.2.2.1. FACTORES ENDÓGENOS

Um dos primeiros mecanismos celulares que ocorrem no local da lesão é a proliferação das **células de Schwann**. As células de Schwann iniciam também a produção de um grande número de moléculas neurotróficas e neurotrópicas que promovem o crescimento do axónio a partir do segmento distal (Cajal, 1928; Dubový, 2004). Interessa aqui relembrar e realçar a importância do segmento distal na produção deste grande número de substâncias. Os neurónios têm preferência de crescimento ao longo dos cordões de células de Schwann do endonervo do segmento distal, servindo desta forma de orientação ao crescimento axonal (Dubový, 2004). Também é sabido que os axónios motores apresentam um elevado número destes cordões de células de Schwann quando comparados com os axónios sensitivos, fornecendo deste modo um melhor ambiente à regeneração axonal (Llyod *et al.*, 2007). Apesar de Evans em 2003 afirmar que os neurónios sensitivos responderem melhor à regeneração do que os neurónios motores (Evans, 2003). Em 1986 Kuffler, confirmou que a atracção pelo segmento distal depende da presença de células de Schwann viáveis. Também se tem investigado acerca do fenómeno de selectividade de crescimento dos axónios sensitivos e motores, e muita controvérsia ainda existe sobre a maior ou menor capacidade e/ou velocidade de regeneração entre estes dois tipos de axónios. Tal como já falado no ponto 2.2.1.2.1., parece que em determinadas situações o crescimento dos axónios sensitivos se sobrepõe ao crescimento dos axónios motores ocupando os tubos endoneurais dos axónios sensitivos e motores, bloqueando desta forma o crescimento dos axónios motores até aos seus órgãos alvo (Suzuki *et al.*, 1998; Dubový, 2004). A capacidade de migração das células de Schwann até uma distância limitada num segmento de enxerto acelular poderá explicar a capacidade também limitada, de regeneração destes mesmos axónios (Dubový *et al.*, 2001). Com base nestes conhecimentos, as células de Schwann têm sido utilizadas por alguns investigadores, para promover a regeneração do nervo periférico (Gravvanis *et al.*, 2005). Não há dúvida de que existe um sincronismo biológico que gere os vários sinais ambientais locais e que é responsável pela regeneração do nervo e também não há dúvida de que este sincronismo está longe de ser completamente compreendido (Gravvanis *et al.*, 2005).

A **matriz extracelular do endoneuro** (MEC) corresponde ao conjunto de substâncias que envolvem cada fibra nervosa, enche todos os espaços intrafasciculares e que é limitada pelo perineuro. Este conjunto de moléculas é produzido pelas células de Schwann e fibroblastos, sob controlo do axónio e têm a capacidade de inibir ou estimular o crescimento axonal (Carey *et al.*, 1982). A matriz endoneural contém quatro categorias de componentes: colagénios, glicoproteínas não-colagénios (fibronectina, laminina,

tenascina, etc.), glicosaminoglicanos e proteinoglicanos (Dubový, 2004). O microambiente criado por este conjunto de substâncias, funciona como ambiente de suporte para o crescimento e regeneração axonal e vai sendo deteriorado à medida que a reparação do nervo se atrasa (Fu e Gordon, 1995). Infelizmente o baixo ritmo de regeneração faz com que este ambiente de suporte se possa deteriorar, antes mesmo, que os motoneurónios estejam regenerados, reduzindo por sua vez, a capacidade desses mesmos neurónios se regenerarem (Sulaiman *et al.*, 2002).

Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo recrutamento de monócitos-macrófagos durante a fase de degenerescência, ainda não são largamente conhecidos. São várias as moléculas, que sendo conhecidas como MACs (moléculas de adesão celular) que têm um papel importante nos fenómenos de adesão entre axónios, entre axónio e célula de Schwann e axónio de membrana basal, regulando desta forma o processo regenerativo do nervo periférico (Varejão, 2003). Algumas moléculas de adesão celular têm um papel importante, como por exemplo: ICAM-1 (*endothelial cell adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1*), moléculas MAC-1 (*complement receptor type 3*), LFA-1 *(lymphocyte function-associated antigen-1*) (Avelino *et al.*, 2004). Foi demonstrado que após transsecção do nervo ciático, há um aumento da expressão de MAC-1 e LFA-1 após o 2º dia, aumentando até ao 14º dia, enquanto que de ICAM-1 é máximo ao 3º dia e decresce até aos níveis basais até ao 14 º dia (Avelino *et al.*, 2004).

Após lesão de um nervo, a lâmina basal dos tubos neuronais permanecem íntegros no segmento distal, enquanto que os axónios e a mielína são degradados. Esta lâmina basal inclui algumas moléculas importantes como o colagénio tipo IV (Carey *et al.*, 1982), laminina, nidigenina e entactina (Dubový *et al.*, 2001).

O colagénio tipo IV, mais especificamente o seu precursor, o procolagénio tipo IV, foi demonstrado *in vivo* e em culturas de células de Schwann de rato, ser sintetizado, segregado e incorporado no interior da matriz extracelular (Carey *et al.*, 1982). Foi também demonstrado, a síntese, por parte da linha celular de neuroblastomas, de procolagénio tipo IV e de outras proteínas da lâmina basal (Alitalo *et al.*, 1980).

A **laminina** é uma glicoproteina produzida pelas células de Schwann, predominantemente localizada na lâmina basal e a sua função biológica inclui: o crescimento e migração celular, a regeneração de tecidos, a diferenciação celular e a adesão celular (Dubový *et al.*, 2001; Dubový, 2004; Akassoglou e Strickland, 2002). Especificamente no nervo periférico, intervém directamente como substrato na regeneração axonal e indirectamente suportando um ambiente próprio às células de Schwann (Chen *et al.*, 2007). Tendo um papel importante não só na estimulação do crescimento axonal como também na especificidade de reinervação dos tecidos alvo (Kauppila *et al.*, 1993; Dubový, 2004).

A **fibronectina** é uma glicoproteina da MEC com funções de adesividade entre células e entre célula e membrana basal e é um potente promotor do crescimento axonal e da migração das células de Schwann (Tong *et al.*, 1994).

As **tenascina** e as **tromboplastinas** também são glicoproteínas com capacidade de promover o crescimento axonal (Dubový, 2004).

Desde há alguns anos, a **lâmina basal** de músculo tem sido investigada, como um material capaz de suportar a regeneração do nervo periférico em intervalos de 0.5 cm, com resultados na recuperação, idênticos aos de autoenxertos (Fawcett e Keynes, 1986).

O **ácido polisiálico** (PSA) promove o RMP, pois parece aumentar a formação de brotamentos colaterais supranumerários, ou seja, o volume de arborização no local de regeneração e ainda é capaz de mediar o mecanismo de retirada dos axónios que se projectam inapropriadamente nas vias cutâneas (Franz *et al.*, 2005). Pensa-se que a capacidade que o PSA tem de promover a RMP é devida à sua capacidade de regular o nível necessário de adesão axónio-axónio (Franz *et al.*, 2005).

A **Netrina -1** e **2** são proteínas presentes em alguns músculos de varias espécies animais e são encontrados uma série de classes de receptores de netrinas nos neurónios motores espinhais, o que sugere que estas poderão ter alguma influência no desenvolvimento do sistema nervoso periférico (Madison *et al.*, 2000). Estudos realizados por Madison *et al.* em 2000, observaram que em ratos, a netrina-1 não tem expressão marcada quer em nervos normais quer 2 semanas após uma lesão de esmagamento, no entanto, apresentam uma marcada expressão 2 semanas após uma lesão de transsecção e reparação. A explicação para este facto poderá ser através da falta de contacto axonal das células de Schwann no caso das lesões por transsecção, pelo maior tempo de desinervação das células de Schwann, ou ainda outra explicação poderá ser pela estimulação da produção de neutrina ser resultado do contacto do axónio proximal com o axónio distal errado, o que será pouco provável no caso de lesões por esmagamento, visto neste tipo de lesão, se manter a integridade e continuidade da lâmina basal do tubo do endoneuro (Madison *et al.*, 2000). Esta poderá também ser uma explicação possível para a reinervação motora preferencial, tal como acontece com o **epítopo de carbohidrato L2/HNK-1** (Martini *et al.*, 1994; Madison *et al.*, 1996, Mears *et al.*, 2003; Robinson e Madison, 2004; Nichols *et al.*, 2004).

O **Monóxido de Azoto** (NO) é um radical livre com funções biológicas a nível do sistema nervoso central e periférico (Garthwaite, 1991), cardiovascular (Johnson e Billiar, 1998) e imunitário (Kilbourn *et al.*, 1997). Sabe-se que, as lesões do nervo periférico induzem um aumento da expressão da isoenzima iNOS (*inducible nitric oxide synthase)* nas células do gânglio de raiz dorsal ipsilateral, tal como a sua manutenção de níveis altos, durante aproximadamente de 2 meses (Verge *et al.*, 1992). Há estudos que sugerem que o NO

pode induzir efeitos pronociceptivos a baixas concentrações e antinociceptivos a altas concentrações (Zakaria *et al.*, 2005). A síntese de monóxido de azoto a partir da L-arginase através da sua isoenzima iNOS (Verge *et al.*, 1992; Condi *et al.*, 2004) tem grande importância na patogenia do processo de mediação celular de desmielinização e possivelmente também na indução de citotoxicidade (Condi *et al.*, 2004). O NO pode causar morte celular por apoptose e/ou necrose (Bal-Price e Brown, 2000). Deve-se ter em conta o papel da iNOS na regeneração do nervo e no futuro considerar a sua possível utilização farmacológica em processos de desmielinização (Conti *et al.*, 2004).

Os **Radicais Livres de Oxigénio** são os produtos resultantes da degradação dos lipídos por peroxidação através da enzima peroxinitritase, dos quais quer os SNC quer o SNP são ricos, cujas principais substâncias são: glutatião peroxidase, glutatião reductase e a catalase (Khalil *et al.*, 1999). Tal como NO também outros radicais livres de oxigénio aumentam com a idade e encontram-se associados a determinadas doenças relacionadas com o envelhecimento. Parecem ao mesmo tempo ter um papel importante na dor neuropática (Khalil *et al.*, 1999) e contribuir para a hiperalgesia verificada nas lesões do nervo periférico (Khalil e Khodr, 2001), isto é, são um dos componentes que modulam o fenómeno fisiopatológico associado à lesão do nervo (Khalil *et al.*, 1999). Estes radicais livres poderão ser um dos factores responsáveis pelo atraso da recuperação após lesão do nervo periférico, que se verifica com o aumento da idade (Khalil e Khodr, 2001). A avaliação do atraso da recuperação de um nervo lesado com a idade pode ser avaliado e monitorizado através da hiperalgesia térmica e do fluxo sanguíneo microvascular na área de pele inervada pelo nervo lesionado (Khalil *et al.*, 1999; Khalil e Khodr, 2001). Estas afirmações poderão sugerir o estudo da aplicação e do papel dos antioxidantes, como agentes capazes de acelerar a recuperação do nervo lesado, e uma possível intervenção farmacológica deste tipo de agentes. No entanto, o estudo realizado por Khalil *et al.*, 1999 demonstra o aumento de radicais livres no local de compressão crónica do nervo ciático, tal como o seu contributo para a manutenção da hiperalgesia térmica, e ainda redução da resposta vascular no local enervado pelo ciático. Mas mais tarde, Khalil e Khodr em 2001 revelam que, quando em animais jovens os radicais livres têm um papel positivo na regeneração do nervo, bem como a utilização de agentes antioxidantes têm papel negativo e quando utilizados numa fase inicial, sendo que o contrário acontece quando utilizado em animais velhos (momento em que os níveis de radicais livres aumentam).

A **quinona pirroloquinolona (PQQ**) é um agente antioxidante, capaz de estimular a regeneração do nervo periférico (Lui *et al.*, 2005) através de três mecanismos: i) bloqueando o processo oxidativo característico da lesão de todos os tecidos (nervoso e tecidos moles vizinhos); ii) sendo um promotor da proliferação celular também estimula a

proliferação das células de Schwann e iii) promovendo a síntese do factor de crescimento do nervo (NGF) (Lui *et al.*, 2005).

O **GABA** (ácido gama-amino butirico) é um neurotransmissor inibitório com um papel na regulação da transmissão nociceptiva, parece ter importância no comportamento de sinais de alodinia e também grande importância nos mecanismos de dor espinhal (Pogár *et al.*, 2003). Existe uma grande controvérsia neste tema, com diferentes resultados obtidos por diferentes autores, talvez devido a diferentes técnicas de imunohistoquimica utilizadas. No entanto, parece haver alterações da expressão do GABA a nível do corno dorsal do SNC quando há lesões do nervo periférico, nomeadamente no ciático e em modelos de constrição crónica ou de secção (Pogár *et al.*, 2003).

Os **Factores Neurotróficos** incluem as citoquinas e os factores de crescimento que são sintetizados pelo tecido alvo, pelas células da glia (no SNP as células de Schwann) e também pelo neurónio (Yuen, 2001). Estes factores são estruturalmente e funcionalmente relatados como polipeptídeos, que suportam o desenvolvimento, a manutenção e a plasticidade das distintas populações de neurónios do sistema nervoso central e periférico (Fu e Gordon, 1997; Terenghi, 1999; Chen *et al.*, 2007). Os efeitos das moléculas dos factores neurotróficos parecem estar limitados, à distância entre os dois topos, e que é estimada em cerca de 5 mm (Kuffler, 1989; Dubový, 2004). Os factores de crescimentos foram considerados endógenos, mas poderão ser também adicionados no local da lesão. Tradicionalmente, a forma de aplicação é feita através de tubos ou injecções, cuja concentração se torna quase impossível de regular. Um método alternativo que tem vindo a ser explorado, é através da tecnologia de microesferas de libertação lenta (Schmidt e Leach, 2003). No entanto, persiste o problema da sequência, tempo, dose e duração de libertação desses factores, focando-se agora mais na sua aplicação através da terapia genética utilizando para isso, vectores virais ou plasmídeos (Chalfoun *et al.*, 2006). Os factores neurotróficos induzem o crescimento axonal por via intracelular, de uma forma idêntica às proteínas de matriz extracelular e de uma forma ainda pouco clara. No entanto, os seus efeitos a nível da regeneração do nervo periférico são optimizados através de efeitos balanceados entre ambos, isto é, a falta de factor neurotrófico no local regeneração pode ser compensada por outro factor ou outra proteína de matriz extracelular, o que por sua vez quererá dizer que a adição de factores neurotróficos exógenos poderá perturbar este equilíbrio (Chen *et al.*, 2007).

O **BDNF** (Factor de Crescimento Derivado do Cérebro) é um factor neurotrófico que tem vindo a ser estudado, como um factor que induz a diferenciação celular, bem como previne a morte celular dos neurónios lesados (Sendtner *et al.*, 1992). Caracteriza-se pela sua elevada afinidade para o receptor TrkB (receptor de tirosina quinase B) e baixa afinidade para o receptor p75 (Al-Majed *et al.*, 2000a). A síntese de BDNF e de TrkB

aumenta após lesão dos motoneurónios (Kobayashi *et al.*, 1996). Também é sabido que a regulação da produção de BDNF está ligada à actividade eléctrica (Al-Majed *et al.*, 2000a; Al-Majed *et al.*, 2000b). No entanto, foi demonstrado por Gordon *et al.* em 2003 que elevadas doses de BDNF localmente, não aumentam o número de motoneurónios que regeneram no axónio, têm inclusivamente, um efeito inibitório na regeneração axonal (Gordon *et al.*, 2003). Ao contrário, baixas doses de BDNF facilitam a regeneração axonal imediatamente após a reparação do nervo periférico e aumentam significativamente o número de motoneurónios que regeneram no axónio (Gordon *et al.*, 2003; Boyd e Gordon, 2002).

O **NGF** (Factor de Crescimento do Nervo) intervêm na sobrevivência, crescimento e diferenciação dos axónios e vários autores têm demonstrado, ter capacidade significativa para melhorar a regeneração do nervo após lesão (Rich *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1998). É uma proteína sintetizada pelo músculo-estriado desinervado e liga-se exclusivamente ao receptor p75 no axónio motor em regeneração e pode possibilitar um aumento adicional da acção inibitória dos sinais p75-independentes (Gordon *et al.*, 2003). Assim juntamente com outros sinais músculo-derivados, que incluem a s-laminina, podem servir de sinais de paragem do crescimento axonal, e/ou por sua vez facilitar a reinervação das placas motoras desinervadas. É interessante notar que, assim que começa a emergir o receptor p75 este está ubiquitariamente envolvido na inibição do crescimento do axónio (Gordon, *et al.*, 2003). O receptor p75 liga-se a todas as neurotrofinas e tem grande importância na forma de regulação e actuação dos factores neurotróficos, bem como outros receptores como sejam: Trk A, B e C (Gordon *et al.*, 2003).

O **TGF-α** (Factor de Necrose Tumoral alfa) e a **interleucina 1α,** são segregados pelas células de Schwann, ajudam no recrutamento de macrófagos para o topo distal e portanto têm grande importância na fase de degenerescência Walleriana (Wagner e Myers, 1996; Stoll *et al.*, 2002), promovendo a apoptose e podendo também ter influência como suporte na maturação e diferenciação dos neurónios (Stark *et al.*, 2001). O TGF-α, usado em recombinação com uma solução salina, aplicado intraperitonealmente e antes da lesão do nervo, promove a recuperação funcional do nervo periférico em ratos (Chen *et al.*, 1998).

O **CNTF** (Factor Neurotrófico Cilar) promove a sobrevivência dos neurónios e o brotamento no local lesionado (Siegel *et al.*, 2000). A aplicação exógena de CNTF está associada a um aumento dos níveis de regeneração do nervo periférico (Newman *et al.*, 1996).

O **GDNF** (Factor de Crescimento Derivada das Células da Glia) também parece estar relacionado com o melhoramento da regeneração do nervo periférico (Fine *et al.*, 2002).

Também algumas **citoquinas** contribuem para a regeneração do nervo periférico, entre elas são a interleucina-6, factor inibitório leucémico (Chen *et al.*,2007).

A **GAP-43** é uma proteína essencial para a formação do cone de crescimento e alongamento do axónio (Sulaiman *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007), e tal como a neuroregulina, os seus receptores erbB também promovem a proliferação de células de Schwann (Gordon *et al.*, 2003).

A **MAG** (Glicoproteina Associada à Mielina) é uma molécula que tem um efeito inibitório sobre o crescimento dos axónios no nervo periférico (Torigoe e Lundborg, 1998; Dubový, 2004). Intrigantes resultados, têm sido obtidos através da injecção de anticorpos para a MAG, em que parece existir uma marcada aceleração e aumento preferencial na reinervação motora do nervo femoral, em contraste com a regeneração sensorial (Mears *et al.*, 2003).

A **acetil-L-carnitina (ALCAR**) é um peptídeo fisiológico com papel na função bioenergética mitocondrial, facilitando o transporte de moléculas de ácidos gordos de cadeia longa ao longo da membrana mitocondrial, intervêm na glicolise oxidativa e tem actividade antioxidante prevenindo a lesão celular por acção dos radicais livres de oxigénio (Tesco *et al.*, 1992), contribuindo desta forma em todos os mecanismos que intervêm na regeneração neuronal. A ALCAR deste modo incrementa a ligação entre o NGF com os neurónios sensoriais. Parece ser o primeiro agente que previne a morte neuronal após a lesão do nervo periférico (Hart *et al.*, 2004). A ALCAR tem uma acção neuroprotectora, *in vitro* e *in vivo* aumenta a regeneração na lesão do nervo periférico, sendo que alguns ensaios clínicos com ALCAR, têm demonstrado resultados promissores no tratamento de neuropatias diabéticas (De Grandis *et al.*, 1995) e ainda em neuropatias periféricas observadas em doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana tipo I e II (HIV I e HIV II) (Hart *et al.*, 2000).

Factores	Efeitos nas células de Schwann	Referências
Moléculas de Matriz Extracelular		
Laminina	Efeito durante a remielinização	Chen e Strickland 2003, Masaki *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007
Distroglicano	Manutenção das bainhas de mielina e regulação da espessura de mielina	Masaki *et al.*, 2000; Satio *et al.*, 2003
L-periaxina	Manutenção das bainhas de mielina e regulação da espessura de mielina	Williams e Brophy, 2002
tPA/plasminogénio	Absorve a fibrina e promove a remielinização	Akassoglou *et al.*, 2002
Fibrina	Inibe a remielinização	Akassoglou *et al.*, 2002
Factores Neurotróficos e Receptores		
BDNF (*Brain Derived Neurothrofic Factor*)	Promotor da remielinização	Zhang *et al.*, 2000
p75 NTR (*p75 Neurotrophin receptor*)	Mediador do efeito mielino-promotor do BDNF	Song *et al.*, 2006
FGF-2 (*Fibroblastic growth factor)*	Promotor da proliferação das células de Schwann mas inibe a remielinização durante a regeneração	Jungnickel *et al.*, 2004a; 2006
TGF-β (*Transforming Growth Factor- beta*)	Aumenta o efeito trófico das células de Schwann sobre o crescimento do axónios	Rogister *et al.*, 1993; Sulaiman e Gordon, 2002
Reguladores intracelulares		
Mensageiro *PI 3-Kinase/Akt*	Promotor da remielinização	Ogata, *et al.*, 2004
Ciclina D1	Necessário para a regeneração e proliferação das células de Schwann	Atanasoski *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2000
Hormonas		
Progesterona	Promotor da remielinização	Koenig *et al.*, 1995
Hormona da Tiróide (T3/T4)	Promotor da remielinização	Voinesco *et al.*, 1998
Eritropoietina	Estimula a regeneração das células de Schwann e diminui a expressão de TGF-β nas células de Schwann	Campana *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005

Tabela 1: Resumo de vários factores implicados na regulação das células de Schwann durante o processo de regeneração do nervo periférico (tabela adaptada de Chen *et al.*, 2007),

2.2.2.2. FACTORES EXÓGENOS

Tal como já foi referido, muitos factores influenciam a regeneração nervosa, tais como: o tipo de lesão, o período de desinervação, o diâmetro da fibra lesada, a idade e ainda factores individuais (Sunderland, 1985). No entanto, nestes factores, o clínico ou o cirurgião dificilmente podem intervir, apenas se limitam a conhecê-los e com eles estabelecer a melhor estratégia de tratamento, bem como estabelecer o prognóstico mais correcto. Nos factores a que chamamos exógenos, estão incluídos alguns agentes físicos, tais como a electricidade, os campos magnéticos, os ultra-sons, cuja influência na regeneração de outros tecidos como pele, osso, músculos e tendões já foi estudada (Shen e Zhu, 1995; Mendonça *et al.*, 2003) bem como alguns agentes farmacológicos que podem ser administrados. Estudos recentes mostram que a aplicação de **ultra-sons** em baixa intensidade (0.5 W/cm^2) podem acelerar ligeiramente a regeneração do nervo tibial após uma lesão de compressão moderada (Raso *et al.*, 2005). No entanto, este será mais um dos temas a aprofundar, não só no que diz respeito à utilização deste agente físico nesta e em outras lesões como também na sua extensão de utilização até a outros animais, nomeadamente em humanos.

A **estimulação eléctrica** é capaz de acelerar a regeneração nervosa (Mendonça *et al.*, 2003) e promover a RMP, através da sincronização da reinervação do topo distal (Al-Majed *et al.*, 2000a; Al-Majed *et al.*, 2000b; Brushart *et al.*, 2002; Brushart *et al.*, 2005), no entanto, parece não ter qualquer influência na velocidade dessa mesma regeneração (Brushart *et al.*, 2002). A estimulação eléctrica recruta mais motoneurónios a regenerar-se ao longo da linha de sutura, de forma que estes penetram mais cedo no topo distal (Brushart *et al.*, 2002). O mecanismo pelo qual esta estimulação eléctrica actua a nível da regeneração nervosa, parece ser através do efeito de estimulação do corpo celular nos quais está envolvido a produção de BDNF e do receptor TrkB (Al-Majed *et al.*, 2000b; Al-Majed *et al.*, 2000a) e que por sua vez está envolvido na regulação de cálcio e Adenosina monofosfato ácida (cAMP) (Brushart *et al.*, 2002). Após qualquer lesão do nervo periférico, segue-se um colapso da membrana do axónio, um aumento da intensidade do fluxo de saída dos iões do axoplasma, com passagem de iões Na^+ e Ca^+ para o interior da fibra e uma saída de iões K^+, tornando o axoplasma positivo; sendo que a aplicação de uma corrente eléctrica, pode fazer com que haja uma paragem da entrada de iões de Ca^{2+} para o interior do axónio e criar ao mesmo tempo uma contra-corrente no interior da porção terminal do axónio, estimulando o transporte axonal e contribuindo para a regeneração (Mendonça *et al.*, 2003). Foi demonstrado por Al-Majed *et al.* em 2000 que 1 hora de estimulação eléctrica no momento da reparação da lesão do nervo promove a correcta reinervação (Al-Majed *et al.*, 2000a). Cerca de 40 % dos neurónios originais

aferentes do músculo é reinervado pelo seu nervo muscular original, enquanto que, após estimulação eléctrica cerca de 75% retornam ao seu destino correcto. O que quer dizer que 1 hora de estimulação eléctrica no momento da cirurgia promove o retorno dos axónios sensoriais ao seu tecido de origem (Brushart *et al.*, 2005), o que poderá sugerir um método potencial a vir a ser utilizado na prática clínica. Também foi já estudada por vários autores a intensidade de corrente eléctrica a aplicar: 10 μA, 1,5μA e 1 μA, e parece que a baixa intensidade utilizada por Mendonça e seus colaboradores em 2003 apresenta valores capazes de ter um efeito positivo na regeneração do nervo periférico em ratos em lesões de axonotmese (Mendonça *et al.*, 2003). É claro que as consequências funcionais desta estimulação eléctrica, deverá ser amplamente estudada antes da sua possível utilização em humanos, o que não deixa no entanto, de ser interessante explorar.

O **Stress** é um dos maiores factores que induzem doenças psicossomáticas e os seus efeitos e influências nos vários sistemas têm sido muito estudados nos últimos anos. No entanto, a influência do stress no SNP, permanece ainda pouco clara. Sendo que vários modelos para o estudo do stress, têm sido propostos como: a imersão dos animais de experiência em água durante períodos regulares (Amako e Nemoto, 1998), alterações específicas de calor ou frio (Ohara *et al.*, 1991), vibração por todo o corpo (Nakamura *et al.*, 1990). Utilizando um modelo de esmagamento de nervo periférico sujeito a um factor de stress (imersão em água) Amako e Nemoto concluem, que o stress induzido pela imersão em água, inibe a recuperação do nervo periférico após uma lesão de esmagamento (Amako e Nemoto, 1998). A explicação para tal mecanismo mantém-se ainda por esclarecer, mas levantam-se algumas hipóteses: i) efeito na regeneração do nervo periférico da hormona corticotrófica, ii) reacções e reflexos anormais via sistema nervoso autónomo, iii) influência do stress no SNC provocando libertação agentes neuroquimicos endógenos capazes de afectar os neurónios, iv) influência directa do stress na formação do tecido conjuntivo e formação da cicatriz, v) alterações nutricionais que levem à inibição da síntese de matriz pelo nervo ou transporte axonal, vi) alterações endócrinas ou do Sistema Nervoso Autónomo (SNA) que afectem o sistema vascular do nervo ou a sua barreira hemática (Amako e Nemoto, 1998). Estes estudos poderão representar mais uma conquista sob o ponto de vista clínico, visto ser mais um factor externo a evitar durante o longo processo de regeneração do nervo periférico de forma a melhorar e tornar mais rápida a recuperação.

Para que haja regeneração nervosa e recuperação funcional, é importante que os dois topos do nervo sejam anastomosados o mais cedo possível após a lesão e em casos em que exista espaços entre os topos, por vezes a técnica a que se recorre é a utilização de alotransplantes acompanhados de terapêutica imunossupressiva. Existe evidência de que alguns agentes imunossupressores (FK506, ciclosporina A e outros) têm efeitos

benéficos na regeneração quer do nervo periférico (Sulaiman *et al.*, 2002), quer da medula espinhal do SNC (Sosa *et al.*, 2005).

O **FK506** (tacrólimos) é um agente imunossupressor interveniente na regeneração nervosa que muito tem sido investigado (Gold *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 2002; Udina *et al.*, 2004; Udina *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005; Sosa *et al.*, 2005). A sua utilização foi testada em autotransplantes, alotransplantes e xenotransplantes e em diferentes doses (0,2, 2 e 5 mg/Kg/dia) apresentando-se efectiva na regeneração axonal na dose de 5 mg/Kg/dia em alotransplantes (Udina *et al.*, 2003). O efeito do FK506 é mediado através de receptores – imunofilinos (IP), que são fármacos imunossupressivos potentes e que participam no transporte axonal, em sinapses e têm um papel importante como neuroprotectores contra a agregação proteica anormal, isquémia e citotoxidade, aumentando a velocidade de condução do nervo regenerado (Udina *et al.*, 2004; 2004; 2003) e a recuperação neurológica (Sosa *et al.*, 2005). A forma de actuação e o efeito do FK506 está dependente da molécula de imunofilina ao qual se liga, como por exemplo, o FK506/FKBP-12 ou o FK506/FKBP-52, ambos os complexos com capacidade de promover a regeneração no nervo periférico. Em lesões de axonotomia prolongada, o FK506 quando administrado na dose de 5 mg/Kg/dia durante 3 semanas (Sulaiman *et al.*, 2002) tem a capacidade de duplicar o número de motoneurónios regenerados, de aumentar o número de axónios mielinizados e de aumentar ainda a espessura de mielina, no topo distal (Gold *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 2002). Outros protocolos e outras doses têm sido utilizadas, bem como a sua comparação com outros agentes como é ciclosporina e a metilprednisolona, utilizados isoladamente ou em combinações. Nomeadamente a combinação de doses baixas de FK506 (0,5 mg/kg/dia) em combinação com anti-CD40L mAb pode potenciar a regeneração nervosa em alotransplantes preservando o seu efeito imunossupressor (Brenner *et al.*, 2005). É importante também notar que o FK506 quando utilizado 2 meses após a secção de um nervo, duplica o seu ritmo de regeneração e que o mesmo acontece quando é utilizado logo após a lesão (Sulaiman *et al.*, 2002, Sosa *et al.*, 2005). Múltiplos mediadores imunofilinos de FK506´s com efeitos neuronais, podem representar um grupo de novos fármacos importantes, com papel vital no melhoramento da recuperação neurológica, quer em lesões agudas quer de longo termo, no nervo periférico e medula espinhal (Sosa *et al.*, 2005). Uma outra acção do FK506 parece ser a de estimular a expressão de GAP-43 após lesão do nervo periférico e da medula espinhal. O FK506 foi já utilizado com sucesso em transplantes de mão de humanos, no entanto, serão necessários mais ensaios clínicos para provar a sua eficácia, quando utilizados neste tipo de cirurgias em humanos (Sulaiman *et al.*, 2002). Os FK506 e RS-61443 são efectivos em xenotransplantes e usados frequentemente para induzir a regeneração de axónios ao

longo de um espaço entre dois topos de fibras nervosas (Hebebrand *et al.*, 1997). Existe ainda muito por saber, acerca da acção do FK506 e dos seus mecanismos de actuação, quando combinados com mecanismos neuroprotectores como a hipotermia e a alcalinização ou ainda combinado com factores de crescimento (Sosa *et al.*, 2005). Pensamos que este grupo de fármacos imunossupressores, é uma forte alternativa à utilização de tubos-guia, competindo com a utilização de transplantes de nervo. A utilização de alotransplantes ou mesmo xenotransplantes (quer de tecido nervoso quer de células promotoras de factores neurotróficos), em associação com estes fármacos, permitem colmatar o espaço entre dois topos de fibras nervosas, e ao mesmo tempo, têm a capacidade de serem imunosupressoras (controlando as rejeições) e estimulantes de regeneração nervosa.

O **receptor antagonista canabinoide CB1 (SR141716**) é um agente com propriedades anti-obesidade (Ravinet-Trillou *et al.*, 2004), é um candidato ao tratamento metabólico de alterações cardiovasculares associadas à obesidade humana (Costa *et al.*, 2005) e parece ainda ser efectivo no tratamento de cessação de fumar (Le Fur, 2004). O SR141716 em tratamentos repetidos é capaz de inibir alguns mediadores da inflamação como é caso do TNFα, PGE2, NO e desta forma influenciar positivamente a regeneração do nervo periférico (Costa *et al.*, 2005). O SR141716 é portanto, um agente capaz de modificar a actividade neuroinflamatória no local da lesão de nervo e promover a sua regeneração, favorecendo o processo de remielinização (Costa *et al.*, 2005).

A **dehidroepiandrosterona (DHEA**) injectada de forma subepineural após uma lesão de esmagamento parece melhorar a recuperação funcional do nervo ciático do rato (Gudemez *et al.*, 2002).

A **ALCAR** já falada anteriormente pode ser utilizada clinicamente logo após traumatismo (Hart *et al.*, 2004), através de uma administração exógena.

O **quitosano** é um polisacarideo derivado da quitina com propriedades antitumorais e antimicrobianas que tem sido demonstrado como promotor da migração e proliferação das células de Schwann e portanto, com grande interesse na utilização na regeneração do nervo (Yuan *et al.*, 2004).

3. CONSIDERAÇÕES CIRÚRGICAS

A história moderna da cirurgia do nervo periférico tem mais de 150 anos e várias revisões deste historial encontram-se disponíveis (Seddon H, 1972; Ijkema-Paassen *et al.*, 2004). De início e durante alguns anos, a técnica cirúrgica de reparação do nervo seccionado era a sutura directa de ambos os topos (anastomose primária ou sutura topo-a-topo), sendo que quando havia perda de substância entre os dois topos, o procedimento consistia em realizar uma sutura sob tensão, o que poderia ser responsável pelos maus resultados obtidos (Naff e Ecklund, 2001). No início dos anos 70, foi demonstrado que a interposição de um enxerto autólogo de nervo entre dois topos, quando existia um defeito significativo entre estes, obtinha melhores resultados, resultando numa sutura livre de tensão (Millesi, 1970; Millesi *et al.*, 1976), abrindo uma nova era na cirurgia do nervo periférico.

Quando um nervo é seccionado, poderá ser reparado utilizando ou a coaptação directa entre os dois topos ou caso esta não seja possível, através da interposição de autoenxertos, ou través de tubos condutores que poderão ser biológicos (por exemplo, veias) ou sintéticos (tubos-guia) (Pfister *et al.*, 2007).

Hoje, as intervenções cirurgias em lesões do nervo periférico são prática comum e são amplamente utilizadas em variadíssimos nervos como: lesões do nervo mediano (Kim, *et al.*, 2002), ciático (Senes *et al.*, 2007), ulnar (Kin *et al.*, 2003), peroneal (Kim *et al.*, 2004) e lesões do plexo braquial. A cirurgia do nervo periférico normalmente implica a utilização de técnicas de microcirurgia, utilizando para tal um microscópio cirúrgico ou lupas que permitam um aumento da imagem de 4 a 6 vezes. É imperativo também que para a realização de uma sutura topo-a-topo clássica, enxerto de nervo ou tubulação seja necessária a selecção de instrumentos cirúrgicos pediátricos, de oftalmologia, de neurocirurgia ou ainda na maioria das vezes um estojo específico de microcirurgia (Figura 8).

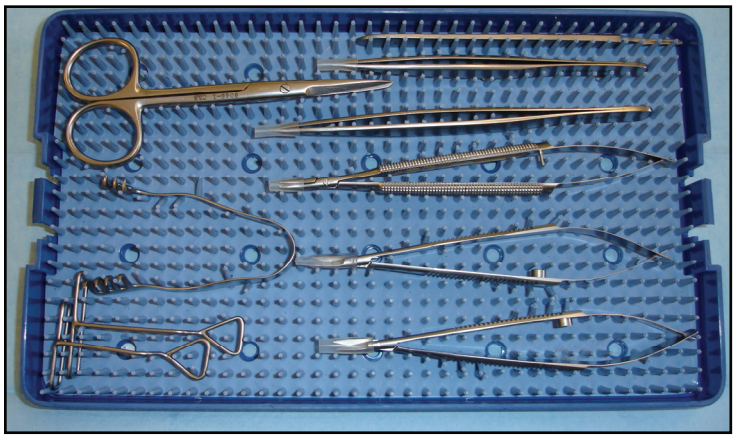


Figura 8: Estojo de Microcirurgia

Para o êxito da reparação do nervo é essencial que os axónios motores, sensoriais e autónomos façam as conexões correctas com o respectivo órgão. Tal como já foi dito anteriormente, o objectivo do cirurgião é reparar as lesões do nervo para que o máximo de axónios volte a crescer e/ou regenerar de forma adequada até à estrutura alvo e com isso obter a melhor recuperação funcional possível (Brushart, 2000). Também nem todas as lesões do nervo periférico podem ser reparadas através de uma única técnica. Portanto, o cirurgião deve estar familiarizado com todas as técnicas e estar preparado, para as poder utilizar, nas circunstâncias em causa.

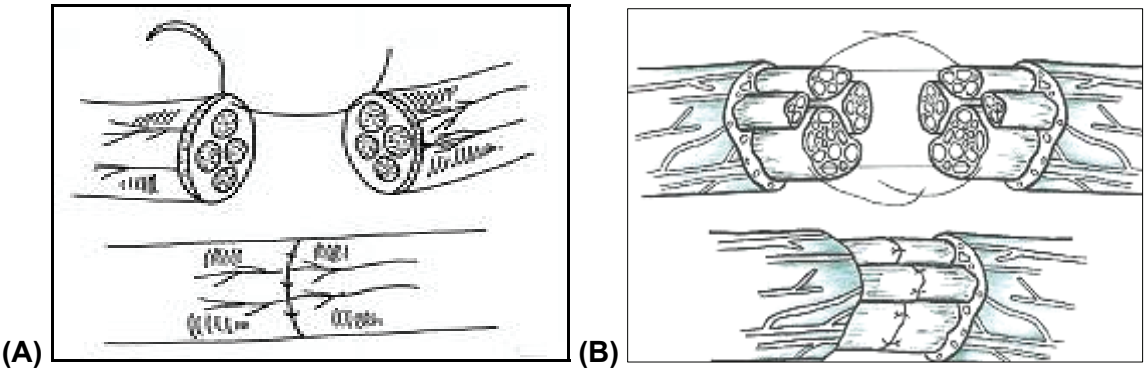
As razões clínicas, mais importantes para maus resultados obtidos em cirurgia do nervo periférico são: a formação de **neuroma** no local da lesão e a **dor neuropática**, (Tyner *et al.*, 2007). Estas na maior parte das vezes, são resultado da regeneração axonal aleatória no local da lesão, criando uma massa de tecido neuronal e ao mesmo tempo de tecido cicatricial e fibrose, que é dolorosa. A formação exagerada de cicatriz e de fibrose à volta dos topos proximal e distal, pode impedir o progresso de regeneração, o que poderá ser minimizado, através da aplicação por parte do cirurgião, de uma boa técnica cirúrgica, promovendo por exemplo um bom **deslizamento entre os tecidos adjacentes** (Millesi, 2006). A formação de um neuroma pós-traumático é a maior causa para o aparecimento da dor neuropática (hiperalgesia ou alodinia) que ocorre após uma cirurgia electiva, uma amputação ou ainda num traumatismo.

A dor neuropática caracteriza-se por uma parestesia, dor espontânea e severa e normalmente com uma resposta exagerada a um estímulo nociceptivo (hiperalgesia) ou provocada por um estímulo não nociceptivo (alodinia). É muitas vezes resistente aos analgésicos convencionais e é frequentemente combatida com fármacos da família dos GABA. A etiologia da dor neuropática é complexa e permanece ainda por desvendar completamente, correspondendo a alterações da função do neurónio do SNP ou do SNC, quer químicas quer morfológicas, nomeadamente a nível dos canais de Na^{++} (Widenfalk e Abrams, 2005).

O maneio destes neuromas, passa por uma 2ª intervenção cirúrgica (ou tantas cirurgias quanto as recidivas do neuroma) através da sua excisão e que resulta em cerca de 80% dos pacientes, ou ainda através de tratamento médico utilizando agentes anti-inflamatórios com recorrências muito frequentes (Tyner *et al.*, 2007). No entanto, até hoje os métodos utilizados para eliminação destes problemas não são ainda satisfatórios, o que tem sido talvez uma das razões que faz com que um grande número de grupos de investigação se dedique a esta área.

Os métodos de reparação do nervo periférico dividem-se em dois tipos de intervenção: a neurorrafia ou sutura directa utilizada quando não há perca de tecido nervoso e utilização de enxertos quando existe perca de tecido nervoso (Matsuyama *et al.*, 2000). É ao

cirurgião que cabe a tarefa de identificar a lesão e avaliar qual a técnica a utilizar para a melhor recuperação, bem como uma correcta execução dessa técnica. É também importante ter conhecimentos profundos sobre as várias técnicas possíveis para a realização da neurorrafia: sutura topo-a-topo clássica epineuro-epineuro (Figura 9 A) ou inter-fascilular (estando esta última em desuso) (Figura 9 B), sutura oblíqua (a 30º) (Figura 13 B), sutura topo-a-lado ou terminolateral (Rovak *et al.*, 2001); ou ainda na utilização de enxertos: a interposição de autoenxertos (Figura 10), vários tipos de *flap* epineural (Figura 17), a técnica da tubulação (Figura 11); bem como a combinação destas técnicas com factores ou sistemas celulares capazes de promover a regeneração. Só desta forma, o cirurgião, terá capacidade de tomar a melhor decisão para cada caso clínico.



(A) **(B)**

Figura 9: Reconstrução de um nervo periférico numa lesão de neurotmese, recorrendo-se à sutura entre os seus topos ou anastomose primária (Neurorrafia). Adaptado de Schmidt e Leach (2003). Actualmente opta-se por fazer a sutura topo-a-topo ao nível do epineuro (A) em vez do perineuro ou interfascicular (B).

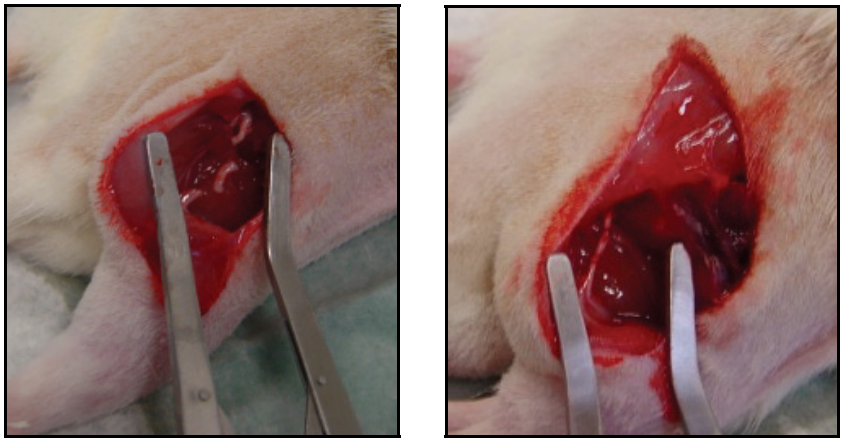


Figura 10: Reconstrução de um nervo periférico numa lesão de neurotmese com perda de tecido nervoso, recorrendo a um autoenxerto seguido de sutura clássica topo-a-topo em ambos os topos.

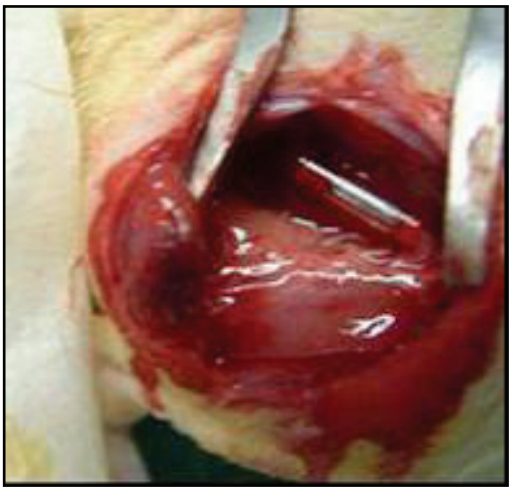
(A) (B) 

Figura 11: Reconstrução de um nervo periférico recorrendo numa lesão de neurotmese com separação dos topos recorrendo à técnica da tubulação. (A) tubo-guia de PLGA; (B) tubo-guia de Neurolac®.

É sabido também que um dos princípios básicos que o cirurgião deverá ter em conta é a aplicação de suturas em tecido saudável, o que implica que a área lesada tem que ser avaliada e se necessário ser removida a porção lesionada, como é o caso de neuromas.

Quando não há defeito, ou o defeito é mínimo, no nervo lesado não há grandes dificuldades na sua coaptação e normalmente é utilizada a sutura **topo-a-topo clássica** e caso seja necessário, poder-se-á optar por **neutralizar a mínima tensão,** através da flexão das articulações adjacentes durante o tempo da cirurgia, dando lugar a uma sutura final com uma tensão mínima (Millesi, 2006).

A sutura clássica topo-a-topo poderá consistir em várias técnicas: **Técnica Epineural e Técnica Interfascicular.** A utilização de cada uma destas técnicas, tem sido muito discutida e mantém-se ainda algumas duvidas quando às vantagens e desvantagens de cada uma delas. A **técnica de sutura epineural** (Figura 9 A) é mais fácil e mais rápida de realizar e implica uma menor manipulação das estruturas internas do nervo incluindo o suprimento sanguíneo (Matsuyama *et al.*, 2000). A **técnica de sutura interfascicular** (figura 9 B) desde que seja possível um bom reconhecimento dos feixes motores e sensitivos permite um melhor alinhamento entre os respectivos tubos endoneurais. No entanto, esta técnica tem algumas desvantagens: formação de uma cicatriz no local da sutura, potencial danificação das fibras interfasciculares por aumentar muito a manipulação cirúrgica, ser muito morosa e potencial interrupção do suprimento sanguíneo (Matsuyama *et al.*, 2000).

As **suturas demasiado fechadas** podem ser responsáveis por alinhamentos impróprios, isto é, uma incorrecta relação entre fibras motoras e sensoriais, o que poderá ser prejudicial (Millesi, 2006). Ainda uma outra opção será, a utilização de **cola de fibrina,**

que parece ser uma alternativa viável, não só como alternativa à sutura tradicional (diminuindo o tempo de cirurgia e a sua dificuldade) como também, como um método capaz de promover a regeneração do nervo (Martins *et al.*, 2005). Pensa-se que os dois factores que são capazes de explicar os resultados obtidos com a cola de fibrina, serão devidos ao facto desta induzir uma menor reacção inflamatória no local e/ou uma menor interferência na microcirculação local, ambas as razões com efeitos positivos na regeneração de qualquer tecido (Martins *et al.*, 2005). No entanto, a sua utilização parece ser limitada a nervos de pequeno calibre (nervo ciático de rato e em humanos nos nervos intercostais e digitais) sendo que ainda é necessário, ter em conta, que nem sempre a redução da reacção inflamatória é justificada, pois esta é responsável pela densidade do epineuro, que por sua vez funciona como factor de protecção.

Outra técnica também experimentada com algum sucesso, mas sem grandes vantagens em relação à sutura simples na reparação do nervo periférico, é a utilização de **aparelhos de ligação dos topos** que são utilizados em anastomoses microvasculares venosas (*Mechanical coupler device*) (Figura 12) (Lutz e Lidman 2005).

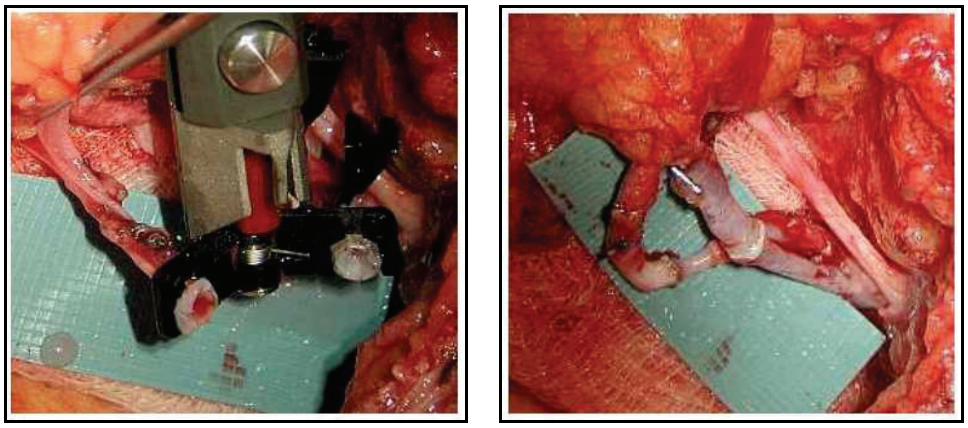


Figura 12: Aparelhos de anastomoses microvasculares (Cope *et al.*, 2001).

Quando ocorre a neurotmese do nervo, o cirurgião tem que ter em conta não só a possível perda de material nervoso como também o **estiramento longitudinal** a que o nervo está sujeito durante o movimento fisiológico, de forma a evitar o estiramento da sutura. Por exemplo, um espaço de 2 mm entre dois topos nervosos poderá ter necessidade de um enxerto de 3,5 mm se durante o movimento estiver sujeito a um estiramento de 1,5 mm (Matsuyama *et al.*, 2000). O que significa que o cirurgião terá também que ter conhecimentos dos factores dinâmicos a que o local de intervenção está sujeita. Por fim, quando o defeito é demasiado longo, a neurorrafia sem tensão só é possível através da **interposição de um enxerto (**Figuras 10 e 11**)**.

3.1. TENSÃO

Já em 1976 Hikosaka, utilizou num trabalho experimental, várias técnicas cirúrgicas de reparação do nervo ciático em cães, experimentando: i) sutura topo-a-topo em condições óptimas, ii) sutura em tensão moderada, iii) sutura onde foi aplicada compressão, iv) Uma sutura em que a superfície dos topos foi desviada *offset*, v) sutura segura aos tecidos vizinhos e ainda vi) sutura com espaço entre os topos. Os resultados foram muito interessantes: o desvio dos topos do nervo durante a sutura é o factor que mais negativamente influencia a regeneração dos axónios e parece também, que quer a tensão moderada quer a compressão no local da sutura não têm qualquer influência na regeneração dos axónios, levando a pensar numa adaptação do nervo às condições vizinhas (Hikosaka, 1979). Este pressuposto entrega uma grande responsabilidade à capacidade técnica dos cirurgiões, isto é, só uma ampla prática e perícia em microcirurgia permite a execução de uma sutura em que os topos distal e proximal estejam o mais alinhados possível.

Na cirurgia do nervo periférico, parece então ser opinião unânime, de que é sempre preferível uma anastomose directa (topo-a-topo), desde que sob baixa tensão, do que a interposição de um enxerto, seja ele autoenxerto de nervo, veia ou seja de qualquer outro tipo de biomaterial (Pogrel e Maghen, 2001). O enxerto autólogo com veia parece ter algum interesse (Chiu *et al.*, 1982), no entanto, os maus resultados obtidos, talvez se devam ao facto de haver colapso do lúmen, o que parece ter sido ultrapassado em defeitos inferiores a 5 mm do nervo lingual (Pogrel e Maghen, 2001), que devido tamanho do enxerto e ao local de implantação, não colapsa.

É conhecido, que o nervo tem algum grau de capacidade de se estender, e que esta capacidade está dependente da topografia interna do nervo, do número, do tamanho e o arranjo dos fascículos, juntamente com todas as estruturas que fazem parte integrante do epineuro (Sunderland, 1978). E já em 1872, Mitchell afirma que o nervo tem uma capacidade de se alongar cerca de 25% sem perca de função (Mitchell, 1872). Desde aí, muitos estudos foram realizados utilizando vários nervos (sural, peroneal, poplíteo, tibial, ciático, ulnar), e ainda várias espécies animais (rato, gato, coelho, cão e humanos). Bem como, existem estudos realizados em cadáveres, dentro das 24 horas pós-morten, que sugerem que as lesões do nervo, ocorrem após cerca de 4,2% de extensão, tendo a capacidade de se estender até 10% do seu comprimento (Lui *et al.*, 1948). No entanto, é sabido que os melhores resultados são obtidos após suturas directas sem tensão (Terzis *et al.*, 1975; Miyamoto Y, 1979; Maeda *et al.*, 1999). Alguns autores acreditam que, de uma forma muito prática, não deve haver tensão na linha de sutura quando este se

encontra em posição neutral, e que sempre que tal não acontece há predisposição para a formação de neuroma e dor local (Dellon e Mackinnon, 1988a).

Alguns estudos demonstram que, quando é aplicada uma tensão de 25 g após uma sutura de um nervo, o suprimento sanguíneo no local da sutura fica comprometido e os resultados pioram consideravelmente. Sendo que, situações em que a tensão seja igual ou superior a 25 g é preferível a utilização de enxertos (Miyamoto, 1979). A aplicação de forças de tensão induz no nervo, a uma isquémia que é provavelmente a principal responsável pelos danos causados no nervo (Lundborg e Rydevik, 1973) e também pela má regeneração verificada. Clark e colaboradores (1992), utilizando o nervo ciático de ratos, demonstram que o fluxo sanguíneo decresce em cerca de 50% após 8% de alongamento durante 30 minutos, enquanto que 15% de alongamento produz uma redução de 80% no fluxo sanguíneo (Lundborg e Rydevik, 1973; Clark *et al.*, 1992). Segundo Lundborg (1970) a isquémia do nervo, pode ser mantida durante cerca de 4 a 6 horas permitindo que, após retoma das condições de relaxamento, este mantenha a sua capacidade de retorno do fluxo sanguíneo e a sua função, ao normal. Este conhecimento é de extrema importância, para o clínico poder determinar prognósticos, em caso de lesões provocadas por isquémias, como poderá ser o caso de acidentes com esmagamento ou estiramento dos membros. Estes estudos vêm de encontro com a seguinte afirmação: "o sucesso da anastomose directa diminui à medida que aumenta o espaço entre os dois topos (Terzis *et al.*, 1975) ", e que uma possível razão para este facto, será não só por lesão dos axónios, como também por diminuição do fluxo sanguíneo no local. Smith e Robinson em 1995, utilizando três métodos distintos, para a reparação do nervo lingual em gatos, demonstraram que um espaço de 4 mm será demasiado longo para poder ser reaproximado com sucesso. Maeda e colaboradores (1999) comparam suturas de baixa tensão (topo-a-topo clássica) com sutura em elevada tensão (espaço de 5 mm) e com utilização de enxerto de nervo de 5 mm, obtendo os melhores resultados, mais uma vez em primeiro lugar com a sutura topo-a-topo clássica seguida de utilização de enxerto, vindo em último lugar a sutura em elevada tensão (Maeda *et al.*, 1999). As desvantagens inerentes à utilização de suturas em elevada tensão são as seguintes: i) interfere na microvascularização intraneural e consequentemente na nutrição dos componentes celulares do nervo (Lundborg e Rydevik, 1973; Miyamoto, 1979); ii) a tensão na linha de sutura aumenta a formação de tecido cicatricial e diminui a qualidade da regeneração, mesmo comparando com o enxerto que necessita de aplicação de duas linhas de suturas (Maeda *et al.*, 1999). Muitos autores têm estudado este tema, e torna-se difícil conciliar os resultados, talvez porque, nos parece haver uma grande influência de muitos factores que se interligam entre si, como são o caso: do nervo utilizado, do tamanho (comprimento e diâmetro), da

espécie utilizada e ainda no local da lesão e das relações anatómicas locais, bem como as condições do pós-operatório (imobilização ou não). Parece no entanto, e tal como já afirmamos, não haver dúvida que, os melhores resultados são obtidos em suturas topo-a -topo sem tensão (Terzis *et al.*, 1970; Miyamoto, 1979) e que os resultados de uma sutura topo-a-topo com tensão moderada são equivalentes aos de um enxerto (Smith e Robinson, 1995; Clark *et al.*, 1992) e ainda que maus resultados são obtidos em situações de tensão severa (Maeda *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 1992). Isto é, desde que sob baixa tensão é preferível, uma sutura directa topo-a-topo, do que um enxerto. Evitando desta forma a formação de duas linhas de sutura, ser uma técnica de mais fácil execução, mais rápida e evitar no caso de autoenxertos de morbilidade associada ao local da colheita (Matsuyama *et al.*, 2000).

Também no desenvolvimento deste tema da tensão, foram já testadas técnicas em que existe uma aproximação gradual dos topos, isto é, a reconstrução é realizada em dois tempos cirúrgicos, em que numa 1ª intervenção é realizada uma aproximação gradual com uma sutura simples e 3 semanas depois é então realizada uma sutura epineuro-epineuro após reavivamento dos topos do nervo (Okamoto e Oka, 1990).

Pensamos que muito trabalho, existe ainda a realizar nesta área, pois é impossível definir os limites da maior ou menor capacidade de tensão para os nervos em geral e portanto permanece ainda o dilema do cirurgião perante determinados lesões, isto é, fazer uma sutura topo-a-topo directa e clássica sob alguma tensão ou utilizar um enxerto autólogo, ou ainda utilizar um tubo-guia? Neste aspecto, a Medicina Regenerativa e a Engenharia de Tecidos, recorrendo-se de biomateriais associados a células estaminais pluripotentes e multipotentes, é talvez uma opção válida e promissora.

3.2. ÁREA DE CONTACTO

Sempre com o objectivo de um melhoramento dos resultados finais e também devido à insatisfação desses mesmos resultados obtidos, varias técnicas têm sido utilizadas no sentido de aumentar a área de contacto entre os dois topos. Uma técnica cirúrgica explorada por alguns investigadores e com alguns resultados satisfatórios é a utilização de suturas oblíquas entre os dois topos, em vez da clássica sutura perpendicular, aumentando desta forma a superfície de contacto (Kotulska *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2002; Kayikcioglu *et al.*, 1999). Em 1999 Kayikcioglu e os seus colaboradores descreveram uma técnica de coaptação de dois topos nervosos, utilizando diferentes ângulos em vez do tradicional ângulo de 90º (Kayikcioglu *et al.*, 1999) e parece que quer utilizando sutura directa quer utilizando autoenxerto, se conseguem melhores resultados quando é adoptada a união oblíqua (kotulska *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2002) (Figura 13). Na união

oblíqua, a avaliação funcional apresenta melhores valores de SFI e a avaliação morfológica expressa um número superior de axónios mielinizados, com maior diâmetro bem como um maior número de células de Schwann no topo distal, o que faz supor uma melhor e mais rápida regeneração. Também é observada uma menor fibrose epineural e intraneural (Kotulska *et al.*, 2006).

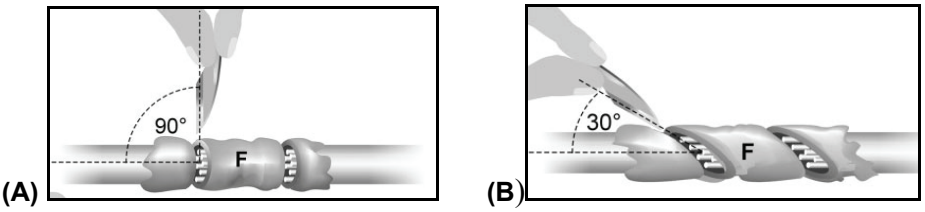


Figura 13: Representação esquemática de diferentes cortes do nervo a 90º (A) e a 30º (B) e respectiva sutura. A sutura oblíqua obtida num corte a 30º corresponde a um aumento da área de contacto entre os dois topos (Kotulska *et al.*, 2006).

Outra técnica também já experimentada, com obtenção de resultados interessantes, é a utilização de um anel metálico externo (Figura 14) que é colocado no local da sutura com o objectivo de aumentar e melhorar a área de contacto entre os dois topos no local da lesão (Kayikcioglu *et al.*, 2004).

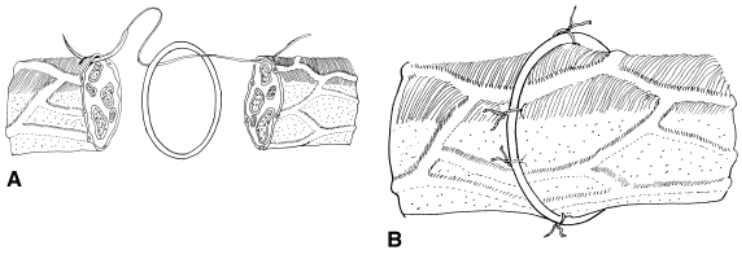


Figura 14: Utilização de um anel metálico externo que é colocado no local da sutura aumentando a área de contacto entre os dois topos (Kayikcioglu *et al.*, 2004).

3.3. ENXERTOS / TUBULAÇÃO

Em caso de secção do nervo em que não seja possível a anastomose sem tensão (neurorrafia) por deficit de nervo, é prática comum a interposição de um enxerto. Os enxertos podem ser: substitutos bioartificiais (Mackinnon e Dellon, 1990a; Doolabh *et al.*, 1996), aloenxertos (Mackinnon, 1996) ou ainda autoenxertos, sendo estes últimos considerados como a técnica de eleição (Millesi *et al.*,1990). Autoenxertos de nervo e também de muitos outros materiais têm sido propostos para a realização desta técnica.

Os resultados obtidos através da utilização de autoenxertos de nervo, apresentam algumas desvantagens i) requerem o sacrifício de um nervo funcional (Udina *et al.*, 2004); ii) a reinervação é insatisfatória assim como a vascularização; iii) levam normalmente à formação de neuromas e cicatrizes mais importantes (Millesi, 1990; Madison *et al.*, 1992; Dahlin e Lundborg, 1998; Maeda *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Varejão, 2003; Ahmed *et al.*, 2005; Ravi, 2006; Tyner *et al.*, 2007). Em casos de enxertos autólogos e em alotransplantes os nervos utilizados são: o nervo sural, o nervo grande auricular e o nervo antebraquial medial (Pogrel e Maghen, 2001) ou de uma forma geral um nervo sensitivo, visto não haver um grande número de nervos motores disponíveis para colheita, com um mínimo de morbilidade local. Sabe-se ainda que os nervos sensitivos não promovem uma óptima regeneração de axónios motores, quando comparada com a regeneração induzida por nervos mistos (Nichols *et al.*, 2004) ou motores (Lloyd *et al.*, 2007). Por todas estas razões, os clínicos e investigadores não poupam esforços na tentativa de arranjar alternativas. Sendo que as alternativas propostas são a utilização de aloenxertos de cadáveres e técnica da tubulação utilizando tecidos autólogos não nervosos como veia ou músculo (Millesi, 1990, Varejão, 2003) e ainda a utilização de biomateriais.

Desde o século XIX que é investigada a possibilidade de utilização de um conduto não nervoso para colmatar um defeito do nervo, guiando as fibras nervosas do topo proximal até ao topo distal, surgindo a divulgação da técnica da tubulação (Lundborg, 2003; Ijkema-Paassen *et al.*, 2004; Meek e Coert., 2002; Brunelli *et al.*, 1994). A técnica da tubulação consiste na colocação de um tubo entre os dois topos do nervo seccionado que é fixado com uma sutura, que consiste normalmente em 1 a 2 pontos que passam através do epineuro e através do tubo-guia, utilizando um fio não absorvível monofilamentar 7-0 a 9-0 (Figura 16). Esta técnica cirúrgica baseia-se nos conhecimentos divulgados pelos considerados pais da neurobiologia moderna, A.V. Waller e L. Ranvier e que afirma que a regeneração do nervo ocorre por crescimento do axónio no local seccionado, do topo proximal para a lesão e não regeneração do topo distal (Stoll *et al.*, 2002). Portanto a tubulação tem como objectivo a orientação desse crescimento neuronal, prevenindo ao mesmo tempo a formação de neuromas e o crescimento de tecido fibroso no interior do espaço entre os topos (Suematsu, 1989). Nesta técnica ambos os topos proximal e distal são introduzidos no lúmen do tubo-guia e fixados com uma ou duas suturas em cada topo (Figuras 16 e 18). As fibras nervosas do topo proximal, desta forma, regeneram em direcção ao topo distal, através de sinais químicos libertados a partir do topo distal (fenómeno denominado por quimiotropismo) (Hudson *et al.*, 2000). Os tubos-guia evitam desta forma a invasão de fibrose no local e a possibilidade de desenvolver neuromas, promovendo ainda a acumulação de factores

neurotróficos em concentrações fisiológicas, criando um microambiente favorável à regeneração entre os dois topos do nervo. De uma forma geral, podemos dizer que um tubo ideal seria aquele que: fosse inerte ou biocompativel, flexível, transparente, que possa inibir os processos negativos à regeneração do nervo (fibrose, neuroma, edema, isquémia, aderências), promova a vascularização local e concentração de factores neurotróficos (Figura 15) e ainda não seja tóxico ou carcinógenico.

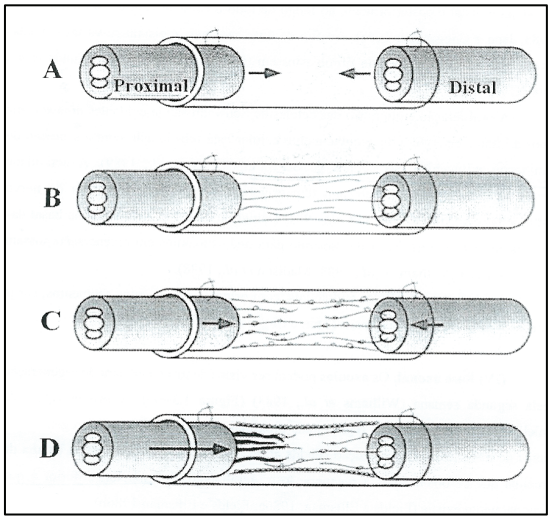


Figura 15: Desenvolvimento do meio interno dentro de um tubo-guia de silicone, para uma solução de continuidade de 10 mm no nervo ciático do rato. (A) Acumulação de fluído de origem plasmática logo nas primeiras horas pós-secção. (B) Formação da matriz de fibrina entre os segmentos do nervo, no decorrer da primeira semana. (C) Durante a segunda semana, a fase celular corresponde à migração de fibroblastos, de células de Schwann e de células endoteliais, a partir de ambos os segmentos. (D) A fase axonal é definida pela migração dos axónios a partir do segmento proximal (Adaptado de Varejão, 2003).

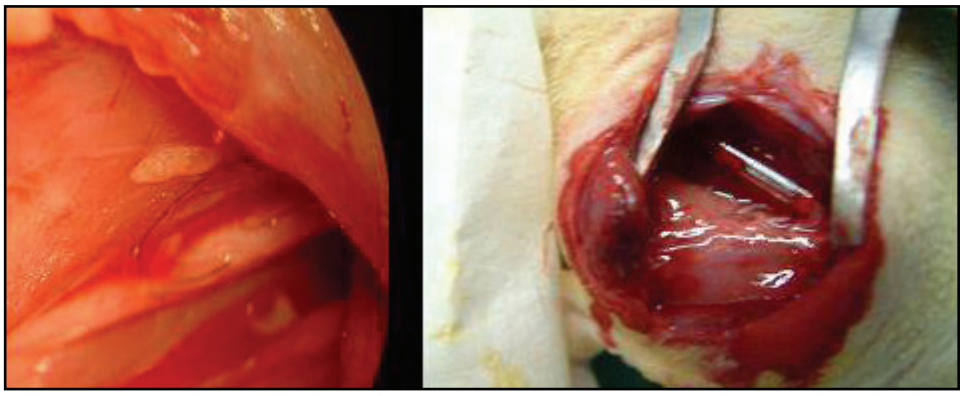
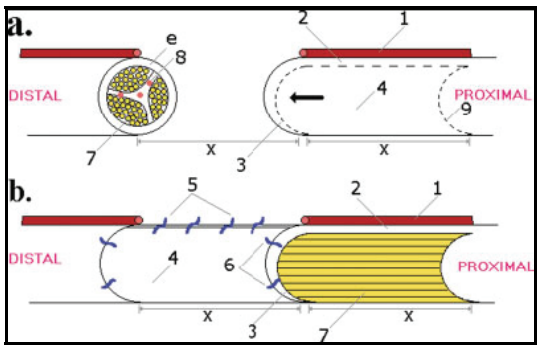


Figura 16: Técnica de tubulação em que em ambos os topos proximal e distal, são introduzidos no lúmen do tubo-guia e fixados com uma ou duas suturas em cada topo, utilizando um fio não absorvível monofilamentar 7-0 a 9-0.

Em 1988 Dellon e Mackinnon demonstram que o nervo é capaz de regenerar através de um conduto de ácido poliglicólico (PGA) com resultados idênticos aos conseguidos utilizando um enxerto de nervo, o que evita o sacrifício de um nervo funcional (Dellon e Mackinnon, 1988). Desde o início do século XX, surgem portanto, várias alternativas ao autoenxerto. Têm sido experimentados através da utilização enxertos artificiais, ou bioartificiais, ou tubos-guia como: silicone (Lundborg *et al.*, 1982), colagénio (Colin e Donoff, 1984; Tyner *et al.*, 2007), ácido poliglicólico (Dellon e Mackinnon, 1988), quitina, acido poliláctico e poliglicólico (PLLA) (Ngo *et al.*, 2003), acido poliláctico (Rodriguez *et al.*, 2000; Mosahebi *et al.*, 2002) gelatina, fibronectina (Whiworth *et al.*, 1995), laminina (Kauppila *et al.*, 1993), músculo *freeze-thawed* (Fawcett e Keynes, 1986; Glasby, 1991), e ainda veia (Chiu *et al.*, 1982; Foidart-Dessalle *et al.*, 1997), bem como combinações entre enxertos de nervo e músculo (*sandwich* nervo-músculo) (Tabela 2) (Whitworth *et al.*, 1995). A *sandwich* nervo – músculo testada por Whitworth e colaboradores (1995) permite fornecer ao musculo, células de Schwann (nas quais o musculo não é rico) produtoras de factores neurotróficos, importantes para o processo de regeneração do nervo e ao mesmo tempo permite reduzir o tamanho do enxerto de nervo necessário, parecendo ser um potencial método a utilizar em cirurgia do nervo periférico (Whitworth *et al.*, 1995). No entanto, uma grande parte destes materiais não são utilizados sistematicamente na prática clínica, por falta de estudos clínicos (em humanos) suficientes que comprovem a sua eficácia.

Com a técnica da tubulação e o aparecimento dos tubos-guia, surge também a possibilidade de se poder manipular o microambiente criado entre os dois topos do nervo, o que abre ainda mais perspectivas no âmbito da cirurgia e regeneração do nervo periférico.

Apesar de tudo, os tubos-guia têm sido a alternativa utilizada pelos cirurgiões, sempre que haja perca significativa de nervo e em que não seja possível realização de sutura clássica sem tensão excessiva, permitindo assim o crescimento do axónios ao longo do espaço entre os topos com o mínimo de perturbação do processo de regeneração. Também é sabido, que a regeneração tende a ser cada vez menos efectiva à medida que aumenta a distância entre os dois topos, daí a importância de adicionar factores neurotróficos e sistemas celulares adjuvantes. Outras técnicas cirúrgicas baseadas no conceito da tubulação, têm sido propostas por outros autores como é **técnica do *flap* epineural (**Figura 17**)** (Snyder *et al.*, 2007; Siemionow *et al.*, 2002; Tetik *et al.*, 2002; Karacaoglu *et al.*, 2001; Ignatiadis *et al.*, 2007).

(A) 

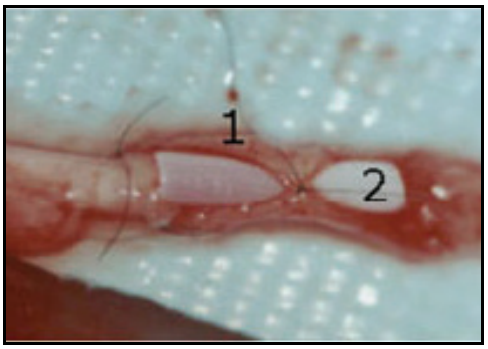
(B) 

Figura 17: Técnica de *flap* epineural para reparação de um defeito do nervo. (A) O *flap* é colhido no topo proximal e avançado até ao topo distal: 1- artéria; 2 – zona de preservação perivascular; 3 – zona de preservação de perineuro; 4 – avanço do *flap* epineural; 5 e 6 – zona de colocação de suturas; 7 – fascículos nervosos; 8 – plexo vascular intranervoso; 9- zona de separação do epineuro; X – defeito do nervo. (B) fotografia intraoperatória da técnica de *flap* epineural (1) com colocação de um tubo temporário de silicone (2) para prevenir o colapso do *flap* durante a realização da cirurgia. (Ignatiadis *et al.*, 2007).

O epineuro é a camada fibrosa mais externa que reveste todo o nervo, preenchendo os espaços entre os feixes de fibras nervosas, contendo os vasos sanguíneos – os *vasa nervorum*, com numerosos vasos longitudinais, cuja função é suprimir os capilares do endoneuro, protegendo o nervo contra estiramentos e traumatismos externos (Sunderland, 1978; Kierszenbaum, 2004; Junqueira e Carneiro, 1999). Será previsível portanto, vir a comportar-se como um bom tecido de suporte de regeneração e sendo colhido no local da lesão tem a vantagem de não provocar morbilidade acrescida no dador. No entanto, é uma técnica de difícil execução necessitando um cirurgião experiente em técnicas de microcirurgia, aumentando muito o tempo de cirurgia (Ignatiadis *et al.*, 2007). A técnica cirúrgica consiste, com ajuda de microscópio cirúrgico, em fazer a excisão do epineuro contendo a artéria principal e tendo o cuidado de evitar a lesão dos fascículos nervosos que recobre, sendo esta porção de epineuro retirada, usada para corrigir o defeito de nervo. Esta porção de epineuro pode ter origem no segmento proximal ou distal, pode ser livre ou não completamente excisada num dos topos, sendo depois suturada em um ou em ambos topos formado uma manga ou tubo cujo espaço interior poderá ser preenchido com algo prevenindo assim o seu colapso (Figura 17 A). Para evitar o colapso no local, durante a execução da técnica, pode ser utilizado um tubo de silicone que é temporariamente inserido entre os dois topos, e que é removido no final da cirurgia (Ignatiadis *et al.*, 2007) (Figura 17 B). Esta técnica parece ser uma alternativa viável quando usada em pequenos defeitos, no entanto, em defeitos maiores não parece ser uma alternativa a considerar quando comparada com enxertos autólogos de nervo, talvez devido ao colapso do lúmen. Não obstante, parece que o uso deste tubo de epineuro apresenta melhores resultados funcionais e morfológicos quando

comparados com os enxertos autólogos de veia (Karacaoglu *et al.*, 2001). Parece também, que são melhores os resultados quando o *flap* epineural, avança a partir do topo proximal (Ignatiadis *et al.*, 2007).

4. ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS

A Engenharia de Tecidos e os Biomateriais são uma ciência em amplo desenvolvimento e com aplicações em Medicina Humana e Veterinária de indiscutíveis vantagens. Talvez por essa razão existe um número enorme de investigações e publicações científicas acerca deste assunto. O uso de materiais tridimensionais usados para a regeneração de tecidos é hoje uma técnica cada vez mais usada a que se dá o nome de Regeneração de Tecidos Guiada (GRT), na qual a regeneração do nervo periférico é um forte candidato.

A aplicação de biomateriais em Medicina tem quase o mesmo tempo do que a própria história da Medicina e em especial em aplicações cirúrgicas: fios de sutura, materiais para controlo de hemostáse e de preenchimento de locas deixadas em determinadas intervenções cirúrgicas, próteses e implantes com aplicação em ortopedia, estomatologia, cirurgia vascular, estética, tecidos de suporte e estimulação à regeneração de tecidos, incluindo biomateriais que podem suportar a lenta regeneração do tecido nervoso. Para a reparação de defeitos do nervo periférico, nos últimos 15 anos tem vindo a crescer o interesse do uso da Engenharia de Tecidos ou Bioengenharia, sempre acompanhadas das respectivas técnicas de microcirurgia (Evans, 2001; Battiston *et al.*, 2005).

A produção de próteses produzidas ou envolvidas com células dos tecidos que queremos regenerar e do próprio indivíduo, é uma “indústria” em desenvolvimento e que apresenta vantagens que quase são inesgotáveis. A primeira vantagem a ter em conta, é evitar a utilização de agentes imunossupressores e portanto, evitar os seus efeitos secundários.

No caso da sua utilização em cirurgia do nervo periférico, o desenvolvimento desta área surge como consequência das limitações inerentes ao uso de enxertos, quer no que diz respeito ao comprimento do espaço entre os topos, diâmetro e tipo de fibra, quer ainda das desvantagens inerentes à lesão do local da colheita. É com o objectivo de ultrapassar estas limitações que surge a técnica da tubulação e com ela a investigação e o desenvolvimento do uso de biomateriais na regeneração do nervo periférico. A possibilidade de utilização de um conduto não nervoso para colmatar um defeito do nervo, guiando as fibras nervosas do topo proximal até ao topo distal tem vindo a ser investigado desde o século XIX (Lundborg, 2003; Ijkema-Paassen *et al.*, 2004; Meek e Coert., 2002; Brunelli *et al.*, 1994). Glück em 1880, foi talvez o primeiro a utilizar osso de cadáver na interposição entre dois topos nervosos, sem no entanto obter sucesso (Glück, 1880). Sendo seguido por Vanlair utilizando, neste caso com algum sucesso, osso descalcificado num espaço entre dois topos de cerca de 3 cm (Vanlair, 1882). Nos anos que se seguiram, um grande número de experiências e artigos científicos foram realizados, baseados na nova ideia da comunidade científica, para a qual grandemente

contribuíram A.V. Waller e L. Ranvier, e que afirma que a regeneração do nervo ocorre por crescimento do axónio no local seccionado, do topo proximal para a lesão e não regeneração do topo distal (Stoll *et al.*, 2002). Desde esta altura muitos tipos de materiais têm sido testados e utilizados como tubos-guia para a regeneração do nervo periférico.

Quando falamos em Engenharia de Tecidos aplicada à reparação do nervo periférico parece óbvia a sua aplicabilidade à clínica quotidiana mas permanece ainda por esclarecer muitos pontos, que ainda não permitem na prática a sua utilização.

Em regeneração nervosa, também na sequência do desenvolvimento da Engenharia de Tecidos, surgem também as inúmeras combinações possíveis entre biomateriais e agentes celulares (células de Schwann, células estaminais, células musculares), factores neurotróficos (NGF, BDNF), proteínas ou peptideos componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina), outros substratos (hidrogeis, nano/micro fibras) que parecem ser inesgotáveis e nos últimos anos torna-se quase impossível abarcar toda a informação fornecida à comunidade científica sobre este tema.

Tal como já vimos, a presença de factores de crescimento no local parece ser importante mas um dos principais problemas é a curta semi-vida destes factores, de minutos a horas. O que torna imperativo que estes tenham um período longo de libertação e que portanto sejam idealmente combinados com o material do tubo-guia (Tria *et al.*, 1994).

A inclusão de um suporte celular na proliferação axonal tem sido amplamente testada e **várias células** têm sido utilizadas bem como a sua combinação com vários biomateriais. Assim, têm sido explorados: células de Schwann (Hadlock *et al.*, 2001), fibroblastos (Patrick *et al.*, 2001), macrófagos (Ludborg, 2000), células HEK-293 (McConnell *et al.*, 2004; Chalfoun *et al.*, 2006), células da mucosa olfatória (OEC's) (Tohill e Terenghi, 2004), células de medula óssea (Zhang *et al.*, 2005), células N1E-115 (neuroblastomas diferenciados *in vitro*) (Rodrigues *et al.*, 2005a e b) e células estaminais (resultados do nosso grupo de investigação ainda não publicados). A **utilização de células de Schwann** tem sido muito limitada quer pela sua fonte de colheita, como também, devido à dificuldade da sua cultura e proliferação (Mauritz *et al.*, 2004). Permanecendo ainda algumas dúvidas de quanto tempo as células de Schwann conseguem sobreviver, bem como se estas células mantêm a sua viabilidade após transporte e implantação num biomaterial (Chalfoun *et al.*, 2006). Tal como as células de Schwann, os **fibroblastos** também produzem factor de crescimento do nervo (NGF) (Patrick *et al.*, 2001), no entanto, parece haver uma limitação, dado a formação de cicatrizes exageradas (Chalfoun e tal., 2006). Sendo uma alternativa a esta limitação a utilização de células **HEK-293,** com um efeito similar mas sem o risco elevado de formação de cicatriz exagerada (McConnell *et al.*, 2004). As **células estaminais** são objecto de estudo de uma grande parte das investigações presentes e nelas se depositam inesgotáveis

esperanças devido à sua potencial capacidade de multiplicação e diferenciação nos vários tipos de células e tecidos e ainda na sua capacidade anti-inflamatória local. A introdução de **células estaminais mesenquimais (**EMSCs) originadas da crista neural craneal e suspensas numa matriz de colagénio tipo I quando introduzidas no interior de um tubo-guia de poli(ácido-láctico-glicólico (PLGA), parece ter demonstrado algumas vantagens quando comparado com a utilização do mesmo biomaterial, somente com matriz de colagénio ou com autoenxertos de nervo (Nie *et al.*, 2007). A utilização de células estaminais pluripotentes poderá permitir a diferenciação de várias linhas celulares de forma a criar um ambiente de suporte à regeneração axonal. Murakami e colaboradores (2003), transplantaram células neuronais progenitoras derivadas do hipocampo fetal de rato e demonstraram a sua diferenciação em células de Schwann de forma a promover a regeneração axonal através de um defeito nervoso (Murakami *et al.*, 2003). As **células da mucosa olfactiva (OEC's)** têm sido descritas como possíveis células progenitoras do sistema nervoso periférico (Tohill e Terenghi, 2004) e parecem providenciar um bom suporte para o crescimento e regeneração axonal (Wewetzer al., 2002). As **células estaminais isoladas dos folículos pilosos** sendo de fácil acesso podem ser diferenciadas em células de Schwann e portanto com papel a desempenhar na regeneração nervosa (Amoh *et al.*, 2005). As **células estaminais da medula óssea** ou as **células estaminais mesenquimais** são também células de fácil acessibilidade e parecem poder vir a exibir características similares às células de Schwann e ter o seu papel na regeneração do nervo (Choi *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2007) (resultados ainda não publicados pelo nosso grupo de investigação).

4.1. CONDUTO NEURONAL

Quando não é possível uma sutura topo-a-topo directa sem tensão exagerada surgem a alternativa dos enxertos (autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos) e os tubos-guia. O conceito de tubulação, tal com já foi abordado anteriormente, consiste na interposição de um tubo oco ou não, entre os dois topos nervosos colmatando o espaço entre os dois topos na tentativa de orientar a regeneração das fibras nervosas (Figura 18).

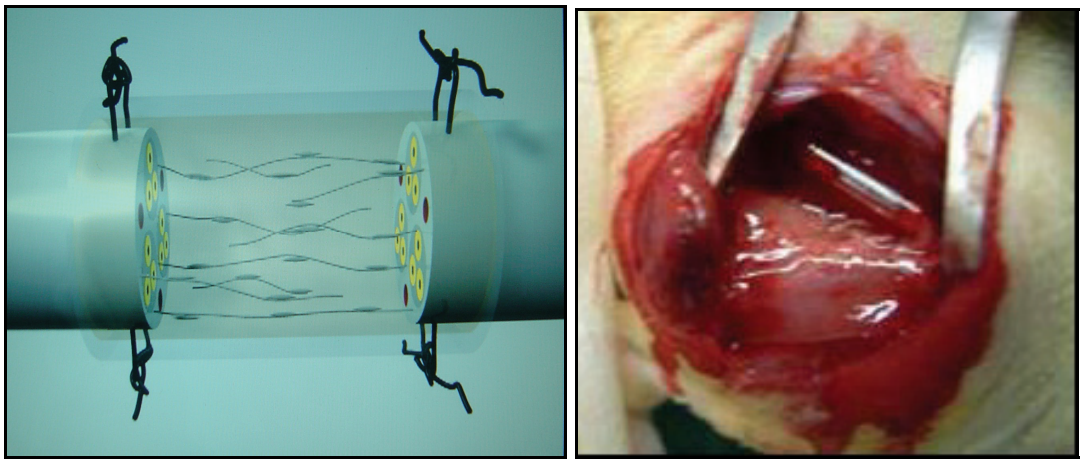


Figura 18: Realização da técnica de tubulação. Cada um dos topos é introduzido cerca de 2 mm no interior do tubo-guia e fixada com 2 pontos simples diametralmente posicionados utilizando monofilamento não absorvível 0/7.

Em relação aos autoenxertos, a utilização de tubos-guia tem como vantagens: evitar uma cirurgia de colheita de nervo noutro local e a lesão provocada por essa colheita, bem como o facto de a fonte de tubo-guia não ser limitada quer em tamanho, espessura e número. Assim, há algumas propriedades básicas que deverão ser tidas em conta durante a fabricação de um tubo-guia: i) ter em conta o diâmetro e espessura de acordo com lesão a colmatar, ii) devem ser resistentes e manter a sua força de tensão durante o tempo necessário à regeneração iii) devem ser de fácil implantação por técnicas de microcirurgia iv) devem ser esterilizáveis e v) devem ser biodegradáveis e ter porosidade adequada (Hudson *et al.*, 2000). Para além destas propriedades básicas, outras características podem ser tidas em conta com o objectivo de incrementar a regeneração do nervo periférico: i) a capacidade de incorporação e suporte de células (células de Schwann, células estaminais, etc.), ii) a capacidade de controlar a libertação de factores neurotróficos, iii) fornecer um substrato capaz de orientar o nervo (ex: fibras de colagénio), iv) conter canais intraluminais e v) capacidade de actividade eléctrica através da criação de campos eléctricos com um potencial impacto na regeneração de tecidos (Huang e Huang, 2006).

A facilidade de implantação por parte do cirurgião é de extrema importância para o sucesso final. Um tubo **transparente** permite ao cirurgião a visualização e monitorização de todo o processo de implantação. Um tubo **flexível** permite uma melhor penetração da agulha durante a sutura e diminui o risco de quebra da mesma. No entanto, deverá ao mesmo tempo manter a sua **forma** e ser **resistente** ao colapso quer durante a implantação, quer ao longo do processo de regeneração. Os tubos **degradáveis** são também preferíveis visto os materiais permanentes aumentarem o risco de infecção, tal como poderem provocar uma resposta inflamatória crónica, serem uma fonte de

compressão do nervo durante todo o processo de regeneração e ainda necessitarem de uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção. A investigação tem também demonstrado, que os tubos-guia devem ser **semipermeáveis (porosos)**, permitindo quer a incorporação de matrizes com manutenção do microambiente, quer ainda a possibilidade de eliminação de produtos resultantes do metabolismo local (Lundborg *et al.*, 1982a; Gibson *et al.*, 1991, Madison *et al.*, 1992, Meyer *et al.*, 1997, Steuer *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2000; Lee e Wolfe, 2000; Heijke *et al.*, 2001; Meek *et al.*, 2001). Com todas estas exigências cabe aos engenheiros de biomateriais um árduo trabalho numa tentativa de juntar todas estas propriedades num só material.

Um estudo comparativo entre autoenxertos e tubos de colagénio (Archibald *et al.*, 1995) ou poliglicólico (Batttiston *et al.*, 2005), em pequenos espaços demonstraram resultados idênticos. No entanto, muitos factores e alguns já abordados, fazem variar esta observação e não é possível extrapolar estes resultados se não de uma forma muito cuidadosa. Não obstante, este estudo servirá de uma constatação interessante e que suporta a constante investigação nesta matéria.

Muitos biomateriais têm sido utilizados como tubos-guia e apresentam duas grandes classificações: naturais e sintéticos. Sendo que nos sintéticos, se destacam também dois grandes grupos: os biodegradáveis e os não biodegradáveis. Na tabela 2 podemos rever resumidamente alguns materiais que têm sido investigados em enxertos nervosos:

Enxerto	Referência
Enxerto com tecido autólogo:	
1. Enxerto de nervo (Técnica *Standard*)	Lundborg, 1998; Mackinnon e Dellon, 1988
2. Enxerto de veia	Chui, 1995; Chiu *et al.*, 1982; Risitano *et al.*, 2002
3. Enxerto de músculo	Fawcett e Keynes, 1986; Battiston *et al.*, 2000; Meek *et al.*, 2002
4. Bainha Epineural	Karacaoglu *et al.*, 2001
5. Enxerto de tendão	Brandt *et al.*, 1999
Enxerto não autólogo /acelular	
1. Aloenxertos com imunossupressão	Jablecki e Pielka, 2004; Sen *et al.*, 2005
2. Aloenxertos acelulares e xenoenxertos	
Decelulização térmica	Ide *et al.*, 1998; Frerichs *et al.*, 2002
Tratamento com radiação	Hiles, 1972; Marmor, 1964
Decelulização química	Sondell *et al.*, 1998; Sonell *et al.*, 1999
3. Submucosa de Intestino Delgado	Hadlock *et al.*, 2001
4. Membrana Amniótica Humana	Meek *et al.*, 2001; Mligiliche *et al.*, 2002
Materiais baseados em substancias Naturais	
1. Proteínas derivadas da MEC	
Fibronectina	Tong *et al.*,1994; Ahmed e Brown, 1999
Laminina	Kauppila *et al.*, 1993; Dubový *et al.*, 2001; Dubový, 2004; Chen *et al.*, 2007
Colagénio	Yoshii *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 1996; Heijke *et al.*, 2001; Mackinnon e Dellon, 1990b; Archibald *et al.*, 1995; Tyner *et al.*, 2007
2. Materiais ácido-base hialorónicos	Seckel *et al.*, 1995
3. Fibrina/Fibrinogénio	Ahmed *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 1998
4. Outros (alginato, agarose, quitosano….)	Hashimoto *et al.*, 2002; Balgude *et al.*, 2001; Haipeng *et al.*, 2000
Materiais Sintéticos	
1. Materiais sintéticos Biodegradaveis:	
Poli(ácido láctico) (PLA)	Evans *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2002
Poli(ácido glicólico) (PGA)	Dellon e Mackinnon, 1988b
Poli(acido láctico e glicólico) (PLGA)	Molander *et al.*, 1982
Poli(caprolactona)	den Dunnen *et al.*, 2000; Valero-Cabre *et al.*, 2001
Poli(L-lactido-co-ε;-caprolactona) (PLC)	Navarro *et al.*, 1996
Poli(uretano)	Soldani *et al.*, 1919
Poli(organo)fosfato	Nicoli *et al.*, 2000
Poli(3-hidroxibuirato)	Young *et al.*, 2002
Poli(etilenoglicol) “cola”	Lore *et al.*, 1999; Borgens *et al.*, 2002
Vidro biodegradável	Gilchrist *et al.*, 1998
2. Materiais electricamente activos	Schmidt *et al.*, 1997
3. Materiais não biodegradaveis	
Silicone	Dahlin e Lundborg 2001; Lundborg *et al.*, 1982a; Navarro *et al.*, 1996; Lundborg *et al.*, 2004; Dahlin *et al.*, 2001; Mackinnon e Dellon, 1990b

Tabela 2: Materiais usados em enxertos nervosos (adaptada de Schmidt e Leach, 2003).

O **Silicone** (Lundborg *et al.*, 1982a; Navarro *et al.*, 1996; Lundborg *et al.*, 2004) é um material inerte que não induz nenhuma ou pelo menos mínima, reacção inflamatória dos tecidos vizinhos (Dahlin *et al.*, 2001). No entanto, tem como principal desvantagem o de ser um material semi-rígido e não biodegradável, o que ocasionalmente, predispõe mais tarde à formação de neuromas, dor ou simples desconforto local pelo que é necessário ser removido (Lundborg *et al.*, 2004; Mackinnon e Dellon, 1990b). A reparação do nervo periférico utilizando tubos de silicone foi pela primeira vez descrita há mais de 20 anos (Lundborg *et al.*, 1982a) e tem sido amplamente utilizado também em trabalhos experimentais em animais. Recentemente Lundborg e seus colaboradores (2004) publicaram um estudo realizado em humanos, durante 5 anos em 30 pacientes, com lesões do nervo mediano ou ulnar, que compara a utilização de tubos de silicone com uma sutura topo-a-topo epineural, concluindo que não é visível nenhuma vantagem na utilização de tubos de silicone quando comparados com a sutura clássica (Lundborg *et al.*, 2004).

Todos os biomateriais recentemente utilizados, têm se mostrado no entanto, sem grandes vantagens quando comparados com a sutura clássica (Heijke *et al.*, 2001). Quando utilizados em espaços entre os topos nervosos de 5 mm em comparação com enxertos, os resultados são igualmente muito similares (Archibald *et al.*, 1995). Inclusivamente foi referenciado por Madorshy *et al.* (1998) a utilização de tubos de colagénio, dando resultados inferiores em termos de contagem de neurónios motores e sensoriais quando comparados com a sutura clássica epineural (Madorshy *et al.*, 1998). Recentemente, Tyner e seus colaboradores (2007), desenvolveram um trabalho, em que estudaram a formação de neuromas e consequente dor neuropática, através de monitorização detalhada da autotomia, acompanhada de estudos histológicos do local da lesão ao fim de 8 semanas, utilizando tubos de colagénio em espaços entre topos nervosos de 6 mm, concluindo que estes previnem a formação de neuromas quando comparados com autoenxertos (Tyner *et al.*, 2007).

Desde há alguns anos, a **lâmina basal de músculo** tem sido investigada como um material capaz de suportar a regeneração do nervo periférico em espaços entre dois topos nervosos de 5 mm, com resultados na recuperação idênticos aos de autoenxertos (Fawcett e Keynes, 1986).

O **TEN** (*tissue-engineered nerve*) é um exemplo da produção de um *enxerto*, isto é, um tecido contendo uma elevada densidade de células de Schwann activas (que crescem dentro de uma construção biodegradável e que acaba por desaparecer) e que é capaz de produzir no local factores de crescimento que, tal como já vimos têm um importante papel na regeneração do nervo periférico (Komiyama *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005 a e b). Trata-se da produção de um tecido que tem como finalidade colmatar um espaço entre

dois topos nervosos sem que sejam utilizados tubos-guia ou enxertos autólogos, cujas vantagens são indiscutíveis e já muitas aqui vezes referidas. A sua produção implica a utilização do polímero acido poliglicólico (PGA) que serve de suporte para o crescimento de uma cultura de células de Schwann e que é montado no interior de um tubo de silicone, servindo apenas de molde durante um determinado período, sendo retirado no momento da sua implantação cirúrgica. O resultado final é de um segmento de células de Schwann que vai colmatar o espaço entre os dois topos da fibra nervosa (Komiyama *et al.*, 2004).

O **colagénio** é também um biomaterial amplamente usado em Medicina e que faz parte integrante da fibra nervosa (especialmente colagénio do tipo III). Juntamente com outros componentes (como a laminina, fibronectina) faz parte integrante da matriz extracelular (MEC) do nervo e tem um papel activo e importante na regeneração do nervo periférico. Vários estudos em regeneração nervosa têm utilizado o colagénio para o fabrico de tugos-guia (Mackinnon e Dellon, 1990; Navarro *et al.*, 1996; Tyner *et al.*, 2007). Tal como também várias formas de tratamento das fibras de colagénio que produzem o tubo-guia têm sido já estudadas (Ahmed *et al.*, 2004; 2005). Isto é, a forma como as fibras de colagénio se encontram entrelaçadas (*crosslinking*) pode de alguma forma intervir não só na capacidade de crescimento do nervo regenerado como também na capacidade e velocidade de degradação do biomaterial (Ceballos e al., 1999; Navarro *et al.*, 1996). A utilização de **tecido muscular** tem sido experimentada com algum sucesso através da combinação de fragmentos de veia que repletos de tecido muscular fresco ou pré-degenerado (Varejão, 2003; Meek *et al.*, 2002 e 2004; Tos *et al.*, 2004; Tos *et al.*, 2007), poderiam ser uma fonte de factores neurotróficos que promoveriam o crescimento axonal, induzindo a migração de células de Schwann.

Outra vantagem na utilização de tubos-guia, tal como já foi referido, é o facto de permitir a formação de um microambiente capaz de ser manipulado. E sobre este tema têm sido investigados os mais variados materiais e/ou componentes, sempre com o mesmo objectivo – promover a regeneração do nervo periférico. Começou por se preencher este espaço do tubo guia com solução salina, gel de colagénio (Ceballos *et al.*, 1999; Labrador *et al.*, 1998), fibrina (Williams e Varon, 1985; Williams *et al.*, 1987), laminima (Madison *et al.*, 1985, 1988; Tong *et al.*, 1994), fibronectina (Bailey *et al.*, 1993), músculo fresco (Varejão, 2003), células de Shwann (Guenard *et al.*, 1992; Levi *et al.*, 1997) e factores tróficos (Rich *et al.*, 1989). O objectivo é que seja criado em substrato para a migração de células não neuronais (fibroblastos, células endoteliais, células de Schwann) de forma a criar uma matriz de ligação entre os dois topos (Labrador *et al.*, 1998) e permitir a formação de uma ponte que sirva de suporte para o crescimento dos axónios. Com base nestes conhecimentos, Ngo e colaboradores em 2003, utilizam nas suas investigações

tubos-guia de silicone cheios de outro biomaterial – microfilamentos de poli-(L-láctico) (PLLA), com diferentes densidades e obtiveram melhoria de resultados com estes tubos cheios de microfilamentos podendo estes serem embebidos com outro material proteico.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Enquanto os materiais naturais são apreciados pela sua biocompatibilidade, os materiais sintéticos tornam-se atractivos pelas sua propriedades físicas e químicas, como o ritmo de degradação, a porosidade, a força mecânica, a condutividade eléctrica, poderem ser especificamente optimizadas de acordo com sua aplicação particular, tal como também a consistência do material pode ser controlada (Schmidt e Leach, 2003; Bruns *et al.*, 2006). Mas infelizmente muitas vezes é acompanhada de resposta inflamatória e imunológica (Schmidt e Leach, 2003). Também é preciso não esquecer que todos os biomateriais para aplicações *in vivo* são previamente aprovados pela "US Food and Drug Administration (FDA)". Infelizmente em regeneração do nervo periférico são poucos os biomateriais aprovados pela FDA (Archibald *et al.*, 1995). E também muitos deles limitados a soluções de continuidade muito pequenas e que não se podem utilizar em grandes defeitos (Schmidt e Leach, 2003).

A primeira característica de um material sintético a ter em conta, é o ser biodegradável ou não. Quando é utilizado um biomaterial não biodegradável ou não-absorvivel, torna-se necessário remover posteriormente o implante, devido à estenose que a permanência deste tudo provoca, no local da cicatriz e o efeito negativo sobre a função do nervo (Merle *et al.*, 1989).

Outro factor importante a ter em conta quando falamos em biomateriais, é a velocidade da sua biodegradação, isto é, se se degrada muito rapidamente, o seu desaparecimento poderá ocorrer antes que esteja completa a regeneração ou sem que a regeneração esteja suficientemente sólida para suportar a ligação entre os dois topos (den Dunnen *et al.*, 1995). Se pelo contrário, a absorção for demasiado lenta, poderá a partir de determinada altura provocar uma compressão no local da regeneração e funcionar como inibidor deste processo (den Dunnen *et al.*, 1995). A velocidade de degradação de um biomaterial pode ser definida através do controlo de parâmetros específicos durante o seu fabrico, o que parece também ser uma vantagem a explorar no fabrico de biomateriais.

Muitos polímeros bioreabsorvíveis têm sido utilizados como dispositivos biomédicos devido às suas propriedades físico-químicas e mecânicas, cada vez mais adequadas para aplicação no corpo humano e também em animais.

Na classe dos poli (α-hidroxi ácidos) encontram-se muitos exemplos de polímeros reabsorvíveis utilizados na regeneração do nervo periférico (por ex: poli (l-ácido láctico, poli (ácido glicólico) e seus copolímeros. As desvantagens destes polímeros são a sua má biocompatibilidade, a libertação de produtos ácidos resultantes do processo de degradação no local de regeneração, a má processabilidade e ainda a perda de propriedades mecânicas muito cedo, isto é, antes do processo de regeneração estar completo. A vantagem da utilização de um copolímero é poder variar a proporção entre os monómeros e optimizar as suas propriedades, como por exemplo o tempo de degradação do material para a aplicação em vista, a sua configuração geométrica e ainda todas as sua propriedades físico-químicas (Huang e Huang, 2006).

O processo de degradação de um polímero é função da sua massa molar, composição, história térmica e estrutura cristalina. Apesar de um material ser amorfo ou parcialmente cristalino, antes do processo de degradação, o comportamento observado em muitos materiais reabsorvíveis mostra que à medida que o processo de degradação ocorre, o material torna-se mais cristalino, dificultando a mobilidade das cadeias das regiões amorfas (Ratner *et al.*, 2004). Como a presença de fragmentos cristalinos pode causar reacções inflamatórias, é fundamental proceder a um estudo detalhado do processo de degradação (Ratner *et al.*, 2004). Neste ensaio de degradação, acelerado ou em tempo real, deverá proceder-se à avaliação da morfologia (ex: TEM- microscopia electrónica de transmissão), variação da temperatura vítrea, Tg (DSC- calorimetria diferencial de varrimento), perda de massa/alteração da massa molecular (TGA- analise gravimétrica e GPC – cromatografia de exclusão molecular) e o intumescimento (Ratner *et al.*, 2004). Esta caracterização tem em vista seleccionar o material que alie propriedades mecânicas e um tempo de degradação adequado a aplicações em regeneração nervosa periférica.

Por outro lado, a estrutura tridimensional (Harley *et al.*, 2006) e a microgeometria da superfície tubo-guia influencia a regeneração do nervo periférico afectando potencialmente na disposição inicial da matriz de fibrina e/ou na resposta celular do local (Aebischer *et al.*, 1990). A utilização de materiais sintéticos como suporte para a adesão e crescimento de células, como as células de Schwann, ou como sistema de libertação controlada de moléculas terapêuticas, como os factores neurotróficos, requer uma caracterização de superfície e estrutural detalhada. Factores como os grupos químicos disponíveis à superfície, hidrofobicidade, carga de superfície e rugosidade são conhecidos por influenciar a adesão celular e a absorção de moléculas na superfície de um biomaterial. A utilização de um material com substrato para células requer o desenvolvimento de uma matriz tridimensional, mecanicamente estável e com poros interconectados, para que as células possam crescer por toda a estrutura. À medida que

as células crescem e se organizam, o polímero deve degradar-se e ser absorvido pelo organismo, levando a uma substituição natural do tecido em causa (Harley *et al.*, 2006).

5. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO NEUROLÓGICA

Após uma lesão ou doença do sistema nervoso, o objectivo final do tratamento é promover a recuperação funcional, sendo que é de grande importância que tenhamos meios para o realizar.

Os ratos são a espécie mais utilizada como modelo na investigação de doenças neurológicas quer do sistema nervoso periférico e central, quer ainda em doenças neurovegetativas (ex: Alzheimar e Parkinson) (Cenci *et al*., 2002). Uma das principais dificuldades que se deparam aos investigadores, que se dedicam ao estudo de lesões do nervo periférico, é a avaliação da recuperação funcional. Não existem métodos perfeitos para esta avaliação, daí terem sido desenvolvidos vários métodos e técnicas, todas elas se utilizadas em simultâneo, ajudam a minimizar as imperfeições de cada uma e portanto, a validar as conclusões finais. Também é sabido das diferenças que existem no tipo de locomoção quadrúpede dos animais e bípede dos humanos, no entanto têm sido demonstradas algumas semelhanças básicas entre ambos (Duysens *et al*, 2002). O nervo ciático logo abaixo da fossa poplitea subdivide-se em três ramos: tibial, peroneal e sural (Figura 19).

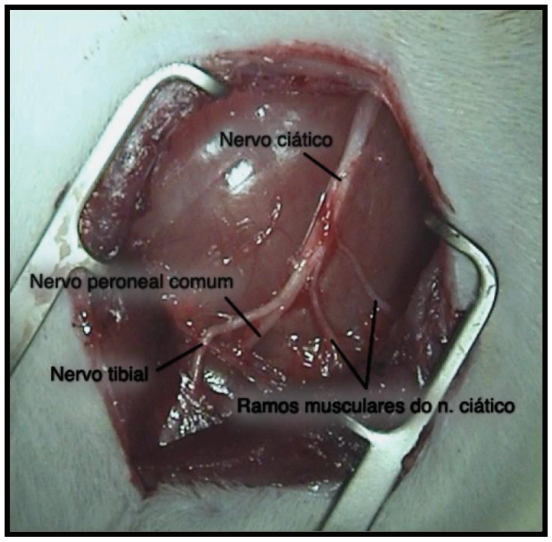


Figura 19: Acesso cirúrgico ao nervo ciático do rato, mostrando a união dos seus ramos musculares e a sua bifurcação em nervo peroneal e nervo tibial (Figura gentilmente cedida por Professor Doutor Artur Varejão).

Cada um destes ramos com diferentes proporções de axónios motores, sensitivos e autónomos que se dirigem para músculos, pele, vasos e glândulas sudoríparas, localizam-se em territórios definidos dos membros pélvicos. A lesão de um destes ramos induz a paralisia e anestesia de determinadas regiões particulares. Os corpos celulares destes axónios encontram-se distribuídos em diferentes locais da medula espinhal e nos

gânglios de raiz dorsal (Rodriguez *et al*., 2004). Apesar das lesões do nervo ciático serem raras, quer em Medicina Veterinária quer em Medicina Humana, este modelo experimental representa um teste muito realista quando queremos estudar nervos mistos ou plurifasciculares com axónios de diferentes tamanhos e com diferentes tecidos alvo (Mackinnon *et al*., 1985).

A adicionar a estas dificuldades, existem as inerentes a possíveis efeitos secundários referentes à evolução dessa recuperação nas diferentes lesões. À medida que as lesões se tornam mais graves são também mais frequentes as lesões secundárias, decorrentes de longos períodos de desinervação, como por exemplo, atrofias musculares, anquiloses da articulação tíbio-társica e ainda contracturas musculares e autotomias. Estas lesões secundárias muitas vezes tornam impossíveis a aplicação de muitos testes de avaliação. Por exemplo, o aparecimento de uma autotomia profunda torna impossível a recolha de medidas utilizadas no Índice de Funcionalidade do Ciático (SFI) ou ainda a anquilose da articulação tíbio-társica pode comprometer o reflexo postural de extensão do membro afectado. O aparecimento de contracturas leva também, a uma alteração do andamento o que poderá tornar inválida a avaliação da recuperação através deste método (Dellon e Mackinnon, 1989). Também, quanto mais grave é a lesão induzida no nervo ciático, maior é a incidência destas lesões secundárias e como tal, maior é a dificuldade de aplicação de testes funcionais de avaliação da regeneração nervosa.

Com base nestas dificuldades muitos investigadores têm utilizado modelos experimentais cuja lesão é de menor gravidade e portanto com menor incidência de lesões secundárias, como é o caso do esmagamento, e como consequência, maior facilidade e viabilidade de avaliação da evolução funcional. Esta é uma das razões pela qual o modelo de esmagamento do nervo é tão utilizado em estudos de investigação de regeneração do nervo periférico (Varejão, 2003; Luís *et al*, 2007 b).

Estas são razões que justificam a utilização de vários métodos tendo em conta a lesão induzida, sendo também relevante estabelecer correlações entre os vários métodos de avaliação, de forma à obtenção de uma melhor combinação de ferramentas, com a melhor avaliação possível e portanto, com resultados mais viáveis (Hadlock *et al*., 1999; Varejão *et al*., 2001; 2004 a). Na verdade os diferentes métodos utilizados nem sempre apresentam a correlação necessária em termos de recuperação da actividade motora, sensorial e autónoma (Dellon e Mackinnon, 1989; Hare *et al*., 1992; Koka e Hadlock, 2001).

Também é sabido que uma ferramenta importante para a avaliação da regeneração do nervo periférico é a avaliação morfológica através da **histomorfometria**. Somente este método é completamente alheio às lesões secundárias anteriormente descritas e capaz de nos dizer se as estruturas estão presentes ou não. É também o método com menor

subjectividade do investigador (ver 5.2) e portanto mais preciso na sua forma de realização e interpretação o que explica também o grande número de trabalhos em regeneração do nervo, cuja única forma de avaliação realizada é somente através da histomorfometria. No entanto, pouco nos informa acerca da funcionalidade, que nos parece ser de extrema importância, em especial quando queremos aplicar a investigação à prática clínica de Medicina Veterinária e Humana. Para qualquer doente ou clínico, tem mais importância a recuperação da função do que a recuperação morfológica. Muitos autores têm observado que existe muitas vezes uma falta de correlação entre os resultados obtidos através da histomorfometria e os resultados obtidos pelos testes funcionais. E têm sido levantadas algumas razões para esta discordância, entre elas a regeneração axonal incompleta e ainda o direccionamento incorrecto das fibras nervosas regeneradas (Dellon e Macckinnon, 1989; De Medinaceli e Seaber 1989). Após a secção do nervo periférico, as fibras nervosas reinervam os músculos de forma não selectiva, o que leva a um padrão de activação dos músculos da perna, anormal durante o andamento (Gramsbergen *et al.,* 2000). Um determinado músculo poderá estar devidamente reinervado mas o controlo cortical pode não permitir uma activação muscular adequada (Dellon e Mackinnon, 1989). Após lesão de um nervo periférico a reorganização do córtex somatossensorial poderá influenciar a recuperação funcional (Ridding *et al*., 2000; Dupont *et al*., 2001). É sabido também da capacidade que qualquer animal tem para se adaptar e portanto conseguir recuperar a função através do desenvolvimento de meios alternativos, adaptando-se às suas novas condições ou limitações morfológicas. Tudo isto poderá servir de explicação para a correlação moderada que existe entre os diferentes testes que tradicionalmente se usam para avaliação da regeneração do nervo periférico (histomorfometria, electrofisiologia e estudo das pegadas). Daí que a escolha do método de avaliação deva ter em conta os diferentes componentes do processo regenerativo (Mackinnon, 1996; Kanaya *et al*., 1996).

5. 1. TESTES DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

5.1.1. REACÇÃO POSTURAL DE EXTENSÃO (RPE)

Em 1995 foi proposta a Reacção Postural de Extensão (RPE) para avaliação da função motora dos membros pélvicos do rato (Tralhammer *et al*., 1995). Esta reacção postural, em Medicina Veterinária, faz parte integrante do exame neurológico que é utilizado na clínica de animais de companhia. Para a realização deste teste, todo o corpo do animal deve ser envolvido num pano, com excepção dos membros pélvicos, sendo suspenso pelo tórax numa posição vertical e de seguida transportado para uma plataforma de uma

balança digital. Enquanto o membro a testar realiza um movimento de extensão a antecipar o contacto com a plataforma, o outro membro é seguro pelo operador (Figura 20) Deve ser utilizada uma balança digital com uma escala compreendida entre os 0 e 500 g, para registar a força em grama produzida pelo membro a testar.

Figura 20: Execução do teste motor de Reacção Postural de Extensão (RPE). Os valores obtidos para a RPE no membro normal (NRPE) e no membro de experiência (ERPE) são introduzidos numa equação de forma a traduzirem a percentagem de deficit motor do membro experimental relativamente ao membro normal.

O teste é realizado no membro de experiência (ERPE) e no membro normal (NRPE) e os valores obtidos são introduzidos na equação 1, de forma a traduzirem um valor que multiplicado por 100, traduz a percentagem de deficit motor do membro experimental em relação ao membro normal:

% DE DÉFICE MOTOR = (NRPE – ERPE) / NRPE (**Equação 1**)

Este teste é de fácil execução, dependendo apenas de alguma sensibilidade do operador e é uma arma importante para avaliação da função motora, mesmo quando temos dificuldade na realização do estudo das pegadas do rato para dedução do SFI e do Índice de Funcionalidade do Ciático em Condições Estáticas (SSI), por como por exemplo, em casos de autotomia. Tem vindo a ser bastante usado por ter mostrado resultados comparáveis aos obtidos com o estudo das pegadas do rato (Hadlock *et al*., 1999a; Koka e Hadlock, 2001).

5.1.2. AVALIAÇÃO SENSORIAL (WRL)

Esta avaliação baseia-se na quantificação do reflexo flexor proposto por Sherrington em 1910, através do qual o animal exibe um reflexo de retirada do membro quando exposto a um estimulo térmico, mecânico ou eléctrico. A avaliação nociceptiva é então testada

através da observação do reflexo de retirada do membro pélvico como resposta a uma estimulação nociceptiva (Schouenborg e Kalliomaki, 1990). Alguns investigadores têm evocado este reflexo pós-sinaptico usando vários estímulos dolorosos como: estimulação térmica (Hu *et al*., 1997; Varejão *et al*., 2003 a), estimulação eléctrica (Hoogeveen *et al*., 1992), estimulação mecânica (Chamberlein *et al*., 2000), ou ainda utilizando uma picada com uma agulha (Navarro *et al*., 1994). No nosso trabalho a recuperação sensorial, ou seja, a reinervação da face plantar do membro foi avaliada através da utilização de um estímulo térmico doloroso (Figura 21). A função nociceptiva, com base numa técnica desenvolvida e adoptada por Masters e colaboradores em 1993, é avaliada utilizando um estimulo térmico, usando para tal uma placa térmica aquecida a 56 ºC. À semelhança do teste anterior, o animal é envolvido num pano e o membro a testar é posicionado de forma a tocar na placa aquecida (Figura 21). A duração necessária do estímulo para induzir o reflexo flexor é registada e determina a Latência do Reflexo Flexor (WRL). Este reflexo em ratos e em membros normais não deverá exceder os 4.3 segundos (Hu *et al*., 1997). O membro afectado é testado três vezes consecutivas, em intervalos de 2 segundos entre eles, a fim de evitar o fenómeno de sensibilização, após o que é realizada a média desses três registos. A fim de evitar lesões de queimadura da pele, caso não ocorra reflexo de flexão após o tempo máximo de 12 segundos, o teste será terminado usando-se para registo o valor de 12 segundos. Para uma correcta avaliação da recuperação nociceptiva deve ser evitada a região medial da face plantar do pé do rato, de forma a limitar a influência da invasão territorial por parte do nervo safeno quando numa lesão do nervo ciático (Kingery e Vallin, 1989). Tal como no teste anterior, para evitar erros de leitura, os animais deverão estar tranquilos, serem testados em ambiente calmo, retirando se possível todas as possíveis fontes de stress. Se possível também, deverá ser realizado pelo mesmo operador, numa sequência sempre idêntica, com o mesmo material e na mesma sala, evitando desta forma fontes de curiosidade e distracção.

Figura 21: Execução do teste de sensibilidade da Latência do Reflexo Flexor (WRL).

Outras formas de avaliação nociceptiva incluem a detecção do fenómeno de alodinia, de hiperalgesia ou de dor crónica, que são normalmente utilizadas em estudos de constrição crónica do nervo e especialmente utilizada quando o objectivo do estudo é a dor ou investigação de medicamentos analgésicos. Para isso é necessário uma observação cuidada do comportamento dos animais dado a presença de dor crónica ser manifestada através de alterações de comportamento (Monassi *et al*., 2003; Keay *et al.*, 2004). Em Medicina Humana são muitas vezes utilizados os filamentos de *Von Frey* como forma de testar a função nociceptiva, mas especialmente para diagnóstico de alodinia.

5.1.3 ESTUDO DAS PEGADAS (WALKING TRACK ANALYSIS) (SFI E SSI)

De Medinaceli e colaboradores em 1982, utilizando o rato como modelo experimental criaram um método para quantificar a recuperação funcional do nervo ciático após lesão, baseado no estudo das pegadas (*walking track Analysis*). Destes estudos resultou o Índice de Funcionalidade do Ciático (SFI). Desde aí, muitos investigadores têm utilizado esta ferramenta de avaliação funcional em estudos de lesões do nervo periférico. Trata-se de um meio que não requer equipamento especialmente dispendioso, de fácil execução e com resultados precisos e fiáveis (De Medinaceli *et al*., 1982; Bain *et al*., 1989; Nichols *et al*., 2005).

5.1.3.1. IMPRESSÃO DAS PEGADAS

Desde 1982 que várias estripeis de *Rattus norvegius* têm sido utilizados para a obtenção de pegadas mensuráveis capazes de serem utilizadas no cálculo do SFI. O animal é colocado num corredor, que termina numa caixa com fraca luminosidade de forma a se sentir atraído para o seu interior (De Medinaceli *et al*., 1982; Maeda *et al*., 1993; Maeda *et al.*, 1999; Meek *et al*., 1999, Varejão, 2003). No chão do corredor é colocada uma tira de papel branco com as dimensões apropriadas sobre a qual os animais vão andar e imprimir a sua pegada, após a face plantar dos pés ter sido pintada (Figura 24 A). A fase plantar de ambos os membros posteriores é pintada colocando-os em contacto com uma esponja embebida em tinta preta não tóxica (Figura 24 A). Vários métodos de impressão de pegadas têm sido descritos com vista a melhorar a qualidade das imagens obtidas, não só substâncias para pintar a face plantar como também diferentes materiais a colocar no chão do corredor. O método descrito por De Medinaceli e colaboradores em 1982, utilizou películas fotográficas e em que a face plantar do membro era marcado com

liquido revelador. No entanto, outros métodos utilizaram vaselina em papel branco (Rushton *et al*., 1963), gordura e papel polígrafo (Hruska *et al*., 1979), uma folha de papel previamente mergulhada em bromofenol (Lowdon *et al.*, 1988) e a utilização da tinta em papel branco (Jolicoeur *et al*., 1979). O uso de papel de fotografia com revelador fotográfico apesar de ser utilizado por alguns investigadores (MeeK *et al*., 1997), apresenta algumas desvantagens, tais como: o seu custo, ser escorregadio e ainda o líquido de revelação ser irritante para a pele (Dijkstra *et al*., 2000). Em 1990 Westerga e Gramsbergen introduz a utilização de um espelho inclinado na obtenção de dois planos da extremidade dos membros pélvicos, no plano sagital e transversal. O registo de imagens para o cálculo do SFI, realizado em vídeo, foi utilizado por Walker e colaboradores em 1994, e Dijkstra e colaboradores em 2000. Para tal é construído um corredor em material acrílico transparente, onde é colocado um espelho a 45º por baixo do referido corredor, com uma câmara de filmar em posição ortogonal (Figura 22).

Figura 22: Corredor em material acrílico transparente, onde é colocado um espelho a 45º por baixo do referido corredor, sendo que câmara de filmar se encontra em posição ortogonal.

As imagens seleccionadas para o cálculo do SFI têm que corresponder a uma caminhada, na qual não poderá haver algum tipo de hesitações (Dijkstra *et al*., 2000; Meek *et al*., 2001). As imagens obtidas na posição de estação foram mais tarde utilizadas por Bervar (2000) para o cálculo de um novo índice, o Índice de Funcionalidade do Ciático em Condições Estáticas (SSI).

5.1.3.2. ANALISE DA IMPRESSÃO DAS PEGADAS – CÁLCULO DO SFI

O cálculo do SFI é obtido, depois da obtenção da impressão da face plantar, e através dos seguintes parâmetros: i) distância entre o extremo do terceiro dedo e o calcanhar (zona mais posterior do pé que contacta com o solo) – Comprimento da Pegada (PL); ii) a distância entre o primeiro e o quinto dedo – Largura da Pegada (TS); e iii) a distância entre o segundo e o quarto dedo – Largura Intermédia da Pegada (ITS). As medições são realizadas para o membro normal (N) e de experiência (E) (Figura 23 A e B).

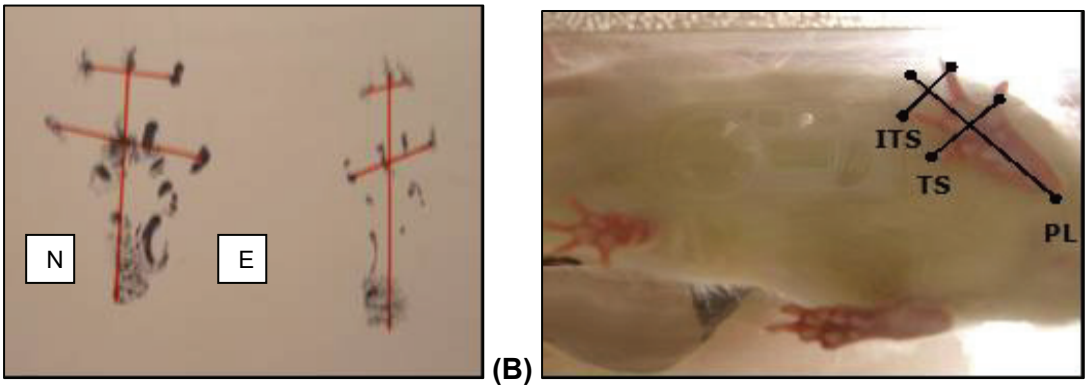


Figura 23 – Fotografia da fase de suporte do andamento do rato, tirada num corredor com impressão das pegadas em tiras de papel branco (A) (membro normal - N e membro de experiência - E) ou num corredor de acrílico (B). Foram assinalados os seguintes segmentos: PL é o comprimento da pegada; TS é a largura da pegada; IT é a largura intermédia da pegada.

Tal como já foi referido o cálculo do SFI originalmente descrito por De Medinaceli e colaboradores em 1982, sofreu algumas alterações e surgiu uma equação proposta por Bain e colaboradores em 1989.

$$SFI = -38{,}3\left(\frac{EPL - NPL}{NPL}\right) + 109{,}5\left(\frac{ETS - NTS}{NTS}\right) + 13{,}3\left(\frac{EIT - NIT}{NIT}\right) - 8{,}8 \quad (\textbf{Equação 2})$$

Ou

$$SFI = -38.3 \times PLF + 109.5 \times TSF + 13.3 \times ITF - 8.8 \quad (\textbf{Equação 3})$$

Em que: PL corresponde ao comprimento da pegada; TS à largura da pegada; o ITS à largura intermédia da pegada; N corresponde ao membro normal e E ao membro experimental.

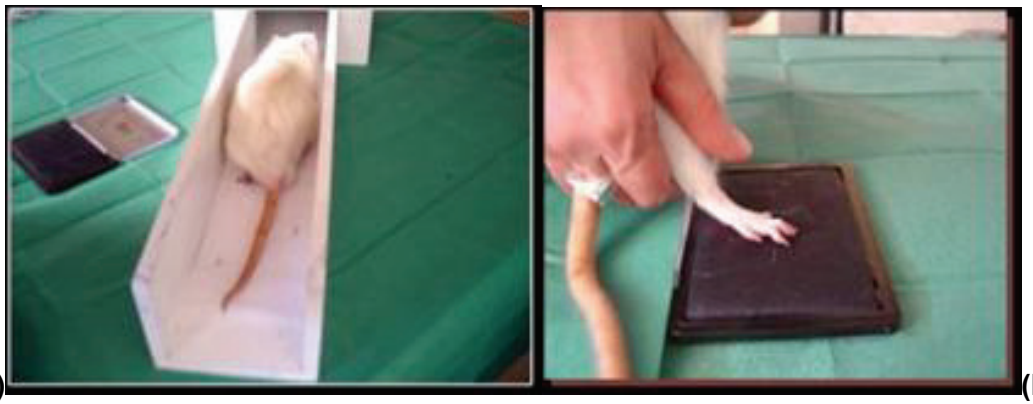
(A)  (B)

Figura 24: Realização do teste SFI. Para a impressão das pegadas, são colocadas tiras de papel branco com a dimensão adequada no corredor (A) e a face plantar dos pés dos ratos é pintada com tinta através da impressão do pé do rato numa esponja de tinta preta não tóxica (B).

O valor do SFI varia entre zero, referente a uma função normal e -100, para uma disfunção absoluta (Kanaya *et al*., 1992; Terris *et al*., 1999). No nosso trabalho, foi utilizado um corredor que termina numa caixa com fraca luminosidade, de forma a atrair o rato para o seu interior (Figura 24 A) tal como descrito anteriormente. Previamente, à realização da prova, os animais devem ser treinados a andar no corredor em direcção à caixa (Varejão, 2003). Para a impressão das pegadas, foram colocadas tiras de papel branco com a dimensão adequada ao corredor e a face plantar dos pés dos ratos é pintada através da impressão do pé do rato numa esponja de tinta preta (Figura 24 B). Utilizando o rato como modelo experimental, pode-se observar que a duração da fase de suporte do membro experimental é inferior ao do membro normal (Varejão, 2003). Quando existe uma lesão do nervo ciático, normalmente assiste-se a um aumento do PL, diminuição de TS e de ITS que vão evoluindo gradualmente para valores cada vez mais perto dos normais, à mediada que há recuperação. Os valores de PL dependem do nervo tibial posterior e activam a função do músculo gastrocnémico, enquanto que TS e ITS reflectem a enervação do músculo extensor e intrínseco do pé (Bain *et al*., 1989; Valero-Cabré e Navarro, 2001). Após lesão do nervo ciático a impossibilidade ou dificuldade na abdução dos dedos é traduzida na equação pelo aumento de TSF, enquanto que o aumento do comprimento da pegada reflecte-se na obtenção de um coeficiente negativo na referida equação (Bain *et al*., 1989; Inserra *et al*., 1998).

Outros índices foram recomendados para avaliação da recuperação funcional como são o caso de Índice de Funcionalidade do Tibial (TFI) e Índice de Funcionalidade do Peroneal (PFI) (Hare *et al*., 1992).

Uma outra forma de avaliação dos parâmetros das pegadas é através de técnicas de digitalização (Hare *et al*., 1992; Maeda *et al.,* 1993;) e ainda a utilização de um software para cálculo dos índices de funcionalidade (Dellon e Dellon, 1991; Oliveira *et al*., 2001).

5.1.3.3. LARGURA DAS PEGADAS - CÁLCULO DO SSI

A obtenção de pegadas que apresentem uma boa leitura para o cálculo do SFI por vezes é difícil de realizar e poderá ser ainda acrescida de alguns problemas que poderão surgir durante a recuperação, como são o caso de contraturas e o fenómeno de autotomia (Figura 25) (Varejão, 2003). Estas dificuldades são tanto mais frequentes quanto mais grave a lesão do nervo ciático. A medição do parâmetro TS pode ser difícil e por vezes mesmo impossível de se realizar (De Medinaceli *et al*., 1982). Nestes casos, é dado um valor de 6 mm para esse parâmetro ou é realizada a medição manual. Para a medição manual, o rato é colocado em posição vertical e a face plantar do membro é direccionada para uma folha de acetato (Bain *et al*., 1989; Brown *et al*., 1989) ou ainda para uma folha de papel branco, da mesma forma que para a realização do SFI (Figura 23 e 24).
Devido a estas dificuldades Bervar, em 2000 propôs uma fórmula que tem vindo a ser utilizada por alguns investigadores e também adoptada no nosso trabalho, como é o caso do Índice de **Funcionalidade do Ciático em Condições Estáticas (SSI),** onde não é utilizada a medida de PL (comprimento da pegada) (Bervar, 2000). É representada pela seguinte equação:

$$SSI = 108.4 \times TSF + 31.85 \times ITF - 5.49 \quad (\textbf{Equação 4})$$

A perda de 100% da capacidade motora de membro lesionado corresponde a um valor de TS de 35% em relação ao membro normal, enquanto que uma perda de 50% corresponde a um valor de TS de cerca de 65% (Hoogeveen *et al*., 1992).

5.1.3.4. LIMITAÇÕES DO SFI

Tal com já foi referido anteriormente a obtenção de pegadas que representem uma boa leitura para o cálculo do SFI, por vezes torna-se difícil e muitas vezes são necessárias várias passagens do rato pelo corredor, o que poderá transmitir algum grau de subjectividade (Bain *et al*., 1989; Hare *et al*., 1992; Varejão *et al*., 2001). Têm sido apontados muitos problemas de subjectividade inter e intra-observador e respectiva validade da análise deste teste, desde a primeira descrição da análise da impressão das pegadas (Grasso *et al*., 2004). Frequentemente os ratos param no corredor ou antes de entrar na caixa escura, colocando o peso sobre os membros pélvicos, criando valores falsamente exagerados de PL (Dellon e Dellon, 1991). Também a **velocidade** do andamento durante a fase de suporte influencia os valores de PL (Walker *et al*., 1999b). Dijkstra *et al*., (2000) referem a importância da análise das pegadas ser realizada em

pegadas não-hesitantes e de **velocidade constante**, uma vez que os valores de PL variam com a velocidade do andamento. O **aumento de peso corporal** ao longo do trabalho experimental pode igualmente influenciar a medição das pegadas (Dellon e Dellon, 1991). Este mesmo autor, e em estripes de ratos Sprague Dawley, descreve um fenómeno de compensação do membro normal que suporta mais peso, compensando desta forma o membro lesado (Dellon e Dellon, 1991). Este fenómeno foi mais tarde rebatido por Hare *et al.* (1992), num ensaio de avaliação a longo prazo da regeneração nervosa em ratos de estirpe Lewis. É sugerido, que uma ligeira evolução favorável no membro lesado, mesmo antes da conexão funcional entre os topos distal e proximal do ciático, se deva a um fenómeno de adaptação por parte do animal (Chamberlain *et al*., 2000). Utilizando o rato como modelo experimental, é possível observar que a duração da fase de suporte do membro experimental é inferior ao do membro normal (Dijkstra *et al*., 2000; Meek *et al*., 2001).

O aparecimento de **contracturas articulares** em lesões do nervo ciático são resultado de uma reinervação mais rápida ou completa dos músculos flexores em detrimento dos músculos extensores e fazem com que os animais caminhem sobre o dorso do pé (Chamberlain *et al*., 2000). Este fenómeno faz com que não seja possível a obtenção de impressão de pegadas. A fim de evitar as contracturas, muitos investigadores têm recorrido a técnicas de fisioterapia, quer através da manipulação manual do membro lesado quer ainda através da utilização de uma rede com cerca de 45º de inclinação e que é colocada no interior da jaula dos animais (Kobayashi *et al*., 1997;Varejão *et al*., 2003). De facto, a utilização de um protocolo de fisioterapia tem-se mostrado vantajoso na fase inicial da regeneração, evitando a inactivação muscular durante períodos prolongados (Watson *et al*., 2001; Sagiv *et al*., 2002; Varejão *et al*., 2003).

O fenómeno de **autotomia** é muitas vezes observado especialmente quando são realizadas lesões de secção do nervo ciático em ratos (Figura 25). É possível que tenha origem numa disestesia dolorosa projectada nos dedos que leva à auto-mutilação, em especial dos dois dedos laterais (Kauppila, 1998). Este fenómeno leva também a uma incapacidade de obtenção de valores para o cálculo de SFI e SSI e pode ser evitado através da utilização de uma substância com um sabor dissuasor no local (Hadlock *et al*., 1999b, Varejão, 2003; Luís *et al.,* 2007). Outras estratégias têm sido utilizadas por outros autores como o uso de amitriptilina (Navarro et al., 1994; Rodriguez *et al*., 1999) e o alojamento na mesma jaula de machos e fêmeas (Zellem *et al*., 1989).

(A) (B)

Figura 25: (A) grau grave de autotomia com desaparecimento completo do 1º e 2º dedos, que implica a não utilização deste animal em estudos de SFI e SSI; (B) Grau suave de autotomia em que apenas houve perda das unhas, o que permite ainda o registo de medidas para o cálculo de SFI e cálculo de SSI.

Os valores de SFI nunca são de zero em animais com o membro intacto mas oscilam à volta de -10, o que provavelmente também é indicativo de que este método não é inteiramente preciso. Interessa portanto estabelecer limites para a aplicação deste teste e ainda estabelecer correlações entre os resultados por meio destes testes e a histomorfometria. Em lesões de axonotmese parece não haver dúvida de que existe uma tendência de recuperação funcional visível à medida que os valores de SFI se dirigem para valores mais perto do zero (normal) e parece também haver uma correlação directa entre os dados de morfometria e SFI (Mendonça *et al*., 2003) mais especificamente entre a evolução da densidade nervo-fibra e dos valores de SFI (Oliveira *et al*., 2001), confirmando a validade do SFI como uma ferramenta viável para a avaliação funcional do nervo ciático em rato. Também em lesões de axonotmese, muitas das complicações que impossibilitam a recolha de dados para o estudo das pegadas não estão presentes: o tempo de reinervação do órgão alvo é menor, a desinervação e a inactividade é menor, as contracturas são portanto raras tais como os fenómenos de autotomia. Tal como já foi referido, estas são entre outras, as razões pelas quais as lesões de axonotmese são preferidas por muitos investigadores para o estudo da regeneração do nervo periférico.

5.1.4. ANÁLISE CINEMÁTICA

Para além da avaliação da recuperação funcional é importante saber se a função de locomoção é realizada correctamente e para isso a análise cinemática é a melhor ferramenta. A análise visual é o método de avaliação do movimento mais utilizado, nomeadamente na análise da marcha (Knudson e Morrison, 1997). É utilizada como instrumento de avaliação, de monitorização e de diagnóstico (Winter, 1990). A perda de

informação importante, como pequenas mas significativas alterações na evolução das condições clínicas, promoveu a necessidade de dispor de instrumentos de medida que possibilitem a obtenção de informação cinemática, através da utilização de câmaras de vídeo de alta velocidade e computadores, sensíveis a pequenas alterações. A possibilidade de avaliar movimento funcional através de dados objectivos, nomeadamente através da amplitude articular, permite orientar a tomada de decisões na intervenção terapêutica, avaliar resultados e pode também melhorar a compreensão da evolução de uma patologia, como é o caso das afecções ortopédicas e neurológicas (Durward *et al.*, 1999). Estas técnicas têm sido aplicadas a patologias no Homem (Huitema *et al*., 2002) mas também no cão e no gato (McLaughin, 2001).

A compreensão e avaliação da análise da locomoção do rato deverão ser um desafio para a investigação biomecânica. Sendo um processo mecânico que requer coordenação entre recepção sensorial, a resposta motora e a integração cortical, é apropriado o seu estudo sob a perspectiva da análise biomecânica (Varejão et al., 2001). Recentemente, a actividade locomotora do rato tem também sido objecto de estudo no campo da fisiopatologia muscular e do nervo periférico (Varejão *et al*., 2003).

As variáveis usadas na descrição e análise de qualquer movimento podem ser categorizadas da seguinte forma: cinemática, cinética, antropometria, mecânica muscular e electromiografia. A cinemática descreve os detalhes do movimento em si mesmo, independentemente das forças, internas e externas, que o originaram (Winter, 1990). Envolve variáveis, tais como: deslocamento linear e angular, velocidade e aceleração (Nigg e Cole, 1994; Winter, 1990)**.**

A cinemática da articulação tíbio-társica permite uma análise precisa e quantifica pequenas alterações biomecânicas, até recentemente inacessíveis. Perante o estudo do movimento angular da articulação tíbio-társica que sofre alterações significativas em lesões do nervo ciático, durante a recuperação funcional (Varejão *et al*., 2003). Nos ratos normais, no último período da fase de apoio, a articulação tíbio-társica move-se para flexão plantar. Este movimento é necessário para a progressão do andamento através da contracção dos músculos posteriores da perna. A comparação dos dados cinemáticos entre animais normais e animais sujeitos a lesão do nervo ciático facilitará a compreensão dos distúrbios fisiopatológicos que afectam os membros posteriores.

Será feita uma revisão dos vários parâmetros cinemáticos utilizados nos diferentes estudos. De referir a existência de bibliografia escassa, com recurso a esta metodologia.

Usualmente para a análise da locomoção, o animal percorre um corredor de acrílico que permite visualizar simultaneamente o plano lateral e ventral, através da utilização de um espelho colocado por baixo do corredor a 45º da base do corredor (Dijkstra *et al*., 2000, Meek *et al*., 2004) (Figura 22 e 26).

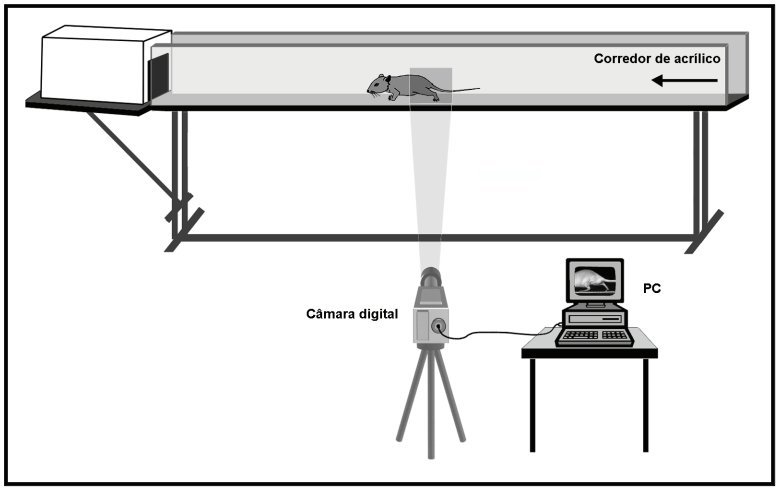
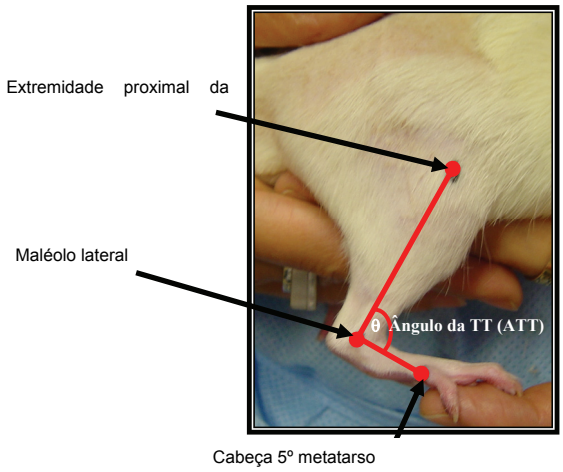
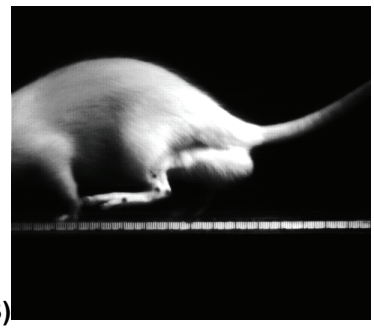


Figura 26: Esquema de recolha de dados para análise cinemática (Varejão, 2003).

Importa referir, a existência de mais do que um modelo biomecânico bidimensional descrito na literatura. O aspecto que difere entre eles está relacionado com a definição dos segmentos rígidos. Yu e seus colaboradores (2001) definiram o ângulo da articulação tíbio-társica pela intersecção das linhas obtidas pelo prolongamento: i) da articulação do joelho até a articulação tíbio-társica e ii) da articulação tíbio-társica até à cabeça do 5º metatarso (Figura 27 A). Por outro lado, Varejão e colaboradores (2002) caracterizaram o modelo biomecânico bidimensional definindo dois segmentos rígidos: i) uma linha que une o joelho ao tarso (segmento da perna) e ii) uma linha que une a cabeça do 5º metatarso ao tarso (segmento do pé) (Figura 27 B). Para definir os segmentos mencionados do membro pélvico são tatuados manualmente, no fim de cada cirurgia e ainda sob anestesia, com tinta preta, 3 pontos de referência correspondentes às seguintes referências anatómicas: i) o ponto proximal da extremidade proximal da tíbia; ii) o maléolo lateral; e iii) cabeça do 5º metatarso (Figura 27 A).



(A)



(B)

Figura 27 – Modelo biomecânico para a articulação tíbio-társica (A)(Amado, 2007); (B) (Varejão, 2003)

O modelo biomecânico utilizado definido desta forma é constituído por dois segmentos: **perna** e **pé**. Os segmentos definem-se através da união das referências anatómicas previamente marcadas (Figura 27).

O ângulo da articulação tíbio–társica, no plano sagital, é estimado a partir da diferença entre o ângulo do pé e o ângulo da perna (**Equação 5 A**), ângulos estes medidos na direcção dos ponteiros do relógio com a linha horizontal a 0º, ou através do produto interno de 2 vectores que representam o pé e a perna (**Equação 5 B**).

$$\theta_{\text{Articulação tíbio-társica}} = \theta_{\text{pé}} - \theta_{\text{perna}} - 90^{\circ}. \qquad \textbf{(Equação 5 A)}$$

$$\cos\theta = \frac{(x1-x2)(x3-x2) + (y1-y2)(y3-y2)}{|b| \times |c|}$$

$$\theta = \cos^{-1}\theta \qquad \textbf{(Equação 5 B)}$$

Equação 5 – Equação utilizada para calcular o ângulo da articulação tíbio–társica (Varejão *et al*., 2002) (Equação 5 A); (Amado , 2007) (Equação 5 B).

No rato, o pé está praticamente em ângulo recto com a perna. Neste modelo biomecânico, se o segmento do pé estivesse localizado exactamente a 90º do segmento perna durante determinado período da fase de suporte, o ângulo da articulação tíbio – társica seria definido com valor 0º (zeroº). Se o valor do ângulo entre os dois segmentos (θ) da articulação tíbio - társica fosse positivo, o pé era considerado em flexão dorsal; se negativo, o pé era considerado em flexão plantar; quando o valor era 0º, o pé era considerado em posição neutra.

Também Filipe e seus colaboradores no seu estudo, onde se propôs estudar os efeitos do movimento da pele na região da articulação do joelho na marca de referência, utilizou 5 referências anatómicas: i) a crista ilíaca; ii) o grande trocanter; iii) a articulação do joelho; iv) o maléolo lateral e v) a cabeça do 5º metatarso (Figura 27 B). A posição do joelho era determinada pela intersecção de dois círculos definidos na articulação tíbio-társica e coxo-femural, com conhecimento do comprimento dos segmentos fémur e tíbia (Filipe *et al.*, 2006).

A definição do modelo biomecânico que melhor reproduza o comportamento cinemático da articulação tíbio-társica tem sido objecto de preocupação de diversos grupos de investigação, na tentativa de ultrapassar as limitações já encontradas. As marcas usadas para a análise de movimento podem ser pontos pintados na pele nas referências de interesse. Em casos especiais, quando o movimento dos tecidos moles (pele) interfere no movimento em estudo, pode tornar-se vantajoso delinear o segmento de interesse com as marcas nos pontos definidos (Nigg e Cole, 1994)**.** A limitação mais referida na literatura da análise cinemática está relacionada com a precisão da marca na referência anatómica do joelho. Esta limitação parece ficar a dever-se à mobilidade dos tecidos moles, nomeadamente da pele (Basso, 2004, Metz *et al.*, 2000). Várias estratégias foram tomadas no sentido de minimizar esta limitação. Assim, é sugerido que se tatue as referências anatómicas no período pré-cirúrgico (Basso, 2004); que se estime a localização do joelho através da identificação das articulações coxo-femural e tíbio-társica, e da medida do comprimento da tíbia e fémur (Filipe et al., 2006; Metz *et al.*, 2000). Diferenças nos procedimentos experimentais, como a colocação dos marcadores em diferentes referências para definir o modelo geométrico, podem também conduzir a diferentes resultados (Varejão et al., 2003). Daí a importância da realização de marcas que permaneçam durante todo o percurso da investigação.

Interessa aqui também relembrar que o recurso a técnicas de filmar permite também a recolha de parâmetros utilizados no cálculo de SFI e SSI. Walker *et al*., 1994; Bervar, 2000). Dijkstra *et al.* (2000) utilizaram um corredor acrílico com espelho colocado a 45 º por debaixo do animal, estando ele a ser filmado de lado.

5.1.4.1. ERROS COMUNS NA ANÁLISE DO MOVIMENTO

Apesar da avaliação objectiva que a análise cinemática permite fazer do movimento, existem fontes de erro que podem prejudicar a validade dos resultados. Assim, Nigg e Cole (1994) identificam vários tipos de erro. Especialmente na análise de movimento bidimensional, existem erros relacionados basicamente com a determinação da distância entre as marcas de coordenadas, nomeadamente: i) o sistema da câmara (erro das

lentes, predominantemente); ii) a distância entre o objecto e a câmara (o plano do movimento ser diferente do plano calibrado) e iii) erros de projecção (posição oblíqua do campo de interesse). O erro devido à realização de movimento fora da área calibrada reduz-se, se o desvio do plano calibrado de movimento e/ou o comprimento do objecto é menor que a distância entre as lentes da câmara e o objecto.

Segundo os mesmos autores, podemos dividir o tipo de erros em duas partes: i) erros na determinação das coordenadas das marcas de calibração, estes relacionados com: o posicionamento relativo da câmara; número de câmaras; a calibração e a digitalização (os resultados da digitalização manual podem ser afectados por imprecisões de posicionamento do operador); ii) erros na representação dos segmentos cinemáticos usando informação de marcas. Este segundo tipo de erros está relacionado com o facto de uma marca colocada no segmento de interesse não representar sempre a verdadeira localização anatómica, referida como erro absoluto e erro relativo da marca. Entende-se ainda por erro absoluto da marca, como o movimento de uma marca específica em relação à referência do segmento (Nigg e Cole, 1994).

Adicionalmente, a colocação das marcas pode influenciar substancialmente a propagação do erro da coordenada da marca e dos erros dos movimentos relativos da marca, no cálculo da cinemática do movimento. Têm sido sugeridas abordagens para corrigir o erro relacionado com o movimento da pele, como por exemplo, no método invasivo das marcas a utilizar e no tratamento dos dados (Nigg e Cole, 1994).

5.1.4.2. DESLOCAMENTO ANGULAR DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-TÁRSICA DURANTE A FASE DE SUPORTE

É definido como a mudança na posição angular (Robertson *et al.*, 2004). A importância da análise do ângulo da articulação tíbio-társica durante a fase de suporte, está relacionada com o facto de ser durante esta fase que se dá a actividade contráctil dos músculos posteriores da perna, quer para oferecer resistência à flexão dorsal, quer para originar uma flexão plantar activa (Varejão *et al.*, 2003). É expresso em graus (º).

5.1.4.3. VELOCIDADE ANGULAR

É o rácio da mudança do deslocamento angular relativamente ao tempo (Robertson *et al.*, 2004). Apesar da inexistência de estudos publicados com recurso a este parâmetro cinemático, consideramos pertinente a sua utilização. Assim, esperamos que os resultados obtidos no nosso estudo possam fornecer dados - padrão, numa população de

ratos normais, com os quais serão confrontados os resultados de animais com alterações funcionais da articulação tíbio - társica e do pé. É expressa em graus por segundo (º/s).

5.1.4.4. PARÂMETROS TEMPORAIS DA ARTICULAÇÃO TÍBIO-TÁRSICA DURANTE A FASE DE SUPORTE

Varejão *et al.* (2002) definem como parâmetros temporais cinemáticos (Figura 28):
i) Contacto Inicial (IC): a articulação tíbio-társica (TT) encontra-se em flexão plantar e é feito o apoio no solo através dos dedos. A posição apresentada pelas articulações determina o padrão de resposta do membro ao suporte de peso. É sobretudo uma fase de posicionamento do membro (Perry, 1992);
ii) Saída da parte distal do pé contralateral (OT): o período entre o contacto inicial (IC) e a saída da parte distal do pé contralateral (OT) corresponde aos primeiros 20% da fase de suporte. É caracterizado pelo fim da fase de apoio duplo, e tem como objectivo a absorção do impacto no solo, a estabilidade no suporte do peso e preservar a progressão (Perry, 1992);
iii) Saída do calcanhar (HR): o período entre a saída da parte distal do pé contralateral (OT) e a saída do calcanhar do membro de apoio (HR) corresponde a 20-40% da fase de suporte. Verifica-se um movimento da tíbia sobre o pé no sentido da flexão dorsal. Período onde se verificou valor aproximado de 90º. Corresponde ao primeiro parâmetro do intervalo de apoio num membro posterior. Tem como objectivo assegurar a progressão sobre o pé de apoio e a estabilidade do membro (Perry, 1992);
iv) Saída da parte distal do pé (TO): o período entre HR e TO corresponde a 40-100% da fase de suporte. Corresponde ao último parâmetro do intervalo de apoio num membro posterior. Durante este período verifica-se uma progressão do corpo para a frente do pé e posicionamento do membro para a fase oscilante (Perry, 1992).

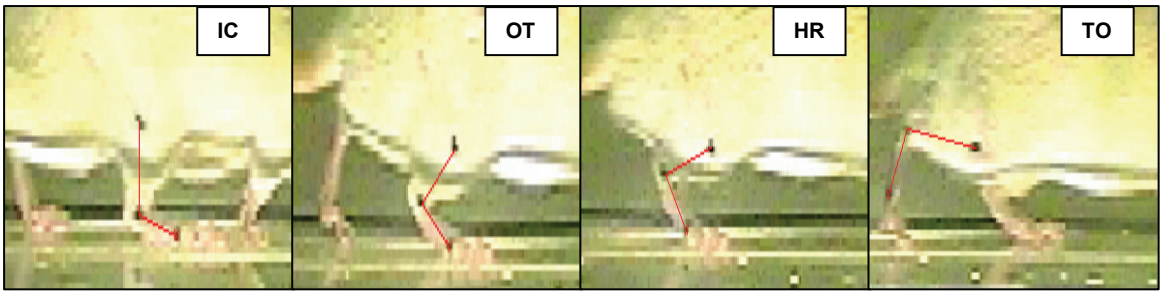


Figura 28 – Imagens correspondentes aos parâmetros temporais em estudo da fase de suporte do andamento do rato.

5.1.4.5. FACTOR DE SUPORTE *(SF)*

O cálculo do Factor de Suporte (SF) define o rácio entre a duração de contacto com o chão do membro experimental e o normal durante a marcha (Walker *et al*., 1994).

$$\text{SF}\textbf{(stance factor)} = \frac{\text{Tempo de suporte experimental}}{\text{Tempo de suporte normal}} \qquad \textbf{(Equação 6)}$$

Equação 6 - Equação utilizada para calcular o valor o factor de suporte (SF).

O valor deste rácio para membros normais, aproxima-se do 100%, mas perante lesão do nervo ciático obtêm-se valores inferiores. Este parâmetro apresenta a vantagem de o seu cálculo ser independente da existência de contracturas e automutilação.

5.1.4.6. VELOCIDADE DA MARCHA

A velocidade da marcha parece influenciar a duração das fases da locomoção (apoio e suspensão) (Gillis e Bierwener., 2002). Quando a velocidade aumenta a fase de apoio diminui, contrariamente, a fase de suspensão permanece relativamente inalterada com a variação de velocidade da marcha. Parece também influenciar os níveis de activação muscular, assim como o padrão e grau de tensão muscular (Gillis e Bierwener, 2001). Este parâmetro foi utilizado por Yu e colaboradores em 2001. É expressa em centímetros por segundo (cm/s).

5.1.4.7. DURAÇÃO DA FASE DE SUPORTE

Consiste no intervalo de tempo em que o membro está em contacto com o solo (Craik e Oatis, 1995). Em modelos experimentais que envolviam o nervo ciático e o nervo tibial, o encurtamento da fase de suporte foi atribuído a um decréscimo da força muscular (Yu *et al*., 2001). A duração considerada ideal para o estudo cinemático da articulação tíbio – társica durante o andamento está compreendida entre 150 e 400ms (Varejão *et al*., 2003). É expressa em milissegundos (ms).

5.1.4.8. DURAÇÃO DE CADA FASE DA MARCHA

A duração de cada fase da marcha, suporte e suspensão, foi considerada para obter o rácio fase de suporte/fase suspenção do mesmo membro e posteriormente o rácio membro experimental/ membro normal (Equação 7) (Yu *et al*., 2001). O rácio é calculado da seguinte forma:

$$SS = \frac{\text{Tempo de suporte /tempo de suspensão experimental}}{\text{Tempo de suporte /tempo de suspensão normal}} \qquad \textbf{(Equação 7)}$$

O tempo de contacto com o solo, duração da fase de suporte, parece estar correlacionado com o comprimento do membro, assim como com a velocidade de corrida nos bípedes terrestres e quadrúpedes (Hoyt *et al*., 2000).

5.1.4.9. COMPRIMENTO DA PASSADA

Consiste na distância compreendida entre a cabeça do metatarso médio de um pé do membro pélvico e o outro (Yu *et al*., 2001). O comprimento da passada parece estar directamente relacionado com a velocidade (Hoyt *et al*., 2000). É expressa em milímetros (mm).

5.1.4.10. ÂNGULO DE ROTAÇÃO EXTERNA DO DEDO (*TOE OUT ANGLE)*

Foi definido como o ângulo entre o eixo longitudinal do pé (desde o calcâneo até à extremidade do terceiro dedo) e a linha de progressão do animal. É calculado quando ocorre o apoio máximo da superfície plantar do rato, antes da perna em suspensão cruzar a perna que está apoiada no solo (Varejão *et al*., 2003).

5.1.5. AVALIAÇÃO ELECTROFISIOLÓGICA

A avaliação electrofisiológica baseia-se em estudos da condução nervosa. Quando as fibras motoras de um nervo periférico sofrem um estímulo eléctrico, surge uma resposta nos músculos que são por esse nervo inervados, que pode ser registada. Esse potencial é então designado por Potencial de Acção Muscular Composto (CMAP). A electrofisiologia é especialmente destinada para a avaliação motora visto estar preparada para estudar mais especificamente o sistema motor do que o sistema sensorial (Dorfman,

1990). Tal como já referimos em 1.2.5., quando classificamos as fibras nervosas, a velocidade de condução é influenciada por vários factores como a área de secção transversal do axónio e muito especialmente pelo facto de se tratarem de fibras mielinizadas ou não (Junqueira e Carneiro, 1999).

Dentro do Potencial de Acção Muscular Composto (CMAP) podem ser medidos vários parâmetros: latência da resposta, amplitude do componente negativo da resposta, área do componente negativo da resposta e ainda a duração da resposta. Sendo que a latência corresponde ao intervalo de tempo entre o início do estímulo e o aparecimento da resposta.

Outro parâmetro importante é a Velocidade da Condução Nervosa Motora (MNCV) que resulta da divisão da distância entre dois pontos de estimulação pelo tempo de condução.

No modelo animal de rato este estudo é sempre realizado com os animais sob anestesia geral e poderá ser determinada sob duas técnicas: uma técnica não invasiva, em que a estimulação é realizada de forma percutânea e outra técnica invasiva em que o nervo é exposto directamente à estimulação. Pensamos se tratarem de técnicas, que implicam uma grande manipulação dos animais e talvez por isso, nos arriscaríamos a chamá-la de técnica muito invasiva. Quando comparamos com testes anteriormente descritos, parecem-nos apresentar algumas desvantagens, nomeadamente a sua limitação quanto ao número e periodicidade com que poderão ser realizados. Os testes de cinemática, de estudo das pegadas, o WRL e o RPE, poderão ser realizados quantas vezes as necessárias e com a periodicidade que melhor se adapte ao estudo que estamos a realizar, sem com isso interferir com o estado fisiológico nem o bem-estar dos animais. Outra desvantagem a salientar trata-se da necessidade de um equipamento específico, por vezes com alguma dificuldade de acesso, bem como o de implicar alguma formação para a sua interpretação.

No entanto, muitos autores têm referido uma grande correlação entre os resultados obtidos em histomorfometria e electrofisiologia, o que confere a este método de avaliação, alguma consistência e um grande valor como arma de avaliação funcional (Matsumoto *et al*. 2000). Várias vantagens têm também sido descritas na utilização deste método entre elas o facto de não ser afectada por autotomias e contraturas a que já nos referimos anteriormente.

5.1.6. OUTROS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Muitos outros testes têm sido utilizados por vários investigadores no estudo da recuperação funcional de lesões do nervo periférico e descritos na bibliografia: parâmetros dinâmicos avaliados através das forças de reacção ao solo utilizando uma

plataforma de forças (Howard *et al*., 2000), electromiografia (Meek *et al*., 2001), performance de locomoção utilizando 9 parâmetros específicos na avaliação da qualidade da marcha (Meek *et al*., 2001; 2004), estudos da função proprioceptiva nos membros pélvicos (Hadlock *et al*., 1999), quantificação da reinervação das glândulas sudoríparas da face plantar do pé (reflexo sudomotor) (Navarro *et al*., 1999; 2000), recuperação da dor através do teste da picada (Navarro *et al*., 1999) e pesagem dos músculos gastrocnémios-solear (Varejão, 2003).

5.2. TESTES DE AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A análise morfológica das fibras nervosas regeneradas através da microscopia de luz representa um dos principais instrumentos na avaliação da reparação do nervo periférico (Lundborg, 1988). Permite verificar a presença ou ausência de fibras nervosas no nervo periférico que tenha sido reparado, a distribuição espacial dessas fibras, a existência e a qualidade de mielinização, a presença e a qualificação dos tecidos vizinhos e se ocorreu a reabsorção total ou parcial dos biomateriais utilizados em cada método de reparação do nervo. Para além desta análise **qualitativa**, permite ainda uma análise **quantitativa** das fibras nervosas que está provado ser fundamental nos estudos de reparação do nervo periférico (Geuna *et al*., 2000; 2001).

As fibras nervosas têm uma distribuição anisotrópica ao longo do nervo periférico e muitas vezes têm tendência a agrupar-se de acordo com o seu diâmetro (Torch *et al*., 1989) o que torna o processo de selecção dos campos histológicos, um factor importante e poderá influenciar de forma decisiva o resultado final. Podendo esta, ser sobrestimada se escolher campos mais densos ou subestimada de escolher campos menos densos e daí, deduzir conclusões erradas. Na realidade, a subjectividade na escolha da amostra representa o principal perigo para a histomorfometria.

Neste método de avaliação é importante estabelecer de uma forma correcta a estratégia utilizada, quanto à recolha da amostragem, que irá ser designada como população, na qual irá ser baseada a análise. A *regra da igualdade de oportunidade* (Geuna, 2000), assegura que todas as fibras nervosas têm a mesma oportunidade de serem incluídas na amostra, uma vez que analisar todas as fibras nervosas de um nervo, é um processo ineficaz. Para respeitar esta regra é designado o *design-based sampling* que consiste num conjunto de regras de amostragem, com a intenção de todos os objectos presentes no espaço da amostragem tenham a mesma probabilidade de serem seleccionados. Do qual resulta uma **amostragem aleatória sistemática** (Geuna *et al*., 2000 a), que irá representar toda a fibra nervosa. Este método consiste em escolher de forma aleatória um campo inicial e a partir dele seleccionar os outros campos, através da sistematização

de um processo de *salto* para o campo seguinte, localizado a uma distância fixa. Como regra, devem ser seleccionados um número relativamente elevado de campos (> 15) de ***efeito da margem*** menores dimensões, em vez de uma selecção de um número menor de campos e de maior dimensão (Schmitz, 1998).

Outra fonte de erro na histomorfometria do nervo periférico é o que consiste na probabilidade de uma determinada fibra de maiores dimensões poder ser interceptada por linhas que delimitam mais que um campo (Geuna *et al*., 2001). O que poderá levar a que uma fibra possa ser lida mais que uma vez. Para evitar tal erro, utiliza-se o método ***two-dimensional-disector*** **(dissecção bi-dimensional) (**Geuna *et al*., 2000 a). É assinalado o topo de cada fibra, que representa o ponto do contorno da fibra que primeiro toca o plano de observação e somente estes são lidos e no sentido norte/sul. Como cada topo só aparece num campo e este também não representa nenhuma subjectividade para o investigador só será incluída na amostra uma vez.

A **técnica de imunohistoquimica** baseia-se na utilização de anticorpos que se ligam especificamente a determinado antigénio celular e que dessa forma se tornam visíveis ao microscópio por fluorescência ou de laser confocal. Para isso é necessário recorrer à utilização de determinadas sondas fluorescentes ou fluoróforos para se detectarem os complexos antigénios-anticorpo. Esta técnica permite detectar os axónios em regeneração e a possível migração das células de Schwann dentro dos tubos-guia ou nos biomateriais durante o período de regeneração do nervo periférico (Geuna *et al*., 2001). Através da imunohistoquimica, são utilizados os anticorpos anti-NF-200 kd (anti - proteína 200 kd dos neurofilamentos) e anti-GFAP (anti - proteína glial fibrilarácida). O primeiro anticorpo vai permitir detectar os axónios em regeneração e o segundo, a possível migração das células de Schwann dentro dos tubos-guia (Geuna *et al*., 2001; Varejão, 2003). Hoje em dia existe um grande número de antigénios disponíveis, afinidades antigénio-anticorpo, tipos de anticorpo e métodos de avaliação e detecção. É necessário no entanto, que o método a utilizar seja aferido para cada situação em particular.

Para a **microscopia óptica**, é normalmente utilizada a coloração com hematoxilina e eosina (HE).

CAPITULO II

ESTADO DE ARTE E OBJECTIVOS DO ESTUDO

ESTADO DA ARTE

As lesões nervosas estão normalmente associadas a traumatismos directos e/ou indirectos dos nervos periféricos, recorrentes de traumatismos provocados por acidentes ou ainda lesões iatrogénicas provenientes de cirurgias de reconstrução (ortopedia, extirpação de neoplasias e outras). Cerca de 5 % das feridas abertas das extremidades provenientes quer de acidentes de viação quer de prática de desportos são complicados com trauma do nervo periférico (Huang e Huang, 2006). A incidência de lesões traumáticas do nervo periférico, em Medicina Veterinária encontra-se por estabelecer, mas em Medicina Humana, está estimada em mais de 500.000 novos pacientes por ano (Rodríguez *et al.*, 2004). Nos humanos, as lesões do nervo periférico são mais frequentes no membro superior e em homens com idade compreendida entre 18-25 anos (Nichols *et al.*, 2004). Nas crianças, num estudo com cerca de 136 casos de lesões traumáticas do nervo periférico, 31 são lesões do membro inferior e nestes cerca de 19 casos estava envolvido o nervo ciático (Senes *et al.*, 2007). Também parece que a incidência é maior em zonas onde existe grande preponderância de sector industrial (Hart *et al.*, 2004). As lesões do nervo periférico são uma das importantes causas de morbilidade, que levam a elevados custos nos cuidados de saúde, perdas de emprego e ainda distúrbios sociais. Estas perdas económicas e sociais justificam, todo o investimento na investigação aplicada nesta área, tendo como objectivo a melhoria da recuperação destes pacientes (Hart *et al.*, 2004).

Assim, as técnicas mais correntes utilizadas na prática clínica são a sutura topo-a-topo e em caso de perda de tecido nervoso, a reconstrução utilizando enxertos autólogos de nervos sensitivo ou outras técnicas ainda sob investigação como é a utilização de tubos-guia (Doolabh *et al.*, 1996) e alotransplantes (Mackinnon *et al.*, 1985). O objectivo dos cirurgiões é reparar as lesões do nervo, para que um número máximo de axónios volte a crescer ou regenerar de forma adequada até ao seu órgão alvo. Sabe-se também, que a correcta identificação dos fascículos de nervos mistos, nervos motores e sensitivos em ambos os topos é essencial, tal como a sua coaptação correcta é crucial para os resultados finais da recuperação funcional (Dubový, 2004, Nichols *et al.*, 2004). E é neste ponto que a experiência do cirurgião tem um papel crucial no resultado final. No entanto, a correcta escolha do ramo do nervo a utilizar, tal como a correcta técnica cirúrgica utilizada, são necessárias para uma boa recuperação funcional, mas não é suficiente (Madison *et al.*, 1999). Por outro lado, este tema, também se torna um desafio, visto que muitas vezes, a conhecida capacidade de regeneração axonal do SNP não corresponde sempre a recuperação funcional proporcional (Gordon *et al.*, 2003; Dubový, 2004). A

principal razão descrita para o mau prognóstico de recuperação funcional após uma lesão do nervo periférico, é a desinervação muscular. O músculo que não recebendo inervação durante longos períodos, atrofia e por fim acaba por haver reposição de tecido adiposo e de tecido cicatricial (Gordon, 2003). Quando as fibras nervosas são danificadas, quer por esmagamento, por secção ou por isquémia, quer no decorrer do processo inflamatório, de forma a causar interrupção da integridade dos axónios, surge um fenómeno degenerativo das fibras distais à lesão, que é denominado por degenerescência Walleriana (Aldini *et al.*, 1999). Após a lesão axonal também surgem alterações do tipo degenerativo no segmento proximal, com consequente reacção do corpo celular (Aldini *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 2004). Todo este processo de degenerescência/regeneração tem um período variável de tempo, durante o qual há uma estrutura alvo que se poderá tornar irreversivelmente não funcional, o que torna urgente tomar duas medidas essenciais: diminuir o tempo de todo o processo de degenerescência/regeneração e ao mesmo tempo evitar a degenerescência das estruturas alvo por inactividade, por exemplo, através de fisioterapia para músculos em risco de paralisia (Kierszenbaum, 2004). Tal como podemos concluir após a revisão bibliográfica que realizamos, vários factores podem influenciar a progressão deste processo de degenerescência a nível do SNP.

Quando há necessidade de efectuar reparações cirúrgicas de qualquer nervo periférico, recorre-se a técnicas de microcirurgia e por norma à sutura entre os seus topos (Figura 29), quando não há perda de tecido nervoso, ou à interposição de enxerto de nervo, quando se verifica a sua perda (Figura 30).

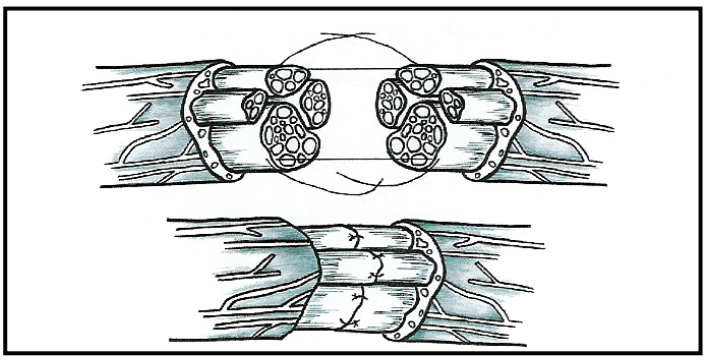


Figura 29: Reconstrução de um nervo periférico recorrendo-se à sutura entre os seus topos ou anastomose primária. Adaptado de Schmidt e Leach (2003). Actualmente opta-se por fazer a sutura topo-a-topo ao nível do epineuro em vez do perineuro ou interfascicular.

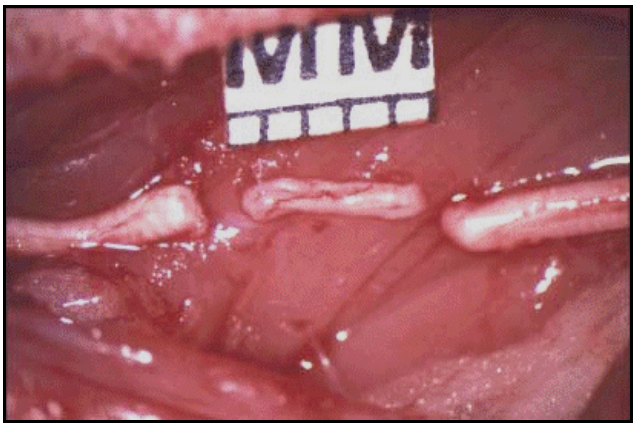


Figura 30: Reconstrução de um nervo periférico recorrendo-se à interposição de um enxerto de nervo.

Os enxertos de nervo autólogos são geralmente utilizados para reparar uma solução de continuidade num nervo periférico, em que não seja possível utilizar a anastomose primária. O recurso a enxertos, nomeadamente autólogos, tem sido amplamente utilizado como um dos métodos de eleição para reparação cirúrgica, em caso de perda de tecido nervoso. No entanto, este método apresenta várias desvantagens, entre elas a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica e a morbilidade causada no local dador (Udina *et al.*, 2004); o diâmetro do enxerto de nervo autólogo é frequentemente mais pequeno (Ravi, 2006); existe o risco de necrose do enxerto autólogo ao longo da sua extensão; surgem alterações de natureza sensorial; pode ocorrer a formação de neuromas (Ravi, 2006) e de tecido fibroso junto à segunda linha de sutura (Millesi, 1990; Madison *et al.*, 1992; Dahlin e Lundborg, 1998; Flores *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Varejão, 2003). Em casos de enxertos autólogos e em alotransplantes, de forma a evitar o máximo de morbilidade no local da colheita, usam-se normalmente nervos sensitivos como: o nervo sural, o nervo grande auricular, o ramo anterior do nervo antebraquial medial, o ramo cutâneo dorsal do nervo ulnar, o ramo sensorial superficial do nervo radial (Matsuyama *et al.*, 2000; Pogrel e Maghen, 2001). É sabido que a utilização de nervos sensitivos não promove uma óptima regeneração de axónios motores, quando comparada com a regeneração induzida por nervos mistos (Nichols *et al.*, 2004). O que poderá ser uma razão para maus resultados.

Apesar das técnicas de microcirurgia utilizadas após reparação de nervos periféricos destruídos, lesados ou em reconstruções dos plexos braquiais, os resultados não são decepcionantes mas são piores do que se gostaria, devido a atrofias musculares que surgem durante o período de desinervação. As lesões mais distais levam mais tempo a recuperar, conduzindo a períodos mais longos de desinervação dos músculos, conduzindo a atrofia e fibrose progressivas durante os 3 anos seguintes (Hudson *et al.*, 2000). Também faz parte do processo de reparação, não haver grande tensão nas

suturas. Desde o início do século XX que existem ensaios e experiências tentando ultrapassar estas limitações. Algumas obtiveram bons resultados, embora apenas em perdas muito limitadas. Para isso, tem sido utilizado o recurso a enxertos da parede de artérias e veias, tendo-se vindo a verificar ineficazes, devido ao colapso provocado pelo tecido cicatricial ao comprimir esses espaços vazios (Pogrel e Maghen, 2001). Em sequência, foram utilizados os mesmos enxertos, preenchidos com músculos quer degenerados, quer frescos, tendo sido obtidos alguns bons resultados, mas somente em distâncias curtas de aproximadamente 1 a 2 cm (Hudson *et al.*, 2000). Outras opções têm sido testadas como segmentos de nervo de cadáveres, fibras musculares e alotransplantes em combinação com imunossupressão (Doolabh *et al.*, 1996).

O conceito de tubulação envolve o uso de um canal oco, construído em material natural ou sintético, designado por tubo-guia, que é interposto nos segmentos lesionados. Durante as últimas décadas, e no sentido de se ultrapassarem as desvantagens encontradas, especialmente com a utilização dos enxertos autólogos, diversos laboratórios têm investigado a aplicação desta técnica em lesões de nervo periférico, que se baseia na orientação das fibras nervosas (denominado fenómeno de quimiotropismo) permitindo que as fibras do topo proximal se encontrem com as do topo distal, através de sinais químicos originados no topo distal (Hudson *et al.*, 2000). Esta alternativa ao enxerto é pois, de grande interesse clínico e tem demonstrado, experimentalmente, que pode ser melhorada a velocidade de regeneração do nervo periférico (Young *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2000). A utilização dos tubos-guia, como alternativa aos enxertos autólogos e outras técnicas, na reparação do nervo periférico, é cada vez mais apreciada pelas suas importantes vantagens como sejam: i) não existem complicações associadas ao uso do enxerto autólogo; ii) o fenómeno regenerativo é direccionado fisicamente pela presença do tubo-guia; iii) verifica-se uma diminuição da tensão no local da sutura; iv) o risco de formação de neuromas é muito menor; v) redução na invasão dos fibroblastos; vi) aumento local da concentração dos factores neurotróficos, vii) a possibilidade de manipular o meio interno no local dos topos do nervo em regeneração e ainda; viii) tornar possível o fabrico e modulação do tubo-guia de acordo com as necessidades (Lundborg *et al.*, 1982; Gibson *et al.*, 1991; Madison *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1997; Steuer *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2000; Lee e Wolfe, 2000; Heijke *et al.*, 2001; Meek e Coert, 2002; Varejão, 2003; Lee *et al.*, 2003). A manipulação do meio interno tem particular interesse no sentido de podermos de alguma forma, reduzir o tempo de regeneração do nervo e diminuir o tempo de recuperação funcional das estruturas alvo. Exemplos dessa manipulação incluem o uso de factores de crescimento, células de Schwann, fibrina, colagénio, laminina, fibronecitina (Dubey *et al.*, 1999¸ Yoshii e Oka, 2001). A tubulação pode também criar um microambiente protegido das influências exteriores e desta forma

permitir também um estudo detalhado das alterações celulares e moleculares ao longo da regeneração do nervo periférico (Varejão, 2003). É unanimemente aceite que as células de Schwann têm um papel central na regeneração nervosa. A nível do segmento distal, destaca-se a síntese de diversos factores neurotróficos por parte destas células, que incluem o factor de crescimento do nervo (NGF), a neurotrofina 4/5 (NT-4/5), o factor de crescimento do nervo derivado do cérebro (BDNF), o factor neurotrófico derivado da linha celular da glia (GDNF), diversos factores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), N- cadherina, integrinas, bem como moléculas da matriz extracelular como a laminina e a fibronectina (Fu e Gordon, 1997; Hudson *et al.*, 2000). Estes factores neurotróficos, parecem desempenhar um papel essencial na sobrevivência do neurónio, após lesão axonal, como têm revelado os mais diversos trabalhos experimentais anteriormente referidos (Terenghi, 1999; Hart *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007). As células de Schwann são também responsáveis pelo aumento do número de receptores para as hormonas da tiróide, especialmente a triodotironina (T3), que é conhecida também por favorecer a regeneração nervosa (Barakat-Walter, 1999), além disso, a sua membrana funciona como substrato disponível para o crescimento axonal (Steuer *et al.*, 1999). Todos os factores neurotróficos são vistos como factores que promovem o crescimento e a regeneração axonal e são transportados em direcção ao soma via transporte retrógrado (Lundborg, 2000; Lindsay, 1996).

O aparecimento de materiais aloplásticos (e o seu conhecimento no que diz respeito a reacções de rejeição) levou à utilização de tubos vazios para interposição entre os dois topos e que posteriormente, foram utilizados na presença destes factores de crescimento, de sistemas celulares como as células de Schwann e músculos. Os estudos originais foram efectuados em ratos, tendo também sido utilizados outras espécies animais (gatos, cães, coelhos, macacos) e posteriormente, foram utilizados em humanos. Os resultados foram similares, tendo havido recuperação da condução nervosa, semelhante aos efectuados com enxerto nervoso. Estes estudos foram efectuados com nervos sensitivos e mistos (Hudson *et al.*, 2000). Recorrendo-se a tubos de silicone como orientadores da condução e usando factores de crescimento, verificaram-se resultados prometedores em termos de recuperação funcional. Esta técnica permite que a regeneração dos axónios ocorra sem que se verifique a troca dos terminais, o que seria prejudicial. Estes tubos de silicone (ou outros não absorvíveis) têm a desvantagem de induzir uma resposta inflamatória crónica e compressão do nervo regenerado (Udina *et al.*, 2004) e ainda ter que ser retirado o tubo-guia para aliviar o desconforto provocado pela contracção cicatricial (Hudson *et al.*, 2000). Archibald e seus colaboradores, em 1995 mostraram que a reparação de uma solução de continuidade de 5mm num nervo de um macaco com um tubo-guia de colagénio, permite uma regeneração histológica e fisiológica similar à

reparação utilizando autoenxertos ou sutura directa. Usando biomateriais reabsorvíveis os problemas anteriormente referidos estão ultrapassados, devido não só às propriedades elásticas que muitas vezes lhe estão inerentes, como também à possibilidade de poder ser controlado durante o seu processo de fabrico, o seu comportamento mecânico e físico-químico, isto é, a sua porosidade, capacidade de absorção de água, tempo de degradação e biocompatibilidade (Wang *et al.*, 2001; Chamberlain *et al.*, 1998; Bender *et al.*, 2004; Meek *et al.*, 2003). Podemos também, junto com o seu fabricante, melhorar a conformação dos tubos-guia de acordo com as necessidades ou ainda com a perspectiva de investigação que pretendemos (Bender *et al.*, 2004). O uso de tubos bioabsorvíveis, enxertos de músculo degenerado e enxerto de nervo acelular, podem originar resultados desfavoráveis, em casos de defeitos nervosos de grandes dimensões devido à perda de células de Schwann viáveis. Pelo contrário, enxertos de nervos pré - degenerados e enxertos de nervo artificial vivo, contendo células de Schwann, em proliferação, levaram a regenerações comparáveis às de autoenxerto frescos e até mesmo a regenerações superiores às de autoenxerto, que são a medida de comparação *standard*. A investigação da viabilidade das células de Schwann (ou de outro sistema celular produtor de factores neurotróficos ou mesmo a presença desses factores neurotróficos) pode antecipar a efectividade dos enxertos nervosos no que respeita à regeneração nervosa (Steuer *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2000). Também a introdução de células de Schwann no interior do tubo-guia antes da sua implantação poderá providenciar um microambiente adequado à regeneração nervosa melhorando desta forma a técnica de tubulação simples (Udina *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2000).

Ainda mais recentemente, foi também reconhecido que um outro elemento celular importante durante a degenerescência Walleriana e a regeneração axonal eram os fibroblastos. Estes são essenciais para proporcionar estruturas mecânicas, nutricionais e protectoras para a regeneração nervosa. Foi descoberto que o perineuro, composto por pontos de fibroblastos, cria pontes no intervalo entre os dois topos nervosos, proporcionando um guia para os elementos celulares subjacentes, tais como as células de Schwann e os novos axónios. Contudo, os fibroblastos contribuem para a fibrose dos nervos periféricos e para a formação de cicatrizes nos locais de sutura, que irão ter efeitos adversos na regeneração nervosa. Se há uma extensa proliferação de células de Schwann e um número limitado de fibroblastos nos enxertos de nervos, tais enxertos nervosos podem ser o guia ideal para a regeneração axonal. De modo a atingir este objectivo será razoável preservar o enxerto *in vitro* e manipular as células dos enxertos nervosos com a suplementação do meio de cultura com factores neurotróficos de crescimento (Hudson *et al.*, 2000). Antigamente, efectuava-se um armazenamento de nervos através da sua criopreservação o que levava à perda da viabilidade de algumas

células e à perda da função antes da implantação. A manutenção em cultura, de fragmentos de nervos, com factores de crescimento provaram que há, não só, manutenção das células pré-existentes, como também ocorre o crescimento de novas células o que melhora a regeneração de novos axónios (Steuer *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2000). É possível intervir no processo de degenerescência e regeneração utilizando factores de crescimento nas zonas de lesão axonal ou introduzindo sistemas celulares produtores locais de factores neurotróficos. No entanto, a utilização local de factores neurotróficos é um problema que também temos que ultrapassar, visto estes se tratarem de proteínas com uma semi-vida e actividade biológica de curta duração (Tria *et al.*, 1994). Torna-se imperativo a utilização de um sistema de libertação lenta destes factores neurotróficos e durante longos períodos de tempo. Esta libertação poderá ser realizada basicamente de 3 formas: i) libertação no lúmen do tubo-guia (tornando o microambiente mais viscoso utilizando hidrogeis, mini-bombas osmóticas, através de microesferas), ii) incorporação de células do interior do tubo que produzam factores neurotróficos no local (células de Schwann, células estaminais, células N1E-115 diferenciadas *in vitro*) e iii) uso de terapêutica génica incorporando genes em células residentes induzindo à produção de factores neurotróficos (Pfister *et al.*, 2007).

Por outro lado, sabemos também que a isquémia tem efeito indesejável nos tecidos, provocando alterações na sua estrutura e sensibilidade, nomeadamente, no cérebro, vísceras e músculos. Nos nervos, ainda não se conhece de forma concreta o efeito deletério da isquémia. No entanto, sabe-se que normalmente, a acompanhar a reinervação segue também a neovascularização (Ferritti *et al.*, 2003). O enxerto, a utilização de tubos siliconados, de enxertos veia ou de tubos absorvíveis, obrigam a que as estruturas nervosas passem por uma fase isquémica, o que pode ser um contributo para a redução da recuperação nervosa, podendo ser também uma explicação para os maus resultados recentemente obtidos (Schmidt e Leach, 2003). Alguns nervos sujeitos a isquémia, sem perfusão, mostraram edema endoneural e muitas das suas fibras apresentaram-se com modificações do tipo isquémico tais como: contracções cicatriciais e/ou ondulação. Outras alterações provocadas pela isquémia e que foram entretanto encontradas são as modificações da mielina, aparecimento de corpos lamelares e leve ou moderada desmielinização. Isquémias de cerca de uma semana mostraram modificações nas células de Schwann e persistência de degenerescência axonal, com uma grave desmielinização provocada pela oclusão dos *vasa vasorum*. Pensa-se que os danos nervosos também sejam devidos ao aparecimento de radicais livres de oxigénio que danificam a barreira endotelial e consequentemente os conteúdos endoneurais (mecanismo idêntico ao que envolve o coração nos enfartes e o cérebro em acidentes vasculares cerebrais) (Schmidt e Leach, 2003). Em situações em que é necessário

proceder à reparação nervosa e em que há perda de nervo, pode ser utilizada como alternativa à utilização de autoenxertos ou qualquer outro método já anteriormente referido - a expansão dos nervos. De qualquer modo é importante saber que qualquer tecido submetido a expansão (e o nervo não se comporta de forma diferente) reduz a sua espessura. Importa portanto, determinar se há alteração da condução provocada por essa expansão. Trabalhos efectuados apenas com topos distais degenerados e onde se esperaria um agravamento da degenerescência devido à compressão (isquémia) verificou-se precisamente o contrário. Verifica-se um atraso na degenerescência Walleriana no local da distensão, talvez motivada pelo aumento do processo vascular que é originado da cápsula devido à rejeição do expansor que rodeia o nervo. Ocorre uma reacção tecidular em simultâneo com o aparecimento de neo-vascularização do novo tecido aí criado. Este facto, além de nos permitir colmatar o espaço existente e assim poder-se proceder à sutura do nervo topo-a-topo (transformando-o num processo de sutura "tipo primário"), permite-nos ainda a utilização do topo distal, com capacidade de regeneração, como numa lesão recente (Schmidt e Leach, 2003). A expansão nervosa foi utilizada apenas sobre os topos distais porque esta não provocava reacção dolorosa sobre o nervo distendido por ter havido descontinuidade da condução após a secção (Hudson *et al.*, 2002; Varejão, 2003).

Todas as afirmações, considerações, duvidas, avanços e conquistas que foram resumidas anteriormente, bem como da sua importância na prática clínica, levaram-nos à realização de um trabalho de investigação com o objectivo de fundo de poder contribuir de alguma forma para este tema tão vasto e importante. Foi deste modo que numa perspectiva de um clínico cirurgião, quer de Medicina Humana quer de Medicina Veterinária, perspectivamos um modelo experimental no qual pudéssemos induzir as várias lesões do nervo periférico que surgem durante a prática clínica (esmagamento, secção e secção com perda de substância) e pudéssemos aplicar técnicas cirúrgicas e coadjuvantes capazes de contribuir para uma melhor e mais rápida recuperação final.

OBJECTIVOS DO ESTUDO

Foi então idealizado um modelo animal e estabelecidos alguns objectivos, numa tentativa de contribuir não só para o estudo da Bioengenharia aplicada ao nervo periférico, como também contribuir para a cirurgia do nervo periférico aplicada à prática de um cirurgião:

1) Em lesões de Axonotmese pretendeu-se estudar:

i) O tempo de recuperação mais indicado para o estudo funcional e morfológico em lesões de axonotmese, do nervo ciático de rato, tendo por base, estudos anteriores de 8 semanas (Figura 31).

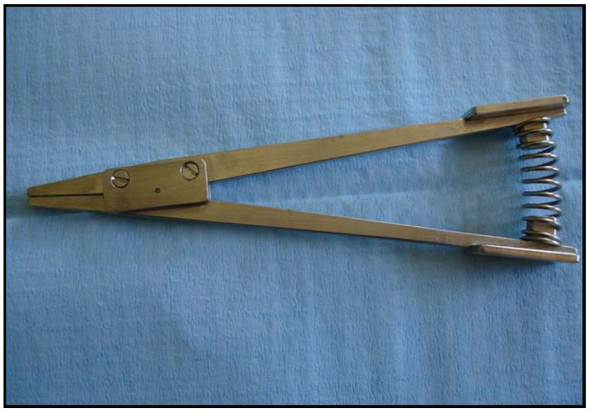
(A) (B) 

Figura 31: Lesão de axonotmese (A); Pinça especialmente concebida para provocar uma lesão *standard* (B).

ii) A utilização de uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina e de um sistema celular de células neuronais diferenciadas *in vitro*, já estudadas anteriormente (Rodrigues *et al.*, 2005 a e b) em lesões de axonotmese (Figura 32)

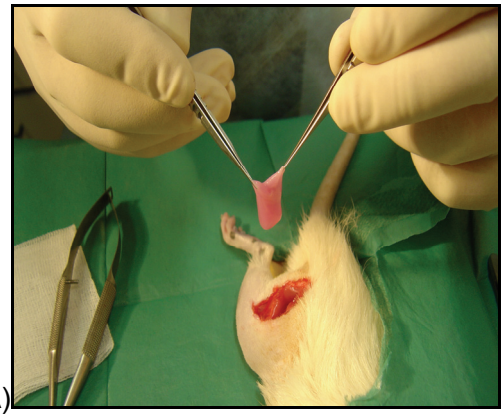
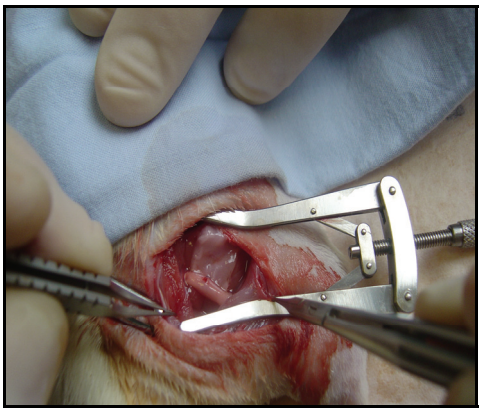
(A)  (B) 

Figura 32: Colocação de uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina forrada com células neuronais diferenciadas *in vitro* (A), e sua colocação de forma a envolver a lesão de axonotmese (B).

2) Em lesões de Neurotmese pretendeu-se estudar:

i) Dois tipos de tubo-guia biodegradáveis na regeneração nervosa em lesões do nervo periférico com perca de substância (Figura 33). Comparar um biomaterial já existente no mercado (Neurolac®) (Figura 33 B e 34 B) e um biomaterial nunca utilizado na regeneração do nervo periférico (PLGA 90:10), (Figura 33 A e 34 A), comparando-os com a utilização de autoenxerto (Figura 34 C).

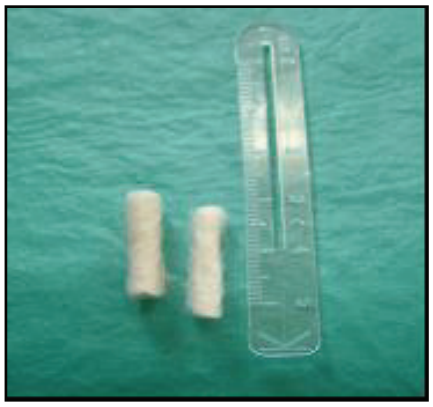
(A)  **(B)**

Figura 33: Tubos-guia de poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), um co-polímero, na relação de 90:10 (PLGA 90:10) (A) e de um co-poliéster de poli(DL-lactido-ε-caprolactona) Neuroloc® (B).

(A) **(B)** **(C)**

Figura 34: Técnica de tubulação utilizando um tubo-guia de PLGA 90:10 (A), um tubo-guia de Neurolac® (B) e um autoenxerto (C).

ii) A utilização de tubos-guia de PLGA 90:10 associado a um sistema celular de células neuronais diferenciadas *in vitro*, já estudadas anteriormente (Rodrigues *et al.*, 2005 a b) em lesões de neurotmese com perda de tecido nervoso (Figura 35).

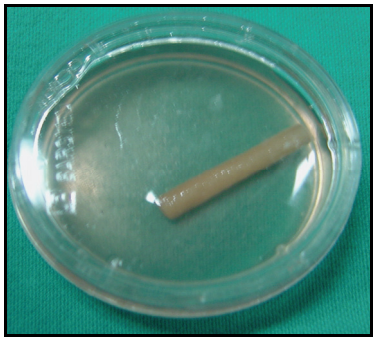
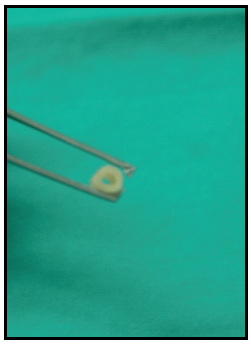
(A)  **(B)** 

Figura 35: Tubo de PLGA 90:10 em meio de cultura com células neuronais diferenciadas in vitro, na presença de 1,5% de DMSO durante 48 horas (A), a estrutura do tubo é mantida permitido a sua fácil implantação (B).

iii) A utilização de uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina, como suporte do sistema celular de células neuronais diferenciadas, já estudadas anteriormente (Rodrigues *et al.*, 2005a b) em lesões de neurotmese sem perda de tecido nervoso e aplicadas a suturas clássicas topo-a-topo (Figura 36) (resultados ainda não publicados).

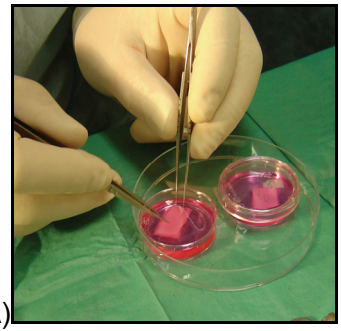
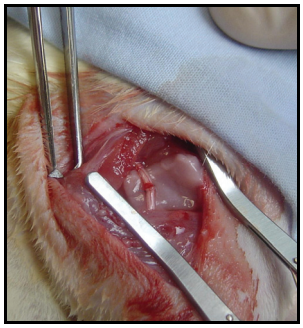
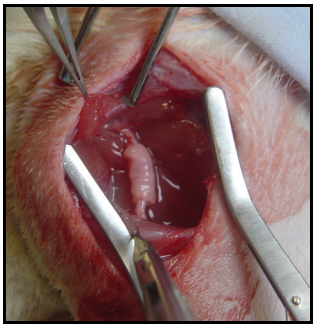
(A)  (B)  (C) 

Figura 36: Numa lesão de neurotmese sem perda de tecido nervoso são aplicadas suturas clássicas topo-a-topo seguida do seu envolvimento com uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina forrada com células N1E-115 diferenciadas *in vitro*, na presença de 1,5% de DMSO, durante 48 h.

Os grupos foram então organizados segundo o quadro 1:

Lesão	Grupo	N	Procedimentos
Axonotmese	Grupo 1	6	Axonotmese
	Grupo 2	6	Axonotmese, membrana de colagénio.
	Grupo 3	6	Axonotmese, membrana de colagénio, sistema celular diferenciado *in vitro*.
Neurotmese s/ afastamento dos topos nervosos	Grupo 4	7	Sutura topo-a-topo
	Grupo 5	9	Sutura topo-a-topo, membrana de colagénio
	Grupo 6	7	Sutura topo-a-topo, membrana de colagénio, Sistema celular diferenciado *in vitro*
Neurotmese c/ afastamento dos topos nervosos de 10 mm	Grupo 7	10	Tubo-guia Neurolac®
	Grupo 8	14	Tubo-guia PLGA 90:10
	Grupo 9	6	Autoenxerto de 10 mm
	Grupo 10	6	Tubo-guia PLGA 90:10, sistema celular diferenciado *in vitro*
	Grupo 11	4	Sem tratamento, controlo negativo

Quadro 1: Esquematização dos grupos para realização do trabalho experimental.

CAPITULO III

RESULTADOS

1. LESÕES DE AXONOTMESE

1.1. INTRODUÇÃO

Trata-se de uma lesão muito utilizada em estudos de investigação de regeneração do nervo periférico por várias razões: por ser de fácil realização e não implicar a realização de cirurgias que envolvam cirurgiões experientes e material especifico, por apresentar um tempo de recuperação mais rápido do que em caso de lesões mais graves (neurotmese), e ainda implicar uma recuperação com menos complicações, que como já referimos, limita muito a aplicação de alguns testes de avaliação de recuperação funcional. Recorrendo a este tipo de lesão, a investigação de alguns aspectos da regeneração do nervo periférico torna-se mais rápida, menos problemática e mesmo mais acessível a investigadores sem experiência de microcirurgia.

As lesões de esmagamento, axonotmese ou tipo II de Sunderland, surgem normalmente por compressão ou tracção da fibra nervosa e implicam uma perda de continuidade axonal e portanto degenerescência Walleriana, no entanto, permanecem ainda intactos os tubos do endoneuro. A recuperação destas lesões é normalmente mais morosa que as lesões de neuropraxia, no entanto, são ainda de prognóstico bastante favorável. Normalmente não implicam intervenção cirúrgica pelo facto do endoneuro, manter a sua integridade e deste modo, toda a estrutura da fibra nervosa perfeitamente orientada. Este facto permite que os axónios se direccionem de forma correcta até aos órgãos alvo. Contudo, é possível haver danos clínicos irreversíveis por várias razões, entre elas e em primeiro lugar, uma possível lesão da estrutura alvo (atrofia muscular por exemplo) durante um período mais longo de regeneração axonal ou ainda por deficits relacionados com a morte de corpos celulares que poderão ocorrer após a lesão axonal. Por esta razão é justificativo que, esta lesão seja alvo de alguma intervenção numa tentativa de minimizar o tempo de recuperação por inactivação da estrutura alvo ou ainda numa tentativa de diminuição dos riscos de morte do corpo celular. Permite ainda testar possíveis estratégias cirúrgicas a serem aplicadas em lesões mais graves, como neurotmese.

O tempo de avaliação da recuperação de uma lesão de axonotmese em ratos foi já amplamente estuda por Varejão e seus colaboradores (Varejão, 2003; Varejão *et al.*, 2004 a). No entanto, as 8 semanas propostas pareciam insuficientes, uma vez que alguns parâmetros da avaliação cinemática e de histomorfometria não se apresentarem ainda normais (Varejão, 2003; Varejão *et al.*, 2004 a). O aumento de tempo de estudo da avaliação de 8 para 12 semanas permitiu não só confirmar as suspeitas já levantadas por este grupo de investigação, como também afirmar que 12 semanas nos parecem mais apropriadas para o estudo. Mesmo ao fim deste período, não se encontra concluída a

recuperação histológica do nervo nem alguns parâmetros avaliados pela análise cinemática da articulação tíbio-társica do rato, durante a fase de suporte. Quererá isto dizer que podemos ainda obter melhores resultados ou que a recuperação histológica e biomecânica da articulação tíbio-társica nunca voltará a atingir os valores anteriores? Estas interrogações levantam pois, mais temas de investigação que nos parecem pertinentes.

Apesar de se tratar de uma lesão de prognóstico favorável, a utilização de métodos que nos permitam melhorar e regeneração do nervo periférico é válida também para lesões de axonotmese e a utilização de um sistema celular que tornasse possível a produção *in loco* de factores neurotróficos parece-nos pertinente, visto estes terem um papel crucial na regeneração neurológica (Fu e Gordon, 1997; Terenghi, 1999; Chen *et al.*, 2007) e também porque a adição exógena destes factores de uma forma aleatória, poderá alterar o equilíbrio do ambiente no local (Chen *et al.*, 2007). A produção de factores neurotróficos através de um sistema celular capaz de produzir esses factores de uma forma balanceada e controlada fisiologicamente de acordo com as necessidades e induzidas pelo próprio ambiente local, seria talvez o sistema ideal. Este efeito foi tentado recriar no nosso estudo, através da utilização de células neuronais diferenciadas *in vitro* transportadas através de uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina. As referidas células são células provenientes de uma linha celular imortalizada, obtidas a partir de bancos celulares e que se multiplicam e diferenciam facilmente *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2005 a e b). Este sistema celular parece logo um pouco problemático, especialmente se pensar na extrapolação destes estudos para a sua utilização na prática clínica quer em Medicina Veterinária quer em Medicina. No entanto, pensamos que será uma forma preliminar de estudar um modelo através do qual possamos estender à utilização de outros sistemas celulares ou de outras biomembranas, tais como células estaminais e membranas de quitosano (Simões *et al.*, 2008).

1.2. ARTIGO 1

Journal of Neuroscience Methods (2007)163, 92-104

LONG-TERM FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF A STANDARDIZED RAT SCIATIC NERVE CRUSH INJURY WITH A NON-SERRATED CLAMP.

ELSEVIER

Journal of Neuroscience Methods 163 (2007) 92–104

JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS

www.elsevier.com/locate/jneumeth

Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp

A.L. Luís [a,b,1], S. Amado [c,1], S. Geuna [d,*], J.M. Rodrigues [a,b,e], M.J. Simões [a,b], J.D. Santos [f], F. Fregnan [d], S. Raimondo [d], A. Prieto Veloso [c], A.J.A. Ferreira [g], P.A.S. Armada-da-Silva [c], A.S.P. Varejão [h], A.C. Maurício [a,b]

[a] *Animal Science and Study Centre (CECA)/Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute (ICETA), Porto University, Portugal*
[b] *Department of Veterinary Clinics, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), Porto University, Portugal*
[c] *Faculty of Human Kinetics (FMH), Technical University of Lisbon (UTL), Portugal*
[d] *Department of Clinical and Biological Sciences, University of Torino, Italy*
[e] *Plastic and Reconstructive Surgery Service, S. João Hospital, Porto University, Portugal*
[f] *Faculty of Engineering, University of Porto (FEUP), Porto, Portugal*
[g] *Faculty of Veterinary Medicine (FMV), Technical University of Lisbon (UTL), Portugal*
[h] *Department of Veterinary Sciences, CETAV, University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal*

Received 27 November 2006; received in revised form 16 February 2007; accepted 17 February 2007

Abstract

We have recently described the sequence of functional and morphologic changes occurring after a standardized sciatic nerve crush injury. An 8-week post-injury time was used because this end point is the far most used. Unexpectedly, both functional and morphological data revealed that animals had still not recovered to normal pre-injury levels. Therefore, the present study was designed in order to prolong the observation up to 12 weeks. Functional recovery was evaluated using sciatic functional index (SFI), static sciatic index (SSI), extensor postural thrust (EPT), withdrawal reflex latency (WRL) and ankle kinematics. In addition, quantitative morphology was carried out on regenerated nerve fibers. A full functional recovery was predicted by SFI/SSI, EPT and WRL but not all ankle kinematics parameters. Moreover, only two morphological parameters (myelin thickness/axon diameter ratio and fiber/axon diameter ratio) returned to normal values. Data presented in this paper provide a baseline for selecting the adequate end-point and methods of recovery assessment for a rat sciatic nerve crush study and suggest that the combined use of functional and morphological analysis should be recommended in this experimental model.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Axonotmesis; Crushed peripheral nerve; Functional recovery; Quantitative morphology; Rat

1. Introduction

Rodents, particularly the rat and the mouse, have become the most frequently utilized animal models for the study of peripheral nerve regeneration because of the widespread availability of these animals as well as the distribution of their nerve trunks which is similar to humans (Mackinnon et al., 1985; Rodriguez et al., 2004). Although major nerve trunks of the rat forelimb are getting more and more used for experimental research (Papalia et al., 2006; Sinis et al., 2006), the rat sciatic nerve is still the far more employed experimental model as it provides a nerve trunk with adequate length and space at the mid-thigh for surgical manipulation and/or introduction of grafts or guides (Rodriguez et al., 2004). Although sciatic nerve injuries themselves are rare in humans, this experimental model provides a very realistic testing bench for lesions involving plurifascicular mixed nerves with axons of different size and type competing to reach and reinnervate distal targets (Mackinnon et al., 1985).

Common types of experimentally induced injuries include focal crush or freeze injury that causes axonal interruption but preserves the connective sheaths (axonotmesis), complete transection disrupting the whole nerve trunk (neurotmesis) and resection of a nerve segment inducing a gap of certain

* Corresponding author at: Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano, Torino, Italy. Tel.: +39 011 670 5433; fax: +39 011 90 38 639.
E-mail address: stefano.geuna@unito.it (S. Geuna).
[1] These authors contributed equivalently to the work.

0165-0270/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jneumeth.2007.02.017

length. As regards axonotmesis, nerve regeneration is usually successful after this type of injury. After a short (1–2 days) latency to cross the injury site, axons regenerate at a steady rate along the distal nerve helped by the reactive Schwann cells and the preserved endoneurial tubules which enhance axonal elongation and facilitate adequate target reinnervation (Valero-Cabré et al., 2004). Crush injuries are appropriate to investigate the cellular and molecular mechanisms of peripheral nerve regeneration, and to assess the role of different factors in the regeneration process (Udina et al., 2003). Nerve crush injury is also a well-established model in experimental regeneration studies to investigate the impact of various pharmacological treatments (Al Moutaery et al., 1998; Algora et al., 1996; Gudemez et al., 2002; Islamov et al., 2002; Lee et al., 2000; Paydarfar and Paniello, 2001; Rodriguez et al., 2004).

Although both morphological and functional data have been used to assess neural regeneration after induced crush injuries, the correlation between these two types of assessment is usually poor (Dellon and Mackinnon, 1989; Kanaya et al., 1996; Shen and Zhu, 1995). Classical and newly developed methods of assessing nerve recovery, including histomorphometry, retrograde transport of horseradish peroxidase and retrograde fluorescent labeling (Mackinnon et al., 1985, 1988) do not necessarily predict the reestablishment of motor and sensory functions (Almquist and Eeg-Olofsson, 1970; de Medinaceli et al., 1982; Shen and Zhu, 1995; Varejão et al., 2004b). Although such techniques are useful in studying the nerve regeneration process, they generally fail in assessing functional recovery (Shen and Zhu, 1995). In this sense, research on peripheral nerve injury needs to combine both functional and morphological assessment.

The use of biomechanical techniques and rat's gait kinematic evaluation is a progress in documenting functional recovery (Varejão et al., 2003a). Indeed, the use of biomechanical parameters has given valuable insight into the effects of the sciatic denervation/reinnervation, and thus represents an integration of the neural control acting on the ankle and foot muscles (Varejão et al., 2003a,b, 2004b).

Most of the studies of sciatic nerve regeneration after axonotmesis include a post-surgery follow-up period of 4–8 weeks based on the assumption that, by the end of this time, functional recovery is complete. This rationale is supported mainly by data on results of the walking track analysis (Gudemez et al., 2002; Oliveira et al., 2001). In a previous study we showed that, unexpectedly, rats' ankle kinematics during gait seems still not to recover completely at week 8 post-traumatic suggesting that previous conclusions of complete recovery from sciatic crush injury within such interval of time might be biased by lack of sensitivity of the tests used (Varejão et al., 2004a). Therefore, in the present study the post-injury follow up period was extended to 12 weeks in order to verify whether additional information about functional recovery and sciatic nerve regeneration is obtained. To this end, measures of hindlimb motor and sensory function were combined with a detailed analysis of the ankle kinematics during the stance phase of gait. At the end of the 12-week follow up period, nerve fiber regeneration was assessed by design-based quantitative morphology.

2. Materials and methods

2.1. Animals and surgery

Twelve adult male Sasco Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighting approximately 300 g were used. Animals were housed two animals per cage (Makrolon type 4, Tecniplast, VA, Italy), in a temperature and humidity controlled room with 12:12 h light/dark cycles, and were allowed normal cage activities under standard laboratory conditions. The animals were fed with standard chow and water *ad libitum*. Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort taking into account human endpoints for animal suffering and distress. Animals were housed for 2 weeks before entering the experiment. All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of Portugal, and in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Crush injury was carried out with the animals ($n = 6$) placed prone under sterile conditions and the skin from the clipped lateral right thigh scrubbed in a routine fashion with antiseptic solution. Under deep anaesthesia (ketamine 9 mg/100 g; xylazine 1.25 mg/100 g, atropine 0.025 mg/100 g body weight, intramuscular), the right sciatic nerve was exposed unilaterally through a skin incision extending from the greater trochanter to the mid-thigh followed by a muscle splitting incision.

After nerve mobilisation, a non-serrated clamp (manufactured by the Institute of Industrial Electronic and Material Sciences, University of Technology, Vienna, Austria) exerting a constant force of 54 N, was used for a period of 30 s to create a 3 mm-long crush injury, 10 mm above the bifurcation into tibial and common peroneal nerves (Fig. 1) (Beer et al., 2001; Varejão et al., 2004a,b). The starting diameter of the sciatic nerve was about 1 mm, flattening during the crush to 2 mm, giving a final pressure of $p = 9$ MPa. The nerves were kept moist with 37 °C sterile saline solution throughout the surgical intervention. The muscle and skin were then closed with 4/0 resorbable sutures.

Fig. 1. Photography of the non-serrated clamp (manufactured by the Institute of Industrial Electronic and Material Sciences, University of Technology, Vienna, Austria) that exerts a constant force (54 N in this study) and was applied for a period of 30 s to create a 3 mm-long crush injury 10 mm above the sciatic division into tibial, peroneal and sural nerves. The scale bar corresponds to 1 cm.

The surgical procedure was performed with the aid of an M-650 operating microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). To prevent autotomy, a deterrent substance was applied to rats' right foot (Kerns et al., 1991; Sporel-Ozakat et al., 1991). The animals were intensively examined for signs of autotomy and contracture and none presented severe wounds (absence of a part of the foot or severe infection) or contractures during the study. Six out of 12 animals were left un-crushed and used as controls.

2.2. Functional assessment of reinnervation

2.2.1. Motor performance and nociceptive function

Motor performance and nociceptive function were evaluated by measuring extensor postural thrust (EPT) and withdrawal reflex latency (WRL), respectively. The animals were tested preoperatively (week 0), and every week during the 12-week follow-up time. The animals were gently handled, and tested in a quiet environment to minimize stress levels. The EPT was originally proposed by Thalhammer et al. (1995) as a part of the neurological recovery evaluation in the rat after sciatic nerve injury. For this test, the entire body of the rat, excepting the hindlimbs, was wrapped in a surgical towel and supported by the thorax. The affected hindlimb was then lowered towards the platform of a digital balance (model PLS 510-3, Kern & Sohn GmbH, Kern, Germany) to elicit the EPT. As the animal is lowered to the platform, it extends the hindlimb, anticipating the contact made by the distal metatarsus and digits. The force in grams (g) applied to the digital platform balance was recorded (digital scale range 0–500 g). The same procedure was applied to the contra-lateral, unaffected limb. The affected and normal limbs were tested three times, with an interval of 2 min between consecutive tests, and the three values were averaged to obtain a final result. The normal (unaffected limb) EPT (NEPT) and experimental EPT (EEPT) values were incorporated into an equation (Eq. (1)) to derive the percentage of functional deficit, as described in the literature (Koka and Hadlock, 2001):

$$\text{percentage motor deficit}\,(\%) = \left[\frac{\text{NEPT} - \text{EEPT}}{\text{NEPT}}\right] \times 100 \quad (1)$$

The nociceptive withdrawal reflex (WRL) was adapted from the hotplate test as described by Masters et al. (1993). The rat was wrapped in a surgical towel above its waist and then positioned to stand with the affected hind paw on a hotplate at 56 °C (model 35-D; IITC Life Science Instruments, Woodland Hill, CA). WRL is defined as the time elapsed from the onset of hotplate contact to withdrawal of the hind paw and measured with a stopwatch. Normal rats withdraw their paws from the hotplate within ~4 s or less (Hu et al., 1997). The affected limbs were tested three times, with an interval of 2 min between consecutive tests to prevent for sensitization, and the three latencies were averaged to obtain a final result (Shir et al., 2001). The cut off time for heat stimulation was set at 12 s, to avoid skin damage to the foot (Varejão et al., 2003a,b, 2004b).

2.2.2. Sciatic functional index (SFI) and static sciatic index (SSI)

For SFI, animals were tested in a confined walkway measuring 42 cm-long and 8.2 cm-wide, with a dark shelter at the end. A white paper was placed on the floor of the rat-walking corridor. The hind paws of the rats were pressed down onto a finger paint-soaked sponge, and they were then allowed to walk down the corridor leaving its hind footprints on the paper. Often, several walks were required to obtain clear print marks of both feet (Varejão et al., 2001). Prior to any surgical procedure, all rats were trained to walk in the corridor, and a baseline-walking track was recorded. Subsequently, walking tracks were recorded at week 0 and, every week post-operatively, during the healing period of 12 weeks. Several measurements were taken from the footprints: (I) distance from the heel to the third toe, the print length (PL); (II) distance from the first to the fifth toe, the toe spread (TS); and (III) distance from the second to the fourth toe, the intermediary toe spread (ITS). The static footprints were obtained at least during four occasional rest periods. In the static evaluation (SSI) only the parameters TS and ITS, were measured. For both dynamic (SFI) and static assessment (SSI), all measurements were taken from the experimental and normal sides. Prints for measurements were chosen at the time of walking based on clarity and completeness at a point when the rat was walking briskly. The mean distances of three measurements were used to calculate the following factors (dynamic and static):

$$\text{toe spread factor (TSF)} = \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}},$$

$$\text{intermediate toe spread factor (ITSF)} = \frac{\text{EITS} - \text{NITS}}{\text{NITS}},$$

$$\text{print length factor (PLF)} = \frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}}$$

where the capital letters E and N indicate injured and non-injured side, respectively.

The SFI was calculated as described by Bain et al. (1989) according to the following equation:

$$\begin{aligned}\text{SFI} &= -38.3\frac{(\text{EPL} - \text{NPL})}{\text{NPL}} + 109.5\frac{(\text{ETS} - \text{NTS})}{\text{NTS}} \\ &\quad + 13.3\frac{(\text{EIT} - \text{NIT})}{\text{NIT}} - 8.8 \\ &= (-38.3 \times \text{PLF}) + (109.5 \times \text{TSF}) + (13.3 \times \text{ITSF}) - 8.8\end{aligned} \quad (2)$$

In 2000, Bervar (2000) described a time-saving digitised static footprint analysis. In that study there were good correlations between the traditional SFI and the newly developed static sciatic index (SSI) and static toe spread factor (TSF), respectively. The SSI is a time-saving and easy technique for accurate functional assessment of peripheral nerve regeneration in rats and is calculated using the static factors, not considering the print length factor (PL), according to the equation:

$$\text{SSI} = [(108.44 \times \text{TSF}) + (31.85 \times \text{ITSF})] - 5.49 \quad (3)$$

For both SFI and SSI, an index score of 0 is considered normal and an index of −100 indicates total impairment. When no footprints were measurable, the index score of −100 was given (Dijkstra et al., 2000). Reproducible walking tracks could be measured from all rats. In each walking track three footprints were analysed by a single observer, and the average of the measurements was used in SFI calculations.

2.2.3. Kinematic analysis

Ankle kinematics and stance duration analysis were carried out prior nerve injury and every second week during the 12-week follow-up time. Animals walked on a Perspex track with length, width and height of, respectively, 120, 12, and 15 cm. In order to ensure locomotion in a straight direction, the width of the apparatus was adjusted to the size of the rats during the experiments, and a darkened cage was connected at the end of the corridor to attract the animals. The rats gait was video recorded at a rate of 100/120 Hz images per second (JVC GR-DVL9800, NJ, USA). The camera was positioned at the track's half length where gait velocity was steady, and 1 m distant from the track obtaining a visualization field of 14 cm wide. Only walking trials with stance phases lasting between 150 and 400 ms were considered for analysis, since this corresponds to the normal walking velocity of the rat (20–60 cm/s) (Clarke and Parker, 1986; Hruska et al., 1979). The video images were stored in a computer hard disk for latter analysis using an appropriate software APAS® (Ariel Performance Analysis System, Ariel Dynamics, San Diego, USA). 2D biomechanical analysis (sagittal plan) was carried out applying a two-segment model of the ankle joint, adopted from the model firstly developed by Varejão et al. (2002). Skin landmarks were tattooed in a point in the proximal edge of the tibia, in the lateral malleolus and, in the fifth metatarsal head (Fig. 2). The rats' ankle angle was determined using the scalar product between a vector representing the foot and a vector representing the lower leg. Four step cycles were analysed per rat.

With this model, positive and negative values of θ ankle indicate dorsiflexion and plantar flexion, respectively. For each stance phase the following time points were identified: opposite toe-off (OT), heel-rise (HR) and toe-off (TO) (Varejão et al., 2002) and were time normalized for 100% of the stance phase. The normalized temporal parameters were averaged over all recorded trials.

2.3. Design-based quantitative morphology

After 12-week follow-up animals were euthanatized and a 10 mm-long segment of the sciatic nerve distal to the site of lesion was removed and a 4/0 stitch was used to mark the proximal stump of the nerve segment. The samples were then fixed, and prepared for histomorphometry of myelinated nerve fibers. A 10 mm segment of uninjured sciatic nerve from a corresponding level was withdrawn also from the six control animals. Sciatic nerve samples were immersed immediately in a fixation solution, containing 2.5% purified glutaraldehyde and 0.5% saccarose in 0.1 M Sorensen phosphate buffer for 6–8 h. Specimens were then washed in a solution containing 1.5% saccarose in 0.1 M Sorensen phosphate buffer, post-fixed in 1.5% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Glauerts' embedding mixture of resins consisting in equal parts of Araldite M and the Araldite Härter, HY 964 (Merck, Darmstad, Germany), to which was added 1–2% of the accelerator 964, DY 064 (Merck, Darmstad, Germany). The plasticizer dibutyl phthalate was added in a quantity of 0.5%.

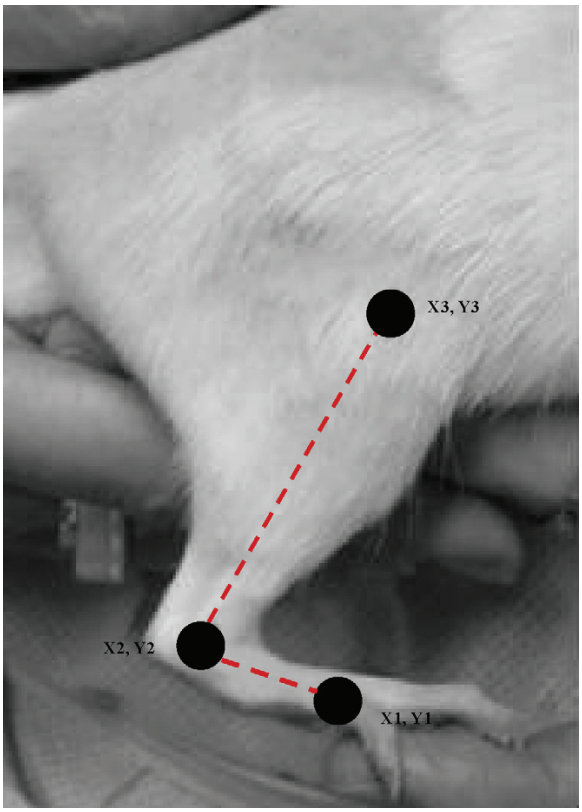


Fig. 2. The three skin landmarks in the rat right legs were used to describe ankle motion in the sagittal plane: the proximal edge of the tibia (x_3, y_3), lateral malleolus (x_2, y_2), and fifth metatarsal head (x_1, y_1). Ankle kinematics in the sagittal plan was analysed by applying a two-segment biomechanical model that intersects these three skin landmarks.

Series of 2 μm thick semi-thin transverse sections were cut, starting from the distal stump of the withdrawn nerve sample, using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained by Toluidine blue for 2–3 min for high resolution light microscopy examination. In each nerve, histomorphometry was conducted using a DM4000B microscope equipped with a DFC320 digital camera and an IM50 image manager system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). This system reproduced microscopic images (obtained through a 100× oil-immersion objective) on the computer monitor at a magnification adjusted by a digital zoom. The final magnification was 6600× enabling accurate identification and morphometry analysis of myelinated nerve fibers.

One semi-thin section from each nerve was randomly selected and used for the morpho-quantitative analysis. The use of a single section deserves particular mention from a methodological point of view since the morphometrical parameters of nerve

fibers can vary significantly depending on the nerve level and on the distance from the point of lesion. Two methodological strategies can be adopted to avoid that this variability affects the results of the quantitative assessment of nerve fibers. First, quantitative estimations can derive from the mean of histomorphometrical data obtained on multiple sections taken at different levels of the nerve. Alternatively, a cutting procedure can be adopted to assure that the section for histomorphometric assessment is taken at the same location along all nerves (10 mm distal to the site of lesion in the present study). Most researchers use the second approach since it is less time consuming and, if adequate sampling techniques are employed (e.g. the 2D disector), provides unbiased data (Geuna et al., 2000; Larsen, 1998).

On the selected section, the total cross-sectional area of the nerve was measured and sampling fields were then randomly selected using a protocol previously described (Geuna et al., 2000, 2004). Possible "edge effects" were compensated by employing a two-dimensional disector procedure, which is based on sampling the "tops" of fibers (Geuna, 2005; Geuna et al., 2000). Mean fiber density was calculated by dividing the total number of nerve fibers within the sampling field by its area (N/mm^2). Total fibers number (N) was then estimated by multiplying the mean fiber density by the total cross-sectional area of the whole nerve cross-section assuming an uniform distribution of nerve fibers across the entire section. Fiber and axon area were measured and the circle-fitting diameter of fiber (D) and axon (d) were calculated. These data was used to calculate myelin thickness [$(D-d)/2$], myelin thickness/axon diameter ratio [$(D-d)/2d$], and fiber/axon diameter ratio (D/d).

The precision of the histomorphometry methods was evaluated by calculating the coefficient of error (CE). Regarding quantitative estimates of fiber number, the CE(n) was obtained as follows (Schmitz, 1998):

$$\mathrm{CE}(n) = \frac{1}{\sqrt{\Sigma Q'}} \tag{4}$$

where $\Sigma Q'$ is the number of counted fibers in all disectors.

For size estimates, the coefficient of error was estimated as (Geuna et al., 2001):

$$\mathrm{CE}(z) = \frac{\mathrm{S.E.M.}}{\mathrm{mean}} \tag{5}$$

where S.E.M. is the standard error of the mean.

The sampling scheme was designed in order to keep the CE below 0.10, which assures enough accuracy for neuromorphological studies (Pakkenberg and Gundersen, 1997).

2.4. Statistics

One-way ANOVA for repeated measures was used to analyse the effect of axonotmesis on functional and kinematic variables. Sphericity was evaluated by the Mauchly's test and when this assumption was not satisfied, the degrees of freedom were corrected by using the more conservative Greenhouse–Geiser's epsilon. Differences between pre-surgery results and those obtained throughout the 12-week recovery period were systematically assessed by applying planned contrasts (general linear model, simple contrasts). Due to violation of normality assumption, WRL results were analysed by the non-parametric Friedman test, followed by pairwise comparisons using the Wilcoxon signed ranks test. For histomorphometry, statistical comparisons of quantitative data were subjected to one-way ANOVA test. Statistical significance was established as $p<0.05$. All statistical procedures were performed by using the statistical package SPSS (version 14.0, SPSS Inc.) except histomorphometry data that was analysed using the software "Statistica per discipline bio-mediche" (McGraw-Hill, Milan, Italy). Unless otherwise stated, all data in this study is presented as mean ± standard error of the mean (S.E.M.).

3. Results

Immediately after the acute compression injury, the crushed areas of all sciatic nerves were flattened but nerve continuity was preserved. Complete flaccid paralysis of the operative foot was observed following crush injury. All rats survived, with no wound infection or auto-mutilation.

3.1. Functional assessment of reinnervation

3.1.1. Withdrawal reflex latency (WRL)

Values in seconds were obtained by performing the withdrawal reflex latency (WRL) test, preoperatively (week 0), and every week after the surgical procedure until week 12 (Table 1), when the animals were sacrificed for histomorphometry analysis.

Nerve injury produced a severe deficit in nociception [$\chi^2(12)=49.639$; $p=0.000$] (Table 1) with three of the six rats reaching the 12 s cutoff time during this test at week 1 post-surgery (Table 1). Post hoc pairwise comparisons (uncorrected for multiple comparisons) revealed significant increases in WRL compared to values prior sciatic axonotmesis at weeks 1, 2, 3 and 4 ($p<0.05$). At week 5, the six animals withdraw their paw from the hotplate within 4 s or less.

3.1.2. Motor deficit

Values of percentage of functional deficit (%), were obtained by performing the extensor postural thrust (EPT) test, preoperatively (week 0), and every week after the surgical procedure until the week 12, when the animals were sacrificed for histomorphometry analysis (Table 1).

Axonotmesis resulted in a severe loss of hindlimb extension force as evaluated by the EPT and derived percentage motor deficit [$F_{(12,\,60)}=98.861$; $p=0.000$] (Table 1 and Fig. 3). The later averaged 5 ± 3% preoperatively and increased to 84 ± 1% at week 1 post-surgery (Table 1). The percentage of motor deficit remained significantly elevated above pre-surgery level until week 7 ($p<0.05$) but not thereafter. At week 9, the percentage of motor deficit reached normal preoperatively values in all operated animals with an average of 3 ± 3%.

Table 1
Values in seconds (s) were obtained performing withdrawal reflex latency (WRL) test to evaluate the nociceptive function

	Week												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
WRL code													
C1	2	6	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2
C2	1	12	10	5	5	2	3	3	4	3	3	2	2
C3	2	10	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
C4	2	12	10	5	5	3	2	2	2	2	2	2	2
C5	1	7	4	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
C6	2	12	12	11	10	4	3	3	2	2	2	2	2
Mean ± S.E.M.	1.7 ± 0.21	8.8 ± 1.72	6.8 ± 1.76	4.8 ± 1.33	4.5 ± 1.23	2.7 ± 0.33	2.3 ± 0.21	2.3 ± 0.21	2.3 ± 0.33	2.3 ± 0.21	2.2 ± 0.17	2.0 ± 0.00	2.0 ± 0.00
EPT code													
C1	0.09	0.83	0.77	0.67	0.61	0.53	0.42	0.3	0.28	0.00	0.15	0.00	0.06
C2	0.00	0.86	0.87	0.75	0.46	0.27	0.23	0.13	0.15	0.13	0.13	0.15	0.00
C3	0.08	0.86	0.77	0.68	0.54	0.35	0.35	0.15	0.19	0.05	0.13	0.05	0.00
C4	0.07	0.83	0.87	0.79	0.58	0.53	0.36	0.14	0.00	0.07	0.06	0.07	0.06
C5	0.06	0.82	0.77	0.68	0.5	0.43	0.36	0.08	0.06	0.00	0.06	0.09	0.06
C6	0.10	0.85	0.85	0.67	0.57	0.43	0.42	0.07	0.08	0.06	0.00	0.07	0.07
Mean ± S.E.M.	0.05 ± 0.03	0.84 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.10 ± 0.05	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.05	0.00 ± 0.04	0.00 ± 0.02

Values of functional deficit were obtained performing extensor postural thrust (EPT) test. These tests have been performed preoperatively (week 0), and every week after the surgical procedure until week 12, when the animals were sacrificed for histomorphometry analysis. Results are presented as mean and standard error of the mean (S.E.M.).

Table 2
Functional assessment obtained by the sciatic function index (SFI) and by static sciatic index (SSI)

	Week												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SFI code													
C1	−0.6	−79.1	−76.8	−36.9	−15.5	−57.3	−31.8	−23.6	−18.8	−8.8	−11.2	−8.8	−4.2
C2	−17.8	−68.8	−66.0	−28.8	−15.6	−19.2	−17.9	−9.9	−14.3	−14.9	−2.7	−11.2	−13.4
C3	−16.9	−82.3	−77.7	−21.6	−36.9	−18.9	−22.6	−10.0	−11.2	−3.8	−8.8	−9.9	−5.9
C4	−16.6	−80.3	−78.8	−45.3	−30.7	−20.2	−35.2	−20.2	4.6	−15.6	−2.9	−2.7	−0.9
C5	−6.7	−44.8	−51.1	−54.7	−41.2	−20.9	−24.3	−9.5	−12.4	−21.0	−10.0	−0.6	−3.0
C6	−20.3	−63.5	−75.6	−51.8	−33.4	−37.2	−25.0	−8.8	−11.6	−10.1	−10.1	−8.8	−4.6
Mean ± S.E.M.	−13.2 ± 3.15	−69.8 ± 5.83	−71.0 ± 4.40	−39.9 ± 5.34	−28.9 ± 4.45	−29.0 ± 6.35	−26.1 ± 2.58	−13.7 ± 2.65	−10.6 ± 3.25	−12.4 ± 2.47	−6.7 ± 2.24	−6.1 ± 2.33	−5.3 ± 1.75
SSI													
C1	−1.2	−66.6	−72.4	−31.5	−13.8	−53.9	−26.1	−24.5	−17.1	−5.5	−10.4	−5.5	−3.4
C2	−12.4	−60.2	−56.4	−11.3	−14.1	−11.9	−13.9	−13.9	−10.9	−5.5	−5.9	−10.4	−5.5
C3	−15.7	−52.1	−73.8	−18.7	−26.9	−16.0	−18.6	−8.4	−5.5	−0.6	−5.5	−2.0	−3.7
C4	−13.3	−76.8	−72.4	−41.2	−27.2	−26.1	−31.0	−10.0	−9.6	−14.4	−0.2	−5.9	−0.1
C5	−5.5	−21.5	−37.4	−38.9	−39.8	−16.3	−20.4	−6.4	−8.5	−17.5	−5.5	−1.2	−0.2
C6	−5.5	−59.5	−72.4	−18.0	−33.6	−37.1	−23.5	−5.5	−8.7	−2.3	−5.5	−5.5	−3.3
Mean ± S.E.M.	−8.9 ± 2.31	−56.1 ± 7.70	−64.1 ± 5.98	−26.6 ± 5.03	−25.9 ± 4.25	−26.9 ± 6.56	−22.3 ± 2.45	−11.5 ± 2.88	−6.9 ± 3.65	−7.6 ± 2.77	−3.5 ± 2.32	−3.1 ± 2.24	−0.3 ± 1.48

These tests have been performed preoperatively (week 0), and every week after the surgical procedure until week 12, when the animals were sacrificed for histomorphometry analysis. The SFI was calculated according to Eq. (2) and SSI according to Eq. (3). Results are presented as mean and standard error of the mean (S.E.M.).

3.1.3. Sciatic functional index (SFI) and static sciatic index (SSI)

SFI indicated significant hindlimb impairment after sciatic axonotmesis [$F_{(12, 60)} = 22.261$; $p = 0.000$]. Before nerve lesion, mean SFI was -13.2 ± 3.15 and decreased to -69.8 ± 5.83 at week 1 post-surgery (Table 2). Planned contrasts showed that changes in SFI were significant at weeks 1, 2, 3, 4 and 6 ($p < 0.05$). Changes in SSI were similar to those observed for SFI, revealing significant impairment after axonal lesion [$F_{(12, 60)} = 23{,}073$; $p = 0.000$] (Table 2). Changes in SSI were significant at weeks 1, 2, 3, 4, 5 and 6 of recovery ($p < 0.05$). Planned contrasts indicate SSI values at week 12 to differ significantly from those obtained prior nerve lesion, a trend also noticed for SFI (week 12 versus pre-surgery, $p = 0.055$).

3.1.4. Kinematics

3.1.4.1. Opposite toe off (OT). At week 4 of recovery, ankle joint position at OT time was significantly different from baseline ($25.65 \pm 1.08^\circ$ versus $7.63 \pm 6.88^\circ$, at baseline and week 4 of recovery, respectively, $p = 0.048$), reflecting motor impairment and inability of ankle joint muscles' to oppose body weight at this point of the rat's gait cycle. This parameter remained altered throughout the entire 12 weeks follow up time. Ankle joint velocity at OT changed from $-270.35 \pm 19.65^\circ$ per s at baseline to $-591.95 \pm 82.28^\circ$ per s at week 2 ($p = 0.018$) (Table 3 and Figs. 3 and 4), but then reached normal values at week 4. No changes existed as a result of nerve sciatic nerve injury on the percentage of the gait cycle where OT occurs [$F_{(2.657, 13.286)} = 2.623$; $p = 0.099$].

3.1.4.2. Heel-raise (HR). At HR both ankle's joint angle and ankle joint velocity were significantly altered at week 2 ($p < 0.05$; Table 3 and Figs. 3 and 4). Beyond week 2, ankle position at HR showed an irregular pattern of recovery being similar to baseline values at weeks 4, 6 and 10 but not at weeks 8 and 12. The direction of ankle rotation changed from positive to negative (i.e. from plantar flexion to dorsiflexion) after sciatic nerve axonotmesis ($53.25 \pm 40.58^\circ$ per s versus $-352 \pm 25.10^\circ$ per s, pre-surgery and at week 2, respectively; $p = 0.000$) and remained negative throughout the entire 12-week follow up period. Differences from baseline values were significant except for week 8. The percent time of the stance phase where HR occurs remained unaltered along the entire follow-up time [$F_{(6, 30)} = 1{,}592$; $p = 0.184$].

3.1.4.3. Toe off (TO). At week 2, the ankle's joint at TO was positioned in dorsiflexion, in contrast to the normal plantar flexion position ($-12.27 \pm 7.01^\circ$ versus $47.63 \pm 0.38^\circ$ pre-surgery and at week 2, respectively; $p = 0.000$) (Table 3 and Figs. 3 and 4) but at week 4 the normal pattern was regained. Ankle joint velocity was significantly altered at week 2 ($p = 0.002$; Table 3 and Figs. 3 and 4), but recovered to normal values at week 4.

3.2. Morphological and histomorphometrical analysis

Fig. 5 shows a comparison between a normal rat sciatic nerve (Fig. 5A and B) and a regenerated nerve, 12 weeks after the crush

Table 3
Values of the ankle angular (θ) position (in $^\circ$) and velocity ($^\circ$ per s) for the temporal parameters obtained by kinematic analysis in the sagittal plane, as it moves through the stance phase

Temporal parameters ($N = 6$)	Kinematic variables	Week						
		0	2	4	6	8	10	12
OT	θ position	25.65 ± 1.08	17.76 ± 2.90	$7.63 \pm 6.88^*$	$8.97 \pm 6.47^*$	$13.93 \pm 4.10^*$	$8.97 \pm 5.32^*$	$10.92 \pm 4.27^*$
	θ velocity	-270.35 ± 19.65	$-591.95 \pm 82.28^*$	-366.15 ± 45.76	-357.87 ± 53.82	-205.13 ± 59.15	-318.12 ± 51.34	-325.92 ± 55.03
HR	θ position	30.67 ± 2.44	$42.35 \pm 2.33^{**}$	25.00 ± 5.16	23.24 ± 4.50	$21.21 \pm 2.05^{**}$	20.21 ± 5.33	$23.23 \pm 1.84^*$
	θ velocity	53.25 ± 40.58	$-352.11 \pm 25.10^{***}$	$-243.78 \pm 67.05^*$	$-190.81 \pm 56.61^*$	-65.53 ± 51.73	$-177.46 \pm 54.01^*$	$-195.17 \pm 52.36^*$
TO	θ position	-12.27 ± 7.01	$47.62 \pm 0.38^{***}$	-2.29 ± 4.85	-5.14 ± 0.81	-11.08 ± 4.05	-3.41 ± 6.17	-3.04 ± 2.21
	θ velocity	-221.38 ± 91.28	$349.70 \pm 15.92^*$	-93.33 ± 61.91	-210.37 ± 43.04	-284.15 ± 51.16	-287.30 ± 35.05	-299.22 ± 30.02

Temporal parameters measured in terms of angular position and velocity: opposite toe-off (OT), heel-rise (HR) and toe-off (TO). $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.

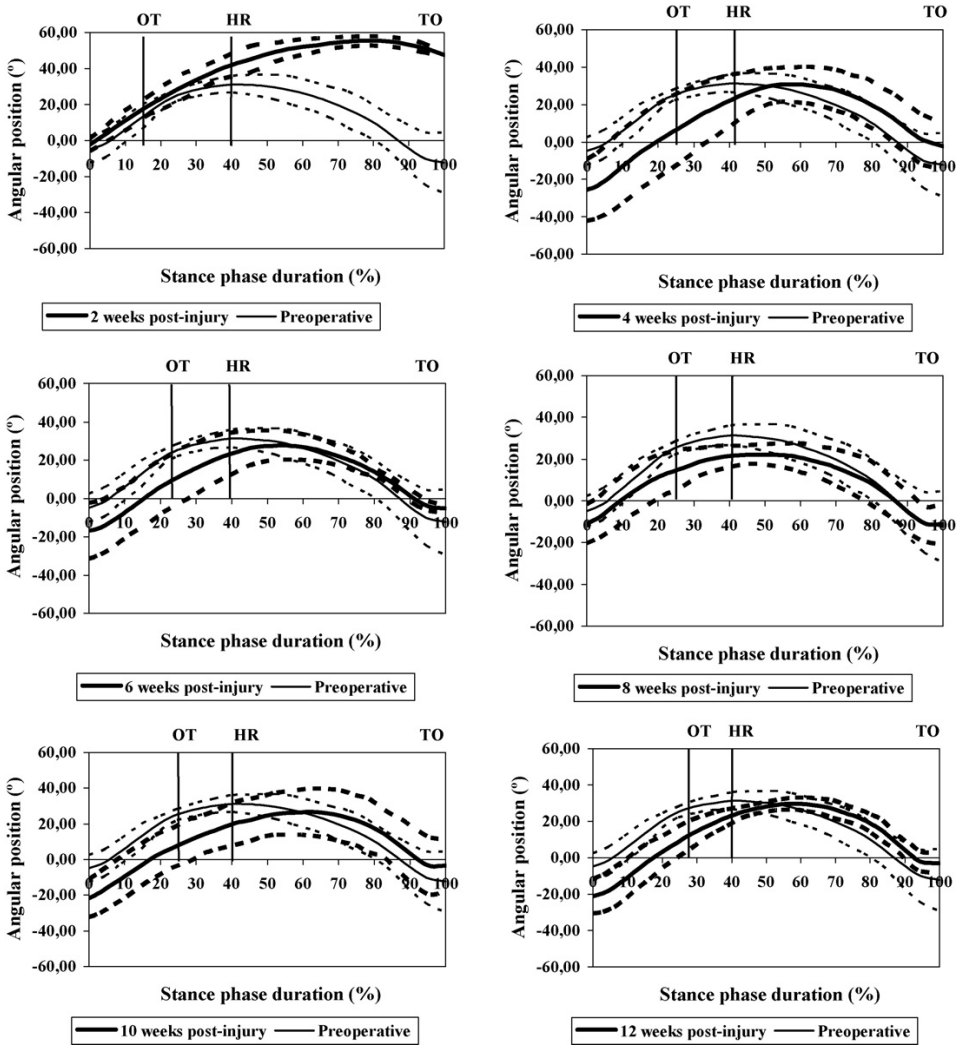


Fig. 3. Kinematics plots in the sagittal plane, for the angular position of the ankle as it moves through the stance phase, during the crush injury study. Standard deviation is plotted on either side of the mean. Temporal parameters are measured in terms of angular position (°): opposite toe-off (OT), heel-rise (HR) and toe-off (TO).

injury (Fig. 5C and D). The presence of microfasciculation, typical of regenerated nerve fibers, and of myelinated fibers with smaller caliber and a thinner myelin sheath in comparison to normal nerve is observable.

Results of the histomorphometrical analysis of normal and regenerated sciatic nerves (12 weeks after crush) are reported in Table 4. Statistical comparison between the two groups revealed that regenerated nerves have a significantly ($p < 0.05$) higher mean density and total number of myelinated axons as well as a significantly ($p < 0.05$) lower mean fiber diameter and myelin thickness. Only myelin thickness/axon diameter ratio and fiber/axon diameter ratio were not significantly ($p > 0.05$) different from normal values.

Table 4
Histomorphometrical assessment of normal and regenerated sciatic nerves at week 12 post-traumatic

	Density (N/mm^2)	Number, N	Fiber diameter, D	Axon diameter, d	Myelin thickness, $(D-d)/2$	$(D-d)/2d$	D/d
Normal	15,905 ± 287	7,666 ± 190	6.66 ± 0.12	4.26 ± 0.07	1.19 ± 0.03	0.28 ± 0.01	1.57 ± 0.02
Regenerated	20,109 ± 1232	10,644 ± 423	4.99 ± 0.19	3.48 ± 0.10	0.76 ± 0.50	0.23 ± 0.01	1.45 ± 0.02

Results are presented as mean and standard error of the mean (S.E.M.).

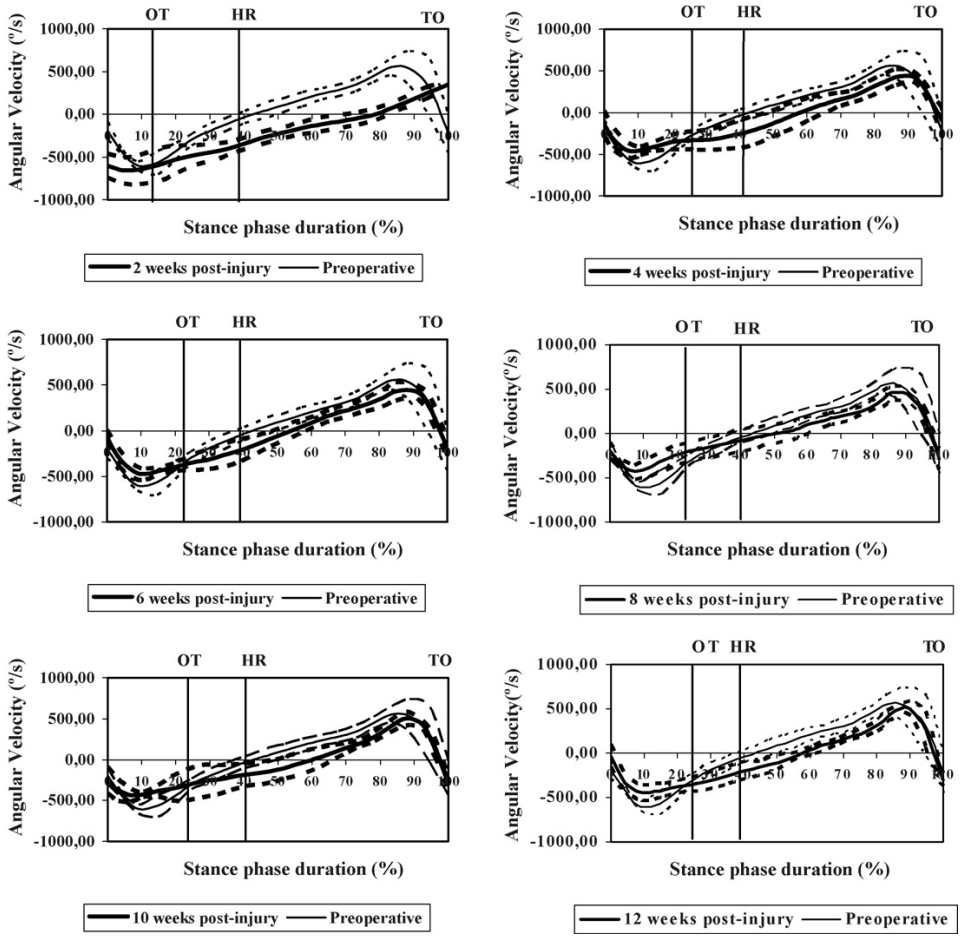


Fig. 4. Kinematics plots in the sagittal plane, for the angular velocity (° per s) of the ankle as it moves through the stance phase, during the crush injury study. Standard deviation is plotted on either side of the mean. Temporal parameters are measured in terms of angular position (° per s): opposite toe-off (OT), heel-rise (HR) and toe-off (TO).

4. Discussion

Peripheral nerve researchers frequently use the rat sciatic nerve crush as a model for axonotmesis (Rodriguez et al., 2004; Varejão et al., 2004b). Axonotmesis or second degree Sunderland injury designates a breakdown of the axon and distal Wallerian degeneration but with preservation of the continuity of the endoneurial sheath. After this type of injury, spontaneous regeneration through the distal nerve stump with good functional return can be expected (Seddon, 1943). As the restored pattern of innervation is expected to be identical to the original, the study of this nerve lesion provides a good model for establishing the ontogeny of functional nerve recovery. The present study was conducted to ascertain whether a 12-week follow-up time after sciatic nerve axonotmesis would provide information about the dynamics of nerve regeneration of the widely used rat model that would be missed with the habitual 8-week or less recovery time.

In the present study, nerve injury produced a profound deficit in nociceptive sensation with three of the six rats reaching the 12 s cutoff time in this test at week 1 post-surgery. The first signs of withdrawal response evoked by thermal noxious stimulation were observed in all animals, only after week 3 of recovery. Data reported by Varejão et al. (2004a), describes the withdrawal response to thermal noxious stimulation after week 4. Hadlock et al. (1999), using the hotplate test, found a slower recovery pattern of the sensory function when compared with recovery of the motor one. Interestingly, when the nerve is transected and the regenerating axons must bridge a gap, sensory neurons exhibit a faster regenerative pattern than motor neurons (Madorsky et al., 1998). However, when interpreting the results of the hotplate test it is important to note that pressing the paw onto the heat source, might recruit the mechanoreceptors, thus confounding the outcome of this test (Kerns et al., 1991).

The EPT measures the force in grams (g) generated by the foot against the surface of the balance, as a result of the extension of the gastrocnemius-soleus muscles, similar to the peak vertical force parameter obtained by the study of the ground reaction forces (Howard et al., 2000). Axonotmesis resulted in a severe

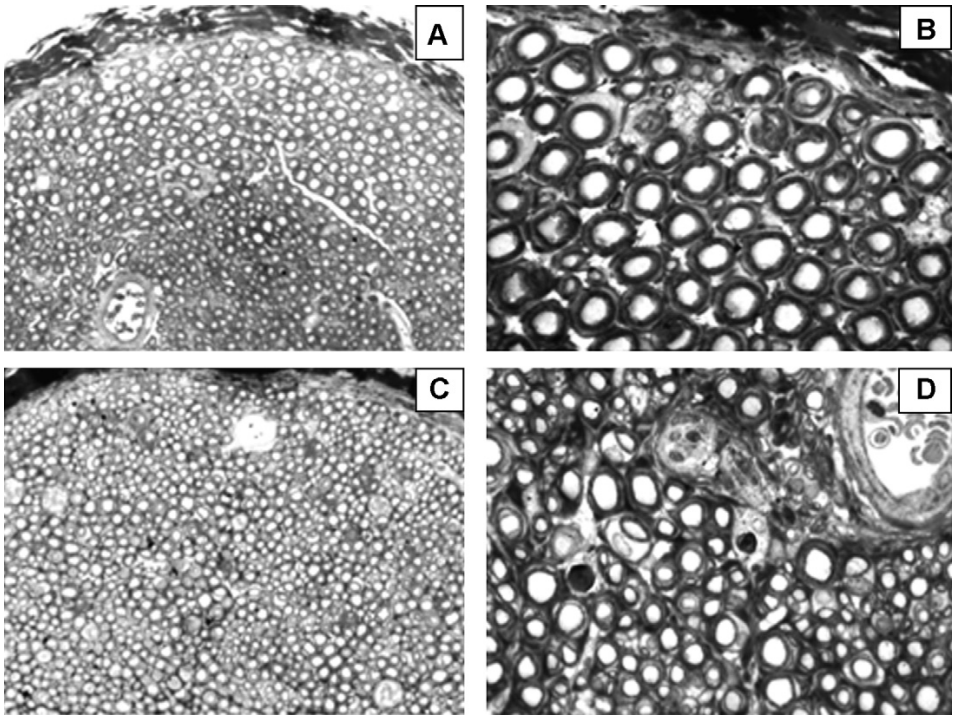


Fig. 5. Photomicrograph of a semithin section cut transversely to the main axis of a normal sciatic nerve (A and B) and a regenerated sciatic nerve 12-week post-injury (C and D). The differences between the two nerves are clearer at high magnification (B and D) and are represented by smaller fibers organized in smaller fascicles in the regenerated nerve. Magnifications: A and C, 200×; B and D, 1000×.

loss of hindlimb extension force as evaluated by the EPT and derived percentage motor deficit that remained significantly elevated until week 8 of follow-up time. After 8 weeks of recovery, motor function as evaluated by the EPT and percentage of motor deficit, was again normal. This pattern of recovery is consistent with the results of the SFI and SSI tests, and in agreement with the results of recent studies, where the time of recovery judged through EPT and SFI assessment was very similar (Hadlock et al., 1999; Koka and Hadlock, 2001; Varejão et al., 2004a).

The most commonly used method of functional assessment after nerve repair in the rat is walking track analysis. The sciatic function index (SFI), developed by de Medinaceli et al. (1982) and later adapted by Bain et al. (1989), is calculated using three measures of hind leg footprints: the 1–5 toe spread (TS), the 2–4 toe spread (ITS) and the print length (PL). During the past two decades, many experimental studies on nerve regeneration have successfully used the SFI as a measure of functional loss (Hare et al., 1992; Maeda et al., 1999; Shen and Zhu, 1995; Tarasidis et al., 1998; Varejão et al., 2001). It is a simple method, non-invasive and has been shown to measure a combination of motor and sensory recovery. It can be used repeatedly to measure functional recovery over time in the same animal. Walking track analysis is a widely accepted technique for functional evaluation after sciatic nerve repair in rats, but it is labour-intensive. In 2000, Bervar described a time-saving static footprint analysis. In that study there were good correlations between the traditional sciatic function index (SFI) and the newly developed static sciatic index (SSI). In our study, after a pressure of 9 MPa exerted to the sciatic nerve, a complete functional deficit was evident in all animals; subsequently the SFI and SSI significantly increased. SFI and SSI indicated significant hindlimb impairment after sciatic axonotmesis and changes were significant at until week 6 (Table 2). At week 7, both SFI and SSI returned to the baseline values of the preoperatively period. These results are in line with the findings of several authors whose studies have also shown normal walking patterns only after the first month of post-crush (Chen et al., 1992; Gudemez et al., 2002; Oliveira et al., 2001; Varejão et al., 2004a). In contrast to these experiments, others reported a full recovery already during the week 3/4 after injury (Bridge et al., 1994; Hare et al., 1992; Walker et al., 1994). The difference in the rate of motor functional recovery may relate to the pathophysiologic response of peripheral nerves to the magnitude of different crushing loads (Lundborg and Dahlin, 1992; Rempel et al., 1999).

Recently, gait kinematics analysis has been introduced to study peripheral nerve regeneration and the accompanying functional rehabilitation. This analysis gives an insight into the effect of the sciatic denervation, and provides an integrated picture of the neural control acting on the ankle and foot muscles (Varejão et al., 2003a,b). The foot and ankle function in a complex manner throughout the stance phase of gait, accomplished by the

equilibrium operated by plantarflexors and dorsiflexors muscles. As sciatic nerve neuropathies are mostly characterized by gastrocnemius-soleus dysfunction, the stance phase is the ideal component of the gait cycle to study the activity of the plantarflexors muscles, whereas the dorsiflexors are swing phase muscles (Bain et al., 1989; Howard et al., 2000; Winter, 1983).

At week 2, gait was transiently abnormal, particularly during the push off phase of stance (Table 3) but the normal gait pattern was quickly regained and by week 6 the trajectories of the ankle movement were similar to those registered prior sciatic nerve injury. However, at the instant of heel-raise an abnormal pattern of ankle position persisted during the whole 12-week follow-up time, thereby suggesting impaired torque production from the plantarflexor muscles. Some parameters of the ankle kinematics during stance revealed a complex pattern of alterations across the recovery time span. Particularly, the position of the ankle joint at the heel-raise point of the stance phase firstly recovered to the normal pattern and then regressed to abnormality. Although speculative this finding might indicate the development of more permanent adaptive changes in the rat's gait pattern following the nerve injury and resultant deficit in motor and sensitive functions. A more detailed analysis of the gait pattern of the rat following crush injury that includes other joints and limbs would be needed to confirm this hypothesis.

The foot and ankle function throughout the stance phase of gait is accomplished by the equilibrium operated by plantarflexors and dorsiflexors muscles. As gastrocnemius-soleus muscle is highly active during the stance phase of walking, this component of the gait cycle is very sensitive to sciatic nerve impairment (Bain et al., 1989; Howard et al., 2000; Winter, 1983). Therefore, although a more detailed analysis of the rat gait pattern, combining kinematic and electromyographic data, revealed that also swing phase is affected after a period of hindlimb suspension (Canu et al., 2005) or during recovery from sciatic nerve transection (Gramsbergen et al., 2000), gait analysis reported in this study focused only the stance phase. This is consistent with a previous study on 8-week sciatic crush injury (Varejão et al., 2004a,b) and, yet, with all other functional evaluation parameters (SFI, SSI, EPT) that were also made during the support phase during locomotion.

A possible limitation of the nerve crush model is related to the possibility that the number of nerve fibers suffering structural damage might vary substantially depending on the different degree of nerve compression and thus rendering this method un-reliable. In fact, some nerve fibers might undergo only a temporary functional impairment (type I lesion according to Sunderland) and the following functional recovery could thus not be due to a true regeneration of the severed axons. The use of a standardized clamping procedure solves this limitation as previously reported by Varejão et al. (2004a).

As regards the morphological parameters of regenerated nerve fibers, we have observed that fiber density and number in crushed nerves after 12 weeks of regeneration is still significantly higher than normal nerves while size is still significantly lower. Other studies have previously shown that nerve fibers augment in number during the first 3 months after end-to-end nerve repair, and then slowly begin to decrease (Mackinnon et al., 1991). This is can be explained by the occurrence of a sprouting of more than one growth cone from each severed axon leading to the presence of an abundance of small regenerating axons that cross the lesion site and grow to innervate the end organs (Mackinnon et al., 1991). The delayed decrease in fiber density and number that follows is due, according to the "pruning hypothesis" (Brushart et al., 1998), to the progressive death of some of the collateral fibers, which did not connect with the appropriate distal target.

Altogether, the results of this study showed that while a full recovery of nociception (WRL), SFI/SSI, and percentage of motor deficit (EPT) was attained by weeks 5, 7 and 9, respectively, ankle kinematic parameters were still recovering their original values at week 12 post-operatively. The same was true for several morphoquantitative parameters of regenerated nerve fibers.

Data presented in this study provide baseline information for enabling researchers in selecting the best end-point for the rat sciatic nerve crush model in relation to their experimental goals. Results of the present study also confirm that the use of multiple (morphological and functional) methods of analysis should always be recommended for an optimal assessment of nerve regeneration and functional recovery in experimental models, especially those based on the crush lesion.

Acknowledgements

The authors would like to gratefully acknowledge the valuable support by Doutor José Manuel Correia Costa, from Laboratório de Parasitologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSRJ), Porto, Portugal. This work was supported by PRIN and FIRB grants from the Italian MIUR (Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca), and by the Regione Piemonte.

References

Al Moutaery K, Arshaduddin M, Tariq M, Al Deeb S. Functional recovery and vitamin E level following sciatic nerve crush injury in normal and diabetic rats. Int J Neurosci 1998;96:245–54.

Algora J, Chen LE, Seaber AV, Wong GH, Urbaniak JR. Functional effects of lymphotoxin on crushed peripheral nerve. Microsurgery 1996;17:131–5.

Almquist E, Eeg-Olofsson O. Sensory-nerve-conduction velocity and two-point discrimination in sutured nerves. J Bone Joint Surg (Am) 1970;52:791–6.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstruct Surg 1989;83:129–38.

Beer GM, Steurer J, Meyer VE. Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. J Reconstr Microsurg 2001;17:531–4.

Bervar M. Video analysis of standing—an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. J Neurosci Methods 2000;102:109–16.

Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. Exp Neurol 1994;127:284–90.

Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. J Neurosci 1998;18:8674–81.

Canu MH, Garnier C, Lepoutre FX, Falempin M. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. Behav Brain Res 2005;157:309–21.

Chen LE, Seaber AV, Glisson RR, Davies H, Murrell GA, Anthony DC, Urbaniak JR. The functional recovery of peripheral nerves following defined acute crush injuries. J Orthop Res 1992;10:657–64.

Clarke KA, Parker AJ. A quantitative study of normal locomotion in the rat. Physiol Behav 1986;38:345–51.

de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. Exp Neurol 1982;77:634–43.

Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. Microsurgery 1989;10:220–5.

Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis and the withdrawal reflex. J Neurosci Methods 2000;96:251–8.

Geuna S. The revolution of counting "tops": two decades of the disector principle in morphological research. Microsc Res Tech 2005;66:270–4.

Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Ann Anat 2000;182: 23–34.

Geuna S, Tos P, Guglielmone R, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Anat Embryol 2001;204:1–10.

Geuna S, Gigo-Benato D, Ade CR. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. Microsurgery 2004;24:72–6.

Gramsbergen A, Ijkema-Paassen J, Meek MF. Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles. Exp Neurol 2000;161:183–93.

Gudemez E, Ozer K, Cunningham B, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve. Microsurgery 2002;22:234–41.

Hadlock T, Koka R, Vacanti JP, Cheney ML. A comparison of assessments of functional recovery in the rat. J Peripher Nerv Syst 1999;4:258–64.

Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. Plast Reconstr Surg 1992;89:251–8.

Howard CS, Blakeney D, Medige J, Moy OJ. Functional assessment in the rat by ground reaction forces. J Biomech 2000;33:751–7.

Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. Life Sci 1979;25:171–9.

Hu D, Hu R, Berde CB. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. Anesthesiology 1997;86:957–65.

Islamov RR, Hendricks WA, Jones RJ, Lyall GJ, Spanier NS, Murashov AK. 17Beta-estradiol stimulates regeneration of sciatic nerve in female mice. Brain Res 2002;943:283–6.

Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. Plast Reconstr Surg 1996;98:1264–71.

Kerns JM, Braverman B, Mathew A, Lucchinetti C, Ivankovich AD. A comparison of cryoprobe and crush lesions in the rat sciatic nerve. Pain 1991;47:31–9.

Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transaction. Exp Neurol 2001;168:192–5.

Larsen JO. Related stereology of nerve cross sections. J Neurosci Methods 1998;85:107–18.

Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. Neuroreport 2000;11:657–61.

Lundborg G, Dahlin L. The pathophysiology of nerve compression. Hand Clin 1992;8:215–27.

Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of the nerve regeneration in the rat. Plast Reconstr Surg 1985;75:384–8.

Mackinnon SE, O'Brien JP, Dellon AL, McLean AR, Hudson AR, Hunter DA. An assessment of the effects of internal neurolysis on a chronically compressed rat sciatic nerve. Plast Reconstr Surg 1988;81:251–8.

Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. Muscle Nerve 1991;14:1116–22.

Madorsky SJ, Swett JE, Crumley RL. Motor versus sensory neuron regeneration through collagen tubules. Plast Reconstr Surg 1998;102:430–6.

Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S. Effects of tension at the site of coaptation on recovery of sciatic nerve function after neurorraphy: evaluation by walking-track measurement, electrophysiology, histomorphometry, and electron probe X-ray microanalysis. Microsurgery 1999;19: 200–7.

Masters DB, Berde CB, Dutta SK, Griggs CT, Hu D, Kupsky W, Langer R. Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. Anesthesiology 1993;79: 340–6.

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. J Reconstr Microsurg 2001;17: 69–75.

Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. J Comp Neurol 1997;384:312–20.

Papalia I, Tos P, Scevola A, Raimondo S, Geuna S. The ulnar test: a method for the quantitative functional assessment of post-traumatic ulnar nerve recovery in the rat. J Neurosci Methods 2006;154:198–203.

Paydarfar JA, Paniello RC. Functional study of four neurotoxins as inhibitors of post-traumatic nerve regeneration. Laryngoscope 2001;111: 844–50.

Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading. J Bone Joint Surg (Am) 1999;81:1600–10.

Rodriguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. Drug Discov Today Dis Models 2004;1:177–85.

Schmitz C. Variation of fractionator estimates and its prediction. Anat Embryol 1998;198:371–97.

Seddon H. Three types of nerve injury. Brain 1943;66:237–88.

Shen N, Zhu J. Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. Microsurgery 1995;16:552–5.

Shir Y, Zeltser R, Vatine J-J, Carmi G, Belfer I, Zangen A, Overstreet D, Raber P, Seltzer Z. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviours in eight inbred and outbreed rat strains and selection lines. Pain 2001;90:75–82.

Sinis N, Schaller HE, Becker ST, Lanaras T, Schulte-Eversum C, Muller HW, Vonthein R, Rosner H, Haerle M. Cross-chest median nerve transfer: a new model for the evaluation of nerve regeneration across a 40 mm gap in the rat. J Neurosci Methods 2006;156:166–72.

Sporel-Ozakat RE, Edwards PM, Hepgul KT, Savas A, Gispen WH. A simple method for reducing autotomy in rats with peripheral nerve lesions. J Neurosci Methods 1991;36:263–5.

Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon SE, Strasberg SR, Haughey BH, Hunter DA. End-to-side neurorraphy: a long-term study of neural regeneration in a rat model. Otalaryngol Head Neck Surg 1998;119: 337–41.

Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershad-Sky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. Anaesthesiology 1995;82:1013–25.

Udina E, Voda J, Gold BG, Navarro X. Comparative dose-dependence study of FK506 on transacted mouse sciatic nerve repaired by allograft or xenograft. J Peripher Nerv Syst 2003;8:145–54.

Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. J Neurotrauma 2004;21:95–108.

Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neurosci Methods 2001;108:1–9.

Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Filipe VM, Melo-Pinto P, Winter DA. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. Muscle Nerve 2002;26:630–5.

Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. Exp Neurol 2003a;183:695–9.

Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe V, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter D. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. Muscle Nerve 2003b;27:706–14.

Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. J Neurotrauma 2004a;21:1652–70.

Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. Neurol Res 2004b;26:186–94.

Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P, Sisken BF. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. J Neurosci Methods 1994;52:47–52.

Winter DA. Energy generation and absorption at the ankle and knee during fast, natural, slow cadences. Clin Orthop 1983;175:147–54.

1.3. ARTIGO 2

Microsurgery (2008) (*in press*).

FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF SCIATIC NERVE REGENERATION ASSOCIATED TO A CELLULAR SYSTEM AFTER A STANDARDIZED CRUSH INJURY WITH A NON-SERRATED CLAMP.

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 1

NEURAL CELL TRANSPLANTATION EFFECTS ON SCIATIC NERVE REGENERATION AFTER A STANDARDIZED CRUSH INJURY IN THE RAT

A.L. LUÍS, D.V.M.,[1,2] J.M. RODRIGUES, M.D.,[1,2] S. GEUNA, M.D.,[3*] S. AMADO, M.D.,[4] M.J. SIMÕES, D.V.M.,[1,2] F. FREGNAN, B.Sc.,[3] A.J. FERREIRA, D.V.M.,[5] A.P. VELOSO, Ph.D.,[4] P.A.S. ARMADA-DA-SILVA, Ph.D.,[4] A.S.P. VAREJÃO, Ph.D.,[6] and A.C. MAURÍCIO, Ph.D.[1,2]

The goal of the present study was to assess whether in vitro-differentiated N1E-115 cells supported by a collagen membrane would enhance rat sciatic nerve regeneration after a crush injury. To set up an appropriate experimental model for investigating the effects of neural cell transplantation, we have recently described the sequence of functional and morphologic changes occurring after a standardized sciatic nerve crush injury with a nonserrated clamp. Functional recovery was evaluated using the sciatic functional index, the static sciatic index, the extensor postural thrust (EPT), the withdrawal reflex latency, and ankle kinematics. In addition, histomorphometric analysis was carried out on regenerated nerve fibers by means of the 2D-disector method. Based on the results of the EPT and of some of the ankle locomotor kinematic parameters analyzed, the hypothesis that N1E-115 cells may enhance nerve regeneration is partially supported although histomorphometry disclosed no significant difference in nerve fiber regeneration between the different experimental groups. Therefore, results suggest that enrichment of equine type III collagen membrane with the N1E-115 cellular system in the rat sciatic nerve crush model may support recovery, at least in terms of motor function. The discrepancy between functional and morphological results also suggests that the combined use of functional and morphological analysis should be recommended for an overall assessment of recovery in nerve regeneration studies. © 2008 Wiley-Liss, Inc. Microsurgery 00:000–000, 2008.

Although sciatic nerve injuries themselves are rare in humans, the experimental model based on the induction of a crush injury (axonotmesis) in the rat sciatic nerve provides a very realistic testing bench for lesions involving plurifascicular mixed nerves with axons of different size and type competing to reach and reinnervate distal targets.[1,2] Axonotmesis, or nerve crush, is a common type of experimentally induced injury that causes axonal interruption but preserves the connective sheaths. Following axonotmesis, nerve regenerates relatively fast and functional recovery is usually achieved.[3,4] Nerve regeneration is usually successful after this type of injury and, after a short (1–2 days) latency to cross the injury site, axons regenerate at a steady rate along the distal nerve helped by the reactive Schwann cells and the preserved endoneurial tubules which enhance axonal elongation and facilitate adequate target reinnervation.[5] This type of injury is thus appropriate to investigate the cellular and molecular mechanisms of peripheral nerve regeneration and to assess the role of different factors in the regeneration process.[6]

The role of neurotrophic factors in neural regeneration has been the focus of extensive research.[7–9] The influence of these factors in neural development, survival, outgrowth, and branching has been explored on various levels, from the molecular level to the macroscopic tissue responses. Neurotrophic factors promote a variety of neural responses, like the survival and outgrowth of the motor and sensory nerve fibers, and are implicated in spinal cord and peripheral nerve regeneration.[7,10–12] However, in vivo, the efficacy of neurotrophic factors in promoting nerve regeneration might vary greatly due to the method used for their delivering. Therefore, it is important to develop methods that permit the application of the neurotrophic factors near the regenerating site. Such methods would then permit to investigate the role of growth factors on nerve regeneration from injury. For that reason, N1E-115 cell line established from a mouse neuroblastoma,[13] might be a useful cellular system to locally produce and deliver these neurotrophic factors.[14,15] In vitro, the N1E-115 cells undergo neuronal differentiation in response to dimethylsulfoxide (DMSO), adenosine 3′, 5′-cyclic monophosphate (cAMP), or serum withdrawal.[16–20] Upon induction of differentiation, proli-

[1]Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Rua P. Armando Quintas, Vairão, Portugal
[2]Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Largo Prof. Abel Salazar 2, Porto, Portugal
[3]Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, Ospedale San Luigi, Regione Gonzole 10, Orbassano (TO), Torino, Italy
[4]Faculdade de Motricidade Humana (FMH), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Estrada da Costa, Cruz Quebrada, Dafundo, Portugal
[5]Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Avenida da Universidade Técnica, Lisboa, Portugal
[6]Departamento de Ciências Veterinárias, CITAB, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Apartado 1013, Vila Real, Portugal
Grant sponsors: Italian Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (PRIN, FIRB), Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata), Operational Programme for Science and Innovation 2010 (Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education).
AQ3
A.L. Luís, J.M. Rodrigues, and A.C. Mauricio contributed equally to this work.
AQ4
*Correspondence to: Stefano Geuna M.D., Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, Ospedale San Luigi, Regione Gonzole 10, Orbassano (TO), 10043 Italy. E-mail: stefano.geuna@unito.it
Received 11 February 2008; Revised 28 March 2008; Accepted 3 April 2008
Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/micr.20524

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 2

feration of N1E-115 cells ceases, extensive neurite outgrowth is observed and the membranes become highly excitable.[15–18] The ideal interval period of 48 hours of differentiation was determined by measurement of the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), when the N1E-115 cells presented already the morphological characteristics of neuronal cells but at a time, cell death due to increased $[Ca^{2+}]_i$ was not still occurring.[14,15]

In a recent study, we have found that enrichment of a PLGA nerve scaffold with N1E-115 cells exerts negative effects on nerve fiber regeneration.[21] Since we hypothesized that the transplanted cells could have represented an impeding material inside the conduit which hindered the positive effect of local neurotrophic factor release, the purpose of the present study was to ascertain whether transplantation of in vitro predifferentiated N1E-115 cells supported by an equine type III collagen membrane wrapped around the site of a nerve crush injury might positively affect nerve regeneration. In this experimental setting, transplanted cells will be able to secrete neurotrophic factors in the site of injury without being directly in contact with regenerating axons. The utilization of N1E-115 cells is warranted since they are relatively inexpensive and they easily develop in culture (properties of typical lineage cells).

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures

N1E-115 cells are clones of cells derived from the mouse neuroblastoma C-1300.[13] These cells retain numerous biochemical, physiological, and morphological properties of differentiated neuronal cells in culture.[22] N1E-115 neuronal cells were cultured in Petri dishes (around 2×10^6 cells) on square 25-mm-side and 3 mm of thickness equine collagen type III membranes (GentaFleece®, Baxter, Nuremberg, Germany) at 37°C, 5% CO_2 in an humidified atmosphere with 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin (Gibco) (see Fig. 1). The cell count required was carried out in the Neubauer chamber. The culture medium was changed every 48 hours and the Petri dishes were observed daily in an inverted microscope (Zeiss, Germany). The cells were passed or were supplied with differentiation medium containing 1.5% of DMSO once they reached ~80% confluence, mostly 48 hours after plating (and before the rats' surgery). The differentiation medium was composed of 96% DMEM supplemented with 2.5% of FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 1.5% of DMSO.[14,15]

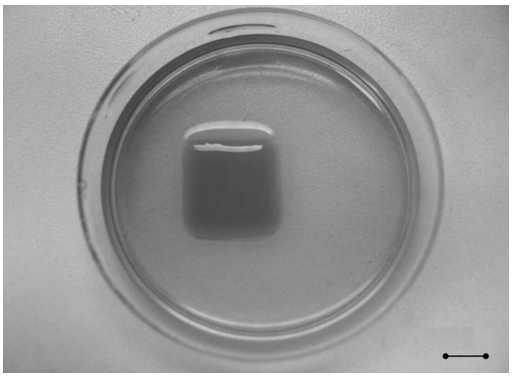


Figure 1. N1E-115 neuronal cells were cultured in Petri dishes (around 2×10^6 cells) on an equine type III collagen membranes (GentaFleece®, Baxter, Nuremberg, Germany). The inserted bar corresponds to 1 cm.

Animals and Surgery Procedures

Six adult male Sasco Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing ~300 g were used in each experimental group. Two animals were housed per cage (Makrolon type 4, Tecniplast, VA, Italy), in a temperature and humidity controlled room with 12–12 hour light/dark cycles, and were allowed normal cage activities under standard laboratory conditions. The animals were fed with standard chow and water ad libitum. Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort taking into account human endpoints for animal suffering and distress. Animals were housed for 2 weeks before entering the experiment. All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of Portugal, and in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Crush injury was carried out with the animals ($n = 6$, in each experimental group) placed prone under sterile conditions and the skin from the clipped lateral right thigh scrubbed in a routine fashion with antiseptic solution. Under deep anesthesia (ketamine 9 mg/100 g; xylazine 1.25 mg/100 g, atropine 0.025 mg/100 body weight, intramuscular—IM), the right sciatic nerve was exposed through a skin incision extending from the greater trochanter to the mid-thigh followed by a muscle splitting incision. After nerve mobilization, a nonserrated clamp (manufactured by the Institute of Industrial Electronic and Material Sciences, University of Technology, Vienna, Austria) exerting a constant force of 54 N, was used for a period of 30 seconds to create a 3-mm long crush injury, 10 mm above the bifurcation into tibial and common peroneal nerves.[3,4,23] The starting diameter of the sciatic nerve was about 1 mm, flattening during the crush to 2 mm, thus giving a final pressure of $P = 9$ MPa. The nerves were kept moist with 37°C sterile saline solution throughout the surgical intervention. Three experimental groups were studied: in group 1 (Crush), the axonotmesis was performed without any additional procedure, in group 2 (CrMemb) the crushed nerve was involved with an equine

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 3

type III collagen membrane, and in group 3 (CrMembCell), the crush injury was involved with the equine collagen type III membrane covered with a monolayer of N1E-115 cells differentiated in vitro for 48 hours in the presence of 1.5% DMSO. There is no need to perform any suture to promote the collagen membrane fixation since these membranes present the capacity to stick around the nerve during the enwrapment. The muscle and skin were then closed with 4/0 resorbable sutures. The surgical procedure was performed with the aid of an M-650 operating microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). To prevent autotomy, a deterrent substance was applied to rats' right foot.[24,25] The animals were intensively examined for signs of autotomy and contracture and none presented severe wounds (absence of a part of the foot or severe infection) or contractures during the study. An additional group of six animals were left uncrushed and used as controls for the morphological and histomorphometrical analysis.

Functional Assessment of Reinnervation

Motor performance and nociceptive function. Motor performance and nociceptive function were evaluated by measuring extensor postural thrust (EPT) and withdrawal reflex latency (WRL), respectively, as previously thoroughly described.[4,26] Briefly, the animals were tested preoperatively (week-0), and every week during the 12-week follow-up time. The animals were gently handled, and tested in a quiet environment to minimize stress levels. The EPT was originally proposed by Thalhammer and collaborators[27] as a part of the neurological recovery evaluation in the rat after sciatic nerve injury. For this test, the entire body of the rat, except the hind limbs, was wrapped in a surgical towel and supported by the thorax. The affected hind limb was then lowered toward the platform of a digital balance (model PLS 510-3, Kern & Sohn GmbH, Kern, Germany) to elicit the EPT. As the animal is lowered to the platform, it extends the hind limb, anticipating the contact made by the distal metatarsus and digits. The force in grams (g) applied to the digital platform balance was recorded (digital scale range 0–500 g). The same procedure was applied to the contra-lateral, unaffected limb. The affected and normal limbs were tested three times, with an interval of 2 minutes between consecutive tests, and the three values were averaged to obtain a final result. The normal (unaffected limb) EPT (NEPT) and experimental EPT (EEPT) values were incorporated into an equation (eq. 1) to derive the motor deficit, as described in the literature[28]:

$$\text{Motor deficit} = [(\text{NEPT} - \text{EEPT})/\text{NEPT}] \qquad (1)$$

The nociceptive withdrawal reflex (WRL) was adapted from the hotplate test as described by Masters and collaborators[29] and was previously detailed.[4,26] The rat was wrapped in a surgical towel above its waist and then positioned to stand with the affected hind paw on a hotplate at 56°C (model 35-D; IITC Life Science Instruments, Woodland Hill, CA). WRL is defined as the time elapsed from the onset of hotplate contact to withdrawal of the hind paw and measured with a stopwatch. Normal rats withdraw their paws from the hotplate within ~4 seconds or less.[30] The affected limbs were tested three times, with an interval of 2 minutes between consecutive tests to prevent for sensitization, and the three latencies were averaged to obtain a final result.[31] The cut off time for heat stimulation was set at 12 seconds, to avoid skin damage to the foot.[3,32]

Sciatic functional index and static sciatic index. For sciatic functional index (SFI), animals were tested in a confined walkway measuring 42-cm-long and 8.2-cm-wide, with a dark shelter at the end. A white paper was placed on the floor of the rats' walking corridor. The hind paws of the rats were pressed down onto a finger paint-soaked sponge, and they were then allowed to walk down the corridor leaving its hind footprints on the paper. Often, several walks were required to obtain clear print marks of both feet. Prior to any surgical procedure, all rats were trained to walk in the corridor, and a baseline walking track was recorded. Subsequently, walking tracks were recorded at week-0 and, every week postoperatively, during the healing period of 12 weeks. Several measurements were taken from the footprints: i) distance from the heel to the third toe, the print length (PL); ii) distance from the first to the fifth toe, the toe spread (TS); and iii) distance from the second to the fourth toe, the intermediary toe spread (ITS). The static footprints were obtained at least during four occasional rest periods. In the static evaluation (SSI) only the parameters TS and ITS, were measured. For both dynamic (SFI) and static assessment (SSI), all measurements were taken from the experimental (E) and normal sides (N). Prints for measurements were chosen at the time of walking based on clarity and completeness at a point when the rat was walking briskly. The mean distances of three measurements were used to calculate the following factors (dynamic and static):

$$\text{Toe spread factor (TSF)} = (\text{ETS} - \text{NTS})/\text{NTS}$$

$$\text{Intermediate toe spread factor (ITSF)} = (\text{EITS} - \text{NITS})/\text{NITS}$$

$$\text{Print length factor (PLF)} = (\text{EPL} - \text{NPL})/\text{NPL}$$

where the capital letters E and N indicate injured and noninjured side, respectively.

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 4

The SFI was calculated as described by Bain et al.[33] according to the following equation:

$$\begin{aligned} \mathrm{SFI} &= -38.3\,(\mathrm{EPL}-\mathrm{NPL})/\mathrm{NPL} + 109.5(\mathrm{ETS} \\ &\quad -\mathrm{NTS})/\mathrm{NTS} + 13.3(\mathrm{EIT}-\mathrm{NIT})/\mathrm{NIT} - 8.8 \\ &= (-38.3 \times \mathrm{PLF}) + (109.5 \times \mathrm{TSF}) \\ &\quad + (13.3 \times \mathrm{ITSF}) - 8.8 \end{aligned} \quad (2)$$

The SSI was calculated from footprints obtained statically and does not take account of the print length factor (PL).[34] The SSI values were calculated according to the equation:

$$\mathrm{SSI} = [(108.44 \times \mathrm{TSF}) + (31.85 \times \mathrm{ITSF})] - 5.49 \quad (3)$$

For both SFI and SSI, an index score of 0 is considered normal and an index of −100 indicates total impairment. When no footprints were measurable, the index score of −100 was given.[35,36] Reproducible walking tracks could be measured from all rats. In each walking track three footprints were analyzed by a single observer, and the average of the measurements was used in SFI calculations.

Kinematic analysis. Ankle kinematics and stance duration analysis were carried out prior nerve injury and every 2 weeks during the 12-week follow-up time. Animals walked on a Perspex track with length, width, and height of 120, 12, and 15 cm, respectively. To ensure locomotion in a straight direction, the width of the apparatus was adjusted to the size of the rats during the experiments, and a darkened cage was connected at the end of the corridor to attract the animals. The rats gait was video recorded at a rate of 100/120 images per second (JVC GR-DVL9800, New Jersey). The camera was positioned at the track's half length where gait velocity was steady, and 1 m distant from the track, thus obtaining a visualization field of 14-cm wide. Only walking trials with stance phases lasting between 150 and 400 ms were considered for analysis, since this corresponds to the normal walking velocity of the rat (20–60 cm/second).[37,38] The video images were stored in a computer hard disk for latter analysis using an appropriate software APAS® (Ariel Performance Analysis System, Ariel Dynamics, San Diego). 2D biomechanical analysis (sagittal plan) was carried out applying a two-segment model of the ankle joint, adopted from the model firstly developed by Varejão and collaborators.[4,39–41] Skin landmarks were tattooed at points in the proximal edge of the tibia, in the lateral malleolus and, in the fifth metatarsal head. The rats' ankle angle was determined using the scalar product between a vector representing the foot and a vector representing the lower leg. Four steps were analyzed per rat.[4] With this model, positive and negative values of position of the ankle joint (θ°) indicate dorsiflexion and plantarflexion, respectively. For each stance phase the following time points were identified: initial contact (IC), opposite toe-off (OT), heel-rise (HR), and toe-off (TO)[4,39–41] and were time normalized for 100% of the stance phase. The normalized temporal parameters were averaged over all recorded trials. Angular velocity of the ankle joint ($\Omega\ ^\circ$/second) was also determined where $\Omega < 0^\circ$/second corresponds to dorsiflexion.

Design-Based Quantitative Morphology

For morphological and histomorphometrical analysis, a 10-mm-long segment of the sciatic nerve distal to the site of lesion was removed, fixed, and prepared for histomorphometry of myelinated nerve fibers. A 10-mm segment of uninjured sciatic nerve was also withdrawn from the six control animals. Sciatic nerve segments were immersed immediately in a fixation solution, containing 2.5% purified glutaraldehyde and 0.5% saccarose in 0.1*M* Sorensen phosphate buffer for 6–8 hours. Specimens were then washed in a solution containing 1.5% saccarose in 0.1*M* Sorensen phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Glauerts' embedding mixture of resins consisting in equal parts of Araldite M and the Araldite Härter, HY 964 (Merck, Darmstad, Germany), to which was added 1–2% of the accelerator 964, DY 064 (Merck, Darmstad, Germany). The plasticizer dibutyl phthalate was added in a quantity of 0.5%. Series of 2-μm thick semithin transverse sections were cut using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained by Toluidine blue for 2–3 minutes for high resolution light microscopy examination. In each nerve, histomorphometry was conducted using a DM4000B microscope equipped with a DFC320 digital camera and an IM50 image manager system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). This system reproduced microscopic images (obtained through a 100× oil-immersion objective) on the computer monitor at a magnification adjusted by a digital zoom. The final magnification was 6,600× enabling accurate identification and morphometry analysis of myelinated nerve fibers. One semithin section from each nerve was randomly selected and used for the morphoquantitative analysis. The total cross-sectional area of the nerve was measured and sampling fields were then randomly selected using a protocol previously described.[42–44] Possible "edge effects" were compensated by employing a two-dimensional dissector procedure which is based on sampling the "tops" of fibers.[42,45] Mean fiber density was calculated by dividing the total number of nerve fibers within the sampling field by its area (N/mm^2). Total fibers number (N) was then estimated by multiplying the mean fiber density by the total cross-sectional area of the whole nerve cross section

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 5

assuming a uniform distribution of nerve fibers across the entire section.

Two-dimensional disector probes were also used for the unbiased selection of a representative sample of myelinated nerve fibers for histomorphometry. Both fiber and axon area were measured and the circle-fitting diameter of fiber (D) and axon (d) were calculated. From these data, myelin thickness [$(D - d)/2$] was calculated.

The precision of estimates was evaluated by calculating the coefficient of error (CE). Regarding quantitative estimates of fiber number, the CE(n) was obtained as follows[46]:

$$\mathrm{CE}(n) = \frac{1}{\sqrt{\Sigma Q'}}$$

where $\Sigma Q'$ is the number of counted fibers in all dissectors.

For size estimates, the coefficient of error was estimated as follows[43]:

$$\mathrm{CE}(z) = \frac{\mathrm{SEM}}{\mathrm{Mean}}$$

where SEM = standard error of the mean.

The sampling scheme was designed to keep the CE below 0.10, which assures enough accuracy for neuromorphological studies.[47]

Statistics

Two-way mixed factorial ANOVA was used to test for the effect of time (within subjects effect; 12 time points) and experimental group (between subjects effect, three groups). The sphericity assumption was evaluated by the Mauchly's test and whenever this test was not computed or sphericity could not be assured, the degrees of freedom were corrected by using the more conservative Greenhouse-Geiser's epsilon. In the cases two-way ANOVA revealed the existence of a significant main effect of time (within subjects factor), simple planned contrasts (General Linear Model, simple contrasts) were then employed to compare pooled data across the three experimental groups along the recovery period to data obtained precrush. If two-way mixed factorial ANOVA analysis identified a significant effect of experimental group (between subjects factor), the post-hoc of the HSD Tukey's test was applied for paired comparisons. Kinematic analysis at precrush week was performed only on group 1 (Crush). Therefore, the kinematic data of this group were first analyzed separately by one-way ANOVA for repeated measures (within subjects effect, seven time points) with differences between pooled data on each week of recovery and data at baseline tested by simple planned contrasts. Thereafter, two-way mixed factorial ANOVA was carried out as described above now including all groups although considering only data from the 12-week recovery period (within subjects factor, six time points; between subjects factor, three groups). The effect of the collagen membrane in isolation or associated to N1E-115 in vitro differentiated cells was then evaluated through two-way mixed factorial ANOVA using post-crush data only. For histomorphometry, statistical comparisons of quantitative data were subjected to one-way ANOVA test. Statistical significance was established as $P < 0.05$. All statistical procedures were performed by using the statistical package SPSS (version 14.0, SPSS) except histomorphometry data that was analyzed using the software "*Statistica per Discipline Bio-mediche*" (McGraw-Hill, Milan, Italy). All data in this study is presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

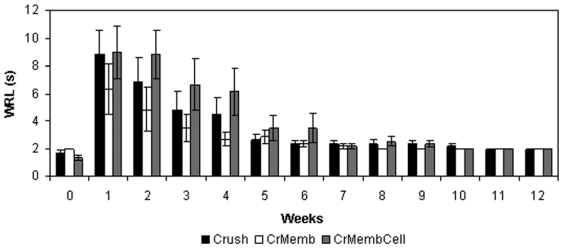


Figure 2. Withdrawal reflex latency (WRL) performed preoperatively (week-0), and every week after the surgical procedure until week-12, when the animals were sacrificed. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within the experimental group. (■) Crush; (□) CrMemb; and (▩) CrMembCell.

RESULTS

Immediately after the acute compression injury (9 MPa of nominal pressure), the crushed areas of all sciatic nerves were flattened but nerve continuity was preserved. The sciatic nerve crush injury caused a severe right hind limb monoparesis. The affected animals walked with the paw knuckled over, with no flexion of the knee, and showed inability to flex and extend the ankle and digits. All rats survived, with no wound infection or automutilation.

Functional Assessment of Reinnervation

Withdrawal reflex latency. Values in seconds were obtained by performing the WRL test, preoperatively (week-0), and every week after the surgical procedure until week-12, when the animals were sacrificed for histomorphometry analysis (see Fig. 2). F2

Crush injury produced a severe deficit in nociception in all rats of the three experimental groups [$F_{(12,180)} = 22.968$; $P = 0.000$] (Table 1). Recovery of nociception occurred in the first 4 weeks, except for rat C1 in group 3 (CrMembCell). No differences in nociceptive deficit and nociceptive recovery were observed for the three experimental groups. T1

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 6

Table 1. Values of the Ankle Angular (θ) Position (°) for the Temporal Parameters Obtained by Kinematic Analysis in the Sagittal Plane, as it Moves Through the Stance Phase. AQ5

Temporal parameter	Group	Week 0 (°)	Week 2 (°)	Week 4 (°)	Week 6 (°)	Week 8 (°)	Week 10 (°)	Week 12 (°)
IC	1	−4.84 ± 2.99	−2.33 ± 1.44	−25.73 ± 6.70	−16.93 ± 5.95	−11.04 ± 3.81	−21.61 ± 4.32	−21.04 ± 3.84
	2		−0.13 ± 1.89	−13.82 ± 3.44	−20.93 ± 4.4	−18.08 ± 3.28	−5.75 ± 2.63	−9.05 ± 3.46
	3		0.42 ± 3.35	−13.28 ± 3.97	−6.89 ± 3.08	−9.30 ± 2.74	−10.43 ± 4.71	−3.60 ± 6.70
OT	1	25.65 ± 1.08	17.76 ± 2.90	7.63 ± 6.88	8.97 ± 6.47	13.93 ± 4.10	8.97 ± 5.32	10.92 ± 4.27
	2		33.17 ± 3.07	19.47 ± 5.89	16.52 ± 7.09	11.59 ± 3.44	17.42 ± 3.42	14.84 ± 3.80
	3		28.71 ± 4.37	17.60 ± 4.00	20.49 ± 2.62	15.11 ± 3.47	14.11 ± 5.33	17.94 ± 5.58
HR	1	30.67 ± 2.44	42.35 ± 2.33	25.00 ± 5.16	23.24 ± 4.50	21.21 ± 2.05	20.21 ± 5.33	23.23 ± 1.84
	2		50.25 ± 4.00	31.54 ± 3.20	30.09 ± 5.91	22.03 ± 2.36	25.03 ± 1.94	20.82 ± 0.95
	3		46.78 ± 3.63	30.24 ± 4.33	26.41 ± 2.81	26.19 ± 1.97	20.68 ± 3.77	26.76 ± 4.21
TO	1	−12.27 ± 7.01	47.62 ± 0.38	−2.29 ± 4.85	−5.14 ± 0.81	−11.08 ± 4.05	−3.41 ± 6.17	−3.04 ± 2.21
	2		48.01 ± 3.60	4.01 ± 6.00	−0.33 ± 4.30	−16.06 ± 3.58	−14.04 ± 3.11	−16.46 ± 2.35
	3		35.27 ± 2.66	−12.83 ± 5.41	−16.87 ± 4.18	−8.08 ± 1.40	−20.28 ± 3.32	−17.38 ± 5.60

Temporal parameters measured in terms of angular position: IC, initial contact; OT, opposite toe-off; HR, heel-rise; TO, toe-off. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within the experimental group. The kinematic analysis of week-0 was only performed in Crush group.

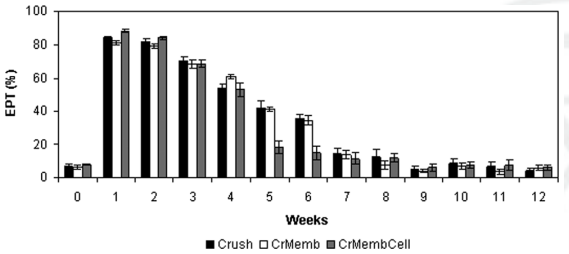


Figure 3. Values of motor deficit were obtained performing extensor postural thrust (EPT) test preoperatively (week-0), and every week after the surgical procedure until week-12, when the animals were sacrificed. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within the experimental group. (■) Crush; (□) CrMemb; and (▩) CrMembCell.

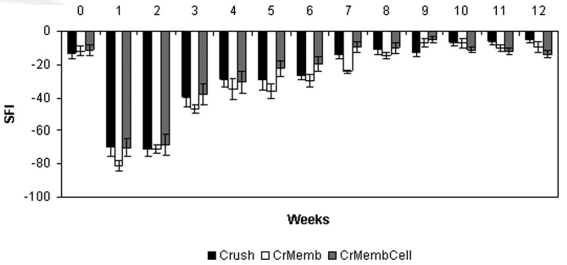


Figure 4. Sciatic Function Index (SFI) measured pre-operatively (week-0), and every week after the surgical procedure until week-12, when the animals were sacrificed. For SFI an index score of 0 is considered normal and an index of −100 indicates total impairment. The measurements of the print length (PL), the toe spread (TS), and the intermediary toe spread (ITS), were taken from the experimental (E) and normal (N) sides. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within the experimental group. (■) Crush; (□) CrMemb; and (▩) CrMembCell.

Motor deficit (EPT). Values of motor deficit, were obtained by performing the EPT test, preoperatively (week-0), and every week after the surgical procedure until week-12, when the animals were sacrificed for histomorphometry analysis (see Fig. 3). F3

Axonotmesis resulted in a severe loss of hind limb extension force as evaluated by the EPT and derived motor deficit [$F_{(12,180)} = 333.795$; $P = 0.000$] (see Fig. 3). The motor deficit remained significantly elevated above presurgery levels up to week-7 ($P < 0.05$) and then recovered to values similar to those observed at baseline. The ANOVA revealed the presence of significant differences between the experimental groups in the motor deficit throughout the duration of the study, with post-hoc comparisons demonstrating that group 3 (CrMembCell) differed significantly from the other two experimental groups in motor deficit ($P < 0.05$), suggesting that the presence of the N1E-115 cells in vitro differentiated, might have stimulated the recovery of motor function probably by accelerating axonal regeneration after crush injury.

Sciatic functional index and static sciatic index. After sciatic nerve crush, SFI revealed significant alterations in the normal foot placement during locomotion [$F_{(12,180)} = 116{,}377$; $P = 0.000$] (see Fig. 4). F4 Although in the week immediately after the sciatic nerve crush, SFI values were consistent with a high degree of functional impairment, normalization of this variable occurred relatively fast during recovery. Planned contrasts showed that SFI values were similar to baseline after week-6 considering all three groups ($P < 0.05$). Changes in SSI were similar to those observed for SFI, revealing significant impairment after axonal lesion [$F_{(12,180)} = 60.947$; $P = 0.000$] (see Fig. 5). The recovery of this F5

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 7

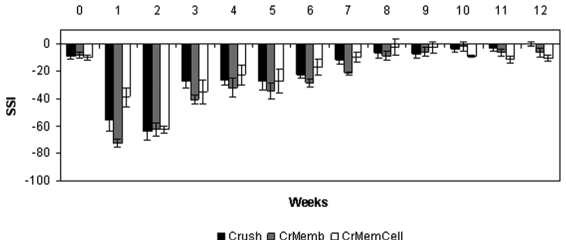


Figure 5. Static sciatic index (SSI) measured preoperatively (week-0), and every week after the surgical procedure until week-12, when the animals were sacrificed. For SSI, an index score of 0 is considered normal and an index of −100 indicates total impairment. The measurements of the toe spread (TS), and the intermediary toe spread (ITS), were taken from the experimental (E) and normal (N) sides. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within the experimental group. (■) Crush; (▩) CrMemb; and (□) CrMembCell.

variable occurred within 7 weeks after crush injury in all three groups ($P < 0.05$). No differences between the three experimental groups were observed for SFI or SSI results.

Kinematics analysis. Kinematics analysis was performed before the crush injury (week 0) and weekly every 2 weeks during the 12-weeks recovery period in group 1 (Crush), whereas in group 2 (CrMemb) and in group 3 (CrMembCell) video recordings of locomotion started only at week-2 during recovery.

Initial contact. The ankle's joint angle at IC changed significantly after sciatic nerve injury in group 1 (Crush) [$F_{(6,30)} = 5{,}661$; $P = 0.001$], however the effect of crush injury on this particular parameter started to be significantly different from values obtained precrush only at week-4 (Table 1, Fig. 6). No statistical differences in this kinematic variable existed between the three groups during the healing period of 12 weeks. In group 1 (Crush), a large increase in angular velocity at IC (negative values indicate displacement to dorsiflexion) was observed between week-2 and week-6 [$F_{(6,30)} = 13.230$; $P = 0.000$]. With respect to angular velocity of the ankle joint at IC and considering the whole of the 12-week recovery period, significant differences between the groups were observed, with post-hoc test indicating that the values of group 3 (CrMembCell) were different from those of the other two groups ($P < 0.05$) (Table 2, Fig. 7).

Opposite toe off. In group 1 (Crush), the position of the ankle joint at OT changed modestly, although significantly [$F_{(6,30)} = 2.573$; $P = 0.039$] between week-4 and -12 (Table 1, Fig. 6). In what accounts this variable, no differences existed between the three groups. Ankle joint velocity at OT in group 1 (Crush), during week-2 changed significantly from baseline only at week-2 ($P < 0.05$) and for the remaining of the recovery period it was comparable to precrush values (Table 2, Fig. 7). No differences between the three experimental groups were observed for the angular velocity of the ankle joint movement at OT.

Heel raise. At HR, ankle's joint angle was significantly affected by the sciatic nerve crush in group 1 (Crush) [$F_{(6,30)} = 5.369$; $P = 0.001$] along the 12 healing weeks (Table 1, Fig. 6). No differences were observed between the three groups in this variable. The ankle's velocity was also significantly altered as a result of the sciatic axonotmesis in group 1 (Crush) [$F_{(6,30)} = 8.309$; $P = 0.000$]. ANOVA revealed the existence of significant differences between the three groups with post-hoc test showing that group 1 (Crush) differed from the other two groups ($P < 0.05$; Table 2, Fig. 7).

Toe off. At TO, ankle's joint angle was significantly affected by the sciatic nerve crush [$F_{(6,30)} = 24.283$; $P = 0.000$; group 1 (Crush)] although planned contrasts showed that differences from precrush were only significant at week-2. ANOVA revealed the existence of significant differences between the three groups with post-hoc test showing that group 3 (CrMembCell) differed from the other two groups ($P < 0.05$; Table 1, Fig. 6). The velocity of the ankle joint at this instant of the stance phase was also significantly altered as a result of the sciatic axonotmesis in group 1 (Crush) [$F_{(6,30)} = 8.309$; $P = 0.000$]. ANOVA revealed the existence of significant differences between the three groups with post-hoc test showing that group 3 (CrMembCell) differed from the other two groups ($P < 0.05$; Table 2, Fig. 7).

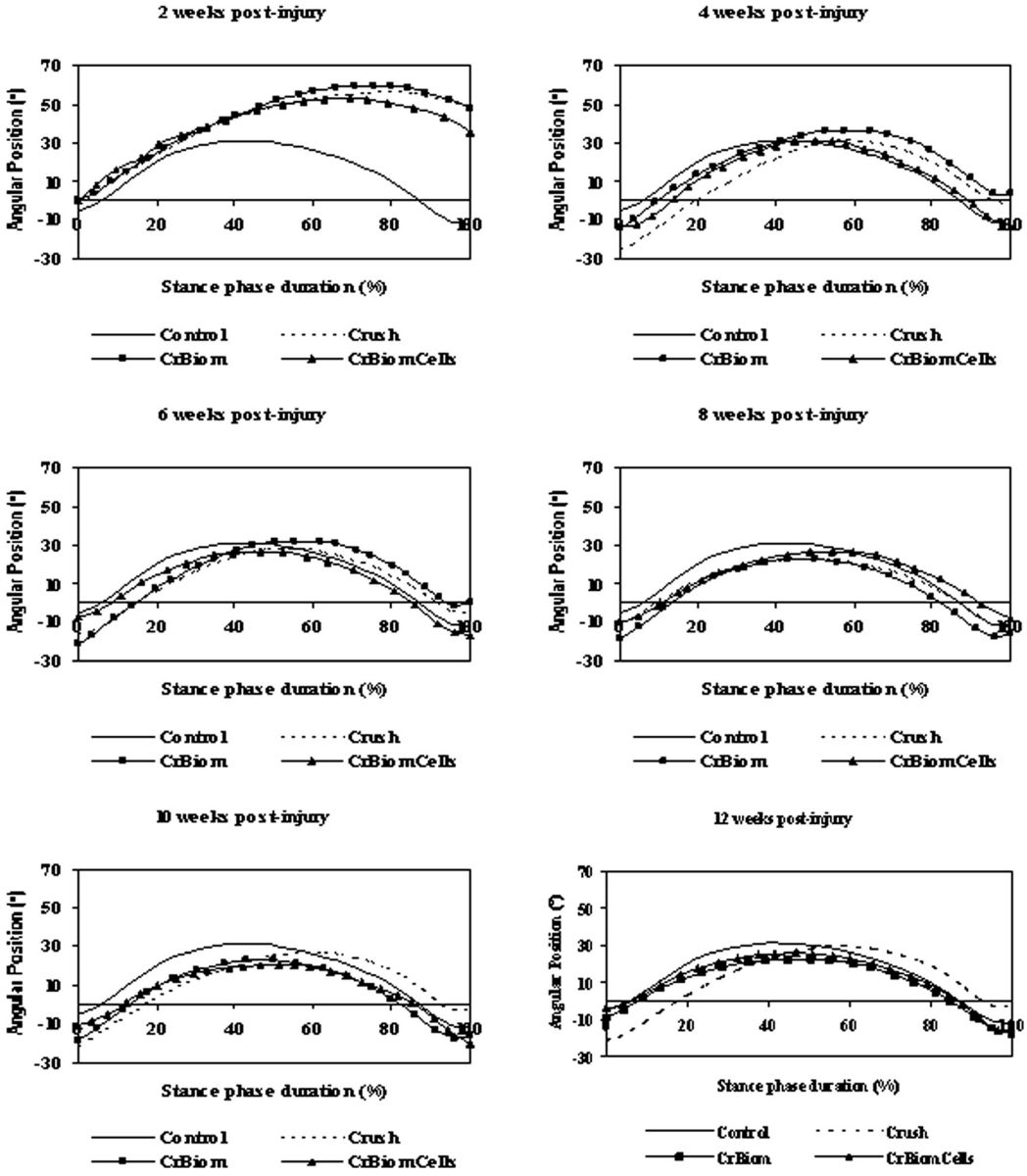
Peak velocity during dorsiflexion and plantarflexion. The peak velocity of dorsiflexion significantly decreased after the sciatic crush injury [$F_{(6,30)} = 5.195$; $P = 0.001$; group 1 (Crush)]. Nevertheless, the dorsiflexion peak velocity at week-2 was similar to preoperative value, decreasing from the later value during the following weeks of recovery. No differences were observed between the three groups in peak dorsiflexion velocity. The timing of peak dorsiflexion velocity remained unchanged after sciatic crush injury in group 1 (Crush) and between the three groups (see Fig. 7).

The peak velocity of plantarflexion significantly decreased after the sciatic crush injury [$F_{(6,30)} = 5.074$; $P = 0.001$; group 1 (Crush)]. This parameter averaged 601 ± 56°/second preoperatively, decreasing to 350 ± 16°/second at week-2 ($P < 0.05$). No differences were observed between the three groups in peak plantarflexion velocity. The timing of peak plantarflexion velocity also changed as a result of the crush injury [$F_{(6,30)} = 33.764$; $P = 0.000$; group 1 (Crush)]. In week-2, peak velocity occurred at the instant of TO, significantly later in the stance phase compared to the normal locomotor's pattern. The explanation for such deviation from the normal behavior is that it is caused by inability to generate a

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 8



ED1

Figure 6. Kinematics plots in the sagittal plane for the angular position (°) of the ankle as it moves through the stance phase, during the crush injury study. The mean of each group is plotted: ([—]) Control group; ([- - -]) Crush; (■) CrMemb; (▲) CrMembCell.

propulsive action by the injured hind limb as a result of the muscles loss of force. No differences were observed between the three groups in what concerns this parameter ($P < 0.05$).

The instant into the normalized duration of the stance phase when the ankle's movement reverses from dorsiflexion to plantarflexion (corresponding to $\Omega = 0°$/second) was also determined. This variable was significantly affected by crush injury [$F_{(6,30)} = 15.959$; $P = 0.000$; group 1 (Crush)]. Furthermore, it did not recovered to normal values during the 12-week healing period. The ankle position at the point of reversal from dorsiflexion to plantarflexion was also determined and statistical analysis showed that it changed significantly as the result of

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 9

Table 2. Values of the Ankle Angular (θ) Velocity (°/second) for the Temporal Parameters Obtained by Kinematic Analysis in the Sagittal Plane.

Temporal parameter	Group	Week 0 (°/second)	Week 2 (°/second)	Week 4 (°/second)	Week 6 (°/second)	Week 8 (°/second)	Week 10 (°/second)	Week 12 (°/second)
IC	1	−194.15 ± 44.35	−601.77 ± 58.05	−134.34 ± 63.11	−61.12 ± 28.81	−188.71 ± 36.52	−252.74 ± 65.72	−33.65 ± 51.11
	2		−326.37 ± 69.63	−280.94 ± 29.12	−260.28 ± 45.19	−286.93 ± 54.93	−226.57 ± 56.80	−266.45 ± 31.27
	3		−586.65 ± 71.34	139.05 ± 72.05	49.76 ± 37.16	24.05 ± 51.93	4.74 ± 48.01	49.07 ± 39.00
OT	1	−270.35 ± 19.65	−591.95 ± 82.28	−366.15 ± 45.76	−357.87 ± 53.82	−205.13 ± 59.15	−318.12 ± 51.34	−325.92 ± 55.03
	2		−344.77 ± 28.73	−316.93 ± 67.46	−331.16 ± 56.07	−355.98 ± 43.29	−319.18 ± 36.42	−238.78 ± 48.75
	3		−453.64 ± 64.59	−362.13 ± 38.98	−232.39 ± 36.71	−278.92 ± 70.42	−225.74 ± 52.39	−211.61 ± 39.12
HR	1	53.25 ± 40.58	−352.11 ± 25.10	−243.78 ± 67.05	−190.81 ± 56.61	−65.53 ± 51.73	−177.46 ± 54.01	−195.17 ± 52.36
	2		−247.43 ± 8.74	−187.42 ± 44.07	−164.35 ± 26.44	−46.48 ± 44.48	51.58 ± 50.13	−15.54 ± 43.48
	3		−264.58 ± 39.15	−137.57 ± 33.56	−13.67 ± 10.76	−87.22 ± 23.54	−9.85 ± 30.52	−50.33 ± 34.58
TO	1	−221.38 ± 91.28	349.70 ± 15.92	−93.33 ± 61.91	−210.37 ± 43.04	−284.15 ± 51.16	−287.30 ± 35.05	−299.22 ± 30.02
	2		297.33 ± 31.84	−342.56 ± 60.59	−389.86 ± 101.08	−382.82 ± 48.06	−216.85 ± 44.23	−157.94 ± 64.16
	3		414.19 ± 77.72	−120.13 ± 62.61	−168.61 ± 101.16	−48.37 ± 114.65	98.92 ± 65.93	−106.90 ± 73.96

Temporal parameters measured in terms of angular velocity: IC, initial contact; OT, opposite toe-off; HR, heel-rise; TO, toe-off. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within the experimental group. The kinematic analysis of week-0 was only performed in Crush group.

sciatic nerve crush [$F_{(6,30)} = 12.411$; $P = 0.000$; group 1 (Crush)]. Planned contrasts revealed that the differences to precrush were significant at week-2 and -8. Looking to the mean values it is possible to appreciate that at week-2 initiation of plantarflexion occurs later during stance and at greater dorsiflexion of the ankle joint. In contrast, at week-8 the degree of dorsiflexion at reversal of the ankle movement to plantarflexion is diminished. This pattern of changes in the position of the ankle joint at the point of reversal of its movement was similar in the three groups ($P < 0.05$).

Morphological and Histomorphometrical Analysis

Figure 8 depicts the morphology of nerve fibers distally to the injury site at week-12 postcrush. High resolution optical imaging revealed that the nerve structure was very similar in all three experimental groups. Histomorphometrical analysis (Table 3) showed no statistically significant difference ($P > 0.05$) between the three regenerated nerve groups in density, number, axon and fiber diameter, and myelin thickness of nerve fibers. By contrast, statistical comparison between regenerated and normal nerves (group 4) revealed a significant difference ($P < 0.05$) for all parameters.

F8

T3

DISCUSSION

The sought for new effective strategies for improving post-traumatic recovery is one of the key challenges in peripheral nerve reconstruction.[7–9,48] The main goal of the present study was to assess whether N1E-115 in vitro differentiated cells supported by an equine type III collagen membrane would enhance sciatic nerve regeneration after a crush injury.[3,4,49] Results of the EPT and of some of the kinematic data regarding the ankle joint action during the stance phase of the rat's locomotion partially support this hypothesis.

After axonotmesis, the nerve regenerates spontaneously through the distal stump and functional recovery usually occurs within 8 to 12 weeks.[3,4,49,50] Although all studies showed that nerve fibers regenerate after experimental axonotmesis, there are considerable differences in the extent and rate of recovery between studies probably reflecting the particular techniques used to induce the injury.[3,4,32,50,51] In fact, some nerve fibers might undergo only a temporary functional impairment (type I lesion according to Sunderland) and the following recovery might not reflect a true axonal regeneration. To avoid this limitation, this study used a standardized clamping procedure explained in detail in previous works.[3,4]

The EPT measures the force mainly generated by the gastrocnemius-soleus muscles and is similar to the peak vertical force parameter obtained by the study of the ground reaction forces during locomotion.[37,52] In accord-

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 10

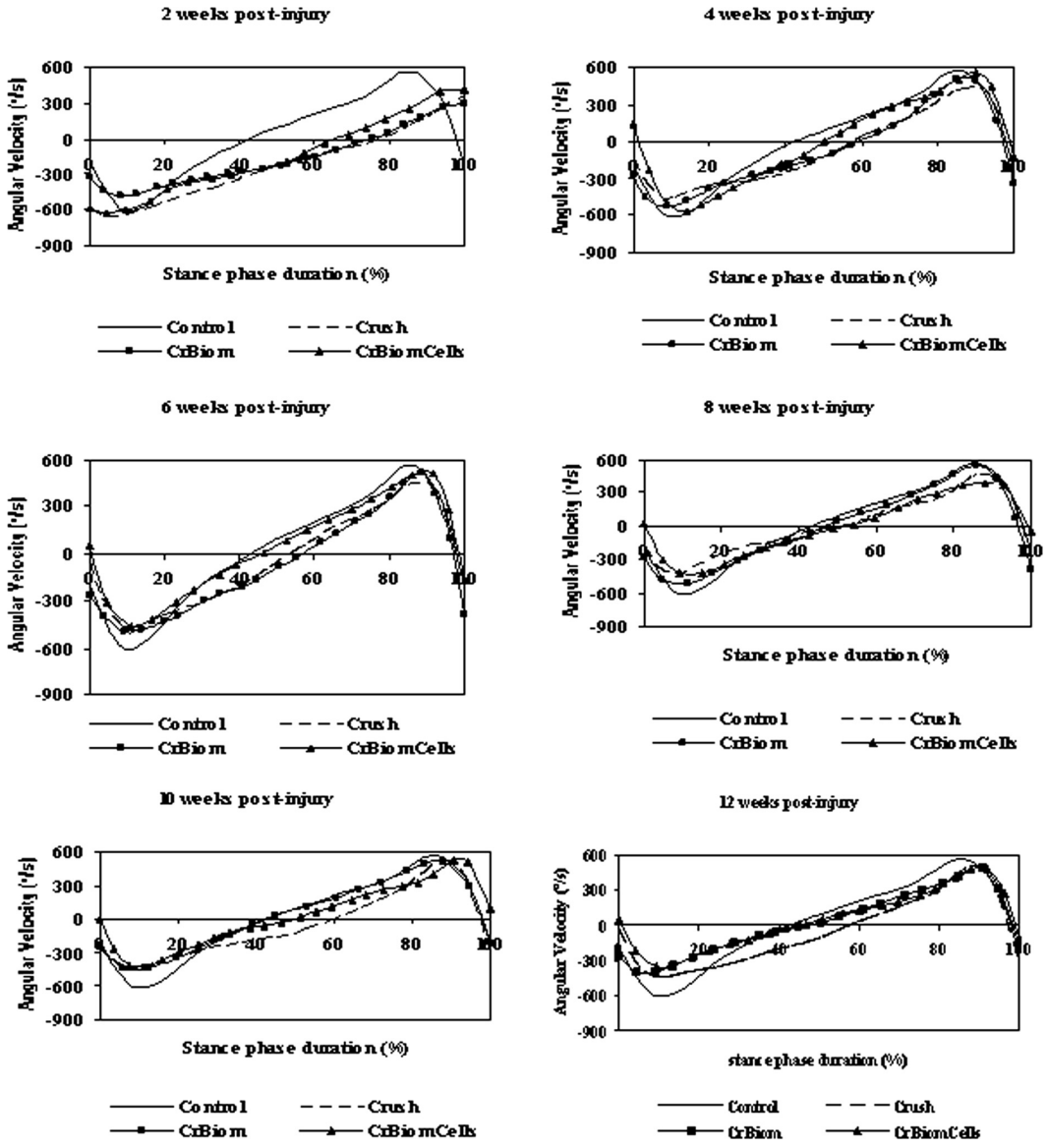


Figure 7. Kinematics plots in the sagittal plane for the angular velocity (°/second) of the ankle as it moves through the stance phase. The mean of each group is plotted: ([—]) Control group; ([- - -]) Crush; (■) CrMemb; (▲) CrMembCell.

ance to another study previously published by our group,[4] the EPT was fully restored at the end of 12 weeks, suggesting that the affected skeletal muscles were successfully reinnervated. Although the extent of recovery in EPT performance after the 12 weeks was similar in the three groups, the rate of recovery was faster in the experimental group where N1E-115 cells were applied together with the type III equine collagen membrane. Some of the parameters used to assess changes in the normal pattern of the kinematics of the ankle joint in the sagittal plane during the stance phase of locomotion also suggest that N1E-115 cells might have accelerated axonal growth. The main advantage in the use of the EPT and kinematics in research of nerve regeneration is the possibility of assessing the time course of functional recovery. In this sense, it is possible to evaluate not just the extent of recovery at the end of the established recovery time, but also the dynamics of this recovery. The fact that EPT in

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 11

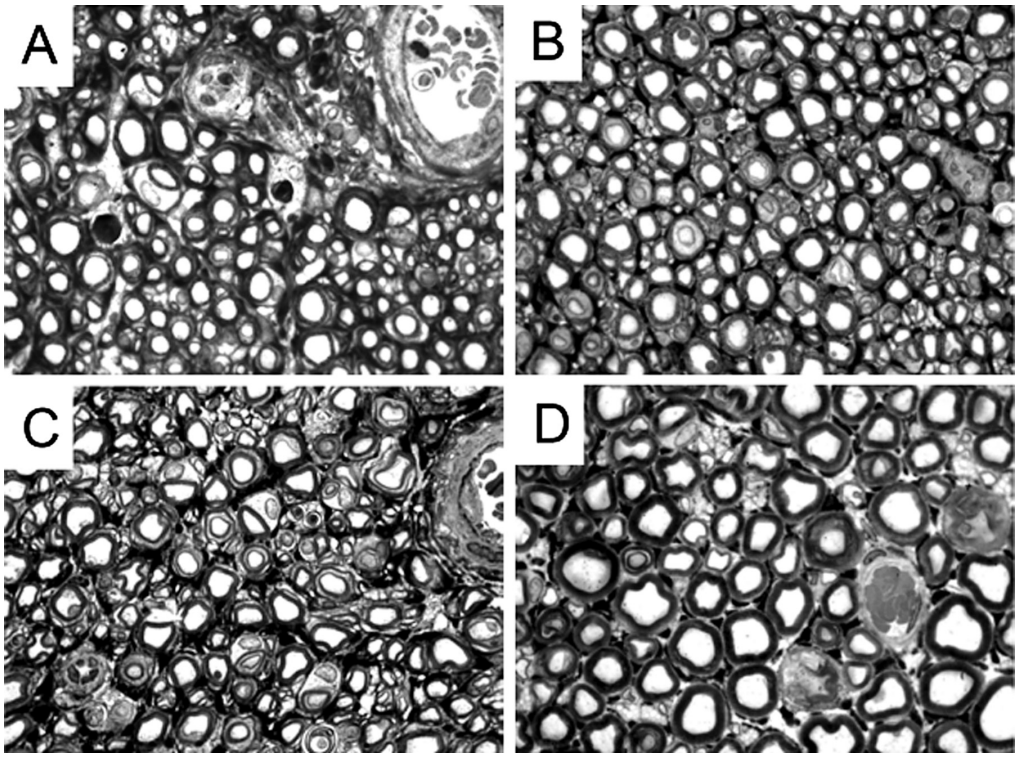


*Figure 8. High resolution photomicrographs of nerve fibers from regenerated (**A–C**) and normal (**D**) rat sciatic nerves. A: Crush; B: CrMemb; C: CrMembCell. Magnification = ×1,200.*

Table 3. Histomorphometrical Assessment of Normal and Regenerated Sciatic Nerves Submitted to a Standardized Sciatic Nerve Crush Injury with Nonserrated Clamp (week-12 posttraumatic).

	Density (N/mm^2)	Number (*N*)	Fiber diameter (*D*)	Axon diameter (*d*)	Myelin thickness $(D - d)/2$
Crush	20,109 ± 1,232	10,644 ± 423	4.99 ± 0.19	3.48 ± 0.10	0.76 ± 0.12
CrMembr	19,005 ± 3,004	10,450 ± 1,677	5.14 ± 0.46	3.77 ± 0.25	0.68 ± 0.22
CrmembrCell	19,635 ± 2,122	10,014 ± 1,032	5.12 ± 0.52	3.81 ± 0.33	0.66 ± 0.12
Normal	15,905 ± 287	7,666 ± 190	6.66 ± 0.12	4.26 ± 0.07	1.19 ± 0.03

Results are presented as mean ± standard deviation. Group 1 (Crush); group 2 (CrMembr); group 3 (CrMembrCell); Group 4 (normal sciatic nerves).

CrMembCell group along the 12-week healing period was significantly different from the remaining groups suggests that the N1E-115 cells somehow influenced the rate of functional recovery.

In the normal rat, the ankle joint at IC is slightly plantarflexed but it then dorsiflexes as an immediate response to weight support. Early in this phase of the gait cycle the ankle joint moves from plantarflexion to dorsiflexion and it is also around this instant that angular velocity into dorsiflexion reaches peak levels (see Fig. 7). This normal loading response at early stance is lost in the 2 weeks following sciatic crush, a time in which the ankle joint "collapses" into dorsiflexion due to the inability to oppose the body weight. In the following weeks the normal loading response during early stance is regained. This recovery however seemed to have occurred faster when the N1E-115 cells and the type III equine collagen membrane were wrapped around the crushed nerve, an observation that is compatible with the EPT data.

Walking track analysis is a widely accepted technique for functional evaluation after sciatic nerve repair in rats, but it is labor-intensive. In 2000, Bervar described a time-saving static footprint analysis. In that study there were good correlations between the traditional sciatic function index (SFI) and the newly developed static sci-

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:17 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 12

atic index (SSI). SSI results were similar to those observed for SFI. These measurements revealed that all groups, independently from the surgical nerve reconstruction, recovered within 7 weeks after the crush injury, according to previous studies published by our group.[3,4] Differences between the experimental groups were not evident what concerns SSI and SFI. These results also confirm that the use of multiple (morphological and functional) methods of analysis is recommended for an optimal assessment of nerve regeneration and functional recovery in experimental models.

Various reasons can make N1E-115 cells good candidate enhancers of nerve regeneration. These cells derived from mouse neuroblastoma C-1300, undergo in vitro neuronal differentiation in response to DMSO loosing its potential to proliferate.[14,15,53] Neuronal differentiation of these cells is accompanied by synthesis and delivery a number of neurotrophic factors that might be useful in promoting axonal elongation.[14,15] Neurotrophic factors play critical roles in neuronal survival after peripheral axon injury.[11,12] Moreover, neurotrophic factors also play important roles in regulating Schwann cell differentiation and axon remyelination.[9] As a mean to increase local concentrations of neurotrophic factors, the N1E-115 cells have two possible additional advantages: i) the levels of neurotrophic factors are probably closer to the endogenous cell production concentrations, ii) the neurotrophic factors are released in the vicinity of the area regenerating from the injury. These advantages are hardly met when neurotrophic factors are administrated through more conventional ways. The neurotrophic factors production under these experimental conditions are obviously speculative and need further studies.

Results of the present study confirm the hypothesis that the impeding presence of transplanted N1E-115 cells inside PLGA nerve scaffolds could have hindered the positive effect of local neurotrophic factor release leading a negative outcome on nerve regeneration.[21] Yet, equine type III collagen membrane wrapping around the site of a nerve lesion injury appears to be an effective system for local positioning of transplanted cells enabling them to secrete neurotrophic factors in the site of injury without directly being in contact with regenerating axons.

Despite the enhancing potential of the N1E-115 cells on functional recovery, histomorphometrical assessment of nerve fiber regeneration at the end of the 12 weeks of recovery did not show significant differences between the three nerve-crushed groups, in contrast to the hypothesis that in the long term, N1E-115 cells applied to the injured nerve have a positive regenerative effect in morphological terms too. However, histomorphometry was assessed at the single time point (week-12) and it cannot be excluded that N1E-115 cells may have exerted an effect on early phases of regeneration only and that these effects cannot be detectable anymore at a morphological level at the end-point of the experiment.

In conclusion, the transplantation of N1E-115 around the crushed sciatic nerves seemed to have a modest beneficial effect on functional recovery and without an evident effect on the number, density, and size of regenerated nerve fibers. Yet, N1E-115 cells are not a potential candidate therapeutic agent for treatment of nerve injury in patients due to their neoplastic nature. Their utilization is thus limited to research purposes, mainly as a basic scientific step in the investigation of the potentiality for nerve regeneration promotion of cells transplantation delivery systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to gratefully acknowledge the valuable support by Dr. José Manuel Correia Costa, from Laboratório de Parasitologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSRJ), Porto, Portugal.

REFERENCES

1. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of the nerve regeneration in the rat. Plast Reconstruct Surg 1985;75: 384–388.
2. Rodriguez FJ, Valero-Cabre A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. Drug Discov Today Dis Model 2004;1:177–185.
3. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. J Neurotrauma 2004;21:1652–1670.
4. Luis AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, Simoes MJ, Santos JD, Fregnan F, Raimondo S, Veloso AP, Ferreira AJ, Armada-da-Silva PA, Varejao AS, Mauricio AC. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. J Neurosci Methods 2007;163:92–104.
5. Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. J Neurotrauma 2004;21:95–108.
6. Udina E, Voda J, Gold BG, Navarro X. Comparative dose-dependence study of FK506 on transected mouse sciatic nerve repaired by allograft or xenograft. J Peripher Nerv Syst 2003;8:145–154.
7. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. Annu Rev Biomed Eng 2003;5:293–347.
8. Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GR. Tissue engineered nerve constructs: Where do we stand? J Cell Mol Med 2006;10:309–317.
9. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. Annu Rev Neurosci 2007;30:209–233.
10. Longo FM, Hayman EG, Davis GE, Ruoslahti E, Engvall E, Manthorpe M, Varon S. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. Brain Res 1984;309:105–117.
11. Miyata Y, Kashihara Y, Homma S, Kuno M. Effects of nerve growth factor on the survival and synaptic function of Ia sensory neurons axotomized in neonatal rats. J Neurosci 1986;6:2012–2018.
12. Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. Nature 1992;360:753–755.
13. Amano T, Richelson E, Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:18 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

J_ID: CRO Customer A_ID: 08-0029.R2 Cadmus Art: MICR20524 Date: 19-APRIL-08 Stage: I Page: 13

acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). Proc Natl Acad Sci USA 1972;69:258–263.
14. Rodrigues JM, Luis AL, Lobato JV, Pinto MV, Faustino A, Hussain NS, Lopes MA, Veloso AP, Freitas M, Geuna S, Santos JD, Mauricio AC. Intracellular Ca^{2+} concentration in the N1E-115 neuronal cell line and its use for peripheric nerve regeneration. Acta Med Port 2005;18:323–328.
15. Rodrigues JM, Luís AL, Lobato JV, Pinto MV, Lopes MA, Freitas M, Geuna S, Santos JD, Maurício AC. Determination of the intracellular Ca^{2+} concentration in the N1E-115 neuronal cell line in perspective of its use for peripheric nerve regeneration. Biomed Mater Eng 2005;15:455–465.
16. Kimhi Y, Palfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer UZ. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:462–466.
17. Reagan LP, Ye XH, Mir R, DePalo LR, Fluharty SJ. Up-regulation of angiotensin II receptors by in vitro differentiation of murine N1E-115 neuroblastoma cells. Mol Pharmacol 1990;38:878–886.
18. Larcher JC, Basseville M, Vayssiere JL, Cordeau-Lossouarn L, Croizat B, Gros F. Growth inhibition of N1E-115 mouse neuroblastoma cells by c-myc or N-myc antisense oligodeoxynucleotides causes limited differentiation but is not coupled to neurite formation. Biochem Biophys Res Commun 1992;185:915–924.
19. Prasad KN, Kentroti S, Edwards-Prasad J, Vernadakis A, Imam M, Carvalho E, Kumar S. Modification of the expression of adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate-induced differentiated functions in neuroblastoma cells by β-carotene and D-α-tocopheryl succinate. J Am Coll Nutr 1994;13:298–303.
20. Prasad KN. Differentiation of neuroblastoma cells: A useful model for neurobiology and cancer. Biol Rev Camb Philos Soc 1991;66: 431–451.
21. Luís AL, Rodrigues JM, Geuna S, Amado S, Shirosaki Y, Lee JM, Fregnan F, Lopes MA, Veloso AP, Ferreira AJ, Santos JD, Armada-Da-Silva PA, Varejão AS, Maurício AC. Use of PLGA 90:10 scaffolds enriched with in vitro-differentiated neural cells for repairing rat sciatic nerve defects. Tissue Eng (in press).
AQ2
22. Tutter JB, Richelson E. Phenytoin action on the excitable membrane of mouse neuroblastoma. J Pharmacol Exp Ther 1979;211: 632–637.
23. Beer GM, Steurer J, Meyer VE. Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. J Reconstr Microsurg 2001;17:531–534.
24. Kerns JM, Braverman B, Mathew A, Lucchinetti C, Ivankovich AD. A comparison of cryoprobe and crush lesions in the rat sciatic nerve. Pain 1991;47:31–39.
25. Sporel-Ozakat RE, Edwards PM, Hepgul KT, Savas A, Gispen WH. A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. J Neurosci Methods 1991;36:263–265.
26. Luis AL, Rodrigues JM, Amado S, Veloso AP, Armada-Da-Silva PA, Raimondo S, Fregnan F, Ferreira AJ, Lopes MA, Santos JD, Geuna S, Varejao AS, Mauricio AC. PLGA 90/10 and caprolactone biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. Microsurgery 2007;27:125–137.
27. Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershad-Sky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. Anaesthesiology 1995;82:1013–1025.
28. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transaction. Exp Neurol 2001;168:192–195.
29. Masters DB, Berge CB, Dutta SK, Griggs CT, Hu D, Kupsky W, Langer R. Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. Anesthesiology 1993;79:340–346.
30. Hu D, Hu R, Berde CB. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. Anaesthesiology 1997;86:957–965.
31. Shir Y, Zeltser R, Vatine J-J, Carmi G, Belfer I, Zangen A, Overstreet D, Raber P, Seltzer Z. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviours in eight inbred and outbreed rat strains and selection lines. Pain 2001;90:75–82.
32. Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. Neurol Res 2004;26:186–194.
33. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg 1989;83:129–138.
34. Bervar M. Video analysis of standing—An alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. J Neurosci Methods 2000;102:109–116.
35. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. J Neurosci Methods 2000;96:89–96.
36. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. J Neurosci Methods 2001;108:1–9.
37. Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. Life Sci 1979;25:171–179.
38. Clarke KA, Parker AJ. A quantitative study of normal locomotion in the rat. Physiol Behav 1986;38:345–351.
39. Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Filipe VM, Melo-Pinto P, Winter DA. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. Muscle Nerve 2002;26:630–635.
40. Varejao AS, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: A functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. Exp Neurol 2003;183:695–699.
41. Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe V, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter D. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. Muscle Nerve 2003;27:706–714.
42. Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Ann Anat 2000;182:23–34.
43. Geuna S, Tos P, Guglielmone R, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Anat Embryol 2001;204:1–10.
44. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. Microsurgery 2004;24:72–76.
45. Geuna S. The revolution of counting "tops": Two decades of the disector principle in morphological research. Microsc Res Tech 2005;66:270–274.
46. Schmitz C. Variation of fractionator estimates and its prediction. Anat Embryol 1998;198:371–397.
47. Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: Effect of sex and age. J Comp Neurol 1997;384:312–320.
48. Geuna S, Papalia I, Tos P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: A challenge for neuroscientists coming from an intriguing nerve repair concept. Brain Res Rev 2006;52:381–388.
49. Sarikcioglu L, Yaba A, Tanriover G, Demirtop A, Demir N, Ozkan O. Effect of severe crush injury on axonal regeneration: A functional and ultrastructural study. J Reconstr Microsurg 2007;23:143–149.
50. Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. Muscle Nerve 1991;14:1116–1122.
51. Mackinnon SE, O'Brien JP, Dellon AL, McLean AR, Hudson AR, Hunter DA. An assessment of the effects of internal neurolysis on a chronically compressed rat sciatic nerve. Plast Reconstr Surg 1988; 81:251–288.
52. Howard CS, Blakeney DC, Medige J, Moy OJ, Peimer CA. Functional assessment in the rat by ground reaction forces. J Biomech 2000;33:751–757.
53. Kumar B, Hanson AJ, Prasad KN. Sensitivity of proteasome to its inhibitors increases during cAMP-induced differentiation of neuroblastoma cells in culture and causes decreased viability. Cancer Lett 2004;204:53–59.

ID: ananda Date: 19/4/08 Time: 14:18 Path: J:/Production/MICR/Vol00000/080067/3B2/C2MICR080067

Ana Lúcia Emidia de Jesus Luís – ICBAS - UP

1.4. CONCLUSÕES

Os estudos recorrendo à lesão de axonotmese do nervo ciático de rato permitiram obter as seguintes conclusões:

i) O tempo de 12 semanas parece ser mais indicado para avaliação da recuperação em lesões de axonotmese em rato;

ii) A utilização de uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina não interfere negativamente no processo de regeneração do nervo, no entanto, parece ser capaz de servir de meio de transporte de um sistema celular;

iii) O sistema celular utilizando células neuronais com 48 horas de diferenciação *in vitro* parece não interferir positivamente na regeneração do nervo periférico de rato em lesões de axonotmese.

2. LESÕES DE NEUROTMESE

2.1. INTRODUÇÃO

A regeneração axonal pode ocorrer após uma lesão do SNP, quer em casos de simples esmagamento (axonotmese), quer em casos em que existe apenas secção e/ou pequenas soluções de continuidade (neurotmese), em que estes podem ser anastomosados e ainda em casos em que a anastomose não é possível visto o afastamento ser demasiado grande e pôr em causa a integridade da sutura clássica topo-a-topo. Quando em situações de secção do nervo periférico, o cirurgião deve saber qual a melhor opção reconstrutiva a tomar, com vista à obtenção dos melhores resultados finais. Para isso, o cirurgião ou clínico, necessita de ter um amplo conhecimento sobre as possíveis técnicas cirúrgicas, bem como os vários biomateriais existentes no mercado, capazes de sustentar o crescimento ou regeneração do nervo e ainda ter conhecimento sobre possíveis factores endógenos ou exógenos, a utilizar durante e após a intervenção cirúrgica. Da combinação de todos estes factores poderá surgir uma melhor ou pior recuperação.

As lesões de secção do nervo periférico podem ter maior ou menor gravidade e podem requerer vários tipos de intervenção cirúrgica, que poderá ir desde a sutura clássica topo-a-topo (epineuro-epineuro), ou nos casos de perca de tecido, poderão implicar a reconstrução com auto-enxertos ou ainda a utilização de tubos-guia de biomateriais (técnica de tubulação).

A utilização de autoenxertos na reconstrução de defeitos do nervo periférico e a neurorrafia primária (sutura clássica top-a-topo), permanecem ainda hoje como a técnica *standard* (Chalfoun, *et al.*, 2006), apesar de, em caso de autoenxerto, a morbilidade associada ao local da colheita e a falta de recuperação completa serem um problema. Sendo a utilização de tubo-guia uma alternativa à utilização de autoenxertos, é portanto compreensível o empenho da bioengenharia na criação dessas alternativas, de forma a evitar todas as desvantagens inerentes a um autoenxerto de nervo. A Engenharia de Tecidos aplicada à reconstrução de nervo periférico desenvolve um trabalho árduo não só em biomateriais para a produção de tubos-guia, como também na sua combinação com factores promotores da regeneração do nervo e que incluem diferentes matrizes extracelulares, factores de crescimento e sistemas celulares.

Com base nestes conhecimentos e na tentativa de poder contribuir de alguma forma para este assunto, foi idealizado um trabalho experimental que teria como objectivo, testar um novo biomaterial, o PLGA 90:10 e ao mesmo tempo um biomaterial capaz de suportar ou transportar um sistema celular promotor da produção de factores neurotróficos, acelerando e melhorando desta forma a regeneração do nervo ciático sujeito a

neurotmese. O sistema celular foi em primeiro lugar testado *in vitro* quanto ao seu comportamento, sobrevivência e adesividade ao material que serviria como meio de transporte (Rodrigues *et al.*, 2005 a e b). Os biomateriais utilizados foram: membranas de colagénio III de origem equina e tubos-guia de PLGA 90:10.

Assim, numa lesão em que apenas há secção do nervo sem perca de material (lesão de Sunderland tipo V) foi possível a realização de uma sutura clássica topo-a-topo sem tensão, a qual foi envolvida com uma biomembrana forrada com um sistema celular de células neuronais diferenciadas *in vitro* (resultados ainda não publicados).

Para uma lesão de neurotmese com afastamentos dos topos nervosos foram testadas as opções de autoenxerto, técnica de tubulação com Neurolac® e PLGA 90:10 e ainda a utilização de tubos-guia de PGA 90:10 forrados com o sistema celular. Ao contrário do Neurolac® já existente no mercado, o PLGA 90:10, permite que um sistema celular seja fixado na sua microestrutura de forma a servir ao mesmo tempo de tubo-guia e de meio de transporte desse sistema celular (Rodrigues *et al.*, 2005 a e b). Apesar dos resultados obtidos através da adição de células neuronais diferenciadas *in vitro* ao tubo-guia de PLGA 90:10, serem sempre um sistema celular muito problemático, visto serem células provenientes de uma linha imortalizada de origem tumoral, do ponto de vista de investigação pensamos este ser um primeiro passo para estender a utilização destes biomateriais a um sistema celular, utilizando outro tipo de células, como células de Schwann, células do sistema olfactivo e em especial células estaminais autólogas ou heterólogas.

Neste trabalho foi utilizado um tempo de recuperação de 20 semanas. O tempo de recuperação destas lesões é um factor preponderante, especialmente porque o tempo de inactividade dos órgãos alvo é algo importante a ter em conta na recuperação final. O tempo de recuperação será tanto mais prolongado quanto mais grave for a lesão, e por sua vez, quanto mais tempo o órgão alvo estiver desinervado, mais difícil é a sua recuperação. Portanto, trata-se de uma luta incessante contra o tempo, contra a inactivação do órgão alvo e a favor da regeneração do nervo. Em 1991 Mackinnon *et al.* comprovaram que o número de fibras nervosas no terço distal do nervo regenerado aumenta bastante nos primeiros três meses, mas que antes dos 24 meses não retorna a valores normais (Mackinnon *et al.*, 1991). Interessa portanto, também relacionar os dados da avaliação histológica, com dados provenientes de uma avaliação funcional, que nem sempre evoluem na mesma proporcionalidade. Tendo em conta estudos anteriores realizados por outros investigadores e os resultados obtidos através das várias formas de avaliação, pareceu-nos que 20 semanas seriam um período aceitável para cada uma das lesões reproduzidas.

2.2. ARTIGO 3

MICROSURGERY (2008) 27, 125-137

PLGA 90/10 AND CAPROLACTONE BIODEGRADABLE NERVE GUIDES FOR THE RECONSTRUCTION OF THE RAT SCIATIC NERVE.

PLGA 90/10 AND CAPROLACTONE BIODEGRADABLE NERVE GUIDES FOR THE RECONSTRUCTION OF THE RAT SCIATIC NERVE

ANA L. LUIS, D.V.M.,[1,2] JORGE M. RODRIGUES, D.M.,[1,2,3] SANDRA AMADO, M.D.,[4] ANTÓNIO P. VELOSO, Ph.D.,[4] PAULO A. S. ARMADA-DA-SILVA, Ph.D.,[4] STEFANIA RAIMONDO, B.Sc.,[5] FEDERICA FREGNAN, B.Sc.,[5] ANTÓNIO J. FERREIRA, D.V.M., Ph.D.,[6] MARIA A. LOPES, M.D., Ph.D,[7] JOSÉ D. SANTOS, M.D., Ph.D.,[7] STEFANO GEUNA, M.D.,[5] ARTUR S. P. VAREJÃO, D.V.M., Ph.D.,[8] and ANA C. MAURÍCIO, D.V.M., Ph.D.[1,2*]

The purpose of this study was to test in vivo two different nerve guides for promoting nerve regeneration across a 10-mm gap of the rat sciatic nerve: 1) one made of PLGA in a novel proportion (90:10) of the two polymers poly(L-lactide):poly(glycolide); 2) another made of (DL-lactide-ε-caprolactone) copolyester (Neurolac®) tube, by comparing its healing efficacy with that of the more traditional methods of end-to-end nerve suture and autologous graft. Motor and sensory functional recovery were assessed throughout the healing period of 20 weeks, and the repaired nerves were processed for morphological and histomorphometrical analysis. Both motor and sensory functions improved significantly in all experimental nerve repaired groups. At the end of the 20-week follow-up, the end-to-end group showed better recovery of motor function when compared with the groups treated with guiding tubes. However, at this time point, the level of motor function in the Neurolac® and PLGA groups was similar to the one of the graft group. Nociception function also recovered faster in the end-to-end group compared with the Neurolac® and PLGA groups, and in this case, recovery was also delayed in the graft group. At the end of follow-up, nociception was similar in all experimental groups. Morphological and histomorphometrical analysis showed that axon regeneration occurred in both PLGA and Neurolac® experimental groups, with no significant differences in the total number of regenerated fibers, but disclosed a different pattern of degradation of the two types of tubes with larger biodegradation of PLGA material by the end of 20 weeks. These results suggest that both types of biomaterials are a good substrate for preparing tubular nerve guides, and their different pattern of degradation does not seem to influence the degree of nerve regeneration. © 2007 Wiley-Liss, Inc. Microsurgery 27:125–137, 2007.

Many peripheral nerve injuries can only be dealt through reconstructive surgical procedures.[1] Despite continuous refinement of microsurgery techniques, peripheral nerve repair still stands as one of the most challenging tasks in neurosurgery, as functional recovery is rarely satisfactory in these patients.[2–5] Direct repair should be the procedure of choice whenever tension-free suturing is possible; however, patients with loss of nerve tissue, resulting in a nerve gap, are considered for a nerve graft procedure.[6] In these cases, the donor nerves used for grafting are commonly expendable sensory nerves.[7] This technique, however, has some disadvantages, with the most prominent being donor site morbidity, that may lead to a secondary sensory deficit and occasionally neuroma and pain. In addition, no donor and recipient nerve diameters often occurs, which might be the basis for poor functional recovery.[8] Alternatives to peripheral nerve grafts include cadaver nerve segments allografts, end-to-side neurorrhaphy, and entubulation by means of autologous non-nervous tissues, such as vein and muscles.[9–13] Experimental work from a number of laboratories has emphasized the importance of entubulation for peripheral nerve repair to manage nerve defects that cannot be bridged without tension.[14–16] Nerves will regenerate from the proximal nerve stump towards the distal one, whereas neuroma formation and ingrowth of fibrous tissue into the nerve gap are prevented. Tubes can be biological and synthetic and, among the latter, both nonabsorbable (e.g. silicon) and biodegradable tubes have been used.[15] The concept behind the use of biodegradable nerve guides is that no foreign body material will be left in the host after the device has fulfilled its task. Among synthetic biodegradable tubes, two types attracted particular attention: those made of PLGA and those made of poly(DL-lactide-ε-caprolactone) copolyester (Neurolac®). These two types of nerve guides showed several different physical–chemical properties; Neurolac® is stiffer than PLGA due to structural reinforcement of the ester bonds and does not degrade so quickly. The biodegradation rate of PLGA, which is controlled by the monomer ratio, molecular weight, and crystallinity, can be varied from weeks to months, while that complete resorption of Neurolac® is estimated to be of 16 months approximately (PLGA data

[1]Animal Science and Study Centre, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, Porto University, Porto, Portugal
[2]Department of Veterinary Clinics, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, Porto University, Porto, Portugal
[3]Plastic, Reconstructive and Aesthetic Service, Hospital of S. João, University of Porto, Porto, Portugal
[4]Faculty of Human Kinetics, Technical University of Lisbon, Lisbon, Portugal
[5]Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin, Italy
[6]Veterinary Medicine Faculty, Technical University of Lisbon, Lisbon, Portugal
[7]Engineering Faculty of Porto University, Porto, Portugal
[8]Department of Veterinary Sciences, CETAV, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal
*Correspondence to: Ana C. Maurício, Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485–661 Vairão, Portugal.
E-mail: ana.colette@mail.icav.up.pt
Received 12 October 2005; Accepted 21 December 2006
Published online 8 February 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/micr.20317

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

WILEY InterScience® DISCOVER SOMETHING GREAT

not published).[14,17,18] The degradation products of Neurolac® are less acidic, which may cause less damage to the surrounding tissue, and they are transparent so that the correct positioning of the nerve stumps may be confirmed after suturing. On the other hand, the biodegradable nonwoven structure of PLGA tubes may offer some advantages in terms of microporosity, which may enhance nerve repair.[14,17,18] The present study aimed to use the rat sciatic nerve as a model for peripheral nerve recovery, performing a 10-mm gap to directly compare the efficacy of these two types of bioresorbable guide tubes for the reconstruction of peripheral nerve, as well as to compare them to traditional end-to-end suture and nerve autograft repair. In this experimental work we used a PLGA tube where the proportion between the poly(L-lactide) and poly(glycolide) (PLA/PLG) was 90:10, respectively, a proportion which was never tested in vivo before, as far as we know from the available bibliography. This polymer composition is expected to increase the microporosity and to delay the biodegradation rate of the tube, when compared with the other proportions referred to in previously published works.

MATERIALS AND METHODS

Tube-Guides Design and Preparation

Synthetic biodegradable tubes of PLGA and Neurolac® were used to bridge the nerve gaps and guide growing nerve fibers. The latter are known for their transparency, which facilitates suturing procedure. Both types of nerve guides can have unlimited availability in terms of diameters and lengths. In this study, a PLA/PLG ratio of 90/10 was used, since it has been established that with this compositional range, nerve tubes resorption is completed after 12 weeks of implantation approximately (data not published). As a matter of fact, such high proportion of PLA used in the copolymer aims at reducing the degradation rate of PLGA, and therefore, retaining their strength for a considerable length of time to achieve the complete nerve regeneration. The maintenance of the tube structure may also be an important factor to support growth factors-producing cells as a cellular aid to nerve repair.[19] Poly (DL-lactide-*co*-glycolide) copolymers with ratio of 90 PLA/10 PLG were obtained from their cyclic dimmers, DL-lactide and glycolide. Nonwoven constructs were used to prepare tube guides 16 mm long, internal diameter of 2.0 mm, and thickness wall of 1.5 mm (Fig. 1A). These fully synthetic nonwoven materials are extremely flexible, biologically safe, and are able to sustain the compressive forces due to body movement after implantation. They have also some degree of porosity to allow for influx of low molecular nutrients required for nerve regeneration. The nonwoven structure allowed for the conduit to hold suture without difficulties; however greater care had to be taken to ensure the integrity of the conduit. These tube guides of PLGA are expected to degrade to lactic and glycolic acids through hydrolysis of the ester bonds. The poly(DL-lactide-ε-caprolactone) tube-guides (Neurolac®), 16 mm long, internal diameter of 2 mm, and thickness wall of 1.5 mm, were purchased from Polyganics BV, Groningen, The Netherlands (Fig. 1B).

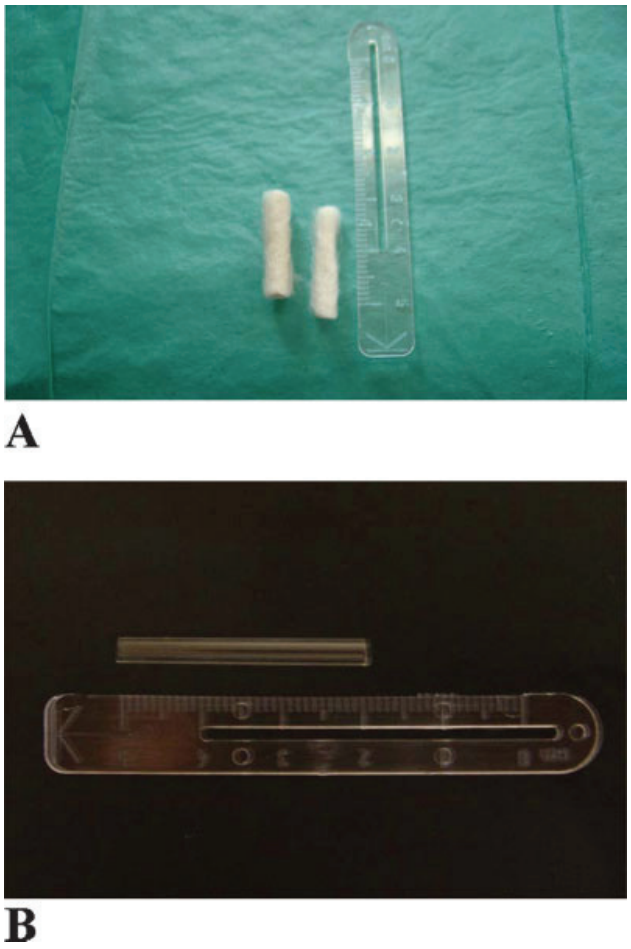


*Figure 1. PLGA 90:10 (**A**) and poly (DL-lactide-ε-caprolactona) copolyester tube-guides (Neurolac®) (**B**). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]*

Surgical Procedure

Adult male Sasco Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing 300–350 g, divided in 5 groups of 6 or 7 animals each, were used. All animals were housed in a temperature and humidity controlled room with 12–12 h light/dark cycles, two animals per cage (Makrolon type 4, Tecniplast, VA, Italy), and were allowed normal cage activities under standard laboratory conditions. The animals were fed with standard chow and water ad libitum. Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort, taking in account

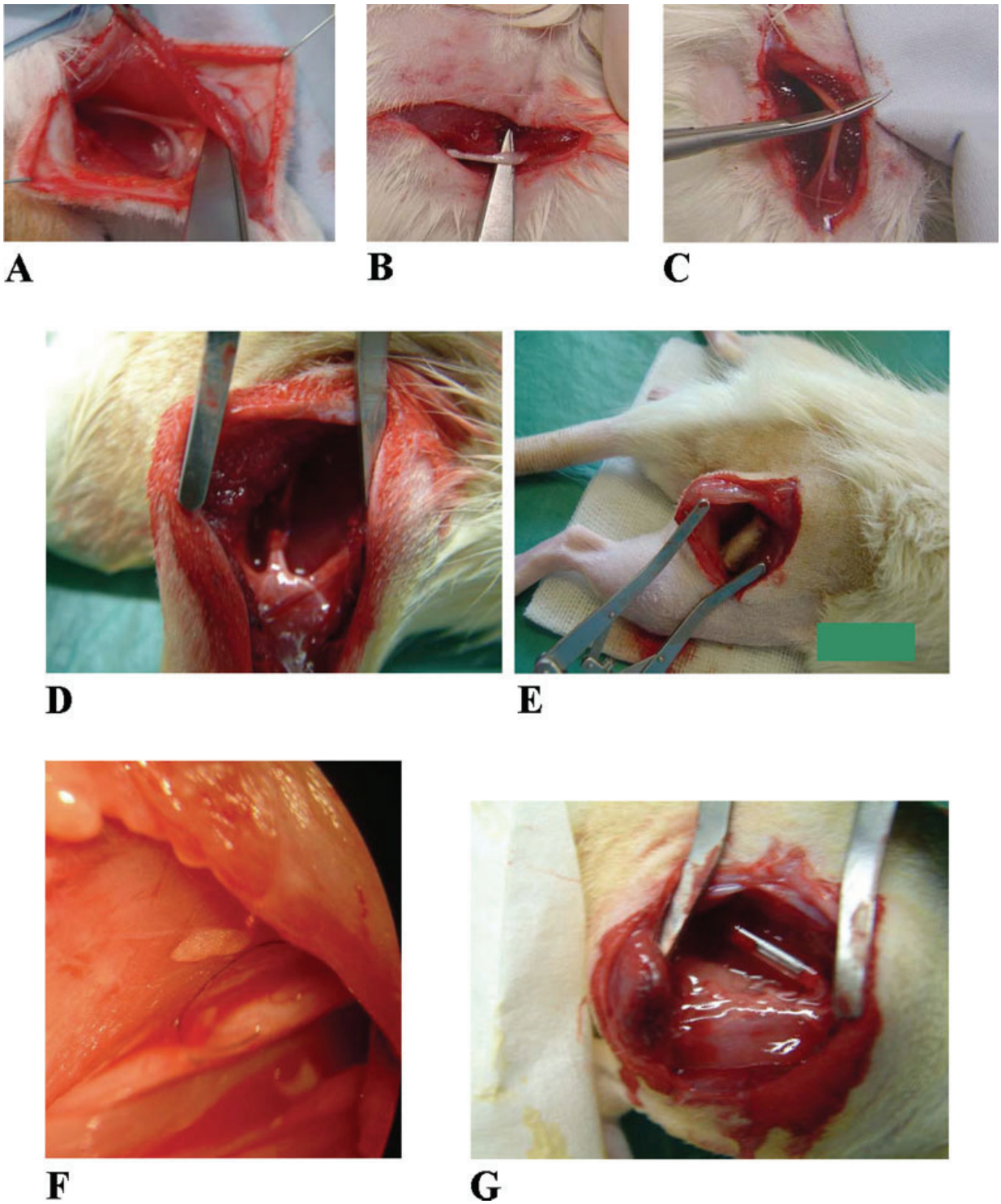


*Figure 2. Surgery technique. The rats were placed prone under sterile conditions for the surgical procedure. Under intramuscular anesthesia, the sciatic nerve was exposed unilaterally (**A, B**), and after nerve mobilization it was performed a transection injury (**C, D**). The level of injury was as low as possible, in general, just above the terminal nerve ramification. In two groups, the nerve was reconstructed using PLGA 90/10 tube-guides (**E**) or poly (DL-lactide-ε-caprolactone) copolyester tube-guides (**G**). In one group of animals was performed an end-to-end traditional suture with 9/0 monofilament nylon (**F**). In graft group, the sciatic nerve was transected immediately above the terminal nerve ramification and in a 10 mm distal point. The nerve graft obtained, with a lenght of 10 mm, was inverted 180° and sutured with 7/0 monofilament nylon (picture not shown). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]*

Microsurgery DOI 10.1002/micr

human endpoints for animal suffering and distress. Animals were housed for 2 weeks before entering the experiment.

For surgery (Fig. 2), rats were placed prone under sterile conditions, and the skin from the clipped lateral right thigh was scrubbed in a routine fashion with antiseptic solution. The surgeries were performed under an M-650 operating microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Under deep anesthesia (ketamine 9 mg/100 g; xylazine 1.25 mg/100 g, atropine 0.025 mg/100 body weight, intramuscular), the right sciatic nerve was exposed unilaterally through a skin incision extending from the greater trochanter to the mid-half, distally followed by a muscle splitting incision. After nerve mobilization, a transection injury was performed (neurotmesis) using straight microsurgical scissors. The nerve was injured at a level as low as possible, in general, immediately above the terminal nerve ramification. In group 1 (control), the injured nerve was left unrepaired. In group 2 (end-to-end), immediate cooptation with 7/0 monofilament nylon sutures of the two injured nerve endings was immediately performed under magnification (end-to-end suture). In groups 3 and 4, the proximal and distal nerve stumps were inserted 3 mm into the Neurolac® or PLGA tube-guides and held in place, maintaining a nerve gap of 10 mm, with two epineurial sutures using 7/0 monofilament nylon, respectively (Fig. 2). The Neurolac® tubes were placed in warm sterile saline (>37°C) for 3 min before implantation. In group 5 (graft), the sciatic nerve was transected immediately above the terminal nerve ramification and at a 10 mm distal point. The nerve graft obtained, with a lenght of 10 mm, was inverted 180° and sutured with 7/0 monofilament nylon. Opposite leg and sciatic nerve were left intact in all groups and served as control for normal nerves.

All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of Portugal in accordance with the European Communities Council Directive of November 1986 (86/609/EEC).

Evaluation of Motor Performance and Nociceptive Function

Motor performance and nociceptive function were evaluated by measuring extensor postural thrust (EPT) and withdrawal reflex latency (WRL), respectively. The animals were tested preoperatively (week 0), at weeks 1, 2, and every 2 weeks thereafter until week 20. The animals were gently handled and tested in a quiet environment to minimize stress levels. The EPT was originally proposed by Thalhammer et al.[20] as a part of the neurological recovery evaluation in the rat after sciatic nerve injury. For this test, the entire body of the rat, excepting the hind limbs, was wrapped in a surgical towel. Supporting the animal by the thorax and lowering the affected hind limb towards the platform of a digital balance elicits the EPT. As the animal is lowered to the platform, it extends the hind limb, anticipating the contact made by the distal metatarsus and digits. The force in grams (g) applied to the digital platform balance (model TM 560; Gibertini, Milan, Italy) was recorded. The same procedure was applied to the contra-lateral, unaffected limb (Fig. 3). The normal (unaffected limb) EPT (NEPT) and experimental EPT (EEPT) values were incorporated into a equation (eq. 1) to derive the motor deficit index, as described by Koka and Hadlock[21]:

$$\text{Motor deficit index} = (\text{NEPT} - \text{EEPT})/\text{NEPT} \qquad (1)$$

To assess the nociceptive withdrawal reflex (WRL), the hotplate test was modified as described by Masters et al.[22] The rat was wrapped in a surgical towel above its waist and then positioned to stand with the affected hind paw on a hot plate at 56°C (model 35-D, IITC Life Science Instruments, Woodland Hill, CA). WRL is defined as the time elapsed from the onset of hotplate contact to withdrawal of the hind paw and measured with a stopwatch. Normal rats withdraw their paws from the hotplate within 4.3 s or less.[23] The affected limbs were tested three times, with an interval of 2 min between consecutive

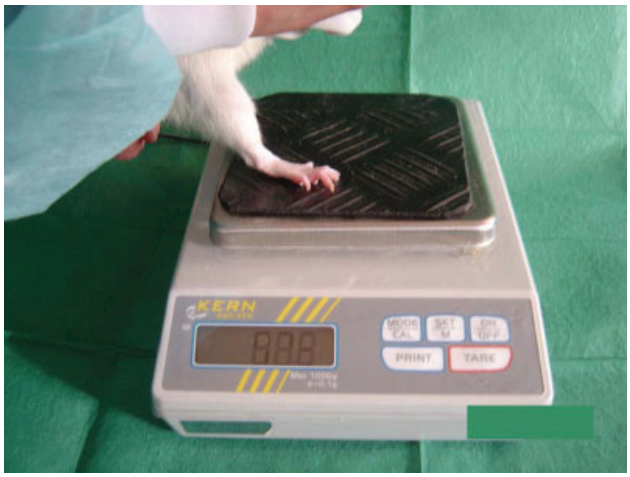


Figure 3. The extensor postural thrust (EPT) test. It is a motor behavior test, where the entire body of the rat, with the exception of the hind limbs, was wrapped in a surgical towel. Supporting the animal by the thorax and lowering the affected hind limb to the platform of a digital balance elicit EPT, the animal extended its hind limb anticipating contact made by the distal metatarsus and digits. The force in grams (g) applied to the digital platform balance was recorded and the same procedure was applied to the contra-lateral unaffected limb. This test was performed in all animals preoperatively (week 0), at weeks 1, 2, and every 2 weeks thereafter until week 20. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

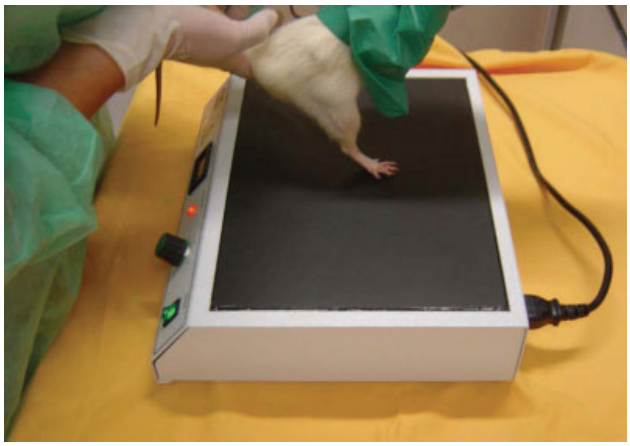


Figure 4. Withdrawal reflex latency (WRL) test using a hot plate at 56°C. The rat was wrapped in a surgical towel above its waist and then positioned to stand with the affected hind paw on the hot plate at 56°C. WRL is defined as time elapsed from the onset of hotplate contact to withdrawal of the hind paw and measured with a stopwatch. Normal rats withdraw their paw from the plate within 4.3 s or less. The cut off time for heat stimulation was set at 12 s, to avoid skin damage to the foot. This test was performed in all animals preoperatively (week 0), at weeks 1, 2, and every 2 weeks thereafter until week 20. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

tests to prevent sensitization, and the three latencies were averaged to obtain a final result.[24,25] If there was no paw withdrawal after 12 s (Fig. 4), the heat stimulus was removed to prevent tissue damage, and the animal was assigned the maximal WRL of 12 s.[26]

Morphological Analysis

The rats were euthanized at week 20 post surgery by lethal intracardiac injection of 5% sodium pentobarbital, after the induction of deep anesthesia (ketamine 9 mg/100 g; xylazine 1.25 mg/100 g, atropine 0.025 mg/100 body weight, intramuscular). The repaired sciatic nerves were excised, including the nerve guide and segments of 5 mm proximal and distal to it. The grafted sciatic nerves were processed either for light microscopy and immunohistochemistry or for histomorphometry and electron microscopy. For traditional light microscopy, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h and then washed and conserved in phosphate buffer saline (PBS) until embedding. The specimens were dehydrated and embedded in paraffin and cut at 10 μm both perpendicular and longitudinal to the main nerve axis. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and observed with a Leica DM4000 microscope equipped with a Leica DFC320 digital camera.

For immunohistochemistry and confocal laser microscopy, sections were incubated in a solution containing the anti-neurofilament-200 kD primary antibody (monoclonal, mouse, 1:200, Sigma, St. Louis, MO) for 12 h. Sections were then washed in PBS and incubated for 1 h with the goat anti-mouse IgG Alexa-Fluor-488-conjugated secondary antibody (1:200, Molecular Probes, Eugene, Oregon). The sections were finally mounted in a Dako fluorescent medium and analyzed by a LSM 510 confocal laser microscopy system (Zeiss, Jena, Germany) that incorporates two lasers (Argon and HeNe).

For histomorphometry and transmission electron microscopy, nerves were fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 0.5% saccarose in 0.1*M* Sörensen phosphate buffer (pH 7.2) for 4–6 h. The specimens were embedded in Glauerts' embedding mixture as described in 2005 by Raimondo et al.[27] All nerves were carefully oriented to obtain sections perpendicular to their main axis and then cut at midway using an Ultratome III ultramicrotome (LKB, Bromma, Sweden). For histomorphometry, series of 2 μm thick semithin transverse sections were cut using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained by Toluidine blue for 2–3 min for high resolution light microscopy examination. In each nerve, the estimation of the total number of regenerated nerve fibers was conducted using a DM4000 microscope equipped with a DFC320 digital camera and an IM50 image manager system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). This system reproduced microscopic images (obtained through a 100× oil-immersion objective) on the computer monitor at a magnification that can be regulated by the operator using the digital zoom. A final magnification of 6,600× that permitted accurate recognition and counting of myelinated nerve fibers was chosen for this present study. Details on the systematic random sampling strategy and the 2D-disector method employed for axon counting were described previously.[28–30]

Electron microscope observations were made on ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) equipped with a Mega-View-III digital camera and a Soft-Imaging-System (SIS, Münster, Germany) for the computerized acquisition of the images.

Statistic Analysis

Differences in motor deficit and nociception recoveries and axon counts between experimental groups were analyzed by two-way mixed factorial ANOVA, with experimental groups as between subjects factor, and time of recovery as the within subjects factor. Whenever a significant main effect was found for the between subjects factor, pairwise comparisons were carried out by applying the Turkey's HSD post hoc test. The Mauchly's test of sphericity was used to assess sphericity, and in cases significant deviations from the later existed, a

Table 1. Values of Percentage of Functional Deficit (Values Presented Between 0 and 1) Obtained Performing Extensor Postural Thrust Test

Weeks	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Group 1 ($N = 4$)												
Gap 10 mm – 1	0.08	0.9	0.92	0.92	0.92	0.98	0.87	0.84	0.84	0.91	0.96	0.94
Gap 10 mm – 2	0.09	0.89	0.9	0.9	0.95	0.89	0.87	0.9	0.89	0.95	0.9	0.95
Gap 10 mm – 3	0.07	0.95	0.9	0.87	0.75	0.85	0.9	0.82	0.8	0.79	0.84	0.86
Gap 10 mm – 4	0.08	0.98	0.9	0.92	0.95	0.9	0.91	0.95	0.89	0.87	0.95	0.9
Mean	0.8	0.93	0.91	0.90	0.98	0.91	0.98	0.88	0.86	0.88	0.91	0.91
SEM	0.08	0.042	0.01	0.024	0.096	0.054	0.021	0.059	0.044	0.068	0.055	0.041
Group 2 ($N = 7$)												
End-to-end – 1	0.07	0.9	0.8	0.73	0.68	0.56	0.54	0.54	0.64	0.48	0.42	0.5
End-to-end – 2	0.07	0.93	0.83	0.7	0.73	0.66	0.57	0.5	0.45	0.4	0.4	0.4
End-to-end – 3	0.08	0.9	0.85	0.88	0.82	0.76	0.57	0.5	0.53	0.44	0.38	0.4
End-to-end – 4	0.07	0.9	0.91	0.84	0.82	0.72	0.57	0.39	0.55	0.38	0.34	0.4
End-to-end – 5	0.09	0.97	0.97	0.69	0.6	0.34	0.29	0.21	0.3	0.28	0.3	0.29
End-to-end – 6	0.06	0.77	0.86	0.83	0.78	0.72	0.63	0.57	0.55	0.38	0.38	0.4
End-to-end – 7	0.07	0.87	0.89	0.81	0.78	0.76	0.7	0.47	0.45	0.33	0.42	0.5
Mean	0.07	0.98	0.87	0.78	0.74	0.65	0.55	0.45	0.50	0.38	0.38	0.41
SEM	0.01	0.065	0.056	0.075	0.081	0.152	0.128	0.122	0.108	0.066	0.044	0.072
Group 3 ($N = 6$)												
Neurolac® – 1	0.09	0.98	0.98	0.97	0.89	0.82	0.8	0.74	0.62	0.58	0.5	0.49
Neurolac® – 2	0.08	0.89	0.91	0.98	0.9	0.91	0.84	0.64	0.44	0.52	0.57	0.41
Neurolac® – 3	0.08	0.98	0.98	0.96	0.95	0.91	0.97	0.81	0.87	0.9	0.9	0.7
Neurolac® – 4	0.07	0.98	0.98	0.9	0.92	0.9	0.9	0.82	0.69	0.68	0.71	0.55
Neurolac® – 5	0.06	0.9	0.88	0.84	0.77	0.76	0.78	0.68	0.6	0.69	0.6	0.5
Neurolac® – 6	0.07	0.88	0.89	0.85	0.79	0.78	0.75	0.65	0.65	0.65	0.65	0.5
Mean	0.075	0.94	0.94	0.92	0.87	0.85	0.94	0.72	0.65	0.67	0.66	0.53
SEM	0.011	0.05	0.048	0.062	0.073	0.069	0.082	0.079	0.140	0.130	0.140	0.097
Group 4 ($N = 6$)												
PLGA – 1	0.09	0.97	0.65	0.96	0.88	0.95	0.72	0.78	0.74	0.88	0.88	0.6
PLGA – 2	0.08	0.98	0.88	0.85	0.92	0.88	0.88	0.8	0.64	0.7	0.58	0.48
PLGA – 3	0.08	0.96	0.93	0.9	0.88	0.91	0.91	0.88	0.66	0.68	0.7	0.64
PLGA – 4	0.07	0.93	0.94	0.9	0.81	0.82	0.82	0.8	0.69	0.55	0.57	0.6
PLGA – 5	0.05	0.89	0.89	0.84	0.79	0.75	0.77	0.79	0.78	0.72	0.67	0.52
PLGA – 6	0.08	0.83	0.89	0.71	0.8	0.75	0.76	0.71	0.72	0.65	0.6	0.48
Mean	0.08	0.93	0.86	0.86	0.85	0.84	0.81	0.79	0.71	0.7	0.67	0.55
SEM	0.014	0.058	0.107	0.085	0.054	0.084	0.074	0.054	0.052	0.108	0.117	0.069
Group 5 ($N = 6$)												
Graft – 1	0.07	0.83	0.87	0.78	0.78	0.81	0.73	0.72	0.69	0.60	0.5	0.5
Graft – 2	0.08	0.89	0.91	0.92	0.75	0.75	0.6	0.64	0.53	0.46	0.54	0.52
Graft – 3	0.08	0.93	0.94	0.88	0.78	0.65	0.63	0.63	0.50	0.45	0.57	0.54
Graft – 4	0.00	0.91	0.85	0.82	0.77	0.72	0.58	0.68	0.64	0.54	0.57	0.54
Graft – 5	0.09	0.93	0.89	0.82	0.77	0.74	0.63	0.64	0.69	0.64	0.5	0.54
Graft – 6	0.00	0.89	0.87	0.89	0.78	0.65	0.66	0.67	0.53	0.50	0.54	0.46
Mean	0.03	0.90	0.89	0.85	0.77	0.72	0.64	0.66	0.60	0.53	0.54	0.52
SEM	0.066	0.037	0.033	0.053	0.012	0.062	0.053	0.034	0.087	0.077	0.031	0.032

Rats were submitted to surgical sciatic nerve reconstruction using poly(DL-lactide-ε-caprolactone) copolyester (Neurolac®) or PLGA 90:10 copolymer tube-guides, an end-to-end primary suture, or by an autologous 180° inverted graft. The animals were tested preoperatively (week 0), at weeks 1, 2, and every 2 weeks thereafter until 20 weeks, when the animals were killed for histological and electronic microscopy analysis. In the control group, the injured nerve was left unrepaired. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within each group. Gap 10 mm: Animals whose injured nerve was left unrepaired; End-to-end: Rats subjected to an end-to-end suture of the sciatic nerve endings; Neurolac®: Rats whose nerve gap of 10 mm was bridged using Neurolac® tube-guides; PLGA: Rats whose nerve gap of 10 mm was bridged using PLGA tube-guides; Graft: Rats where it was used an autologous 180° inverted graft; ETP: extensor postural thrust.

correction of the degrees of freedom was used by means of the more conservative Grenhouse-Geiser's Epsilon. *T* tests were used for comparisons between experimental groups at week 1 postsurgery, with Bonferroni adjustment for multiple comparisons. All statistical analysis were carried out using the SPSS software package (SPSS, Chicago) and statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS

Motor Deficit and Nociception Function

Motor deficit. Table 1 presents data of the motor deficit index. Sciatic nerve transection caused a severe motor deficit. At week 1, the motor deficit was 0.94 ± 0.05, 0.93 ± 0.06, 0.98 ± 0.07, 0.93 ± 0.042, and 0.90 ± 0.04

Table 2. Values in Seconds Obtained Performing Withdrawal Reflex Latency Test

Weeks	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Group 1 ($N = 4$)												
Gap 10 mm – 1	2	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Gap 10 mm – 2	1	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Gap 10 mm – 3	2	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Gap 10 mm – 4	2	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mean	1.8	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
SEM	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Group 2 ($N = 7$)												
End-to-end – 1	3	12	4	4	10	5	8	12	5	7	5	4
End-to-end – 2	2	12	5	12	5	2	10	2	4	2	2	3
End-to-end – 3	2	12	12	8	5	3	4	4	4	6	4	4
End-to-end – 4	4	12	2	3	4	5	2	6	4	4	4	2
End-to-end – 5	2	12	6	2	10	2	5	2	2	6	2	2
End-to-end – 6	2	12	12	12	12	3	3	3	4	4	2	2
End-to-end – 7	1	12	12	8	10	4	2	2	2	3	2	2
Mean	2.3	12	7.6	7.0	8.0	3.4	4.9	4.4	3.6	3.6	3.0	2.7
SEM	0.95	0	4.31	4.12	3.2	1.27	3.08	3.64	1.13	1.81	1.3	0.95
Group 3 ($N = 6$)												
Neurolac® – 1	2	12	12	12	12	7	7	5	7	6	5	2
Neurolac® – 2	2	12	12	12	12	12	12	9	8	7	6	2
Neurolac® – 3	2	12	12	12	10	3	9	9	6	5	6	2
Neurolac® – 4	2	12	12	12	10	3	8	12	7	6	2	3
Neurolac® – 5	3	12	12	12	12	12	12	11	11	11	11	6
Neurolac® – 6	2	12	12	12	12	7	12	12	8	8	5	4
Mean	2.17	12	12	12	11.3	7.3	10	9.7	7.8	7.2	5.8	3.2
SEM	0.41	0	0	0	1.03	4.03	2.28	2.66	1.72	2.14	2.93	1.60
Group 4 ($N = 6$)												
PLGA – 1	2	12	12	6	10	2	5	12	7	8	7	7
PLGA – 2	2	12	12	1	12	12	2	8	2	3	3	2
PLGA – 3	2	12	12	8	4	8	2	5	6	2	3	3
PLGA – 4	1	12	12	12	3	9	2	3	5	2	6	4
PLGA – 5	2	12	12	12	12	10	10	8	8	12	7	4
PLGA – 6	1	12	12	12	12	12	12	8	12	8	6	3
Mean	1.7	12	12	8.5	8.8	8.8	5.5	7.3	6.7	5.8	5.3	3.8
SEM	0.52	0	0	4.46	4.22	3.71	4.46	3.08	3.33	4.12	1.86	1.72
Group 5 ($N = 6$)												
Graft – 1	2	12	12	12	12	12	5	4	3	4	4	4
Graft – 2	2	12	12	12	12	12	8	5	3	3	3	3
Graft – 3	2	12	12	12	12	12	4	4	3	3	3	3
Graft – 4	2	12	12	12	12	12	12	10	7	7	5	4
Graft – 5	1	12	12	12	12	12	6	6	4	3	3	3
Graft – 6	2	12	12	12	12	12	5	4	4	3	2	3
Mean	1.8	12	12	12	12	12	6.7	5.5	4	3.8	3.33	3.33
SEM	0.41	0	0	0	0	0	2.94	2.35	1.55	1.6	0.42	0.21

Rats were submitted to surgical sciatic nerve reconstruction using poly(DL-lactide-ε-caprolactone) copolyester (Neurolac®) or PLGA 90:10 copolymer tube-guides, an end-to-end primary suture or by an autologous 180° inverted graft. The animals were tested preoperatively (week 0), at weeks 1, 2, and every 2 weeks thereafter until 20 weeks, when the animals were sacrificed for histological and electron microscopy analysis. In the control group, the injured nerve was left unrepaired. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). N corresponds to the number of rats within each group.
WRL, withdrawal reflex latency test.

for Neurolac®, PLGA, end-to-end, control (gap) and graft groups, respectively, with no statistic differences between the groups ($P > 0.05$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of time [$F_{(11,176)} = 195.690$, $P < 0.001$] and group [$F_{(3,21)} = 18.681$, $P = 0.000$] in the results of motor deficit. Post hoc analysis indicated that the recovery of motor function along the 20 weeks occurred faster in the end-to-end group followed by the graft group and slower in both the Neurolac® and PLGA groups (control group not included in the statistical analysis). At the end of follow-up, differences between the end-to-end group and the Neurolac® and PLGA groups were still significant. The type of guide tube had no effect on the rate of motor recovery and

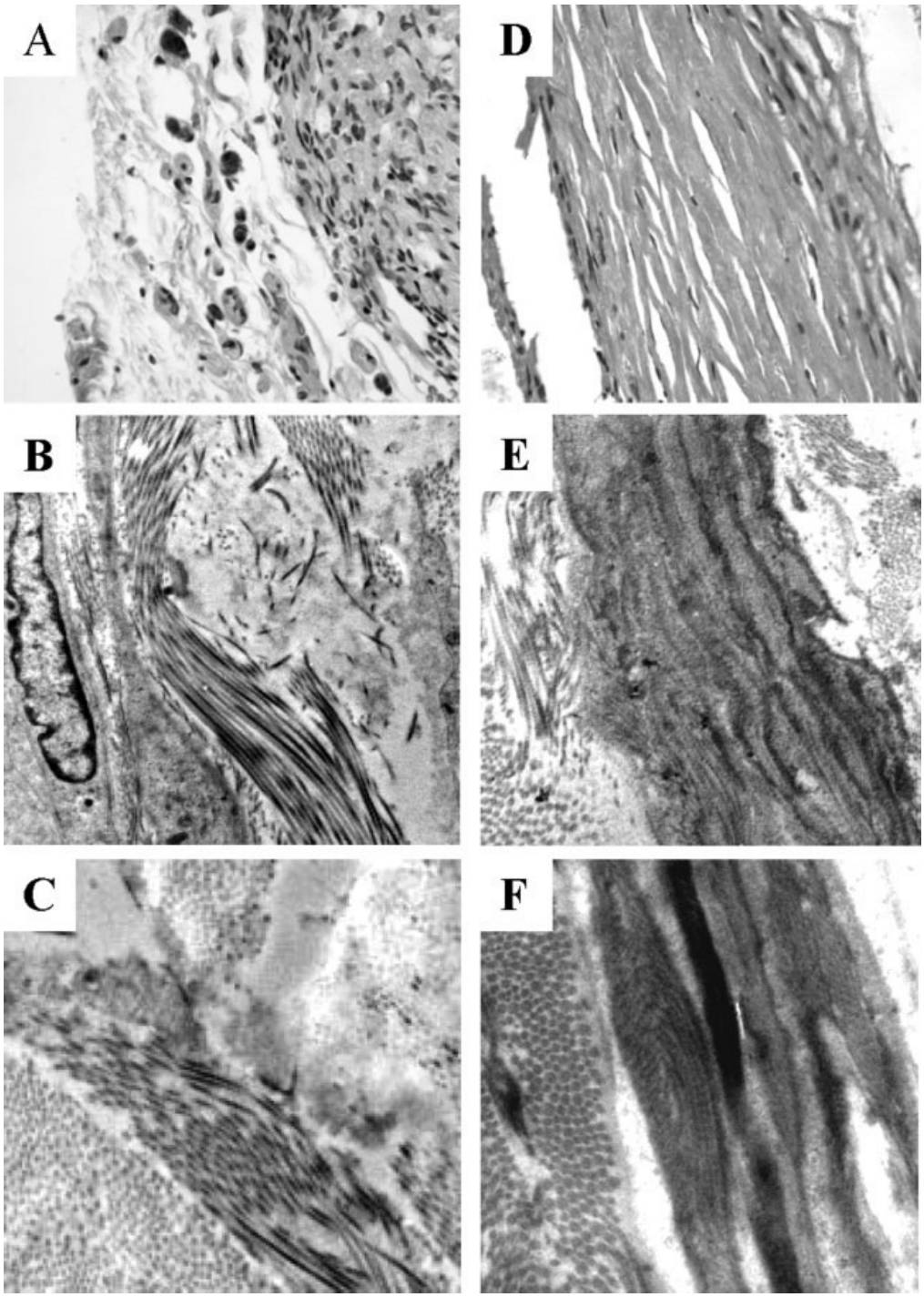


*Figure 5. Light and electron microscope analysis at week 20 postoperatively. Light microscope appearance of PLGA tube wall (**A**) and Neurolac® tube wall (**D**). Electron microscope appearance of PLGA tube wall (**B, C**) and Neurolac® tube wall (**E,F**). Magnification: A, D = ×400; B = 8,000; C, E = ×12,000; F = ×16,000.*

both were associated with a close to 50% improvement in the EPT performance, similar to that registered in the graft group.

Nociception function. Table 2 depicts the data for the WRL tests. In the first week post surgery, all animals presented severe loss of sensory function and all tests

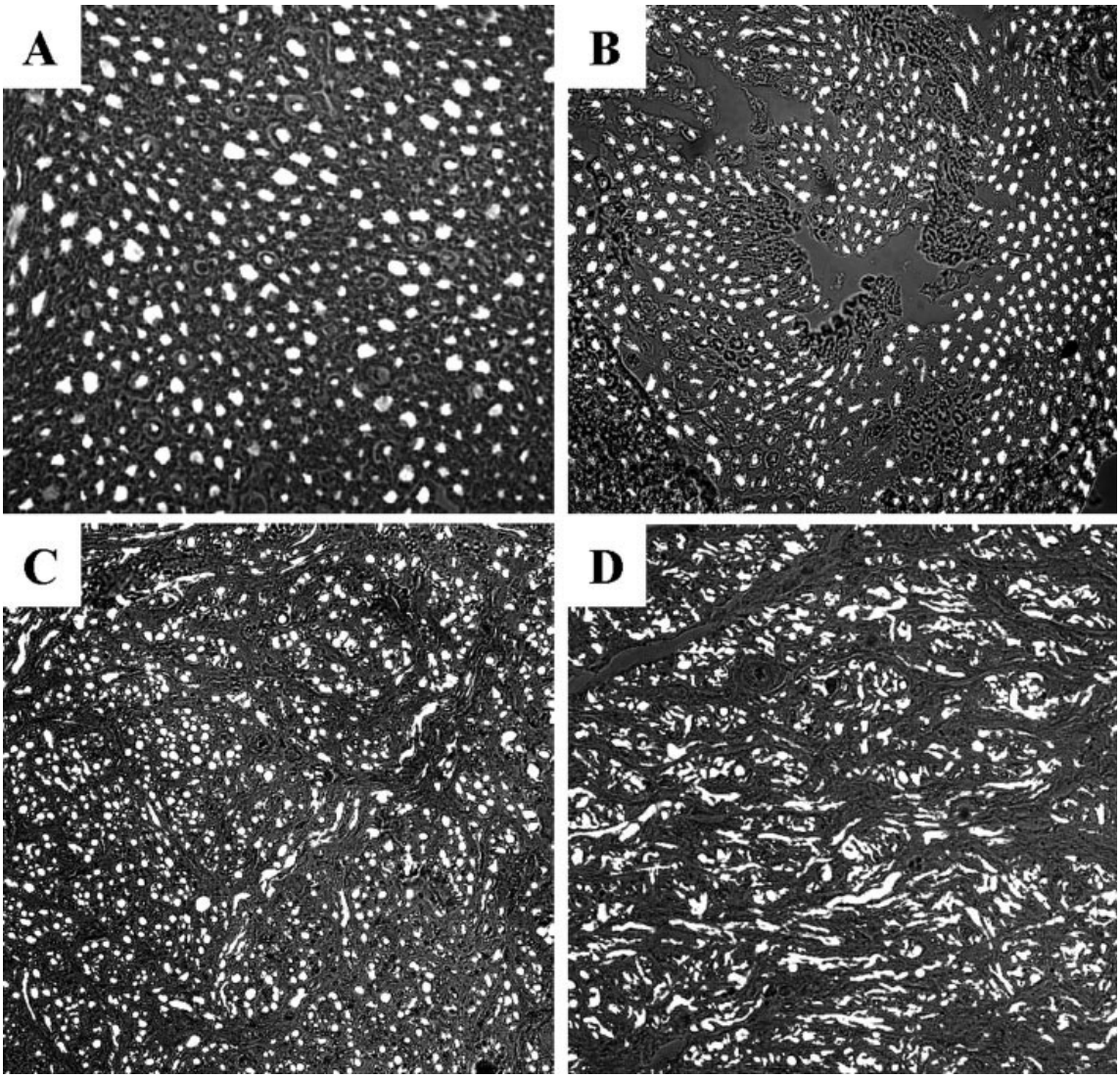


*Figure 6. Confocal imaging after antineurofilament-200 kD immunostaining of normal rat sciatic nerve axons (**A**) and regenerated sciatic nerve axons after termino-terminal suture (**B**), PLGA entubulation (**C**), and Neurolac® entubulation (**D**). Magnification: ×600.*

had to be interrupted at the selected cut off time of 12 s. Nociception recovered significantly along the following weeks [$F_{(11,33)} = 54.065$; $P = 0.000$] except in the gap control group. Two way ANOVA also indicated significant differences between groups in the recovery of nociception [$F_{(3,21)} = 8.270$; $P = 0.001$], with the post hoc test revealing that the end-to-end group differed from the other three groups ($P < 0.05$). At the end of 20 weeks, results of the hotplate test were similar in all four experimental treated groups. In the control, untreated group (Gap Group), no signs of recovery in sensory function were evident along 20 weeks of follow up (Table 2).

Morphological Analysis

Figure 5 shows the results of the morphological analysis carried out by light and electron microscopy at week 20 postoperatively. Light microscope analysis after hematoxylin and eosin (HE) staining disclosed a different pattern of biodegradation of the tube walls between the two entubulation groups. While it was very rarefied in the PLGA group (Fig. 5A), in the Neurolac® group the guide wall was still evident, forming a continuous barrier around the regenerating nerve fibers (Fig. 5D). Electron microscope observation showed that in the PLGA group, the tube wall was substituted by a connective matrix rich in collagen fibers and fibroblasts (Figs. 5B and 5C), while

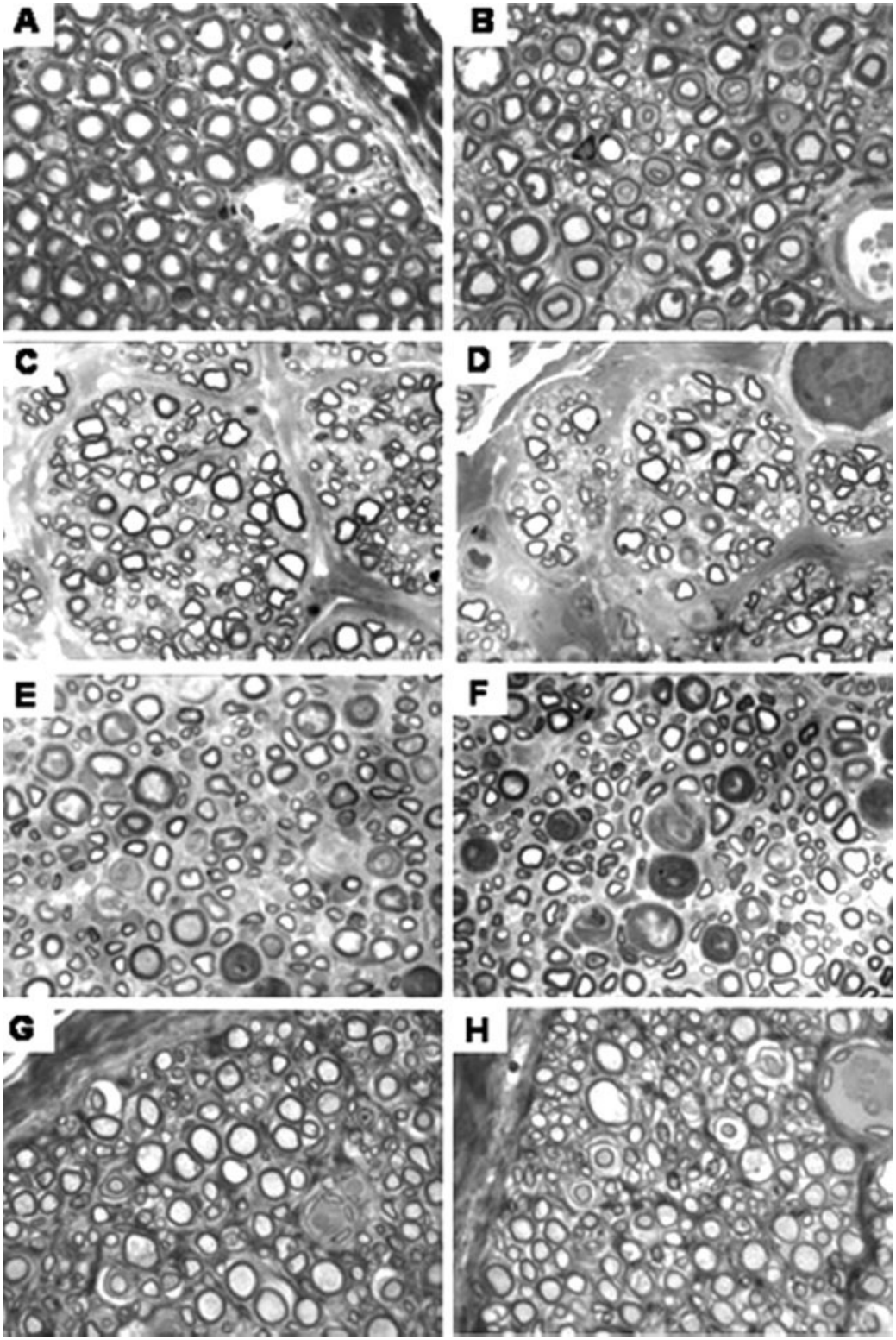


*Figure 7. Representative photomicrographs of semithin sections cut transversely to the main axis of normal nerve fibers (**A**) and regenerated nerve fibers after termino-terminal suture (**B**), PLGA entubulation (**C, D**), Neurolac® entubulation (**E, F**), and autologous nerve graft (**G, H**). Magnification: ×1,500.*

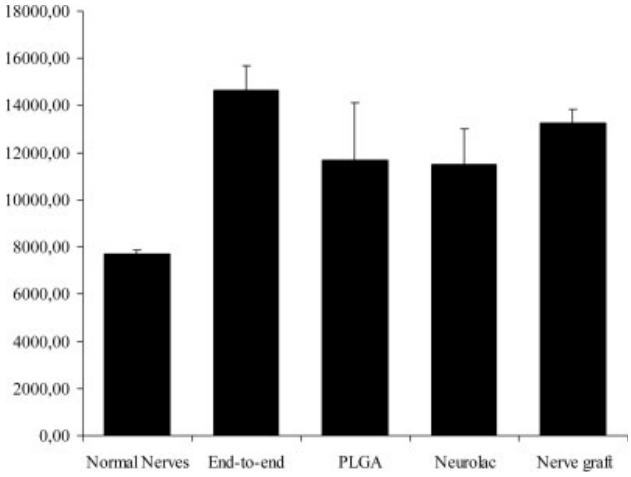


Figure 8. Histogram reporting the total number of regenerated myleinated nerve fibers in the different study groups.

in the Neurolac® group the electrondense structure of the polymer was still well preserved (Figs. 5E and 5F).

Figure 6 shows confocal imaging after anti-neurofilament-200 kD immunostaining. In comparison to normal rat sciatic nerve fibers (Fig. 6A), regenerated nerve fibers were smaller in all experimental groups. The comparison between regenerating axons from nerves repaired by end-to-end suture (Fig. 6B) and from nerves repaired by entubulation with PLGA (Fig. 6C) and Neurolac® (Fig. 6D) nerve guides showed that the quality of nerve fiber regeneration was good in all groups. The main difference was represented by the presence, in the entubulation groups, of smaller fascicles of axons.

Figure 7 shows the high resolution light microscope observation after toluidine blue staining of regenerated nerve fibers in the different study groups. The comparison of PLGA (Figs. 7C and 7D) and Neurolac® (Figs. 7E and 7F) repaired nerves showed the presence of a higher degree of microfasciculation in the former group, which could be attributed to the faster degradation of the conduit wall. The results of the histomorphometrical assessment of the total number of regenerated myelinated nerve fibers are reported in Figure 8. Statistical analysis revealed no significant difference between the four nerve repair groups.

DISCUSSION

The study of peripheral nerve regeneration has been carried out in a number of different experimental models based on the use of nerves from both forelimb and hind limb.[31–34] However, the experimental animal model of choice for many researchers remains the rat sciatic nerve. It provides an inexpensive source of mammalian nervous tissue of identical genetic stock that it is easy to work with and well studied[18] and shows a similar capacity for regeneration in rats and subhuman primates.[35] The rat sciatic nerve is a widely used model for the evaluation of motor as well as sensory nerve function at the same time.[33] One of the most addressed issues in experimental nerve repair research is represented by entubulation.[11,15,16] While early studies were more directed towards biological entubulation,[36,37] recent studies have focused more on synthetic entubulation.[38]

The majority of natural biomaterials used in clinical applications such as hyaluronic acid, collagen, and gelatin are derived from animal sources. In spite of thorough purification methods, these materials bear the inherent risk of transfer of viral diseases and may cause immunological body reactions while synthetic biomaterials are not associated with these risks.[39–41]

In this study, we assessed two types of nerve guides made of a different type of biodegradable synthetic biomaterial, PLGA and Neurolac®. Our data showed that both types of nerve guides are a mean to help in the growth of axons and do not deleteriously interfere with the nerve regeneration process. While the information on the effectiveness of Neurolac® tubes for allowing nerve regeneration was already provided experimentally[17,18,26,42] and with patients,[43] the PLGA tubes with the polymers proportion of 90 PLA/10 PLG used in the present study have never been tested in vivo before.

Results of the comparative functional assessment showed that the differences between the three experimental groups (entubulation and graft groups) were not significant in terms of motor and nociceptive recovery at the end of the 20-week follow-up time. The EPT proposed by Thalhammer et al.[20] to evaluate the motor function in rats is used routinely by veterinarian neurologists to evaluate the nervous system of small domestic animals. This reflex is initiated by a stretching of the spindles in the interosseous muscles and stimulation of sensory receptors of the foot.[44] A steady recovery of motor deficit occurred throughout the 20-week post-surgery period in all treated groups. As expected, the motor recovery in animals of the end-to-end group occurred significantly faster and to a larger extent when compared with the entubulation groups. The graft group also restored its motor function at a higher rate than the two groups where nerve repair utilized the biomaterials, but recovery in these later groups cached up that of the graft group and at the end of 20 weeks time the extent of motor function recovery was similar these three groups. On the other hand, the type of guide tube had no effect on the rate of motor recovery and both were associated with a close to 50% recovery in the EPT performance. Similarly, nociception recovered faster in the end-to-end group, now compared with both entubulation and graft groups. However, at the end of the follow-up period, differences between the

methods for surgically treating the sciatic nerve lesion were no longer found. Moreover, at the end of the 20-week recovery period, the mean latency time was normal in all treated groups (under 4 s). Interestingly, when the nerve is transected and the regenerating axons must bridge a gap, sensory neurons exhibit a faster regenerative pattern than motor neurons.[45]

Morphological analysis showed a different pattern of tube biodegradation between the two entubulation groups. In fact, while in the nerves repaired by Neurolac® guides, the structure of the polymer was still well preserved 20 weeks after surgery, in the nerves repaired by PLGA guides, the polymer was already largely substituted by a connective matrix rich in collagen fibers and fibroblasts which resembles a normal epineurium. Probably related to this difference is the observation that regenerated axons were organized into a higher number fascicles of smaller size in the PLGA group, since the earlier degradation of the conduit walls might have induced an earlier and more evident formation of perineurial scaffolds. In spite of this difference in the organization of regenerating axons, quantitative assessment of the total number of regenerated nerve fibers showed no statistical difference between the two experimental groups in agreement to the results of the motor and sensory functional assessment, which in fact, did not disclose also significant differences between the two entubulation groups.

Therefore it can be concluded that, according to our results, both Neurolac® and PLGA should be considered a good substrate for preparing tubular nerve guides, and none of the two biomaterials proved to be superior to the other. In the experimental conditions used for the present study, it appears that the different pattern of biodegradation does not seem to influence the degree of nerve regeneration. Future studies need to investigate if the same is true also in other experimental models (larger animals) and for longer nerve defects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to gratefully acknowledge the valuable support by Prof. Doutor José Manuel Correia Costa from Laboratório de Parasitologia, Instituto Nacional de Saúde; Dr. Ricardo Jorge (INSRJ), Porto, Portugal; and Dr. Rosette Nogueira from Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia (CHVNG), Vila Nova de Gaia, Portugal.

REFERENCES

1. Kline DG. Spinal nerve root repair after brachial plexus injury. J Neurosurg Spine 2000;93:336–338.
2. Millesi H. Progress in peripheral nerve reconstruction. World J Surg 1990;14:733–747.
3. Madison RD, Archibald SJ, Krarup C. Peripheral nerve injury. In: Cohen IK, Diegelman F, Lindbald WJ, editors. Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. pp 450–487.
4. Lundborg G. Enhancing posttraumatic nerve regeneration. J Peripher Nerv Syst 2002;7:139–140.
5. Hoke A. Mechanisms of disease: What factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? Nat Clin Prac Neurol 2006;2:448–454.
6. Lundborg G. Bridging nerve defects: The role of tissue interpositioning. In: Masquelet AC, Ferreira AC, editors. Severe Traumatic Defects of the Upper Limb. London: Martin Dunitz; 2003. pp 153–167.
7. Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: A review. Neurol Med Chir (Tokyo) 2000;40:187–199.
8. May M. Trauma to the facial nerve. Otolaryngol Clin North Am 1983;16:661–670.
9. Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair, a review. Rev Neurosci 1996;7:47–84.
10. Jensen JN, Tung TH, Mackinnon SE, Brenner MJ, Hunter DA. Use of anti-CD40 ligand monoclonal antibody as antirejection therapy in a murine peripheral nerve allograft model. Microsurgery 2004;24:309–315.
11. Lundborg G. Alternatives to autologous nerve grafts. Handchir Mikrochir Plast Chir 2004;36:1–7.
12. Geuna S, Papalia I, Tos P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: A challenge for neuroscientists coming from an intriguing nerve repair concept. Brain Res Rev 2006;52:381–388.
13. Chen MB, Zhang F, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. Ann Plast Surg 2006;57:462–471.
14. Den Dunnen WFA, Van Wessel R, Pennings AJ, Robinson PH, Van Leeuwen MBM, Schakenraad JM. Long-term evaluation of degradation and foreign body reaction of subcutaneously implanted poly (DL-lactide-ε-caprolactone). J Biomed Mater Sci 1997;36:337–346.
15. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. Annu Rev Biomed Eng 2003;5:293–347.
16. Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biologic and synthetic conduits for sensory nerve repair. Microsurgery 2005;25:258–267.
17. Den Dunnen WFA, Van der Lei B, Schakenraad JM, Stokroos I, Blaauw EH, Bartels H, Pennings AJ, Robinson PH. Poly (DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guides perform better than autologous nerve grafts. Microsurgery 1996;17:348–357.
18. Meek MF, Den Dunnen WFA, Robinson PH, Schakenraad JM. Long-term evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly (DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guide, using walking-track analysis and electrostimulation tests. Microsurgery 1999;19:247–253.
19. Rodrigues JM, Luís AL, Lobato JV, Pinto MV, Lopes MA, Freitas M, Geuna S, Santos JD, Maurício AC. Determination of the intracellular Ca^{2+} concentration in the N1E-115 neuronal cell line in perspective of its use for peripheric nerve regeneration. Biomed Mater Eng 2005;15:455–465.
20. Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershad-Sky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. Anaesthesiology 1995;82:1013–1025.
21. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transaction. Exp Neurol 2001;168:192–195.
22. Masters DB, Berge CB, Dutta SK, Griggs CT, Hu D, Kupsky W, Langer R. Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. Anesthesiology 1993;79:340–346.
23. Hu D, Hu R, Berde CB. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. Anaesthesiology 1997;86:957–965.
24. Campbell JN. Nerve lesions and the generation of pain. Muscle Nerve 2001;24:1261–1273.
25. Shir Y, Zeltser R, Vatine J-J, Carmi G, Belfer I, Zangen A, Overstreet D, Raber P, Seltzer Z. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviours in eight inbred and outbreed rat strains and selection lines. Pain 2001;90:75–82.

26. Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe V, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter D. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. Muscle Nerve 2003;27:706–714.
27. Raimondo S, Nicolino S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, Geuna S. Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. J Comp Neurol 2005;489:249–259.
28. Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmone R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Ann Anat 2000;182:23–34.
29. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. Microsurgery 2004;24:72–76.
30. Geuna S. The revolution of counting "tops": Two decades of the disector principle in morphological research. Microsc Res Tech 2005;66:270–274.
31. Rodriguez FJ, Valero-Cabre A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. Drug Discov Today: Dis Models 2004;1:177–185.
32. Tos P, Calcagni M, Gigo-Benato D, Boux E, Geuna S, Battiston B. Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: Experimental results. Microsurgery 2004;24:459–464.
33. Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. Neurol Res 2004;26:186–194.
34. Papalia I, Tos P, Scevola A, Raimondo S, Geuna S. The ulnar test: A method for the quantitative functional assessment of posttraumatic ulnar nerve recovery in the rat. J Neurosci Methods 2006;154:198–203.
35. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of the nerve regeneration in the rat. Plast Reconstr Surg 1985;75:384–388.
36. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. Prog Neurobiol 1989;33:87–134.
37. Meek MF, Varejão ASP, Geuna S. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: Review of the literature. Tissue Eng 2004; 10:1027–1036.
38. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Seifalian AM. Artificial nerve conduits in peripheral-nerve repair. Biotechnol Appl Biochem 2005; 41:193–200.
39. Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT. Guide neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in stimulated peripheral nerve regeneration. Exp Neurol 1999;158:338–350.
40. Yoshii S, Oka M. Peripherial nerve regeneration along collagen filaments. Brain Res 2001;888:158–162.
41. Meek MF, Jansen K, Steendam R, Van Oeveren W, Van Wachem PB, Luyn MJA. In vitro degradation and biocompatibility of poly (DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guides. J Biomed Mater Res A 2003;68:43–51.
42. Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Fornaro M, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Morphology of nerve fiber regeneration along a biodegradable poly (DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with fresh skeletal muscle. Microsurgery 2003;23:338–345.
43. Bertleff MJ, Meek MF, Nicolai JP. A prospective clinical evaluation of biodegradable Neurolac nerve guides for sensory nerve repair in the hand. J Hand Surg [Am] 2005;30:513–518.
44. Oliver JE, Mayhew IG. Neurologic examination and the diagnostic plan. In: Oliver JE, Hoerlein BF, Mayhew IG, editors. Veterinary Neurology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1987. pp 7–56.
45. Madorsky SJ, Swett JE, Crumley RL. Motor versus sensory neuron regeneration through collagen tubules. Plast Reconstr Surg 1998;102: 430–436.

2.3. ARTIGO 4

TISSUE ENGINEERING (2008) (*In press*)

USE OF PLGA 90:10 SCAFFOLDS ENRICHED WITH IN VITRO-DIFFERENTIATED NEURONAL CELLS FOR REPAIRING RAT SCIATIC NERVE DEFECTS

TISSUE ENGINEERING: Part A
Volume 14, Number 6, 2008
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tea.2007.0273

Use of PLGA 90:10 Scaffolds Enriched with *In Vitro*–Differentiated Neural Cells for Repairing Rat Sciatic Nerve Defects

ANA L. LUÍS,[1,2,*] JORGE M. RODRIGUES,[1,2,*] STEFANO GEUNA, M.D.,[3] SANDRA AMADO,[4] YUKI SHIROSAKI,[5,6] JENNIFER M. LEE,[3] FEDERICA FREGNAN,[3] MARIA A. LOPES,[5] ANTONIO P. VELOSO, Ph.D.,[4] ANTONIO J. FERREIRA, D.V.M.,[7] JOSE D. SANTOS, Ph.D.,[4] PAULO A.S. ARMADA-DA-SILVA, Ph.D.,[4] ARTUR S.P. VAREJÃO, Ph.D.,[8] and ANA COLETTE MAURÍCIO, Ph.D.[1,2]

ABSTRACT

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nerve tube guides, made of a novel proportion (90:10) of the two polymers, poly(L-lactide): poly(glycolide) and covered with a neural cell line differentiated *in vitro*, were tested *in vivo* for promoting nerve regeneration across a 10-mm gap of the rat sciatic nerve. Before *in vivo* testing, the PLGA 90:10 tubes were tested *in vitro* for water uptake and mass loss and compared with collagen sheets. The water uptake of the PLGA tubes was lower, and the mass loss was more rapid and higher than those of the collagen sheets when immersed in phosphate-buffered saline (PBS) solution. The pH values of immersing PBS did not change after soaking the collagen sheets and showed to be around 7.4. On the other hand, the pH values of PBS after soaking PLGA tubes decreased gradually during 10 days reaching values around 3.5. For the *in vivo* testing, 22 Sasco Sprague adult rats were divided into four groups—group 1: gap not reconstructed; group 2: gap reconstructed using an autologous nerve graft; group 3: gap reconstructed with PLGA 90:10 tube guides; group 4: gap reconstructed with PLGA 90:10 tube guides covered with neural cells differentiated *in vitro*. Motor and sensory functional recovery was evaluated throughout a healing period of 20 weeks using sciatic functional index, static sciatic index, extensor postural thrust, withdrawal reflex latency, and ankle kinematics. Stereological analysis was carried out on regenerated nerve fibers. Both motor and sensory functions improved significantly in the three experimental nerve repair groups, although the rate and extent of recovery was significantly higher in the group where the gap was reconstructed using the autologous graft. The presence of neural cells covering the inside of the PLGA tube guides did not make any difference in the functional recovery. By contrast, morphometric analysis showed that the introduction of N1E-115 cells inside PLGA 90:10

[1]Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA), Universidade do Porto, Vairão, Portugal.
[2]Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal.
[3]Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, Orbassano, Torino, Italy.
[4]Faculdade de Motricidade Humana (FMH), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Estrada da Costa, Cruz Quebrada, Dafundo, Portugal.
[5]Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Secção de Materiais, DEMM, Porto, Portugal.
[6]Biomaterials Lab, Graduate School of Natural Sciences and Technology, Okayama University, Okayama, Japan.
[7]Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Avenida da Universidade Técnica, Lisboa, Portugal.
[8]Departamento de Ciências Veterinárias, CITAB, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal.
*These authors contributed equally to this work.

tube guides led to a significant lower number and size of regenerated nerve fibers, suggesting thus that this approach is not adequate for promoting peripheral nerve repair. Further studies are warranted to assess the role of other cellular systems as a foreseeable therapeutic strategy in peripheral nerve regeneration.

INTRODUCTION

THE TREATMENT OF PERIPHERAL NERVE INJURIES is still one of the most challenging tasks in neurosurgery, as functional recovery is rarely satisfactory in these patients.[1–5] While direct nerve suturing is the procedure of choice whenever is possible, in case of loss of substance, a nerve autograft procedure, using commonly expendable sensory nerves, is required.[6,7] However, nerve autograft repair leads to donor site morbidity and secondary sensory deficit.[8] Alternatives to peripheral nerve grafts include cadaver nerve segment allografts, end-to-side neurorraphy, and entubulation by means of autologous nonnervous tissues such as vein and muscles.[9–15] Entubulation nerve repair has been investigated extensively by our research group over the last years.[16–19] Nerve guides can be made of biological or synthetic materials, and among the latter, both nonabsorbable (e.g., silicon) and biodegradable tubes have been used.[15] One possible advantage of biodegradable nerve guides is that no foreign body material will be left in the host after the device has fulfilled its task. Our group has recently tested both *in vitro* and *in vivo* the efficacy of synthetic biodegradable tubes made of PLGA in a 90:10 proportion of the two polymers, poly(L-lactide):poly(glycolide) (PLA:PLG).[20,21] The biodegradation rate of PLGA is controlled by the monomer ratio, molecular weight, and crystallinity, and may vary from weeks to months, depending on the proportion between the two polymers, PLA:PLG. The degradation products of PLGA are more acidic when compared to collagen, which may cause some damage to the surrounding tissue. On the other hand, the biodegradable nonwoven structure of PLGA tubes may offer some advantages in terms of microporosity, which may enhance nerve repair.[14] Synthetic biodegradable tubes of PLGA were used to bridge the nerve gaps and guide growing nerve fibers in this study. These nerve guides can have unlimited availability in terms of diameters and lengths. In this study, a PLA:PLG ratio of 90:10 was used, since it has been established that with this compositional range, nerve tubes resorption is almost completed after 12 weeks of implantation approximately.[22] Indeed, such high proportion of PLA used in the copolymer reduces the degradation rate of PLGA and maintains the tube-guide structural strength for a longer period of time. The maintenance of the tube structure may also be an important factor to support growth factor–producing cells as a cellular aid to nerve repair.[20,21]

The role of neurotrophic factors in neural regeneration has been the focus of extensive research.[15,23,24] The influence of these factors in neural development, survival, outgrowth, and branching has been explored on various levels, from the molecular level to the macroscopic tissue responses. Neurotrophic factors promote a variety of neural responses, like the survival and outgrowth of the motor and sensory nerve fibers, and are implicated in spinal cord and peripheral nerve regeneration.[15,25–27] However, *in vivo*, the efficacy of neurotrophic factors might vary greatly due to the method used for their delivering, and it is thus important to deliver them near the regenerating site. In this view, association of a cellular system producing neurotrophic factors to biodegradable nerve conduits may greatly improve the nerve regeneration in neurotmesis.[15] N1E-115 cell line established from a mouse neuroblastoma[28] might be a useful cellular system to locally produce and deliver these neurotrophic factors.[20,21] *In vitro*, the N1E-115 cells undergo neuronal differentiation in response to dimethylsulfoxide (DMSO), adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate, or serum withdrawal.[29–34] Upon induction of differentiation, proliferation of N1E-115 cells ceases, extensive neurite outgrowth is observed, and the membranes become highly excitable.[20,21,29–34] The ideal interval period of 48 h of differentiation was determined by measurement of the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), when the N1E-115 cells presented already the morphological characteristics of neuronal cells, but at a time, cell death due to increased $[Ca^{2+}]_i$ was not still occurring.[20,21]

The present study aimed to use the rat sciatic nerve as a model for peripheral nerve reconstruction over a 10-mm gap in order to compare the efficacy of PLGA 90:10 tube guides either alone or covered with N1E-115 cells *in vitro* predifferentiated in the presence of DMSO for 48 h.[20,21]

MATERIALS AND METHODS

Tube-guide design and preparation

Poly (DL-lactide-co-glycolide) copolymers with ratio of 90PLA:10PLG were obtained from their cyclic dimmers, DL-lactide and glycolide. Nonwoven constructs were used to prepare tube guides 16 mm long, internal diameter of 2.0 mm, and thickness wall of 1.5 mm. These fully synthetic nonwoven materials are extremely flexible, biologically safe, and are able to sustain the compressive forces due to body movement after implantation. They have also some degree of porosity to allow for influx of low molecular nutrients required for nerve regeneration. The nonwoven structure allowed for the conduit to hold suture without difficulties; however, greater care had to be taken in order to ensure the integrity of the conduit. These tube

guides of PLGA are expected to degrade to lactic and glycolic acids through hydrolysis of the ester bonds.

PLGA water uptake and mass loss

The PLGA 90:10 tubes and the equine collagen type III membranes (GentaFleece®; Baxter, Nuremberg, Germany) were soaked in phosphate-buffered saline aqueous solution (PBS, pH 7.4) for different periods of time at 37°C. After soaking, the tubes were removed from PBS solution and weighed immediately, and then freeze-dried until constant weight was reached ($n = 3$). The percent water uptake of the tubes was calculated according to Equation 1, where W_d and W_w stand for the weights of dry and wet tubes, respectively, measured at different time periods.

$$\text{Water uptake } (\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \qquad (1)$$

The percent mass loss was calculated according to Equation 2, where M_0 and M_d are, respectively, the initial and the final dry mass after soaking in PBS at different time periods.

$$\text{Weight loss } (\%) = \frac{M_o - M_d}{M_o} \times 100 \qquad (2)$$

The pH values for the immersing PBS were also measured at 37°C at different time periods.

Cell culture

N1E-115 cells are clones of cells derived from the mouse neuroblastoma C-1300.[28] These cells retain numerous biochemical, physiological, and morphological properties of differentiated neuronal cells in culture.[35] N1E-115 neuronal cells were cultured in Petri dishes (around 2×10^6 cells) inside the PLGA 90:10 nerve guides at 37°C and 5% carbon dioxide in an humidified atmosphere with 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Gibco). The culture medium was changed every 48 h, and the Petri dishes were observed daily in an inverted microscope (Zeiss, Jena, Germany). The cells were passed or were supplied with differentiation medium containing 1.5% of DMSO once they reached approximately 80% confluence, mostly 48 h after plating (and before the rats' surgery). The differentiation medium was composed of 96% DMEM supplemented with 2.5% of FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 1.5% of DMSO.[20,21]

Surgical procedure

Adult male Sasco Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing 300–350 g, divided into four groups of six animals each (except group 1, the Gap group, with four animals), were used. All animals were housed in a temperature- and humidity-controlled room with 12–12 h light/dark cycles, two animals per cage (Makrolon type 4; Tecniplast, VA, Italy), and were allowed normal cage activities under standard laboratory conditions. The animals were fed with standard chow and water *ad libitum*. Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort taking into account human endpoints for animal suffering and distress. Animals were housed for 2 weeks before entering the experiment.

For surgery, rats were placed prone under sterile conditions and the skin from the clipped lateral right thigh scrubbed in a routine fashion with antiseptic solution. The surgeries were performed under an M-650 operating microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Under deep anesthesia (ketamine 9 mg/100 g; xylazine 1.25 mg/100 g, atropine 0.025 mg/100 body weight, intramuscular), the right sciatic nerve was exposed through a skin incision extending from the greater trochanter to the midhalf distally followed by a muscle-splitting incision. After nerve mobilization, a transection injury was performed (neurotmesis) using straight microsurgical scissors. The nerve was injured at a level as low as possible, in general, immediately above the terminal nerve ramification. In group 1 (Gap), the injured nerve was left unrepaired. In groups 2 (PLGA) and 3 (PLGACell), the proximal and distal nerve stumps were inserted 3 mm into the PLGA tube guides (simple and covered with N1E-115 cells *in vitro* differentiated, respectively) and held in place, maintaining a nerve gap of 10 mm, with two epineurial sutures using 7/0 monofilament nylon, respectively (Fig. 1). In group 4 (Graft), the sciatic nerve was transected immediately above the terminal nerve ramification and in a 10-mm distal point. The nerve graft obtained, with a length of 10 mm, was

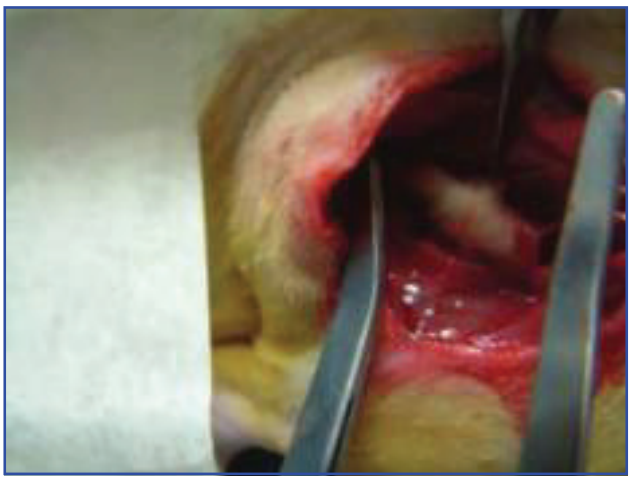


FIG. 1. Under intramuscular anesthesia, the right sciatic nerve was exposed; after nerve mobilization, it was performed a transection injury. The level of injury was as low as possible, in general, just above the terminal nerve ramification. In two groups, the nerve was reconstructed using PLGA 90:10 tube guides, one group without any cellular system and another group with N1E-115 cells *in vitro* differentiated covering the inside diameter of the tube guides. Color images available online at www.liebertpub.com/ten.

inverted 180° and sutured with 7/0 monofilament nylon. Opposite leg and sciatic nerve were left intact in all groups and served as control for normal nerves. One animal of group 2 died in the postoperatory and was replaced by another animal operated on immediately after its death.

To prevent autotomy, a deterrent substance was applied to rats' right foot.[36,37] The animals were intensively examined for signs of autotomy and contracture during the postoperative and none presented severe wounds, infections, or contractures.

All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of Portugal in accordance with the European Communities Council Directive of November 1986 (86/609/EEC).

Evaluation of motor performance (EPT) and nociceptive function (WRL)

Motor performance and nociceptive function were evaluated by measuring extensor postural thrust (EPT) and withdrawal reflex latency (WRL), respectively. The animals were tested preoperatively (week 0), at weeks 1 and 2, and every 2 weeks thereafter until week 20. The animals were gently handled, and tested in a quiet environment to minimize stress levels. The EPT was originally proposed by Thalhammer *et al.*[38] as a part of the neurological recovery evaluation in the rat after sciatic nerve injury. For this test, the entire body of the rat, excepting the hindlimbs, was wrapped in a surgical towel. Supporting the animal by the thorax and lowering the affected hindlimb toward the platform of a digital balance, the EPT was elicited. As the animal is lowered to the platform, it extends the hindlimb, anticipating the contact made by the distal metatarsus and digits. The force in grams (g) applied to the digital platform balance (model TM 560; Gibertini, Milan, Italy) was recorded. The same procedure was applied to the contralateral, unaffected limb. Each EPT test was repeated three times, and the average result was considered. The normal (unaffected limb) EPT (NEPT) and experimental EPT (EEPT) values were incorporated into an equation (Eq. 3) to derive the percentage of functional deficit, as described by Koka and Hadlock.[39]

$$\text{Motor deficit} = \frac{\text{NEPT} - \text{EEPT}}{\text{NEPT}} \tag{3}$$

To assess the nociceptive withdrawal reflex (WRL), the hot-plate test was modified as described by Masters *et al.*[40] The rat was wrapped in a surgical towel above its waist and then positioned to stand with the affected hind paw on a hot plate at 56°C (model 35-D; IITC Life Science Instruments, Woodland Hill, CA). WRL is defined as the time elapsed from the onset of hot-plate contact to withdrawal of the hind paw and measured with a stopwatch. Normal rats withdraw their paws from the hot plate within 4.3 s or less.[41] The affected limbs were tested three times, with an interval of 2 min between consecutive tests to prevent sensitization, and the three latencies were averaged to obtain a final result.[42,43] If there was no paw withdrawal after 12 s, the heat stimulus was removed to prevent tissue damage, and the animal was assigned the maximal WRL of 12 s.[16]

Sciatic functional index and static sciatic index

For sciatic functional index (SFI), animals were tested in a confined walkway measuring 42 cm long and 8.2 cm wide, with a dark shelter at the end. A white paper was placed on the floor of the rat-walking corridor. The hind paws of the rats were pressed down onto a finger paint-soaked sponge, and they were then allowed to walk down the corridor leaving its hind footprints on the paper. Often, several walks were required to obtain clear print marks of both feet. Prior to any surgical procedure, all rats were trained to walk in the corridor, and a baseline walking track was recorded. Subsequently, walking tracks were recorded preoperatively (week 0), at weeks 1 and 2, and every 2 weeks thereafter until week 20. Several measurements were taken from the footprints: (i) distance from the heel to the third toe, the print length (PL); (ii) distance from the first to the fifth toe, the toe spread (TS); and (iii) distance from the second to the fourth toe, the intermediary toe spread (ITS). The static footprints were obtained at least during four occasional rest periods. In the static evaluation (static sciatic index [SSI]), only the parameters TS and ITS were measured. For both dynamic (SFI) and static assessment (SSI), all measurements were taken from the experimental and normal sides. Four steps were analyzed per rat. Prints for measurements were chosen at the time of walking based on clarity and completeness at a point when the rat was walking briskly. The mean distances of three measurements were used to calculate the following factors (dynamic and static):

$$\text{Toe spread factor (TSF)} = \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}}$$

$$\text{Intermediate toe spread factor (ITSF)} = \frac{\text{EITS} - \text{NITS}}{\text{NITS}}$$

$$\text{Print length factor (PLF)} = \frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}}$$

In the above equations, the capital letters E and N indicate injured and noninjured side, respectively.

The SFI was calculated as described by Bain *et al.*[44] according to the following equation:

$$\begin{aligned}\text{SFI} = & -38.3\left(\frac{EPL - NPL}{NPL}\right) + 109.5\left(\frac{ETS - NTS}{NTS}\right) \\ & + 13.3\left(\frac{EIT - NIT}{NIT}\right) - 8.8 \\ = & (-38.3 \times \text{PLF}) + (-109.5 \times \text{TSF}) \\ & + (-13.3 \times \text{ITSF}) - 8.8\end{aligned} \tag{4}$$

The SSI is a time-saving and easy technique for accurate functional assessment of peripheral nerve regeneration in rats and is calculated using the static factors, not considering the PLF, according to the equation[45]:

$$SSI = (108.44 \times TSF) + (31.85 \times ITSF) - 5.49 \quad (5)$$

For both SFI and SSI, an index score of 0 is considered normal and an index of −100 indicates total impairment. When no footprints were measurable, the index score of −100 was given.[46] Reproducible walking tracks could be measured from all rats. In each walking track, three footprints were analyzed by a single observer, and the average of the measurements was used in SFI calculations.

Stereological and electron microscope analysis

A 10-mm-long segment of the sciatic nerve distal to the site of lesion was removed, fixed, and prepared for quantitative morphometry of myelinated nerve fibers. A 10-mm segment of uninjured sciatic nerve was also withdrawn from the six control animals (normal animals N1–N6). Sciatic nerve segments were immersed immediately in a fixation solution, containing 2.5% purified glutaraldehyde and 0.5% saccarose in 0.1 M Sorensen phosphate buffer for 6–8 h. Specimens were then washed in a solution containing 1.5% saccarose in 0.1 M Sorensen phosphate buffer, postfixed in 1.5% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Glauerts' embedding mixture of resins consisting in equal parts of Araldite M and the Araldite Härter, HY 964 (Merck, Darmstad, Germany), to which was added 1–2% of the accelerator 964, DY 064 (Merck). The plasticizer dibutyl phthalate was added in a quantity of 0.5%. Series of 2-μm-thick semithin transverse sections were cut using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems) and stained by Toluidine blue for stereological analysis of regenerated nerve fibers. For high-resolution light microscopy examination, 0.5-μm-thick sections were cut and stained by Toluidine blue. Finally, transmission electron microscopy was also carried out on ultrathin sections (50–90 nm) stained with saturated aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate. Ultrathin sections were analyzed using a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) equipped with a Mega-View-III digital camera and a Soft-Imaging-System (SIS, Münster, Germany) for the computerized acquisition of the images.

For stereological quantitative analysis, we used a DM4000B microscope equipped with a DFC320 digital camera and an IM50 image manager system (Leica Microsystems). This system reproduced microscopic images (obtained through a 100× oil-immersion objective) on the computer monitor at a magnification adjusted by a digital zoom. The final magnification was 6600×, enabling accurate identification and morphometry analysis of myelinated nerve fibers. One semithin section from each nerve was randomly selected and used for the morphoquantitative analysis. The total cross-sectional area of the nerve was measured, and sampling fields were then randomly selected using a protocol previously described.[47,48] Possible "edge effects" were compensated by employing a two-dimensional dissector procedure, which is based on sampling the "tops" of fibers.[49,50] Mean fiber density was calculated by dividing the total number of nerve fibers within the sampling field by its area (N/mm^2). Total fiber number (N) was then estimated by multiplying the mean fiber density by the total cross-sectional area of the whole nerve cross section, assuming a uniform distribution of nerve fibers across the entire section. Two-dimensional dissector probes were also used for the unbiased selection of a representative sample of myelinated nerve fibers for estimating circle-fitting diameter and myelin thickness. Precision and accuracy of the estimates was evaluated by calculating the coefficient of variation (CV = SD/mean) and coefficient of error (CE = SEM/mean).[47,48]

Kinematic analysis

Ankle kinematics and stance duration analysis were carried out prior to nerve injury, at week 2 and every 4 weeks during the 20-week follow-up period. Animals walked on a Perspex track with length, width, and height of, respectively, 120, 12, and 15 cm. In order to ensure locomotion in a straight direction, the width of the apparatus was adjusted to the size of the rats during the experiments, and a darkened cage was connected at the end of the corridor to attract the animals. The rats' gait was video recorded at a rate of 100/120 images per second (JVC GR-DVL9800, Wayne, NJ). The camera was positioned at the track's half-length where gait velocity was steady, and 1 m distant from the track, thus obtaining a visualization field of 14-cm wide. Only walking trials with stance phases lasting between 150 and 400 ms were considered for analysis, since this corresponds to the normal walking velocity of the rat (20–60 cm/s).[17] The video images were stored in a computer hard disk for latter analysis using an appropriate software APAS® (Ariel Performance Analysis System; Ariel Dynamics, San Diego, CA). Two-dimensional biomechanical analysis (sagittal plan) was carried out applying a two-segment model of the ankle joint, adopted from the model first developed by Varejão and collaborators.[16,17,22,51] Skin landmarks were tattooed at points in the proximal edge of the tibia, in the lateral malleolus, and in the fifth metatarsal head. The rats' ankle angle was determined using the scalar product between a vector representing the foot and a vector representing the lower leg. With this model, positive and negative values of position of the ankle joint (θ°) indicate dorsiflexion and plantarflexion, respectively. For each stance phase, the following time points were identified: initial contact (IC), opposite toe-off (OT), heel-rise (HR), and toe-off (TO).[16,17,22,51] They were then time normalized for 100% of the stance phase. The normalized temporal parameters were averaged over all recorded trials. Angular velocity of the ankle joint ($\Omega\ ^\circ/s$) was also determined, where $\Omega < 0^\circ/s$ corresponds to

dorsiflexion. A total of four steps was analyzed for each animal.[22]

Statistical analysis

Two-way mixed factorial ANOVA was used to test for the effect of time (within subjects effect; 12 time points) and experimental group (between subjects effect, three groups). The sphericity assumption was evaluated by the Mauchly's test, and whenever this test was not computed or sphericity could not be assured, the degrees of freedom were corrected by using the more conservative Greenhouse–Geiser's epsilon. In the cases, two-way ANOVA revealed the existence of a significant main effect of time (within subjects factor); simple planned contrasts (General Linear Model, simple contrasts) were then employed to compare pooled data across the three experimental groups along the recovery period to data obtained before the nerve transection. If two-way mixed factorial ANOVA analysis identified a significant effect of experimental group (between subjects factor), the *post hoc* HSD Tukey's test was applied for paired comparisons. Kinematic analysis before the sciatic transection was performed only on PLGA group. Therefore, the kinematic data of this group were first analyzed separately by one-way ANOVA for repeated measures (within subjects effect, seven time points) with differences between pooled data on each week of recovery and data at baseline tested by simple planned contrasts. Thereafter, two-way mixed factorial ANOVA was carried out as described above now including all groups although considering only data from the 20-week recovery period (within subjects factor, six time points; between subjects factor, three groups). For stereology, statistical comparisons of quantitative data were subjected to one-way ANOVA test. Statistical significance was established as $p < 0.05$. All statistical procedures were performed by using the statistical package SPSS (version 14.0; SPSS, Chicago, IL) except stereological data that were analyzed using the software "Statistica per discipline biomediche" (McGraw-Hill, Milan, Italy). All data in this study are presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

RESULTS

PLGA biodegradation

Figure 2 shows the fluid uptake of the PLGA tubes and the equine collagen type III membranes immersed in PBS for 72 h. Liquid uptake by the PLGA tubes and collagen sheets occurred rapidly in the first 24 h and then stabilized until the end of the 72 h. Fluid uptake of the collagen sheets was three- to fourfold higher than in PLGA tubes. For PLGA, mass loss after 14 and 21 days for PLGA was 83.0% and 93.5%, respectively, whereas collagen sheets lost was only 44.9% and 46.2% of their mass during that period of time.

Figure 3 presents changes in the PBS solution pH over time of soaking. Reflecting the chemical nature of PLGA,

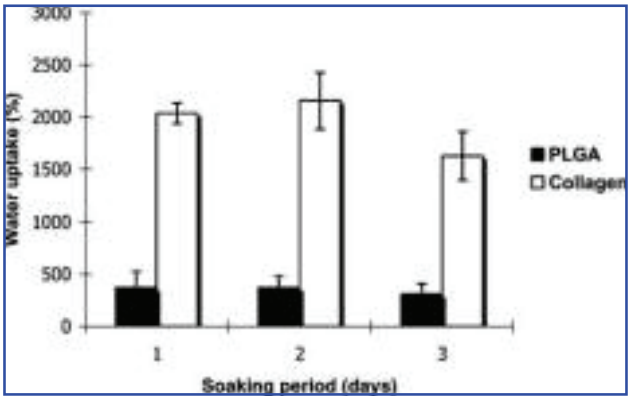


FIG. 2. Water uptake (%) of PLGA tubes and collagen sheets as a function of the period of soaking in PBS at a constant temperature of 37°C. Error bars indicate the standard error of the mean.

its rapid degradation during the first 2 weeks significantly decreased the pH of the immersing PBS solution (pH 3.5). In contrast, pH of the collagen sheets immersing solution did not change (pH 7.4).

Motor deficit and nociception function

Motor deficit (EPT). Table 1 presents the results of motor deficit derived from EPT measures. Sciatic nerve transection caused a severe motor deficit. At week 1 postsurgery, all rats in the three groups presented severe loss of hindlimb extension force. However, two-way ANOVA indicated significant differences between the three groups in motor deficit [$F_{(2,15)} = 45.787$; $p < 0.000$]. *Post hoc* analysis shows that the differences in motor deficit between the three groups were significant, indicating faster recovery in the PLGACell group, comparing to the other two groups ($p < 0.05$). Planned contrasts on the interaction effect (week × group) show that differences between the experimental groups started to be significant from week 6 until week 20 ($p < 0.05$). At the end of follow-up, motor deficit was 0.36 ± 0.07, 0.50 ± 0.1, and 0.52 ± 0.03 for group 3 (PLGACell), group 2 (PLGA), and group 4 (Graft), respectively ($p < 0.05$). In group 1

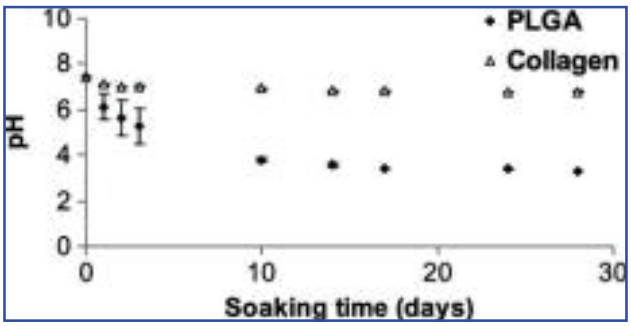


FIG. 3. pH of the PLGA and collagen tubes immersing PBS as a function of the soaking period at a constant temperature of 37°C.

TABLE 1. RESULTS OF THE EXTENSOR POSTURAL THRUST (EPT) TEST

Group	*Week 0*	*Week 1*	*Week 2*	*Week 4*	*Week 6*	*Week 8*	*Week 10*	*Week 12*	*Week 14*	*Week 16*	*Week 18*	*Week 20*
Gap	0.08 ± 0.01	0.93 ± 0.04	0.91 ± 0.01	0.90 ± 0.02	0.98 ± 0.09	0.91 ± 0.05	0.98 ± 0.02	0.88 ± 0.06	0.86 ± 0.04	0.88 ± 0.07	0.91 ± 0.06	0.91 ± 0.04
Graft	0.03 ± 0.07	0.90 ± 0.04	0.89 ± 0.03	0.85 ± 0.05	0.77 ± 0.01	0.72 ± 0.06	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.03	0.60 ± 0.09	0.53 ± 0.08	0.54 ± 0.03	0.52 ± 0.03
PLGA	0.08 ± 0.01	0.93 ± 0.06	0.86 ± 0.10	0.86 ± 0.09	0.85 ± 0.05	0.84 ± 0.08	0.81 ± 0.07	0.79 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.70 ± 0.10	0.67 ± 0.12	0.55 ± 0.07
PLGACell	0.03 ± 0.06	0.92 ± 0.06	0.84 ± 0.04	0.89 ± 0.03	0.87 ± 0.02	0.75 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.55 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.39 ± 0.06	0.36 ± 0.07

Values of motor deficit were obtained performing EPT test. This test has been performed preoperatively (week 0), at week 1, and every 2 weeks after the surgical procedure until week 20, when the animals were sacrificed for morphological analysis. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). *N* corresponds to the number of rats within the experimental group. In group 1 (Gap), the nerve with neurotmesis was left unrepaired. In groups 2 (PLGA) and 3 (PLGACell), the proximal and distal nerve stumps were inserted 3 mm into the PLGA tube guides (simple and covered with N1E-115 cells *in vitro* differentiated, respectively) and held in place, maintaining a nerve gap of 10 mm. In group 4 (Graft), the sciatic nerve was transected immediately above the terminal nerve ramification and in a 10-mm distal point. The nerve graft obtained, with a length of 10 mm, was inverted 180° and sutured with 7/0 monofilament nylon. Opposite leg and sciatic nerve were left intact in all groups and served as control for normal nerves. All groups $n = 6$.

TABLE 2. RESULTS OF THE WITHDRAWAL REFLEX LATENCY (WRL) TEST

Group	*Week 0*	*Week 1*	*Week 2*	*Week 4*	*Week 6*	*Week 8*	*Week 10*	*Week 12*	*Week 14*	*Week 16*	*Week 18*	*Week 20*
GAP	1.8 ± 0.50	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00
Graft	1.8 ± 0.40	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	6.7 ± 2.94	5.5 ± 2.35	4.0 ± 1.55	3.8 ± 1.60	3.3 ± 0.42	3.3 ± 0.21
PLGA	1.7 ± 0.52	12 ± 0.00	12 ± 0.00	8.5 ± 4.46	8.8 ± 4.22	8.8 ± 3.71	5.5 ± 4.46	7.3 ± 3.08	6.7 ± 3.33	5.8 ± 4.12	5.3 ± 1.86	3.8 ± 1.72
PLGACell	1.7 ± 0.52	12 ± 0.00	12 ± 0.00	12 ± 0.00	10.7 ± 2.07	9.2 ± 3.37	8.5 ± 2.43	6.3 ± 1.21	4.0 ± 1.55	4.1 ± 3.20	5.5 ± 3.27	5.0 ± 3.69

Values in seconds (s) were obtained performing WRL test to evaluate the nociceptive function. This test has been performed preoperatively (week 0), at week 1, and every 2 weeks after the surgical procedure until week 20, when the animals were sacrificed for morphological analysis. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). *N* corresponds to the number of rats within the experimental group. In group 1 (Gap), the nerve with neurotmesis was left unrepaired. In groups 2 (PLGA) and 3 (PLGACell), the proximal and distal nerve stumps were inserted 3 mm into the PLGA tube guides (simple and covered with N1E-115 cells *in vitro* differentiated, respectively) and held in place, maintaining a nerve gap of 10 mm. In group 4 (Graft), the sciatic nerve was transected immediately above the terminal nerve ramification and in a 10-mm distal point. The nerve graft obtained, with a length of 10 mm, was inverted 180° and sutured with 7/0 monofilament nylon. Opposite leg and sciatic nerve were left intact in all groups and served as control for normal nerves. All groups $n = 6$.

Ana Lúcia Emídia de Jesus Luís – ICBAS - UP

(Gap), there was no recovery of the motor deficit along the healing period, and at week 20, mean motor deficit was 0.91 ± 0.04.

Nociception function (WRL). Table 2 depicts the data for the WRL tests. In the first week postsurgery, all animals presented severe loss of sensory function and all tests had to be interrupted at the selected cutoff time of 12 s. Nociception function at week 20 was completely recovered in all three groups [$F_{(11,1659)} = 64{,}909$; $p < 0.000$] (PLGA, PLGACell, and Graft groups) (main effect of group, nonsignificant). Group means for WRL at week 20 were between 5 and 3.3 s, in the range of normal clinical values.[41] In the Gap group, there was no recovery of the WRL along the healing period, and at week 20 was still 12 s (cutoff time).

SFI and SSI. SFI and SSI were evaluated only in a small number of animals, and these data were analyzed only qualitatively. SFI at week 0 (preoperative) ranged between -7.4 ± 5.4 (Gap group, $n = 4$) and -14.7 ± 2.6 (PLGACell group, $n = 6$). At week 1, SFI became strongly negative, indicating a profound impairment in foot and toes ground contact. At this time point, SFI values varied between -62.9 ± 4.2 (PLGACell group, $n = 6$) and -83.2 ± 2.2 (Graft group, $n = 6$). At the end of the follow-up, SFI values remained highly negative, indicating a modest recovery of the foot placement after neurotmesis. At week 20, SFI values varied between -62.3 ± 2.3 (PLGA group, $n = 5$) and -82.5 ± 4.3 (Gap group, $n = 4$). Changes in SSI were similar to those observed for SFI. At week 20, SSI values varied between -53.6 ± 4.4 (PLGACell group, $n = 3$) and -76.6 ± 4.9 (Gap group, $n = 4$).

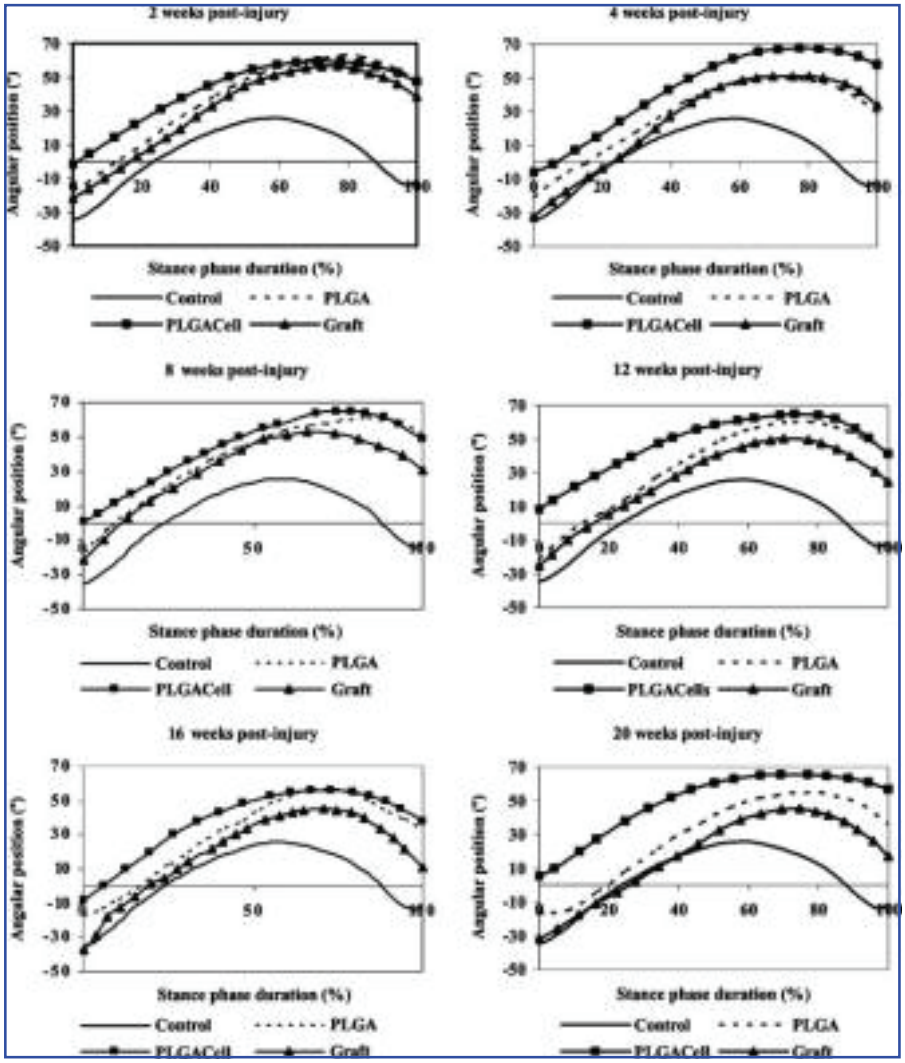


FIG. 4. Kinematics plots in the sagittal plane for the angular position (°) of the ankle as it moves through the stance phase. The mean of each group is plotted. (—) PLGA group at baseline (showed for illustration of normal pattern); (---) group 2 (PLGA); (■) group 3 (PLGACell); (▲) group 1 (Graft).

TABLE 3. RESULTS OF ANKLE KINEMATICS ANALYSIS: ANKLE ANGULAR (θ) POSITION

Temporal parameter	*Group*	*Week 0*	*Week 2*	*Week 4*	*Week 8*	*Week 12*	*Week 16*	*Week 20*
	Graft		-18.54 ± 5.14	-29.01 ± 8.30	-18.32 ± 6.07	-21.21 ± 6.67	-31.98 ± 8.88	-25.68 ± 5.47
IC	PLGA	-34.62 ± 3.98	-17.77 ± 3.73	-21.22 ± 2.16	-17.13 ± 3.49	-21.54 ± 6.61	-18.18 ± 3.56	-16.12 ± 2.22
	PLGACell		-1.77 ± 3.08	-6.07 ± 4.01	1.34 ± 5.00	8.24 ± 6.04	-8.24 ± 3.24	5.28 ± 2.56
	Graft		16.45 ± 5.87	2.63 ± 7.38	21.21 ± 7.55	18.10 ± 5.18	7.81 ± 5.39	11.06 ± 2.46
OT	PLGA	4.30 ± 7.03	16.99 ± 0.98	14.36 ± 3.78	29.56 ± 5.14	22.20 ± 7.50	13.69 ± 3.16	16.20 ± 4.22
	PLGACell		30.14 ± 4.92	30.26 ± 3.62	33.43 ± 5.41	40.55 ± 6.11	32.05 ± 4.65	46.31 ± 2.09
	Graft		37.72 ± 7.87	27.34 ± 7.80	32.29 ± 7.65	32.55 ± 8.11	25.45 ± 7.93	26.17 ± 5.55
HR	PLGA	18.17 ± 3.39	41.76 ± 2.81	32.29 ± 4.00	37.49 ± 1.84	43.48 ± 5.75	33.51 ± 5.73	36.74 ± 5.94
	PLGACell		52.86 ± 2.50	55.38 ± 2.51	50.35 ± 5.81	54.60 ± 5.33	48.82 ± 5.42	62.05 ± 0.74
	Graft		32.58 ± 6.88	28.40 ± 6.17	30.17 ± 7.26	19.61 ± 5.61	10.94 ± 6.05	17.19 ± 6.41
TO	PLGA	-8.87 ± 5.74	47.46 ± 2.84	29.10 ± 10.45	50.41 ± 2.83	41.44 ± 2.82	33.50 ± 1.97	36.02 ± 3.49
	PLGACell		47.54 ± 3.29	57.76 ± 2.59	48.50 ± 6.64	41.15 ± 5.90	38.38 ± 7.96	56.74 ± 2.19

Ankle kinematics and stance duration analysis were carried out prior to nerve injury (week 0), at week 2, and every 4 weeks during the 20-week follow-up period. Values of the ankle angular (θ) position (°) at initial contact (IC), opposite toe-off (OT), heel-rise (HR), and toe-off (TO) of the stance phase. Values at week 0 were obtained only for the PLGA group. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). *N* corresponds to the number of rats within the experimental group. All groups $n = 6$.

Kinematics analysis. Kinematics analysis was performed before the neurotmesis injury (week 0), at week 2, and every 4 weeks during the 20-week recovery period.

Sciatic nerve transection caused a severe alteration in ankle joint kinematics during stance phase. The changes occurred both at the ankle joint motion amplitude and angular velocity. Figure 4 and Table 3 depict ankle joint position across the stance phase for the three experimental groups (Gap group not included). Compared to control values (values of the PLGA group before nerve transection), there is a characteristic loss of the normal midstance plantarflexion. At end stance, a decrease in the abnormal ankle dorsiflexion was registered in all three experimental groups although none of the groups recovered the normal ankle plantarflexion position at TO. At TO, there was a significant difference in the position of the ankle joint between the experimental groups with Tukey's *post hoc* test, indicating that values in the PLGACell group were significantly different from the other two groups ($p < 0.05$). As expected, when data from the ankle joint position are considered, angular velocity of this joint over the stance phase was abnormal up to the end of the recovery period, showing a total loss of the normal peak dorsiflexion and peak plantarflexion velocities that occur at around the start and end of stance, respectively (Fig. 5 and Table 4). Differences between experimental groups for ankle joint angular velocity were found to exist only between the PLGA group and the Graft group at IC ($p < 0.05$).

Morphological and stereological analysis

Table 5 and Figure 8 show the results of the stereological comparison of density, total number mean diameter, and myelin thickness of nerve fibers in the three experimental groups. Statistical analysis by ANOVA showed that while the intergroup numerical differences in the fiber density were not statistically significant ($p > 0.05$), intergroup differences in total fiber number were not significant ($p > 0.05$) between Graft and PLGA groups but was significant ($p < 0.05$) between these two groups and PLGACell group, pointing to a lower number of regenerated axons in the latter group. Yet, statistical analysis of numerical data on mean nerve fiber diameter and myelin thickness revealed statistically significant ($p < 0.05$) differences between all-groups regarding fiber diameter, while intergroup differences in myelin thickness were not significant ($p > 0.05$).

Light (Fig. 6) and electron (Fig. 7) microscopy analysis of the content of PLGACell tubules provide some indications on the possible reason for the observed impairment in nerve fiber regeneration by showing the presence of large number of neuroblastoma-like cells colonizing large areas of the nerve profile, which might have interfered with nerve regeneration inside the nerve guides. Interestingly, the presence of many blood vessels was observed inside the large neuroblastoma-like clusters (Fig. 7, arrows), suggesting that transplanted cells can deprive regenerated nerve fiber blood supply.

DISCUSSION

Entubulation (tubulization) is one the most addressed issues in experimental nerve repair research,[11,15,18,52,53] and many recent studies have focused on the properties and clinical importance of synthetic tube guides.[54] Most natural biomaterials used in clinical applications (e.g., hyaluronic acid, collagen, and gelatine) are derived from animal sources, and in spite of thorough purification methods, these materials bear the inherent risk of transfer of viral diseases.[53–57] Synthetic biomaterials are not associated with these risks.

In the present study, we investigated the effects on nerve regeneration of the employment PLGA 90:10 nerve guide tubes covered with N1E-115 cells *in vitro* differentiated in

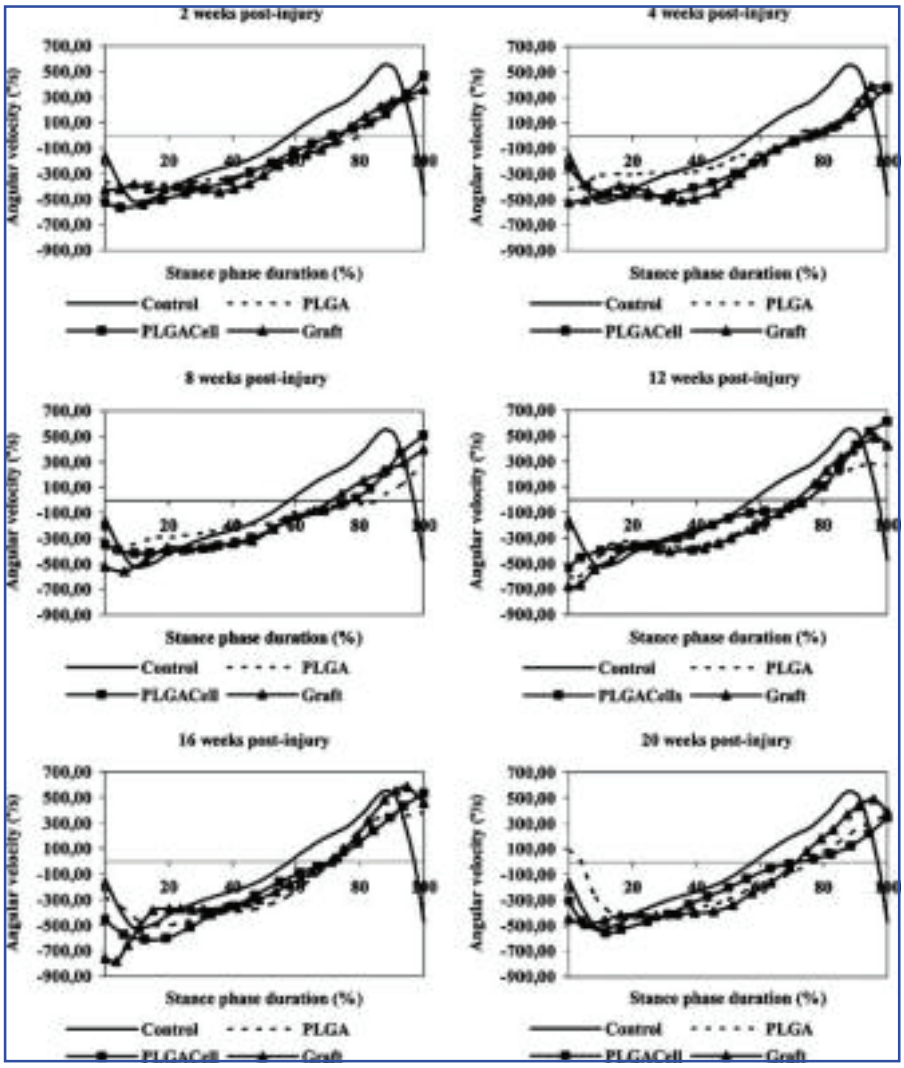


FIG. 5. Kinematics plots in the sagittal plane for the angular velocity (Ω °/s) of the ankle as it moves through the stance phase. The mean of each group is plotted. (—) PLGA group at baseline (showed for illustration of normal pattern); (---) group 2 (PLGA); (■) group 3 (PLGACell); (▲) group 1 (Graft).

the presence of DMSO for 48 h.[20,21] Results showed that both motor and sensory functions improved significantly in this experimental group similarly to what occurs in PLGA tubes alone. Nerve recovery of around 60% was achieved by week 20, in both groups, reconstructed with PLGA 90:10 tube guides with or without the cellular system. The pattern of degradation and the degradation products of PLGA 90:10 more acidic than the collagen ones does not seem to influence negatively the degree of nerve regeneration during the healing period. On the other hand, the biodegradable nonwoven structure of PLGA tubes may offer some advantages in terms of microporosity, which may enhance nerve repair. It is not surprising that recovery was significantly better in the group where the gap was reconstructed using the autologous graft since this is still considered the gold standard for peripheral nerve regeneration.[11,18,23]

The rationale for the utilization of the N1E-115 cells was to take advantages of the properties of these cells as a neural-like cellular source of neurotrophic factors.[20,21] Although tube guides are a suitable choice for peripheral nerve reconstruction, it is known from numerous studies that nerve regeneration and functional recovery are less satisfactory than when nerve repair is done by using an end-to-end neurorraphy or when an autologous nerve graft is applied.[15,18] For example, the risk of neuroma formation in neurotmesis injury is considerable, which is clearly avoided with tube-guide technique. In this sense, enhancing the rate of axonal growth might prevent the occurrence of side effects and might turn nerve regeneration faster, thus improving functional recovery. Neurotrophic factors play an important role in nerve regeneration after injury or disease, and it is conceivable that if neurotrophic factors are applied

Table 4. Results of Ankle Kinematics Analysis: Ankle Angular (θ) Velocity

Temporal parameter	*Group*	*Week 0*	*Week 2*	*Week 4*	*Week 8*	*Week 12*	*Week 16*	*Week 20*
	Graft		−319.6 ± 96.74	−437.9 ± 101.38	−375.4 ± 122.58	−547.4 ± 160.01	−651.9 ± 183.77	−390.9 ± 167.33
IC	PLGA	−139.02 ± 34.13	−381.0 ± 50.16	−416.2 ± 45.87	−374.2 ± 22.35	−606.0 ± 87.41	−284.3 ± 69.64	92.2 ± 87.56
	PLGACell		−525.6 ± 81.66	−248.6 ± 98.89	−346.1 ± 61.87	−536.7 ± 54.04	−453.8 ± 59.07	−305.8 ± 30.75
	Graft		−371.2 ± 86.77	−403.6 ± 115.07	−291.8 ± 97.79	−354.7 ± 91.28	−295.1 ± 81.05	−456.7 ± 120.02
OT	PLGA	−354.45 ± 41.46	−427.0 ± 30.7	−307.3 ± 21.56	−266.7 ± 42.01	−369.7 ± 28.15	−487.9 ± 45.13	−455.4 ± 49.76
	PLGACell		−426.1 ± 59.10	−487.7 ± 59.68	−378.1 ± 38.99	−364.2 ± 56.96	−473.1 ± 99.34	−428.0 ± 41.75
	Graft		−285.5 ± 79.29	−382.8 ± 124.93	−340.3 ± 136.03	−287.19 ± 74.06	−298.58 ± 64.44	−319.5 ± 65.06
HR	PLGA	−200.83 ± 31.96	−325.2 ± 15.30	−260.5 ± 20.88	−206.5 ± 34.37	−287.7 ± 29.3	−490.6 ± 34.8	−367.7 ± 24.58
	PLGACell		−261.2 ± 43.68	−332.1 ± 30.50	−306.1 ± 23.68	−241.8 ± 28.61	−217.2 ± 35.54	−178.4 ± 22.06
	Graft		274.8 ± 73.44	275.9 ± 96.77	256.0 ± 99.50	341.3 ± 93.83	378.3 ± 129.11	273.9 ± 128.60
TO	PLGA	−458.75 ± 84.43	311.3 ± 41.67	306.4 ± 39.54	275.4 ± 45.71	267.4 ± 66.23	380.2 ± 20.18	364.9 ± 49.02
	PLGACell		459.5 ± 74.92	375.56 ± 25.67	508.2 ± 121.52	613.4 ± 105.30	533.4 ± 104.44	343.2 ± 39.69

Ankle kinematics and stance duration analysis were carried out prior to nerve injury (week 0), at week 2, and every 4 weeks during the 20-week follow-up period. Values of the ankle angular (θ) velocity (°/s) at initial contact (IC), opposite toe-off (OT), heel-rise (HR), and toe-off (TO) of the stance phase. Values at week 0 were obtained only for the PLGA group. Results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). *N* corresponds to the number of rats within the experimental group. All groups $n = 6$.

Table 5. Stereological Quantitative Assessment Density, Total Number, Diameter, and Myelin Thickness of Regenerated Sciatic Nerve Fibers at Week 20 after Neurotmesis

Group	*Density (N/mm²)*	*CV*	*CE*	*Number (n)*	*CV*	*CE*	*Fiber diameter (μm)*	*CV*	*CE*	*Myelin thickness (μm)*	*CV*	*CE*
Graft	26,037 ± 1,086	0.10	0.04	13,212 ± 610	0.11	0.05	4.02 ± 0.11	0.07	0.03	0.48 ± 0.03	0.17	0.06
PLGA	21,982 ± 1,927	0.20	0.09	10,532 ± 2,195	0.47	0.21	3.49 ± 0.11	0.07	0.03	0.40 ± 0.02	0.13	0.05
PLGACell	21,231 ± 1,960	0.23	0.09	5,043 ± 1,109	0.54	0.22	3.06 ± 0.10	0.13	0.03	0.39 ± 0.02	0.13	0.05

Values are presented as mean ± SEM. All groups $n = 6$.

Ana Lúcia Emídia de Jesus Luís – ICBAS - UP

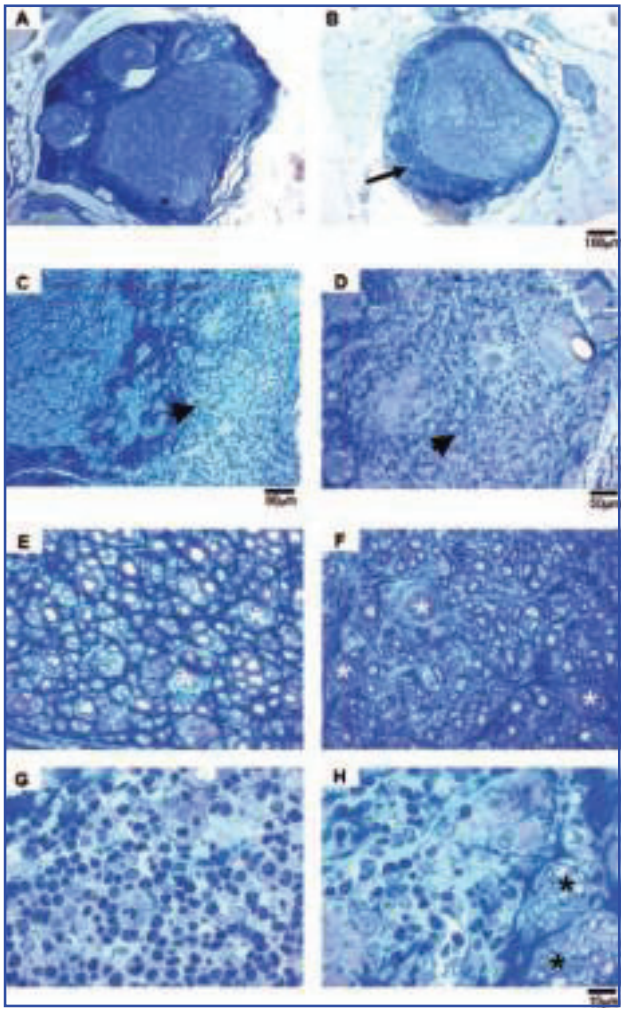


FIG. 6. Representative light micrographs of cell-enriched PLGA nerve conduits. At low magnification (**A, B**), the presence of large spaces around the regenerated nerve fibers can be detected (arrow). At higher magnification, observation (**C, D**) shows that these spaces are populated by many small round-shaped cells (arrowheads). Panels (**E**) and (**F**) show that in other regions of the regenerated nerves, regenerated nerve fibers are organized in typical microfascicles and blood vessels are numerous (white asterisks). Panels (**G**) and (**H**) show the appearance of the neuroblastoma-like round-shaped cells, which appear to be in different maturation stages. Small fascicles of regenerated nerve fibers (dark asterisk) can be observed close to the clusters of round-shaped cells. Scale bars are indicated in the figure. Color images available online at www.liebertpub.com/ten.

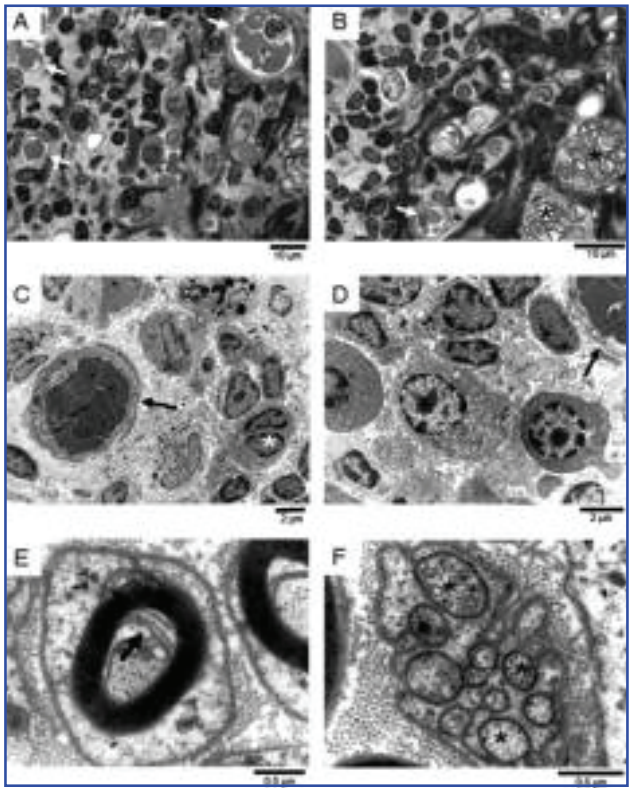


FIG. 7. High-resolution light microscopy (**A, B**) and electron microscopy (**C–F**) of cell-enriched PLGA nerve conduits. In panels (**A**) and (**B**), the appearance of the neuroblastoma-like round-shaped cells in different maturation stages and the fascicles of regenerated nerve fibers (asterisks) can be appreciated more clearly. Yet, the presence of many blood vessels, some of which are very small, can be clearly detected (arrows). Electron microscopy analysis permits to appreciate the cytological details of the regeneration process inside the tubes. Panels (**C**) and (**D**) focus on the transplanted cells that show a polymorphic appearance; the large nuclei showed heterochromatin, and sometimes cells binucleated (asterisk). The ultrastructure of the numerous blood vessels can be appreciated (arrows). Panels (**E**) and (**F**) focus on the regenerated nerve fibers, both myelinated (**E**, arrow) and unmyelinated (**F**, asterisk), which, though very small, show a normal ultrastructure. Scale bars are indicated in the figure.

in the close vicinity of the injured nerve, their healing potency is optimized. In spite of these premises and contrary to our initial hypothesis, the N1E-115 cells did not facilitate either nerve regeneration or functional recovery, and as far as morphometrical parameters are concerned, results showed that the presence of this cellular system reduced the number and size of the regenerated fibers, thus suggesting that this type of nerve guides can partially impair nerve regeneration, at least from a morphological point of view. The impaired axonal regeneration seems to be the result of N1E-115 cells surrounding and invading the regenerating nerve, since numerous of these cells where seen colonizing the nerve and might have deprived regenerated nerve fiber blood supply.

Taken together, the results of this study suggest that the use of N1E-115 cells does not promote nerve healing and their use might even derange the nerve regenerating process. Whereas the effects on nerve regeneration were negative, an interesting result of this study was the demonstration that

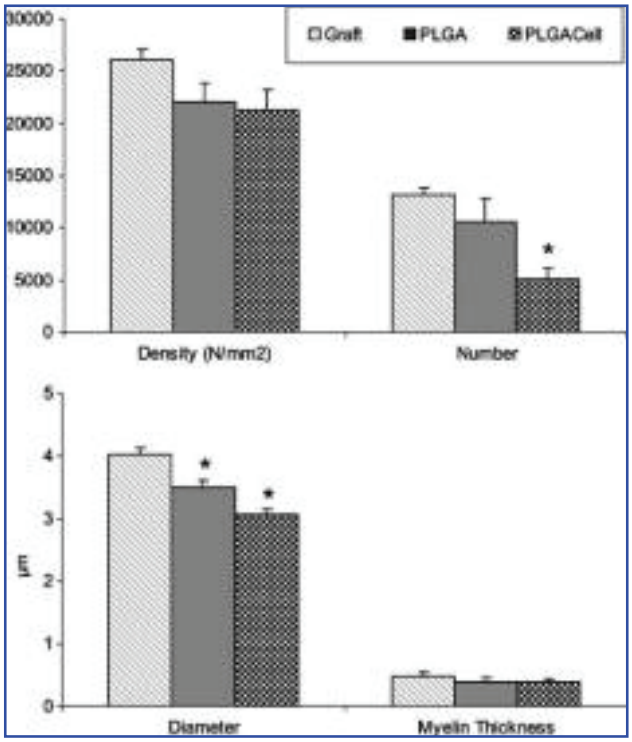


FIG. 8. Histogram summarizing results of the stereological estimates of density, total number, mean diameter, and myelin thickness of nerve fibers in the three experimental groups. Error bars indicate the standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant ($p < 0.05$) intergroup differences.

the cell delivery system that we have used was effecting in enabling long-term colonization of the regenerated nerve by transplanted neural cells. Whether the negative effects of using N1E-115 cells as a cellular aid to peripheral neural tissue regeneration extends to other types of cells is not known at present, and further studies are warranted to assess the role of other cellular systems, for example, mesenchymal stem cells, as a foreseeable therapeutic strategy in peripheral nerve regeneration. Our experimental results are also important in the perspective of the clinical employment of stem cell transplantation for improving posttraumatic nerve regeneration. Actually, a great enthusiasm among researchers and in especially the public opinion has raised over the last years about cell-based therapies in regenerative medicine,[13,15,23,58,59] and there seems to be a widespread conviction that this type of therapy is not only effective but also very safe in comparison to other pharmacological or surgical therapeutic approaches. While a recent study showed that cell-based therapy might be ineffective for improving nerve regeneration,[60] the results of the present study show that this stem cell transplantation can also lead to negative results by hindering the nerve regeneration process after tubulization repair. Besides pointing to the choice of the cell type to be used for transplantation as the critical factor for the therapeutic success, our present results also suggest that it is not always true the paradigm that donor tissues guide transplanted stem cells to differentiate in the direction that is useful for the regeneration process itself. Yet, the possibility that the transplanted stem cells choose another differentiation line potentially in contrast with the regenerative process should be always taken into consideration, and future experimental studies need to find out how to prevent this potentially negative occurrence before stem cell transplantation can be used with patients, in particular for peripheral nerve reconstruction.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to gratefully acknowledge the valuable support from Dr. José Manuel Correia Costa, Laboratório de Parasitologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSRJ), Porto, Portugal. This work was supported by PRIN and FIRB grants from the Italian MIUR (Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca), by the Regione Piemonte, and by the Operational Programme for Science and Innovation 2010 (Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education).

REFERENCES

1. Millesi, H. Progress in peripheral nerve reconstruction. World J. Surg. **14,** 733, 1990.
2. Madison, R.D., Archibald, S.J., and Krarup, C. Peripheral nerve injury. In: Cohen, I.K., Diegelman, F., and Lindbald, W.J., eds. Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. Philadelphia, NJ: W.B. Saunders, 1992, pp. 450–487.
3. Kline, D.G. Spinal nerve root repair after brachial plexus injury. J. Neurosurg. Spine **93,** 336, 2000.
4. Lundborg, G. Enhancing posttraumatic nerve regeneration. J. Peripher. Nerv. Syst. **7,** 139, 2002.
5. Hoke, A. Mechanisms of disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? Nat. Clin. Pract. Neurol. **2,** 448, 2006.
6. Lundborg, G. Bridging nerve defects: the role of tissue interpositioning. In: Masquelet, A.C., and Ferreira, A.C., eds. Severe Traumatic Defects of the Upper Limb. London: Martin Dunitz, 2003, pp. 153–167.
7. Matsuyama, T., Mackay, M., and Midha, R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. Neurol. Med. Chir. **40,** 187, 2000.
8. May, M. Trauma to the facial nerve. Otolaryngol. Clin. North. Am. **16,** 661, 1983.
9. Doolabh, V.B., Hertl, M.C., and Mackinnon, S.E. The role of conduits in nerve repair: a review. Rev. Neurosci. **7,** 47, 1996.
10. Jensen, J.N., Tung, T.H., Mackinnon, S.E., Brenner, M.J., and Hunter, D.A. Use of anti-CD40 ligand monoclonal antibody as antirejection therapy in a murine peripheral nerve allograft model. Microsurgery **24,** 309, 2004.
11. Lundborg, G. Alternatives to autologous nerve grafts. Handchir. Mikrochir. Plast. Chir. **36,** 1, 2004.

12. Geuna, S., Papalia, I., and Tos, P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: a challenge for neuroscientists coming from an intriguing nerve repair concept. Brain Res. Rev. **52,** 381, 2006.
13. Chen, M.B., Zhang, F., and Lineaweaver, W.C. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. Ann. Plast. Surg. **57,** 462, 2006.
14. Den Dunnen, W.F.A, van Wessel, R., Pennings, A.J., Robinson, P.H., van Leeuwen, M.B.M., and Schakenraad, J.M. Long-term evaluation of degradation and foreign body reaction of subcutaneously implanted poly (D,L-lactide-ε-caprolactone). J. Biomed. Mater. Sci. **36,** 337, 1997.
15. Schmidt, C.E., and Leach, J.B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. Annu. Rev. Biomed. Eng. **5,** 293, 2003.
16. Varejão, A.S.P., Cabrita, A.M., Geuna, S., Melo-Pinto, P., Filipe, V.M., Gramsbergen, A., and Meek, M.F. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. Exp. Neurol. **183,** 695, 2003.
17. Varejão, A.S.P., Cabrita, A.M., Meek, M.F., Bulas-Cruz, J., Filipe, V.M., Gabriel, R.C., Ferreira, A.J., Geuna, S., and Winter, D. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. Muscle Nerve **27,** 706, 2003.
18. Battiston, B., Geuna, S., Ferrero, M., and Tos, P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biologic and synthetic conduits for sensory nerve repair. Microsurgery **25,** 258, 2005.
19. Luís, A.L., Rodrigues, J.M., Lobato, J.V., Sooraj Hussain, N., Lopes, M.A., Amado, S., Veloso, A.P., Armada-da-Silva, P.A.S., Geuna, S., Ferreira, A.J., Varejão, A.S.P., Santos, J.D., and Maurício, A.C. PLGA 90/10 and caprolactone biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. Microsurgery **27,** 125, 2007.
20. Rodrigues, J.M., Luís, A.L., Lobato, J.V., Pinto, M.V., Faustino, A., Sooraj Hussain, N., Lopes, M.A., Veloso, A.P., Freitas, M., Geuna, S., Santos, J.D., and Maurício, A.C. Intracellular Ca2+ concentration in the N1E-115 neuronal cell line and its use for peripheric nerve regeneration. Acta Med. Port. **18,** 323, 2005.
21. Rodrigues, J.M., Luís, A.L., Lobato, J.V., Pinto, M.V., Lopes, M.A., Veloso, A.P., Freitas, M., Geuna, S., Santos, J.D., and Maurício, A.C.J. Determination of the intracellular Ca2+ concentration in the N1E-115 neuronal cell line in perspective of its use for peripheric nerve regeneration. Biomed. Mater. Eng. **15,** 455, 2005.
22. Luís, A.L., Amado, S., Geuna, S., Rodrigues, J.M., Simões, M.J., Santos, J.D., Fregman, F., Raimondo, S., Prieto Veloso, A., Ferreira, A.J.A., Armada-da-Silva, P.A.S., Varejão, A.S.P., and Maurício, A.C. J. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. J. Neurosci. Methods **163,** 92, 2007.
23. Chalfoun, C.T., Wirth, G.A., and Evans, G.R.J. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? J. Cell. Mol. Med. **10,** 309, 2006.
24. Chen, Z.L., Yu, W.M, and Strickland, S. Peripheral regeneration. Ann. Rev. Neurosci. **30,** 209, 2007.
25. Longo, F.M., Hayman, E.G., Davis, G.E., Ruoslahtil, E., Engvall, E., Manthorpe, M., and Varon, S. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating *in vivo* within nerve regeneration chambers. Brain Res. **309,** 105, 1984.
26. Miyata, Y., Kashihara, Y., Homma, S., and Kuno, M.J. Effects of nerve growth factor on the survival and synaptic function of Ia sensory neurons axotomized in neonatal rats. Neuroscience **6,** 2012, 1986.
27. Yan, Q., Elliott, J., and Snider, W.D. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. Nature **360,** 753, 1992.
28. Amano, T.E.R., and Nirenberg, M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69,** 258, 1972.
29. Kimhy, Y., Spector, I., Barak, Y., and Littauer, U.Z. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73,** 462, 1976.
30. De Laat, S.L., and van der Saag, P.T. The plasma membrane as a regulatory site in growth and differentiation of neuroblastoma cells. Int. Rev. Cytol. **74,** 1, 1982.
31. Reagan, L.P., Ye, X., Mir, R., DePalo, R., and Fluharty, J. Up-regulation of angiotensin II receptors by *in vitro* differentiation of murine N1E-115 neuroblastoma cells. Mol. Pharmacol. **38,** 878, 1990.
32. Larcher, J.C., Basseville, M., Vaysierre, J.L., Cordeau-Lossouarn, L., Croizat, B., and Gros, F. Growth inhibition of N1E-115 mouse neuroblastoma cells by c-myc or N-myc antisense oligodeoxynucleotides causes limited differentiation but is not coupled to neurite formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **185,** 915, 1992.
33. Prasad, K.N., Kentroti, S., Edwards-Prasad, J., Vernadakis, A., Imam, M., Carvalho, E., and Kumar, S. Modification of the expression of adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate-induced differentiated functions in neuroblastoma cells by beta-carotene and D-alpha-tocopheryl succinate. J. Am. Coll. Nutr. **13,** 298, 1994.
34. Prasad, K.N. Differentiation of neuroblastoma cells: a useful model for neurobiology and cancer. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. **66,** 431, 1991.
35. Tuttle, J.B., and Richelson, E. Phenytoin action on the excitable membrane of mouse neuroblastoma. J. Pharmacol. Exp. Ther. **211,** 632, 1979.
36. Kerns, J.M., Braverman, B., Mathew, A., Lucchinetti, C., and Ivankovich, A.D. A comparison of cryoprobe and crush lesions in the rat sciatic nerve. Pain **47,** 31, 1991.
37. Sporel-Ozakat, M.E., Edwards, P.M., Hepgul, K.T., Savas, A., and Gispen, W.H. A simple method for reducing autotomy in rats with peripheral nerve lesions. J. Neurosci. Methods **36,** 263, 1991.
38. Thalhammer, J.G., Vladimirova, M., Bershad-Sky, B., and Strichartz, G.R. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. Anesthesiology **82,** 1013, 1995.
39. Koka, R., and Hadlock, T.A. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transaction. Exp. Neurol. **168,** 192, 2001.
40. Masters, D.B., Berge, C.B., Dutta, S.K., Griggs, C.T., Hu, D., Kupsky, W., and Langer R. Prolonged regional nerve block-

ade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. Anesthesiology **79,** 340, 1993.
41. Hu, D., Hu, R., and Berde, C.B. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. Anesthesiology **86,** 957, 1997.
42. Campbell, J.N. Nerve lesions and the generation of pain. Muscle Nerve **24,** 1261, 2001.
43. Shir, Y., Zeltser, R., Vatine, J.J., Carmi, G., Belfer, I., Zangen, A., Overstreet, D., Raber, P., and Seltzer Z. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviours in eight inbred and outbreed rat strains and selection lines. Pain **90,** 75, 2001.
44. Bain, J.R., Mackinnon, S.E., and Hunter, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast. Reconstruct. Surg. **83,** 129, 1989.
45. Bervar, M. Video analysis of standing—an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. J. Neurosci. Methods **102,** 109, 2000.
46. Dijkstra, J.R., Meek, M.F., Robinson, P.H., and Gramsbergen, A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. J. Neurosci. Methods **96,** 251, 2000.
47. Geuna, S., Tos, P., Battiston, B., and Guglielmone, R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Ann. Anat. **182,** 23, 2000.
48. Geuna, S., Tos, P., Guglielmone, R., Battiston, B., and Giacobini-Robecchi, M.G. Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. Anat. Embryol. **204,** 1, 2001.
49. Geuna, S., Gigo-Benato, D., and Rodrigues, A.C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. Microsurgery **24,** 72, 2004.
50. Geuna, S. The revolution of counting "tops": two decades of the disector principle in morphological research. Microsc. Res. Tech. **66,** 270, 2005.
51. Varejão, A.S.P., Cabrita, A.M., Meek, M.F., Bulas-Cruz, J., Gabriel, R.C., Filipe, V.M., Melo-Pinto, P., and Winter, D.A. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. Muscle Nerve **26,** 630, 2002.
52. Fields, R.D., Le Beau, J.M., Longo, F.M., and Ellisman, M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. Prog. Neurobiol. **33,** 87, 1989.
53. Meek, M.F., Varejão, A.S.P., and Geuna, S. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. Tissue Eng. **10,** 1027, 2004.
54. Kannan, R.Y., Salacinski, H.J., Butler, P.E., and Seifalian, A.M. Artificial nerve conduits in peripheral-nerve repair. Biotechnol. Appl. Biochem. **41,** 193, 2005.
55. Dubey, N., Letourneau, P.C., and Tranquillo, R.T. Guide neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in stimulated peripheral nerve regeneration. Exp. Neurol. **158,** 338, 1999.
56. Yoshii, S., and Oka, M. Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. Brain Res. **888,** 158, 2001.
57. Meek, M.F., Jansen, K., Steendam, R., van Oeveren, W., van Wachem, P.B., and Luyn, M.J.A. *In vitro* degradation and biocompatibility of poly (D,L-lactide-ε-caprolactone) nerve guides. J. Biomed. Mater. Res. **68,** 43, 2003.
58. Tohill, M., and Terenghi, G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. Biotechnol. Appl. Biochem. **40,** 17, 2004.
59. Pfister, L.A., Papaloïzos, M., Merkle, H.P., and Gander, B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. J. Peripher. Nerv. Syst. **12,** 65, 2007.
60. Sinis, N., Schaller, H.E., Becker, S.T., Schlosshauer, B., Doser, M., Roesner, H., Oberhoffner, S., Müller, H.W., and Haerle, M. Long nerve gaps limit the regenerative potential of bioartificial nerve conduits filled with Schwann cells. Restor. Neurol. Neurosci. **25,** 131, 2007.

Address reprint requests to:
Stefano Geuna, M.D.
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Università di Torino
Ospedale San Luigi
Regione Gonzole 10
10043 Orbassano (TO)
Italy

E-mail: stefano.geuna@unito.it

2.4. CONCLUSÕES

Os estudos de lesão de neurotmese no nervo ciático de rato permitiram chegar às seguintes conclusões:

i) O PLGA 90:10 é um biomaterial capaz de ser utilizado como tubo-guia com resultados idênticos aos obtidos com o Neurolac®, permitindo ainda a incorporação de um sistema celular;

ii) Para defeitos de 10 mm testados no nervo ciático de ratos, sempre que seja possível a colheita de um autoenxerto e **sempre que a perca de função no local da colheita seja mínima, aceitável e justificável**, é preferível a realização de autoenxerto dado que, quando comparada com os biomateriais utilizados apresenta melhores resultados, permanecendo portando como a técnica de eleição*;*

iii) O sistema celular utilizando células neuronais com 48 horas de diferenciação *in vitro* não tem qualquer influência positiva na regeneração do nervo periférico de rato, quando utilizado em associação com PLGA 90:10 e em lesões de neurotmese.

CAPITULO IV

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS FUTURAS

DISCUSSÃO GERAL

A investigação na área da regeneração do nervo periférico, tal como já afirmado anteriormente, é um tema de grande importância dado a incidência de lesões traumáticas do nervo periférico e da morbilidade a ela associada.

O rato é a espécie mais utilizada como modelo na investigação de doenças neurológicas, quer do sistema nervoso periférico e central, quer ainda em doenças neurovegetativas (Cenci *et al.*, 2002). O nervo ciático é um modelo amplamente usado pelos investigadores desta área quer em lesões de axonotmese (Meek *et al.*, 1999; Varejão *et al.*, 2004) quer em lesões de neurotmese que utilizam a técnica de tubulação (Lundborg, 2004; Schmidt *et al.*, 2003; Battiston *et al.*, 2005). Parece também, ter sido encontrada alguma semelhança na regeneração do nervo, entre ratos e primatas (Mackinnon *et al.*, 1985).

Nas lesões de axonotmese, onde a continuidade do nervo é preservada, todos os animais apresentaram uma paralisia flácida logo após a lesão sendo esperado um padrão de reinervação idêntica ao padrão original e ao mesmo tempo também uma boa recuperação funcional (Seddon, 1943). No presente estudo estabeleceu-se um tempo de recuperação de 12 semanas que pareceu ser o mais indicado, especialmente para avaliação dinâmica e morfológica, do que o de 8 semanas habitualmente utilizado (Varejão, 2003). Todos os animais sobreviveram sem sinais de infecção ou de auto-mutilação. Os animais foram eutanasiados para avaliação da recuperação morfológica ao fim das 12 semanas e durante este período foi avaliada a sua recuperação funcional e nociceptiva.

A avaliação da sensação nociceptiva foi avaliada, em segundos, através do reflexo de latência perante um estímulo térmico. Este teste foi realizado e interpretado de forma cuidadosa, tendo em conta a pressão sobre o membro quando este é colocado contra a plataforma a 56 º C, evitando desta forma a estimulação dos mecanoreceptores. Em lesões de axonotmese, verificam-se sinais de recuperação às 3 semanas e todos os animais estão recuperados às 5 semanas.

O Reflexo Postural de Extensão (RPE) resulta da extensão dos músculos gastrocnémico-solear e em qualquer lesão do nervo ciático existe uma perca dessa força de extensão, o que se traduz por um aumento significativo da percentagem de deficit motor durante o tempo de recuperação. Nas lesões de axonotmese, a recuperação da função motora traduzida por este parâmetro atinge o valor normal após as 8 semanas. Estes resultados são também confirmados com os valores obtidos em SFI e SSI e estão de acordo com os resultados de estudos recentes, em que o tempo de recuperação avaliado através do

RPE e SFI foi similar (Hadlock *et al.*, 1999; Koka e Hadlock *et al.*, 2001; Varejão *et al.*, 2004a).

Um dos métodos mais utilizado para avaliação funcional após uma reparação do nervo ciático no rato é o da análise do andamento, utilizando o SFI desenvolvido por De Medinaceli e seus colaboradores (1982), e mais tarde adaptado por Bain (1989). Durante muito tempo e ainda hoje, a maior parte dos estudos experimentais em regeneração do nervo periférico utilizaram este parâmetro para avaliar a perda de função (Hare *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1999; Shen e Zhu *et al.*, 1995; Tarasidis *et al.*, 1998; Varejão *et al.*, 2001). Trata-se de um método não invasivo que avalia ao mesmo tempo a recuperação motora e sensorial. Pode ser repetido as vezes necessárias no mesmo animal sem qualquer contra-indicação para o mesmo. Trata-se no entanto, de um método bastante elaborado. Em 2000, Bervar deduz uma nova formula utilizando a análise da pegada em condições estáticas, o SSI demonstrando uma boa correlação com o SFI (Bervar, 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho experimental, utilizando a lesão de esmagamento estão de acordo com estes estudos e estão também de acordo com estudos recentes, em que o tempo de recuperação avaliado através do RPE e SFI foi similar (Hadlock *et al.*, 1999; Koka e Hadlock *et al.*, 2001; Varejão *et al.*, 2004a). Os valores de SFI e SSI indicam um prejuízo significativo do membro posterior após lesão de axonotmese, e neurotmese do ciático. Em lesões de axonotmese quer a percentagem de deficit motor, quer o SFI e o SSI tornam a valores idênticos aos do período pré-cirurgico, considerado como normal, por volta das 7 semanas. Mais uma vez, de acordo com outros autores cujos estudos demonstram que os parâmetros normais de andamento voltam ao normal somente após um mês da lesão (Chen *et al.*, 1992; Gudemez *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2001; Varejão *et al.*, 2004a). Em contraste com estudos experimentais de outros autores que registaram recuperação completa durante 3 a 4 semanas após uma lesão de axonotmese (Bridge *et al.*, 1994; Hare *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1994). A diferença deste padrão de recuperação pode ser explicado pela resposta fisiopatológica do nervo periférico em diferentes pressões de esmagamento (Lundborg e Dahlin, 1992; Rempel *et al.*, 1999). Nos estudos realizados foi utilizada uma pinça (Figura 31 B) especialmente concebida para exercer uma pressão de 9 MPa quando aplicada durante 30 segundos, o que confere sempre a mesma lesão em todos os animais. O uso deste procedimento estandardizado permite explicar diferentes tempos de recuperação obtidos em estudos semelhantes (Varejão *et al.*, 2000a). Assim um deficit funcional completo, corresponde a valores significativamente elevados de SFI e SSI e que evoluem até cerca das 6 semanas, retornando a valores próximos da linha basal, correspondente ao período pré-cirurgico, às 7 semanas.

Recentemente, a análise cinemática do andamento do rato tem sido introduzida nos estudos de regeneração do nervo periférico e no acompanhamento da sua recuperação funcional. Desta análise, surge uma maior perspicácia na avaliação do efeito da desinervação ciática e ainda providencia uma integração entre a figura da acção do controlo neuronal com os músculos do pé e o tornozelo (Varejão *et al.*, 2003 a, b). O pé e o tornozelo têm uma função complexa na maneira como se desenvolve a fase de suporte do andamento, através de um equilíbrio realizado pelos músculos flexores plantares e flexores dorsais. As neuropatias do nervo ciático são muitas vezes caracterizadas por uma disfunção do músculo gastrocnémico-solear. A fase de suporte do ciclo de andamento é o componente ideal para estudar a actividade dos músculos flexores plantares, enquanto que a fase oscilante é a ideal para os músculos flexores dorsais (Bain *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 2000; inter, 1983).

Em lesões de axonotmese, o padrão de andamento normal é rapidamente retomado e às 6 semanas, as trajectórias do movimento do tornozelo são similares às registadas antes da lesão do ciático. No entanto, no momento da saída do calcanhar (*hel raise* - HR) o tornozelo apresenta uma posição anormal durante todas as 12 semanas após a lesão, sugerindo uma descompensação no movimento de rotação produzido pelos músculos flexores plantares. Alguns parâmetros da cinemática do tornozelo durante a fase de suporte revelam alterações complexas ao longo de todo o tempo de recuperação. Particularmente, a posição da articulação do tornozelo no instante da saída do calcanhar na fase de suporte, que inicialmente recupera a normalidade e depois regressa à anormalidade. Esta observação poderá ser explicada pelo desenvolvimento de mecanismos de adaptação da passada do rato, que se seguem logo após a lesão do nervo e o resultado do deficit das funções motoras e sensitivas. Uma análise mais detalhada do padrão de andamento de rato após lesão do nervo ciático, poderá incluir outras articulações e membros, no entanto necessita de confirmação através de estudos mais detalhados.

A actividade do músculo gastrocnémico-solear é muito elevada durante a fase de suporte do andamento do rato, uma vez que é necessário produzir um impulso propulsivo contra o solo e este componente, é por sua vez muito sensível a alterações do nervo ciático (Bain *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 2000; Winter, 1983). A análise mais detalhada do padrão da passada do rato, combinado com dados de cinemática e de electromiografia, revelou que também a fase oscilante é afectada após o período de suspensão do membro (Canu *et al.*, 2005), ou durante a recuperação de uma lesão de neurotmese (Gamsbergen *et al.*, 2000). No entanto, a análise de andamento representada neste estudo foca especialmente a fase de suporte. Estas afirmações são consistentes com estudos anteriormente realizados durante 8 semanas (Varejão *et al.*, 2004a), e ainda com todos

os outros parâmetros utilizados para a avaliação funcional (RPE, SFI e SSI) que são também realizados durante a fase de suporte da locomoção.

No que diz respeito aos parâmetros de avaliação morfológica, em lesões de axonotmese observou-se que após 12 semanas de regeneração, a densidade e o número das fibras, permanece ainda significantemente elevado em relação ao nervo normal enquanto que a sua dimensão é significantemente baixa. Estudos anteriores demonstraram que o número de fibras nervosas aumenta durante os primeiros 3 meses após reconstrução topo-a-topo, e que depois começa lentamente a decrescer (Mackinnon *et al.*, 1991). Isto pode ser explicado através da ocorrência do fenómeno de brotamento ser maior de cada cone de crescimento, levando a uma presença mais abundante de pequenos axónios em regeneração que atravessam o local da lesão e crescem para enervar o órgão alvo (Mackinnon *et al.*, 1991). O atraso da diminuição da densidade e do número das fibras pode estar de acordo com a hipótese de brotamento com a morte progressiva de parte das fibras colaterais que não se conectam com alvo distal (Mackinnon *et al.*, 1991).

Em suma, os resultados do estudo realizado em lesões de axonotmese durante 12 semanas, revelaram uma recuperação nociceptiva ao fim de 5 semanas, de SFI, SSI e percentagem de deficit motor (RPE) ao fim de 7 e 9 semanas, respectivamente. Alguns parâmetros de avaliação cinemática do tornozelo encontram-se ainda em recuperação até às 12 semanas, acontecendo o mesmo para uma alguns dos parâmetros morfoquantitativos das fibras regeneradas.

Este estudo apresenta uma informação acrescida para os investigadores desta área, no que respeita ao melhor tempo de recuperação para um modelo de axonotmese do nervo ciático do rato.

Os resultados do presente estudo vêm também confirmar a importância do uso de métodos múltiplos (morfológico e funcional) para a avaliação da recuperação de lesões do nervo periférico de rato quer em lesões de axonotmese quer em lesões de neurotmese.

Nas lesões de neurotmese, foram testadas várias técnicas de reparação cirúrgica desde a sutura topo-a-topo epineural, o autoenxerto invertido e a técnica da tubulação onde foi utilizado o PLGA 90:10 testado pela primeira vez em regeneração do nervo periférico e comparado com um tubo-guia de ε-caprolactona já comercializado, o Neurolac®. Nos animais em que foram simulados este tipo de lesão, foi estabelecido um período de recuperação de 20 semanas. Os animais foram avaliados quinzenal e mensalmente para avaliação da recuperação motora e sensitiva, e análise cinemática do andamento, respectivamente. Neste grupo de animais, dado se tratar de uma lesão mais grave do nervo ciático, as lesões de autotomia (Figura 25 A e B) e contractura da articulação tíbio-

társica surgiram numa percentagem de cerca de 10 e 15% respectivamente, dificultando desta forma a realização de alguns testes de avaliação funcional.

Os resultados obtidos na recolha de dados funcionais durante o período estabelecido de 20 semanas, parecem não mostrar diferenças significativas entre os grupos em que houve afastamento dos topos nervosos, isto é, tubulação com Neurolac®, PLGA 90:10 e autoenxerto. A recuperação motora avaliada através do reflexo postural de extensão, não apresenta diferenças entre os grupos em que foi realizada a tubulação (Neurolac®, PLGA 90:10), no entanto, no grupo em que foi realizado autoenxerto o restabelecimento desta função parece ter ocorrido a um ritmo mais rápido, não obstante no final das 20 semanas, se apresentarem todos com valores idênticos que rondam os 50%. Mas quando comparamos estes grupos com o grupo em que não houve separação dos topos nervosos, isto é, sutura topo-a-topo, a recuperação motora neste, é significativamente melhor e mais rápida, ou seja, ocorre mais cedo. O mesmo parece acontecer com a recuperação sensorial avaliada através do reflexo de latência. No entanto, no final das 20 semanas, os grupos em que não houve separação dos topos nervosos, apresentam valores de reflexo de latência dentro dos limites normais (inferior a 4 segundos). É interessante notar que o padrão de regeneração dos neurónios sensitivos é mais rápido do que o padrão dos neurónios motores (Madorsky *et al.*, 1998).

A análise morfológica mostra padrões diferentes de regeneração entre os dois grupos de tubulação. Enquanto que ao fim de 20 semanas a estrutura do polímero de Neurolac® ainda se encontra preservada, no tubo-guia de PLGA 90:10, o biomaterial foi todo substituído por tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio e fibroblastos, fazendo lembrar o epineuro normal. Provavelmente explica a organização observada, com número elevado de fascículos de menor diâmetro no grupo de PLGA 90:10 induzida por uma degradação mais precoce do biomaterial. Apesar desta diferença na organização, na avaliação quantitativa do número total de fibras regeneradas, não são observadas diferenças estatisticamente significativas entres estes dois grupos, o que está de acordo com os resultados obtidos na avaliação da função motora e sensitiva entre estes dois grupos.

Neste trabalho foi utilizado um sistema celular capaz de ser introduzido no local da regeneração do nervo periférico e capaz de produzir factores neurotróficos melhorando, não só a qualidade de recuperação motora e nociceptiva como também a velocidade de recuperação. Estudos recentes revelaram o importante papel que os factores neurotróficos têm na regulação da diferenciação das células de Schwann e na remielinização dos axónios (Chen *et al.*, 2007), na sobrevivência dos axónios após lesão (Miyata *et al.*, 1986; Yan *et al.*, 1992) e também promoção do alongamento axonal

(Rodrigues *et al.*, 2005 a e b). Para esse fim foram utilizadas células neuronais N1E-115 de ratinho com 48 horas de diferenciação *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2005 a e b). Tal como já constatado anteriormente, a forma de administração destes factores neurotróficos, em doses certas durante o período certo é problemática. Sendo que as vantagens na adição destas células seria uma forma de contornar estas dificuldades, aumentando a concentração de factores neurotróficos no local, possivelmente em concentrações fisiológicas e durante um período mais longo.

Em lesões de axonotmese este sistema celular foi suportado por uma membrana de colagénio tipo III de origem equina. No entanto, neste tipo de lesão não parece ter ocorrido diferenças muito significativas entre os diferentes subgrupos (1, 2 e 3). Apesar disso foram detectadas pequenas variações em valores de percentagem de deficit motor e alguns valores em parâmetros de cinemática, que incluem a acção da articulação do tornozelo durante a fase de suporte, no grupo em que foi utilizado o sistema celular referido. Neste grupo, a velocidade de recuperação da percentagem de deficit motor parece ser mais rápida, tal como acontece para os parâmetros da análise cinemática. Os resultados deste estudo, confirmam que a membrana de colagénio tipo III de origem equina parece mostrar-se capaz de servir de suporte ao transplante de células neuronais sem interferirem com a regeneração dos axónios.

Os dados de histomorfometria não mostram diferenças significativas, quanto ao número e densidade de fibras regeneradas, entre os 3 grupos. Às 12 semanas todos os animais se encontram na mesma fase de recuperação, não revelando no entanto, o que acontece nas fases iniciais da regeneração.

Em lesões de neurotmese, este sistema celular foi testado em suturas topo-a-topo utilizando como meio de suporte e transporte a mesma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina utilizada na lesão de axonotmese (resultados ainda não publicados). O sistema celular também foi testado em conjunto com a técnica de tubulação somente com PLGA 90:10, visto o Neurolac® não ser capaz de suportar este sistema celular. Os tubos de Neurolac® são menos porosos e as células não aderem à superfície, o que poderá ser considerada uma desvantagem deste biomaterial. Para tal foram utilizados tubos-guia de PLGA 90:10 forrados com células neuronais N1E-115 com 48 horas de diferenciação *in vitro*. Os resultados mostraram que, quer a função motora, quer a função sensitiva melhoraram significativamente em ambos os grupos (com e sem células) atingindo uma recuperação de cerca de 60% ao fim de 20 semanas. Comparando o padrão de degradação dos tubos de PLGA 90:10 com a membranas de colagénio de tipo III de origem equina pode-se verificar que, quando ambos são imergidos em PBS durante 72 horas, existe uma degradação muito rápida do PLGA 90:10 nas primeiras duas semanas, que é acompanhada com uma diminuição acentuada do pH (pH=3,5), em contraste com

o que acontece com a biomembrana em que não existe alterações de pH (pH=7,4). Este padrão de degradação, e os monómeros resultantes da degradação do PLGA 90:10, parece não ter qualquer influência negativa durante o período de cicatrização.

Nos grupos de tubulação os resultados obtidos através do RPE revelam que, no grupo PLGA 90:10 com sistema celular existe uma recuperação mais rápida quando comparado com os grupos sem células e especialmente quando comparado com o grupo sem reparação (grupo 11). Quanto à recuperação nociceptiva, não apresenta padrões de recuperação com diferenças significativas em todos os grupos, também à excepção do grupo sem reparação (grupo 11). Sendo os valores obtidos através do SFI e SSI concordantes entre si e apresentavam-se no final das 20 semanas com valores que indicam uma recuperação modesta em todos os grupos. A recuperação observada através da análise cinemática do andamento do rato, revela uma alteração acentuada na articulação do tornozelo durante a fase de apoio. Quando comparamos com valores de controlo obtidos antes da lesão, existe uma perda significativa na flexão plantar. Todos os animais no final da fase de suporte, revelam uma recuperação modesta com a articulação do tornozelo mantendo-se em flexão dorsal na saída da parte distal do pé (*Toe-off* – TO).

Do ponto de vista morfológico, os grupos de PLGA 90:10 e autoenxerto, quando comparados com o grupo de PLGA 90:10 na presença deste sistema celular, estes últimos, apresentam uma redução do número de fibras regeneradas, o que poderá sugerir que este sistema celular possa ser prejudicial na regeneração do nervo. A análise através da microscopia de luz permitiu observar um grande número de células idênticas a neuroblastomas colonizando largas áreas do nervo, o que poderá interferir com o processo de regeneração e explicar os maus valores obtidos.

Desta forma pode considerar-se que este sistema celular, não se revelou um potencial candidato como agente terapêutico na regeneração do nervo periférico, quer em lesões de axonotmese, quer em lesões de neurotmese. No entanto, o efeito negativo observado na técnica de tubulação com PLGA 90:10 utilizando este sistema celular, bem como em lesões de axonotmese, não se poderá estender a outros tipos de células e pensar que este biomaterial poderá ser um potencial de investigação, utilizando outros tipos celulares, na estratégia terapêutica da regeneração do nervo periférico.

A utilização deste sistema celular tem, no entanto, o objectivo de investigação científica abrindo as portas para a sua extrapolação a outros sistemas celulares. Também a natureza neoplásica destas células seria, desde logo problemática e eticamente incorrecta para a sua utilização futura quer em Medicina Veterinária, quer em Medicina Humana.

Também para uma melhor compreensão do comportamento dos biomateriais (biomembrana de colagénio tipo III e PLGA 90:10 ambos utilizados em nervo periférico pela primeira vez), alguns animais foram sacrificados sequencialmente ao longo do período pós-operatório, cujos nervos foram colhidos e utilizados para avaliação morfológica em Microscopia óptica (MO) e Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV) (resultados não publicados).

Para a análise de microscopia de luz, as secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e observados com um microscópio Leica DM400 equipado com uma câmara digital Leica DFC320 (Figuras 37,38, 39 e 40).

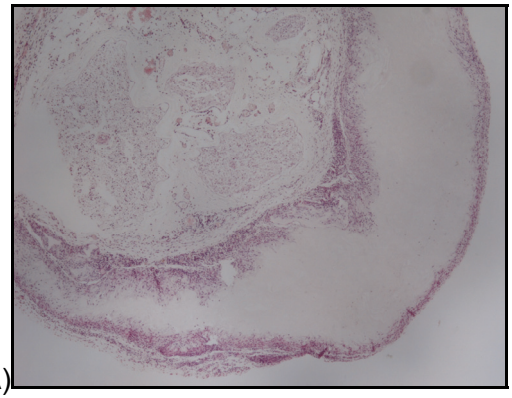
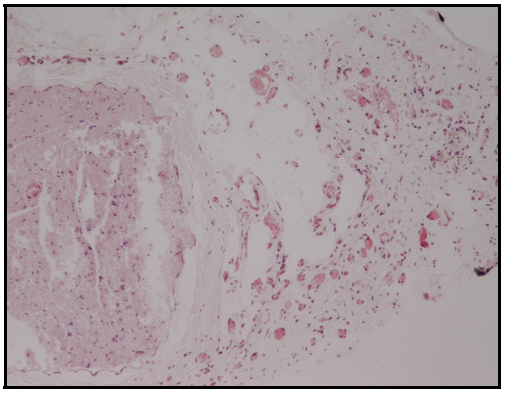
(A)  (B) 

Figura 37 – Imagens de MO - Biomembrana de colagénio tipo III (A) (40x) pós-operatório de 4 semanas – É visível a biomembrana (material amorfo) que é delimitada exterior e interiormente por uma reacção inflamatória. (B)(100X) biomembrana às 8 semanas – Parece quase já não haver vestígios de biomembrana, mas sim tecido de granulação à volta do nervo. No entanto, existem alguns vestígios de material amorfo no meio de tecido de granulação à volta do nervo.

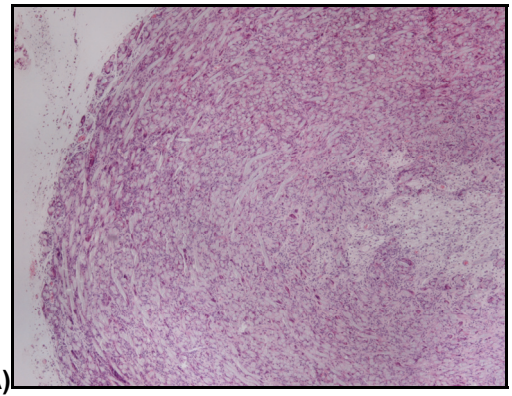
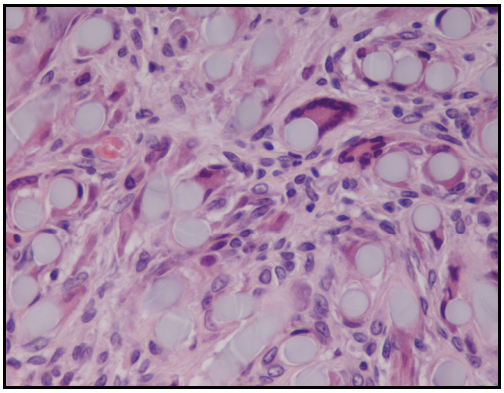
(A)  **(B)** 

Figura 38: Imagens de MO - Tubulação com PLGA 90:10 (A) (40X), (B) (400X) pós-operatório de 4 semanas – parecem haver uns "fios" mais concentrados na periferia do que no centro, que possivelmente serão biomaterial com macrófagos a circundar. Na zona central parece haver tecido conjuntivo.

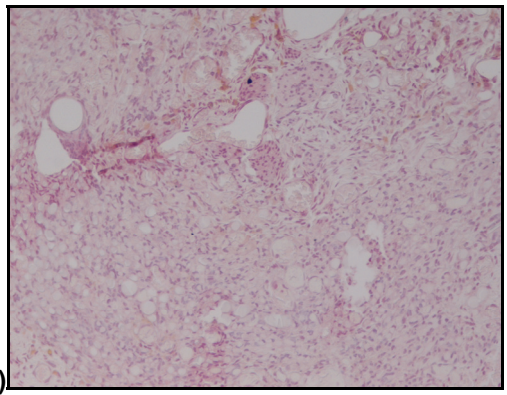
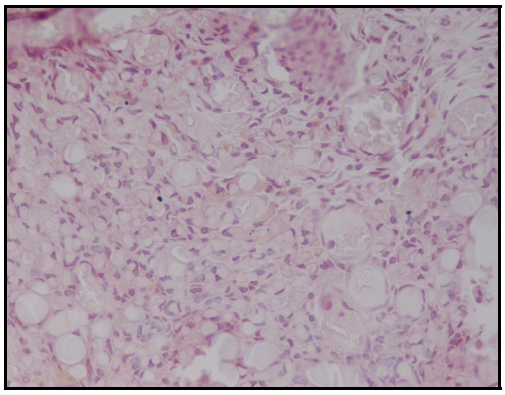
(A)  (B) 

Figura 39: Imagens de MO - Tubulação com PLGA 90:10: (A) (100X), (B) (200X) pós-operatório de 8 semanas – parecem haver uns "fios" que parecem mais finos do que aparecem às 4 semanas. Existem também células em redor destes"fios" que poderão ser fibras nervosas.

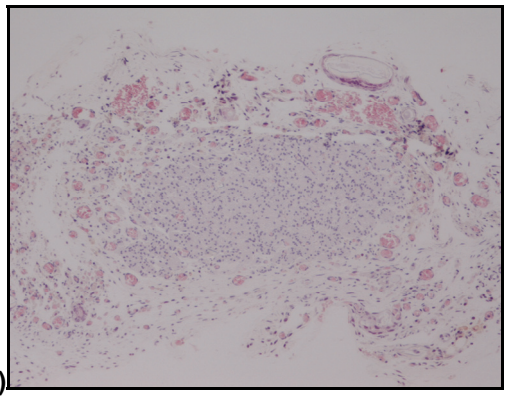
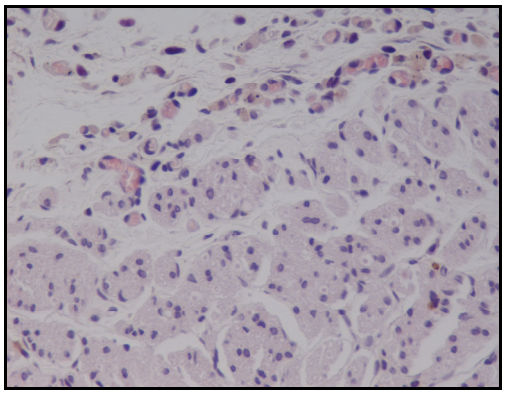
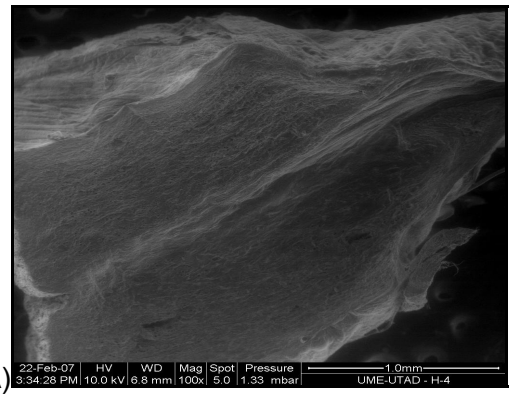
(A)  (B) 

Figura 40 – Imagens de MO - Tubulação com PLGA 90:10: (A) (100X) (B) (400X) pós-operatório de12 semanas – parece haver tecido nervoso na região central mas ainda com aspecto desorientado. Há tecido de granulação muito vascularizado e parece não haver vestígios de biomaterial.

Para análise por MEV foi utilizado um microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM 630IF (Figuras 41, 42 e 43).

(A) 

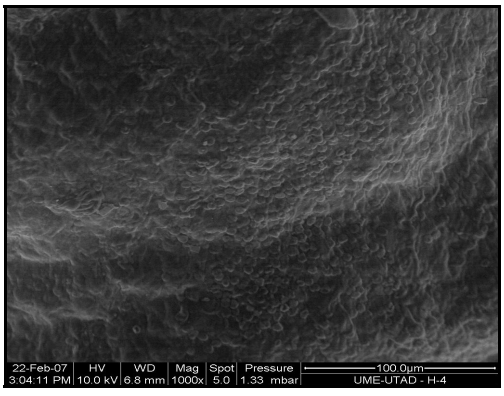
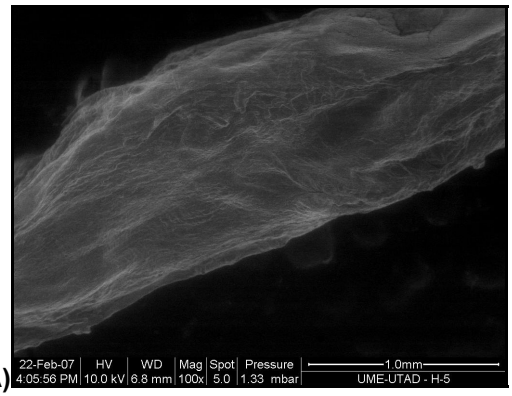
(B) 

Figura 41 – Imagens de MEV: PLGA 90:10 – Pós-operatório de 4 semanas. (A) (100x) Vista geral de toda a zona de transição entre o biomaterial e o nervo. (B) (1000x) As formações esféricas são células possivelmente da periferia do biomaterial que correspondem à reacção inflamatória local (tal como é possível confirmar em imagens de MO).

(A) 

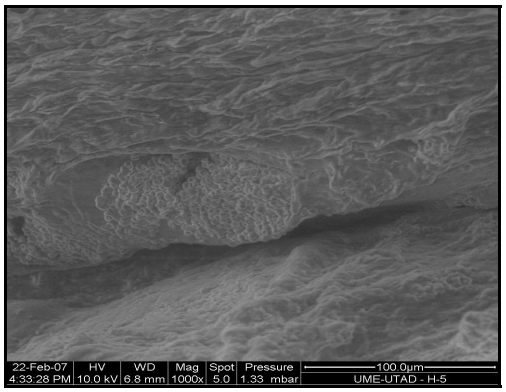
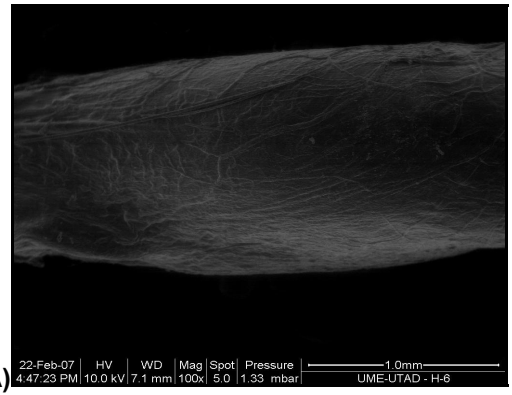
(B) 

Figura 42 – Imagens de MEV: PLGA 90:10 – Pós-operatório de 8 semanas. (A) (100x) Vista geral do nervo em regeneração em que já não é possível visualizar o biomaterial e a orientação das fibras nervosas como na figura anterior (pode confirmar-se na figura da MO). (B) (1000x) É possível observar uma ligeira orientação das possíveis fibras nervosas misturadas com o biomaterial e um grande aporte de células bem localizadas (formações esféricas) e característico desta fase.

(A) 

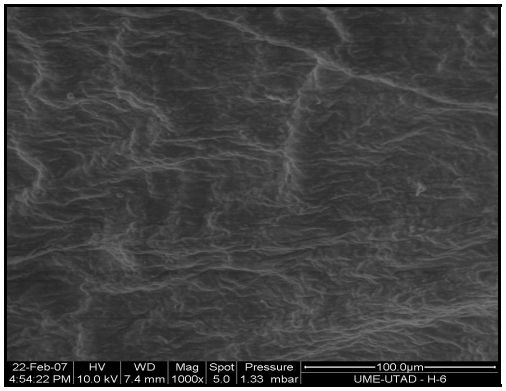
(B) 

Figura 43 – Imagens de MEV: PLGA 90:10 – Pós-operatório de 12 semanas. (A) (100x) Tal como se confirma em MO não se observa com distinção qualquer biomaterial bem como não é possível observar alguma organização ou desorganização das fibras nervosas. (B) (1000x) Idem anterior.

CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS FUTURAS

Após terem sido definidos os objectivos iniciais do nosso trabalho experimental e estabelecido o plano de trabalho, foram simuladas as respectivas lesões do nervo ciático e realizadas as reparações cirúrgicas planeadas. Deste trabalho foram obtidos os resultados apresentados no capítulo anterior dos quais pudemos resumir nos seguintes pontos:

i) Nas lesões de axonotmese, o período de 12 semanas de recuperação parece ser mais indicado que o período de 8 semanas anteriormente estabelecido por Varejão (2003), que apesar de apresentarem total recuperação dos parâmetros funcionais não apresentam ainda total recuperação dos parâmetros morfológicos e de avaliação cinemática do tornozelo.

ii) A associação de um sistema celular que utiliza células neuronais N1E-115 de ratinho com 48 horas de diferenciação *in vitro*, na recuperação de lesões de axonotmese do nervo periférico, parece inicialmente acelerar a recuperação funcional. No entanto, ao final das 12 semanas, os animais não apresentam uma recuperação total, quer morfológica quer cinemática do andamento.

iii) O novo biomaterial para o fabrico de tubos-guia, a utilizar em cirurgia de reconstrução do nervo periférico, PLGA 90:10, com dois co-polímeros na proporção de 90 de PLA/ 10 PLG nunca utilizado anteriormente *in vivo*, demonstrou ser capaz de suportar o crescimento axonal não apresentando qualquer efeito deletério no processo de regeneração do nervo. Conclui-se que tanto o Neurolac® como o PLGA 90:10, são um bom substrato para o fabrico de tubos-guia utilizados em regeneração do nervo periférico e que nenhum deles se mostrou superior ao outro. No entanto, futuras investigações serão necessárias no sentido de estender estas afirmações a outras espécies animais e também ao homem, bem como a sua utilização em maiores defeitos de nervo.

iv) A associação de um sistema celular que utiliza células neuronais N1E-115 de ratinho com 48 horas de diferenciação *in vitro*, na recuperação de lesões do nervo periférico, parece mostrar-se prejudicial quando utilizado em lesões de neurotmese e em associação com o tubo-guia de PLGA 90:10.

v) A utilização de uma biomembrana de colagénio tipo III de origem equina não interfere na regeneração do nervo periférico e pode servir de suporte ao transplante de células neuronais quando utilizada em neurotmese em suturas topo-a-topo epineural (resultados ainda não publicados) ou em lesões de axonotmese.

Os resultados obtidos ao longo do nosso estudo vêm também confirmar a necessidade e a importância do uso e da combinação de múltiplos métodos de avaliação (funcional e morfológico) na recuperação de lesões do nervo periférico de rato, quer em lesões de axonotmese quer em lesões de neurotmese.

Os resultados obtidos na utilização do sistema celular abre perspectivas futuras, no sentido de estender este tipo de método a outras células nomeadamente células estaminais com as quais o grupo em que esta investigação se insere, se encontra a trabalhar, estudando e utilizando ao mesmo tempo outro tipos de biomembranas, nomeadamente membranas de quitosano (Simões *et al.*, 2008).

A problemática da forma de manipulação do microambiente no local da regeneração do nervo é hoje, fonte de numerosas investigações. Estas investigações focam-se especialmente em 3 áreas: i) nos biomateriais a utilizar, ii) nos componentes a introduzir no local e iii) nas formas de introdução desses componentes no local.

Nos biomateriais interessa um biomaterial que não só, não tenha efeitos deletérios na regeneração do nervo, mas também com capacidades físicas e químicas capaz de suportar a regeneração do nervo, bem como capaz de suportar e libertar controladamente os componentes a adicionar, no local. Como por exemplo a produção de um material com uma estrutura multicamada que possa incorporar e libertar faseadamente os factores de crescimento. Esta é matéria de investigação para Químicos e Engenheiros de biomateriais, em que já se começou a trabalhar, nomeadamente testando diferentes tipos de membranas de quitosano (Simões *et al.*, 2008).

Nos componentes a utilizar, tal como foi já referido, existe um número indeterminado de moléculas que interferem na regeneração do nervo periférico, algumas já estudadas e seguramente muitas por testar. E existe também a possibilidade de utilização de vários tipos de células, focando-se actualmente, a atenção para as células estaminais pluripotentes, com as quais também se começou já a trabalhar (Simões *et al.*, 2008).

Nas formas de introdução destes componentes, as perspectivas futuras focam-se muito especialmente na terapia genética. Isto é, a utilização de genes ou cadeias de DNA ou RNA que possam servir de vectores (vectores virais) até ao local, e que

induzam os componentes locais à produção de agentes neurotróficos de uma forma perfeitamente fisiológica.

O desenvolvimento da Engenharia de Tecidos, e o conhecimento cada vez mais detalhado da regeneração dos tecidos, tem vindo nos últimos anos a apresentar-se como uma alternativa cada vez mais utilizada no tratamento de muitas doenças ou incapacidades permanentes, em Medicina Humana ou Medicina Veterinária.
Espera-se que este trabalho possa ter contribuído para o desenvolvimento da Medicina Regenerativa, em especial na regeneração do nervo periférico bem como abrir perspectivas para a continuação desta investigação.

CAPITULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Aebischer P, Guénard V, Valentini R, (1990). *"The morphology of regenerating peripheral nerves is modulated by the surfacce microgeometry of polimeric guidance channels." Brain Research 531(1-2): 211-218.*

Ahmed Z, Brown R (1999). *"Adhesion, alignmente, and migration of cultured Shwann cells on ultrathin fibronectin fibres." Cell Motilily and the Cytoskeleton 42: 331-343.*

Ahmed Z, Underwood S, Brow RA, (2000). *"Low concentrations of fibrinogen increse cell migration speed on fibronectin/fibrinogen composite cables." Cell Motilily and the Cytoskeleton 46: 6-16.*

Ahmed MR, Venkateshwarlu U, Jayakumar R, (2003). *"Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair." Biomaterials 25: 2585-2594.*

Ahmed MR, Venkatesswarlu U, Jayakumar R (2004). *"Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair." Biomaterials 25: 2585-2594.*

Ahmed MR, Vairamuthu S, Shafiuzama Md. Basha SH, Jayakumar R, (2005). *"Microwave irradiated collagen tubes as a better matrix for peripheral nerve regeneration." Brain Research 1046: 55-67.*

Akassoglou K, Strickland S (2002*). "Nervous system pathology: the fibrin perspective." Biological chemistry 383: 37-45.*

Akassoglou K, Yu W, Akpinar P, Strickland S. (2002). *"Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation." Neuron 33: 861-875.*

Aldini NN, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Guzzardella GA, Di Denia P, Caligiuri G, Giardino R (1999). *Trauma of the peripherical nervous system: experimental assessments with guided tissue regeneration. Acta bio-medica de L'Ateneo parmense 70(3 - 4): 49 – 55.*

Alitalo K, Kurkinen M, Vaheri A, Virtanen I,Rohde H,Timpt R, (1980). *"Basal lamina glycoproteinsare producedby neuroblastoma cells." Nature (Lond) 287: 465-466.*

Al-Majed AA, Brushart T, Gordon T, (2000a). *"Electrical stimulation accelarates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurrons." European Journal of Neuroscience 12: 4381-4390.*

Al-Majed AA, Neumann C, Brushart TM, Gordon T, (2000b). *"Brief Electrical Stimulation Promotes the Speed and Accuracy of Motor Axonal Regeneration." The Journal of Neuroscience 20(7): 2602-2608.*

Amado S (2007). Avaliação funcional, biomecânica e morfológica da reparação de lesões do nervo periférico num modelo animal. Dissertação elaborada com vista à obtenção do Grau de Mestre na Especialidade de Ciências da Fisioterapia submetida à Faculdade de Motricidade Humana da Universidade Técnica de Lisboa. Portugal.

Amako M, Nemoto K (1998). *"Influence of water immersion stress on peripheral nerve recovery in the rat." Journal of Orthopaedic Science 3: 32-41.*

Amoh Y, Li L, Campillo R,Kawahara K, Katsuoka K,Penman S, Hoffman RM, (2005). *"Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves." Proceedings of the National Academy of Sciences oh the United States of America 102: 17734-17738.*

Amano TER, Nirenberg M, (1972). *"Neurotransmitter synthesis by neuroblastomas clones" Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 69: 258-263.*

Archibald JS, Shefner C, Krarup C, Madison RD, (1995). *"Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube." Journal of Neurobiology 23: 387-398.*

Atanasoski S, Shumas S, Dickson C, Scherer S, Suter U, (2001). *"Differential Cyclin D1 Requirements of Proliferating Schwann Cells during Development and after Injury." Molecular and Cellular Neurosciences 18: 581-592.*

Avelino AM, Dailey A, Harlan JM, Sharar SR, Winn RK, McNutt LD, Kliot M (2004). *"Blocking of up-regulated ICAM-1 does not prevent macrophage infiltration during Wallerian degeration of peripheral nerve." Experimental Neurology 187: 430-444.*

Bailey SB, Eichler M, Villadiego A, Rich KM, (1993). *"The Influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicone chambers." Journal of Neurocytology 22: 176-184.*

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA, (1989). *"Funcional evaluaton of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerev lesions in the rat." Plastic and Reconstrutuive Surgery 83: 129-138.*

Balgude AP, Yu X, Szymanski A, Bellamkonda RV (2001). *"Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures." Biomaterials 22: 1077-1084.*

Bal-Price A, Brown GC (2000). *"Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosisin PC12 cells mediated by mitochondria." Journal of Neurochemique 75: 1455-1464.*

Basso DM (2004). *"Behavioral Testing After Spinal Cord Injury: Congruities, Complexities, and Controversies." Journal of Neurotrauma 21(4): 395-404.*

Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S, (2000). *"Nerve repair by means of meas of vein filled with muscle grafts I. Clincal results." Microsurgery 20: 32-36.*

Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P, (2005). *"Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biologic and synthetic conduits for sensory nerve repair." Microsurgery 25: 258-267.*

Beer GM, Steurer J., Meyer VE (2001). *"Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp." Journal of Reconstrutive Microsurgery 17: 531-534.*

Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP (2005). *"The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wlds) nerves." BMC Neuroscience 6:6: 1-27.*

Bender MD, Bennett JM, Waddell RL, Doctor JS, Marra KG (2004). *Multi-channeled biodegradable polymer / CultiSpher composite nerve guides. Biomaterials 25(7-8): 1269 – 1278.*

Bervar M (2000). *"Video analysis of standing - an alternative footprint analysis to assess funcional loss following unjury to the rat nerve sciatic." Journal of Neuroscience Methods 102: 109-116.*

Borgens RB, Shi R, Bohnert D, (2002). *"Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol." The Journal of experimental biology 205: 1-12.*

Boyd JG, Gordon T. (2002). *"A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor." European Journal of Neuroscience 15: 13-26.*

Brandt J, Dahlin L, Lundborg G, (1999). *"Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects." Journal of Hand Surgery 24: 284-290.*

Brenner MJ, Mackinnon SE, Rickman AJ, Tung THH, Hunter DA, Mohanakumar T, (2005). *"FK506 and anti-CD40 ligant in peripheral nerve allotransplantation." Restorative Neurology and Neuroscience 23: 237-249.*

Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GMT (1989). *"Self-evaluation of walking-track measurement using a sciatic function index." Microsurgery 10: 226-235.*

Brunetti M, Miscena A, Salvati A, Gaiti A, (1987). *"Effect of aging on the rate of axonal transport of cholinephosphoglycerides." Neurochemical Research. 12: 61-65.*

Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR (1994). *"Different Conduits in Peripheral Nerve Surgery." Microsurgery 15: 176-178.*

Bruns SA, Stark Y, Wieland M, Stahl F, Kasper C, Scheper T, (2006). *"Fast and efficiente screenning system for new biomaterial in tissue engineering: a model for peripheral nerve regeneration." Journal of Biomedical Materials Research: 737-747.*

Brushart TM (1988). *"Preferential Reinnervation of Motor Nerves by Regenerating Motor Axons." The Journal of Neurosciense 8(3): 1026-1031.*

Brushart TM (1991). *The mechanical and humoral control of specificityin nerve repair, in Gelberman RH (ed): Operative Nerve Repair. Philadelphia, JB Lippincott, 215-230.*

Brushart TM (1991). *"The specificity of motor axon regeneration decreases with age." Abstracts - Society for Neuroscience 17: 1481.*

Brushart TM (1993). *"Motor axons preferentially reinnervate motor pathways." The Journal of Neurosciense 13: 17-23.*

Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen Y-G, Royall RM, (1998). *"Contribuitions of Pathway and Neuron to Preferential Motor Reinnervation." The Journal of Neurosciense 18(21): 8674-8681.*

Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T, (2002). *"Electrical Stimulation Promotes Motoneuron Regeneration without Increasing Its Speed or Conditioning the Neuron." The Journal of Neurosciense 22(15): 6631-6638.*

Brushart TM, Jari R, Verge V, Rohde C, Gordon T, (2005). *"Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration." Experimental Neurology 194: 221-229.*

Cajal R (1928). *"Degeneration and regeneration of the nervous system." In DeFelipe J, Jones EG, editors. Oxford University Press: New York, 66-304 (reprinted 1991).*

Campana WM, Li X, Shubayev VI, Angert M, Cai K, Myers RR, (2006). *"Erythropoietin reduces Schwann cell TNF-alpha, Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury." Journal of Neuroscience 23: 617-626.*

Carey JD, Eldridge C, Cornbrooks CJ, Timpl R, Bunge RP, (1983). *"Biosynthesis of Type IV Collegen by Cultured Rat Schwann Cells." The Journal of Cell Biology 97: 473-479.*

Chalfoun CT, Wirth G, Evans GRD, (2006). *"Tissue engineered nerve constructs: where do we stand?" Journal of Cellular and Molecular Medicine 10(2): 309-317.*

Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz G, Spector M (1998). *Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through tubes up to level of autograft. Experimental Neurology 154(2): 315 – 329.*

Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu H-P, Spector M (2000). *"Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: the roleof myofibroblasts." The Journal of Comparative Neurology 417: 415-430.*

Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW, (1992). *"Wallerian degeneration in peripheral nerve disease." Neurologic Clinics 10: 613-627.*

Ceballos D, Navarro X., Dubey N, Wendeschafer-crabb G, Kennedy WR, Tranquillo RT, (1999). *"Magnetically Aligned Collagen Gel Filling a Collagen Nerve Guide Improves Peripheral Nerve Regeneration." Experimental Neurology 158: 290-300.*

Cenci MA, Whishaw I, Schallert T, (2002). *"Animal Models of neurological deficits: how relevant is the rat?" Nature Reviews. Neuroscience 3: 574-579.*

Chen ZL, Strickland S (2003). *"Laminin gammal1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve." The Journal of Cell Biology 163: 889-899.*

Chen Z-L, Yu W.-M., Strickland S, (2007). *"Peripheral Regeneration." Annual review of neuroscience. 30: 209-233.*

Chen L-E, Seaber A, Wong GHW, Urbaniak JR, (1996). *"Tumor Necrosis Factor Promotes Motor Funtional Recovery in Crushed Peripheral Nerve." Neurochemistry International 29(2): 197-203.*

Cheng C, Zochodne DW (2002). *"In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers." Neuroscience 115: 312-329.*

Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE, (1982). *"Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration." Surgery 91: 226-233.*

Chiu DT (1995). *Special article: the development of autogenous venous nerve conduit as a clinical entity, P & S Medical Review, 3(1). New York: Columbia-Presbyterian Med. Cent.*

Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH (2005). *"Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration." Oral & Maxillofacial Surgery Oral 34: 537-542.*

Clark WL, Trumble T, Swiontkowski MF, *et al.*, (1992). *"The nerve tension and blood flow in a rat model of immediate and delayed repairs." Journal of Hand Surgery 17: 677.*

Collin W, Donoff RB (1984). *"Nerve regeneration through collagen tubes." Journal of dental research 63: 987-993.*

Conti G, Rostami A, Scarpini E, Baron P, Galimberti D, Bresolin N, Contri M, Palumbo C, De Pol A, (2004). *"Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune-mediated demyelination and Wallerian degeration of the rat peripheral nervous system." Experimental Neurology 187: 350-358.*

Cope C, Ng R, Miller M, Langstein H, (2001). *"Technique And Clinical Experience Of The Unilink/3M® Microvascular Anastomotic Coupling Device In Free Flap Surgery." The Internet Journal of Plastic Surgery 1(1).*

Costa B, Trovato A E, Colleoni M, Giagnoni G, Zarini E, Croci T, (2005). *"Effect of the cannabinoid CB_1 receptor antagonist, SR141716, on nociceptive response and nerve demyelination in rodents with chronic constriction injury of the sciatic nerve." Pain 116: 52-61.*

Craik RL, Oatis CA, (1995) *"Gait analysis: theory and application". St Louis, Missouri: Mosby.*

Dahlin LB, Lundborg G (1998). *Experimental nerve grafting - Towards future solutions of a clinical problem. Hand Surgery 3: 165-173.*

Dahlin L, Lundborg G (2001). *"The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm." Journal of Hand Surgery 26: 393-394.*

Dahlin LB, Anagnostaki L, Lundborg G, (2001). *"Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves." Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery 35: 29-34.*

Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C. Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, S. Mark Willians, (2005). Neurociências.

De Medinaceli L, Seaber AV (1989). *"Experimental nerve reconnection: importance of initial repair." Microsurgery 10: 56-70.*

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ, (1982). *"An Index of functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks." Experimental Neurology 77: 634-643.*

De Grandis D, Santoro L, Di Benedetto P, (1995). *"L-acetylcarnitine in the treatment of pacients with peripheral neuropathies." Clinical Drug Investigation 10: 317-322.*

Dellon AL, Mackinnon SE (1988a). *"Basic scientific and clinical applications of peripheral nerve regeneration." Surgery Annual 20: 59-100.*

Dellon AL, Mackinnon SE, (1988b). *"An alternative to the classical nerve graft for the management of the short gap." Plastic and Reconstrutuive Surgery 82: 849-856.*

Dellon AL, Mackinnon SE, (1989). *"Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures." Microsurgery 10(3): 220-225.*

Dellon ES, Dellon AL (1991). *"Functional assessment of neurological impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies." Plastic and Reconstrutuive Surgery 88: 686-694.*

Den Dunnen WF, van der Lei B, Robinson PH, Holwerda A, Pennings Aj, Schakenraad JM (1995). *"Biological performance of a degradable poly(lactic acid-epsilon-caprolacone) nerve guide: influence of tube dimensions." Journal of Biomedical Materials Research 29: 757-766.*

Den Dunnen WF, Meek M, Grijpma DW, Robinson PH, Schakenraa JM (2000). *"In vivo and in vitro degradation of poly((50)/(50) ((85)/(15)(L(D))LA/epsilon-CL), and the implications the use in nerve reconstruction." Journal of Biomedical Materials Research 51(4): 575-85.*

Di Virgilio F, Meyer B, Greenberg S, Silverstein SC, (1988.). *"FC receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca2+ levels." Journal of Cell Biology 106(3): 657-666.*

Dhillon GS, Lawrence SM, Hutchinson DT, Horch KW (2004). *"Residual Function in Peripheral Nerve Stumps of Amputees: Implications for Neural Control of Artificial Limbs." The Journal of Hand Surgery 29A No. 4: 605-615.*

Dijkstra JR, M. Meek, Robinson PH, Gramsbergen A, (2000). *"Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex." Journal of Neuroscience Methods 96: 89-96.*

Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE (1996). *The role of conduits in nerve repair: a review. Reviews in Neuroscience 7(1): 47 – 84.*

Dorfman LJ (1990). *"Quantitative clinical electrophysiology in the evaluation of nerve injury and regeneration." Muscle & Nerve 13: 822-825.*

Dubey N, Letourneau PC, Tranquilo RT (1999). *Guide neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in stimulated peripheral nerve regeneration. Experimental Neurology 158: 338 – 350.*

Dubový P, S. I., Klusáková I, Zítková A, Houst'ava L, Hanlhec P (2001). *"Laminin Molecules in Freeze-Treated Nerve Sgments Are Associated With Migrating Schwann Cells That Display the Corresponding $\alpha 6\beta 1$ Integrin Receptor." Glia 33: 36-44.*

Dubový P (2004). *"Schwann cells and endoneurial extracellular matrix molecules as potencial cues for sorting of regenerated axons: A review." Anatomical Science International 79: 198-208.*

Dupont E, Canu M, Langlet C, Falempin M, (2001). *"Time course of recovery of the somatosensoty map following sensory deprivation in the rat." Neuroscience Letters 309: 121-124.*

Durward B, Baer GD, Rowe PJ, (1999) *Functional Human Movement Measurement and analysis: Butterworth-Heinemann.*

Duysens J, Van der Crommert HWAA, Smits-Englesmam BCM, Van der Helm FCT, (2002). *"A wallking robot called human: lessons to be learned from neural control of locomotion." Journal of Biomechanics 35: 447-453.*

Evans GRD, Brandt K, Niederbichler AD, Chauvin P, Herrman S, Bogle M, Otta L, Jr Patrick AW, (2000). *"Clinical long-term in vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration." Journal of Biomaterial Science of Polymers 11(8): 869-878.*

Evans GRD (2001). *"Peripheral Nerve Injury: A review and approach to tissue engineered constructs." The Anatomical Record 263: 396-404.*

Evans GRD, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, Wang B, Meszlenyi RK, Lu Lichun, Mikos AG, Jr Patrick AW (2002). *"Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration." Biomaterials 23: 841-848.*

Evans GRD (2003). *"Approches to tissue engineered peripheral nerve." Clinique Plastic Surgery 30: 559-563.*

Fawcett JW, Keynes R (1986). *"Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair." Journal of Neurosurgery 65: 354-363.*

Ferretti A, Boschi E, Stefani A, Spiga S, Romanelli M, Lemmi M, Giovannetti A, Longoni B, Mosca F (2003). *"Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant." Life Sciences 73: 1985-1995.*

Filipe VM, Pereira JE, Costa LM, Maurício AC, Couto PA, Melo-Pinto P, Varejão ASP, (2006). *"Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats." Journal of Neuroscience Methods 153: 55-61.*

Fine EG, Decosterd I, Papaloizos M, Zurn AD, Aebischer P, (2002). *"GDNF and NGF release by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap." The European Journal of Neuroscience 15: 589-601.*

Fiodart-Dessalle M, Duduisson A, Lejeune A, Severyns A, Manassis Y, Deiree P, Crielaard JM, Bassleer R, Lejeune G (1997). *"Sciatic nerve regereration through venous or nervous grafts in rat." Experimental Neurology 148: 236-246.*

Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW (2000). *Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. The American Journal of Orthopaedics 29: 167-173.*

Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF, (2005). *"Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Is Necessry for Selective Targeting of Regenerating Motor Neurons." The Journal of Neuroscience 25(8): 2081-2091.*

Frerichs O, Fansa H, Schicht C, Wolf G, Schneider W, Keineider W, (2002). *"Reconstruction of peripheral nerves using acellular nerve grafts with implanted cultured Schwann cells." Microsurgery 22: 311-315.*

Fu S Y, Gordon T (1995). *"Contributing factores to poor functional recovery after delayed nerve repair: Prolonged denervation." Journal of Neuroscience 15: 3886-3895.*

Fu SY, Gordon T (1997). *"The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration." Molecular Neurobiology 14: 67-116.*

Garthwaite J (1991). *"Glutamate, Nitric Oxide and Cell-cell Signaling in the Nervous System." Trends in Neurosciences 14: 60-67.*

Geuna S (2000). *"Apreciating the diference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system." Journal of Comparative Neurology 427: 333-339.*

Geuna S, Tos P, Battistom B, Guglielmone R, (2000a). *"Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves." Annals of Anatomy 182: 23-34.*

Geuna S, Tos P, Battistom B, Guglielmone R, Giacobini-Robecchi MC, (2001). *"Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers inperipheral nerves." Anatomy and Embryology 204: 1-10.*

Ghalib N, Houst'ava L, Haninec P, Dubovy P, (2001). *"Morphometric analysis of early regeneration of motor axons through motor and cutaneous nerve grafts." Annals of Anatomy 183: 363-368.*

Gibson KL, Remson L, Smith A, Satterlee N, Strian GM, Daniloff JK (1991*). Comparison of nerve regeneration through different types of neural prostheses. Microsurgery 12: 80 – 85.*

Gilchrist T, Glasby MA, Healy DM, Kelly G, Lenihan DV, McDowall KL, Miller IA, Myles LM, (1998). *"In vitro nerve repair--in vivo. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradeable glass tubes--a preliminary report." British Journal of Plastic Surgery 51: 231-237.*

Gillis GB, Biewener A (2001). *"Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: in vivo patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (rattus norvegicus)." The Journal of Experimental Biology 204: 2717-2731.*

Gillis GB, Biewener A (2002). *"Effects of surface grade on proximal hindlimb muscle stain and activation during rat locomotion." Journal of applied physiology 93: 1731-1743.*

Glasby MA (1991). *"Interposed muscle grafts in nerve repaier in the hand: An experiemental basis for future clinical use." World Journal of surgery 15: 501-510.*

Glass JD, Griffin JW (1994). *"Retrograde transport of radiolabeled cytoskeletal proteins in transected nerves." The Journal of Neurosciense 14: 3915-3921.*

Glass JD (2004). *"Wallerian degeneration as a window to peripheral neuropathy." Journal of Neurological Sciences 220: 123-124.*

Gluck T (1880). *Ueber Neutroplastic Auf dem Wege de Transplantation. Archiv für klinische Medizin. 25: 606-616.*

Gold BG, Katoh K., Storm-Dickerson T, (1995). *"The immunosuppressant FK506 increase the rate of axonal regeneration in the sciatic nerve." Journal of Neuroscience 15: 7509-7516.*

Gordon T, Fu SY (1997) *Long-term response to nerve injury. In: Seil FJ, ed. Advances in Neurology. Neuronal Regeneration, Reorganization, and Repair. Philadelphia: Lippincott-Raven, 72: 185-199.*

Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG (2003). *"Experimental startegies to promote funcional recovery after peripheral nerve injuries." Journal of the Peripheral Nervous System 8: 236-250.*

Grafstein B (1975). *"The nerve cell body response." Experimental Neurology 48: 32-51.*

Grafstein B, Forman DS. (1980). *"Intracellular transport in neurons." Physiological Reviews 60: 1167-1283.*

Gramsbergen A, Ijkema-Paassen J, Meek MF, (2000). *"Sciatic nerve transection in the rat: abnormal EM patterns during locomotion by aberrant innervation of hind leg muscles." Experimental Neurology 161: 183-193.*

Grasso G, Sfacteria A, Brines M, Tomasello F, (2004). *"A new computed assited technique for experimental sciatic nerve function analysis." Med Sci Monit 10(1): BR1-BR3.*

Gravvanis A I, Lavdas A, Papalois A E, Franceschini I, Tsoutsos D A, Dubois-Dacq M, Matsas R, Ioannovich J D (2005). *"Effect of genetically modified schwann cells with increase motility in end-to-side nerve grafting." Microsurgery 25: 423-432.*

Griffin FW, George R, Lobato C, Tyor WR, Li CY, Glass JD (1992). *"Macrophage systems in peripheral nerves: a review." Journal of Neuroimmunology 40: 153-165.*

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY, (1985). *"A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties." Journal of Biological Chemistry 260: 3440-3450.*

Gudemez E, Ozer K, Cunningham B, Siemionow K, Browne E, Siemionow M, (2002). *"Dehydroepiandrosterone as an enhancer of functional recovery following crush injury to rat sciatic nerve." Microsurgery 22: 234-241.*

Guenard V, Kleiman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P, (1992). *"Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration." The Journal of neuroscience 12: 3310-3320.*

Hadlock T, Koka R, Vacati J, Cheney M, (1999). *"A comparison of assessments of funcional recovery in the rat." Journal of Peripheral Nerve System 4: 258-264.*

Hadlock TA, Sundback C, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML, (2001). *"A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers." Microsurgery 21: 96-101.*

Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun Z, Yandao G, Nanmimg Z, Xiufang Z, (2000). *"Studi on nerve cell affinity of chitosan-derived materials." Journal of Biomedical Materials Research 52: 285-295.*

Hafer-Macko CE, Ivey FM; Gyure KA, Sokin JD, Macko RF, (2002). *"Reduced thrombomodulin in human peripheral nerve microvasculature." Muscle & Nerve 26: 218-224.*

Haftek J (1970). *"Stretch Injury of Peripheral Nerve." Journal of Bone and Joint Surgery 52-B: 354.*

Hare GMT, Evans P, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. (1992). *"Walking track analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery." Plastic and Reconstrutuive Surgery 89: 251-258.*

Harley B A, Hastings A Z, Yannas I V, Sannino A, (2006). *"Fabricating tubular scaffolds with a radial pore size gradient by a spinning technique." Biomaterials 27: 866-874.*

Hart A, Terenghi G, Johnson MA, Youle M, (2000). *"Immunohistochemical quantification of cutaneous innervation in HIV-associated peripheral neuropathy: a study of acetyl-L-carnitine therapy". Abstract 36. 3 rd International Worshop on Salvage for HIV Infection, Chicago. Antiviral Therapy 5 (Suppl 2): 32.*

Hart AM, Terenghi G., Kellerth J-O, Wiberg M (2004). *"Sensory Neuroprotection, Michondrial Preservation, and Terapeutic Potential of N-Acetyl-Cysteine after Nerve Injury." Neuroscience 125: 91-101.*

Hart A, W. M., Youle M, Terenghi G, (2004). *"Systemic acetyl-L-carnitine eliminates sensory neuronal loss after peripheral axonotomy: a new clinical approach in the management of peripheral nerve trauma." Experimental Brain Research 145: 182-189.*

Hashimoto T, Suzuki Y., Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C, (2002). *"Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regeneration axons." Experimental Brain Research 146: 356-368.*

Hebebrand D, Zohman G, Jones NF, (1997). *"Nerve xenograft transplantation. Immunosuppression with FK-506 and RS-61443." Journal of Hand Surgery Br.22: 304-307.*

Heijke GCM, Klopper PJ,Baljet B, Van Doorn IBM, Baljet B (2001). *Processed porcine collagen tubulization versus conventional suturing in peripheral nerve reconstruction: an experimental study in rabbits. Microsurgery 21: 84-95.*

Herbert CB, Nagaswami C, Bittner GD, Hubbel JA, Weisel JW, (1998). *"Effects of fubrin micromorphology on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in theree-dimensional fibrin gels." Journal of Biomedical Materials Research 40: 551-559.*

Hikosaka K (1979). *"An experimental study on the regeneration of the peripheral nerve-adaptation of the funiculus at the sutured site (author's transl)." Nippon Seikeideka Gakkai Zasshi 53(11).*

Hiles RW (1972). *"Freeze dried irradiated nerve homograf: a preliminary report." Hand 4: 79-84.*

Hoogeveen JF, Troost D, Wondergem J, van der Kracht AHW, Haveman J (1992). *"Hyperthermic injury versus crush injury in the rat sciatic nerve: a comparative functional, histopathological and morphometric study." Journal of the Neurobiological Sciences 18: 83-88.*

Hoyt DF, Wickler SJ, Cogger EA (2000). *"Time of contact and step length: the effect of limb length, running sped, load carrying and incline". The Journal of Experimental Biology. 203: 221-227.*

Howard CS, Blakeney D, Medige J, Moy OJ, Peirmer CA (2000). *"Funcional assessment in the rat by ground reaction forces." Journal of Biomechanics 33: 751-757.*

Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK, (1979). *"Quantitative aspects of normal locomotion in rats." Life Sciences 25: 171-180.*

Hu D, Hu R, Berde CB, (1997). *"Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade." Anesthesiology 86: 957-965.*

Huang Yi-Cheng, Huang Y-Y (2006). *"Biomaterials and Stratergies for Nerve Regeneration." Artificial Organs 30(7): 514-522.*

Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE (2000). *Engineering strategies for peripherical nerve repair. The Orthopedic clinics of North America 31(3): 485 – 498.*

Huitema RB, Hof A, Postema K, (2002). *"Ultrasonic motion analysis system-measurement of temporal and sagital gait parameters." Journal of Biomechanics 35: 837-842.*

Ide C, Tohayma K, Tajima K, Endoh K, Sano K, Tamura M, Mizoguchi A, Kitad M, Morihara T, Shirasu M (1998). *"Long Acellular Nerve Transplants for Allogeneic Grafting and the effects of Basic Fibroblast Growth Factor on the Regenerating Axons in Dogs: A Preliminary Report." Experimental Neurology 154: 99-112.*

Ignatiadis I A, Yiannakopoulos C K, Barbitsioti A D, Avram A M, Patralexis H G, Tsolakis C K, Papalois A E, Xenakis T H, Beris A E, Soucacos P N, (2007). *"Diverse Types of Epineural Conduits for Bridging Short Nerve Defects. An Experimental Study in the Rabbit." Microsurgery 27: 98-104.*

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF (2004). *"Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation." Biomaterials 25: 1583-1592.*

Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ, (1998). *"Funcional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse." Microsurgery 18: 119-124.*

Jablecki J, Pielka S (2004). *"Clinical applications of peripheral nerve allotransplantation. Present medical experience and review of the literature." Neurologia i neurochirurgia polska 38(2): 137-142.*

Jacob J, Robbins N (1990). *"Age differences in morphology of reinnervation of partially denervated mouse muscle." Journal of Neuroscience 10: 1530-1540.*

Johnson H, Hökfelt T, Ulfhake B, (1996). *"Decreased expression of TrkB and TrkC mRNAs in spinal motoneurons of aged rats." European Journal of Neuroscience 8: 494-499.*

Johnson ML, BilliarT (1998). *"Roles of Nitric Oxide in Surgical Infection and Septics." World Journal of surgery 22: 187-196.*

Jolicoeur FB, Rondeau DB, Hamel E, Butterworth RF, Barbeau A, (1979). *"Masurement of ataxia and related neurological signs in the laboratory rat." The Canadian Journal of Neurological Sciences 6: 209-215.*

Junqueira LC, Carneiro J. (1999). *"Tecido Nervoso" in Histologia Basica, nona Ed. Editora Guanabara. 129-178.*

Jungnickel J, Claus P, Gransalke K, Timmer M, Grothe C, (2004a). *"Targeted disruption of the FGF-2 gene affects the response to peripheral nerve injury." Molecular and cellular neurosciences 25: 444-452.*

Jungnickel J, Haase K, Konitzer J, Timmer M, Grothe C, (2006). *"Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor." Journal of Neurobiology 66: 940-948.*

Kanaya F, Forrell J, Tsai T-M, Breidenbach WC (1992). *"Functional results of vascularized versus nonvascularized nerve grafting." 98: 1264-1271.*

Kanaya F, Forrell J, Breidenbach WC (1996). *"Sciatic function Index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration." Plastic and Reconstrutuive Surgery 98: 1264-1271.*

Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler M, (2001). *"Nerve regenration through an epineural sheath: Its funcional aspect compared with a nerve and vein grafts." Microsurgery 21: 196-201.*

Kauppila T, J. E., Huopaniemi T, Hujanin E Liesi P, (1993). *"A laminin graft replaces neurorraphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve." Experimental Neurology 123: 181-191.*

Kauppilla T (1998). *"Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain." Neuroscience & Biobehavioral Reviews 23: 111-129.*

Kayikcioglu A, Karamursel S, Agaoglu G, Sargon MF, Kecik A, (1999). *"A new epineural nerve repair technique: Oblique nerve coaptation." Annals of plastic surgery 43: 506-512.*

Kayikcioglu A, Karamursel S, Demirci M, Erdem S, Keçik A, (2004). *"A New Epineural Nerve Repair Technique with External Metallic Circle." Surgical neurology 62: 387-392.*

Keay KA, Monassi CR., Levison DB, Bandler R, (2004). *"Peripheral nerve injury evokes disabilities and sensory dysfunction in a subpopulation of rats: a closer model to human chronic neuropathic pain?" Neuroscience Letters 361(1-3): 188-191.*

Khalil Z, Liu T, Helme RD, (1999). *"Free radicals contribute to the reduction in peripheral vasula responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury." Pain 79: 31-37.*

Khalil Z, Khodr B (2001). *"A role for radicals and nitric oxide in delayed recovery in age rats with chronic constriction nerve injury." Free Radical Biology & Medicine 31, No.4: 430-439.*

Kilbourn RG, Traber D, Szabo C, (1997). *"Nitric Oxide and Shock." Disease-A-Month 43(277-348).*

Kierszenbaum, A. L. (2004). *"Tecido Nervoso" in Histologia e Biologia Celular Elsevier Editor Lda 213 -241.*

Kim DH, Kam AC, Chandika P, Tiel RL, Kline DG, (2001). *"Surgical management and outcomes in pacients with median nerve lesion." Journal of Neurosurgery 95(1): 584-594.*

Kim DH, Han K, Tiel RL, Murovis JA, Kline DG, (2003). *"Surgical outcomes of 654 ulnar nerve lesions." Journal of Neurosurgery 198(5): 993-1004.*

Kim DH, Murovic J, Tiel RL, Kline DG, (2004). *"Management and outcomes in 318 operative common peroneal nerve lesions ta the Louisisna State Uneiversity Health Sciences Centar." Neurosurgery 54(6): 1421-1429.*

Kim HA, Pomeroy S, Whoriskey W, Pawlitzky I, Benowitz LI, Sicinski P, Stiles CD, Roberts TM, (2000). *"A Developmentally Regulated Switch Directs Regenerative Growth of Schwann Cells through Cyclin D1." Neuron 26: 405-416.*

Kingery WS, Vallin J (1989). *"The development of chronic mechanical hyperalgesia, autotomy and collateral sprouting following sciatic nerve sectio in rat." Pain 38: 321-332.*

Knudson DV, Morrison CS, (1997). *"Qualitative Analysis of Human Movement: Human Kinetics.*

Kobayashi NR, Bedard A, Hinchke MT, Tetzlaff W, (1996). *"Increase expressionof BDNF and TrkB mRNA in rat facial motoneurons after axotomy." European Journal of Neuroscience 8: 1018-1029.*

Kobayashi NR, Mackinnon S, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM JR, (1997). *"The effect of duration of muscle denervation on funcional recovery in the rat model." Muscle & Nerve 20: 858-866.*

Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE, (1995). *"Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells." Science 268: 1500-1503.*

Koeppen AH (2004). *"Wallerian degeneration: history and clinical significance." Journal of Neurological Sciences 220: 115-117.*

Koka R, Hadlock T (2001). *"Quantification of Funcional Recovery Following Rat Sciatic Nerve Transection." Experimental Neurology 168: 192-195.*

Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, Vacanti CA, Vacanti MP, Ignotz RA (2004). *"Novel technique for peripheral nerve reconstructionin the absence of an artificial conduit." Journal of Neuroscience Methods 134: 133-140.*

kotulska K, Marcol W, Larysz-Brysz M, Tendera Z, Malinowska-Kolodziej I, Slusarczyk W,Jedrzejowska-Szypulka H, Lewin-Kowalik J, (2006). *"Effect of Oblique Nerve Grafting on Peripheral Nerve Regeneration in Rats." Microsurgery 26: 579-584.*

Kuffler DP (1986). *"Accurate reinnervation of motor end plates after disruption of scheath cells and muscle fibres." Journal of Comparative Neurology 250: 228-35.*

Kuffler DP (1989). *"Regeneration of muscle axons in a frog is directed by diffusible factors from denervated muscle and nerve tubes." Journal of Comparative Neurology 281: 416-25.*

Labrador RO, Buti M, Navarro X, (1998). *"Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair." Experimental Neurology 149: 234-252.*

Le Fur G (2004). *"Pharmacology of cannabinoid receptor antagonists-possible therapeutic application." Fundamental & clinical pharmacology: 18-9.*

Lee AC, Yu V, Lowe JB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE, (2003). *"Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration." Experimental Neurology 184: 295-303.*

Lee WP, Wolfe SW (2000). *Peripheral nerve injury and repair. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 8: 243-252.*

Levi ADO, Sonntag VKH, Dickman C, Mather J, Li RH, Cordoba SC, Bichard B, Berens M, (1997). *"The role of cultured Schwann cells grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous systems of primates." Experimental Neurology 143: 25-36.*

Li X, Gonias S, Campana WM. (2005). *"Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury." Glia 51: 254-265.*

Lindsay RM (1996). *Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons. An overview. Philosophical Transactions of the Royal Society of London [Biological Sciences] 351: 365-373.*

Liu S, Li H, Yang J, Peng H, Wu K Liu Y, Yang J, (2005). *"Enhanced Rat Sciatic Nerve Regeneration Through Silicon Tubes Filled With Pyrroloquinoline Quinone." Microsurgery 25: 329-337.*

LLoyd B M, Lunginbuhl R D, Bernner M J, Rocque B G, Tung T H, Myckatyn T M, Hunter D A, Mackinnon S E, Borschel G H, (2007). *"Use of Motor Nerve Material in Peripheral Nerve Repair With Conduits." Microsurgery 27: 138-145.*

Lobsiger CS, Taylor V, Suter U (2002). *"The early life of a Schwann cell." Biological Chemistry 383: 245-253.*

Lore AB, Hubbell J, Bobb DS Jr, Ballinger ML, Loftin KL, Smith JW, Smyers ME, Garcia HD, Bittner GD, (1999). *"Rapid induction of functional and morphological continuity between severed ends of mammalian or earthworm myelinated axons." Journal of Neuroscience 19: 2442-2454.*

Lowdon IMR, Seaber A, Urbaniak JR, (1988). *"An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de medinaceli." Journal of Neuroscience Methods 24: 279-281.*

Lui CT, Bevda CE, Lewey FH, (1948). *"Tensile strength in human nerves." Archives of Clinical Neuropsychology 59: 332.*

Lundborg G (1970). *"Ischaemic Nerve Injury." Scandinavum journal of Plastic and Reconstructive Surgery Supplementum 6.*

Lundborg G, Rydevik B (1973). *"Effects of Stretching the Tibial Nerve of the Rabbit. A preliminar Study of the Intraneural Circulation and the Barrier Function of the Perineurium." The Journal of Bone and Joint Surgery 55-B: 390-401.*

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S (1982a). *Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. Experimental Neurobiology 76: 361-375.*

Lundborg G, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S, (1982). *"In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap." Journal of neuropathology and experimental neurology 41(4): 412-422.*

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Nachemson AK, (1986). *"Tissue specificity in regeneration." Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery. 20: 279-283.*

Lundborg G (1988). Nerve *Injury and Repair. New York: Longman Group UK.*

Lundborg G (2000). *"A 25-Year Perspective of Peripheral Nerve Surgery: Evolving Neuroscientific Concepts and Clinical Significance." Journal of Hand Surgery 25A: 391-414.*

Lungborg G. (2003). *Bridging nerve defects: the role of tissue interpositioning.In: Masquelet AC, Ferreira AC, editors. Severe traumatic defects of the upper limb. London: Martin Dunitz.p153-167.*

Lundborg G, Rosén B, Dahlin L, Holmberg, Rosén I, (2004). *"Tubular Repair of the Median or Ulnar Nerve in the Human Forearm: a 5-year follow-up." Journal of Hand Surgery 29B(2): 100-107.*

Lutz BS, Lidman D (2005). *"Morphological and Funcional Evaluation of Leg-Muscle Reinnervation after Coupler Coaptation of the Divided Rat Sciatic Nerve." Microsurgery 25: 235-240.*

Mackinnon SE, Hundson AR, Hunder DA, (1985). *"Histological assessment of the nerve regeneration in the rat." Plastic and Reconstrutuive Surgery 75: 384-388.*

Mackinnon SE, Dellon AL(1988). *"Surgery of the Peripheral Nerve." New York: Thieme Med. Publ.*

Mackinnon SE, Dellon A, (1990a). *"Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycoli acid tube." Plastic and Reconstrutuive Surgery 85(3): 419-424.*

Mackinnon SE, Dellon AL, (1990b). *"A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate." Journal of Reconstrutive Microsurgery 6(2): 117-121.*

Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP, (1991). *"Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model." Muscle Nerve 14(11): 1116-1122.*

Mackinnon SE (1996). *"Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration-Discussion." Plastic and Reconstrutuive Surgery 98: 1272-1274.*

Mackinnon SE (1996). *"Nerve allotransplantation following severe tibial nerve injury." Journal of Neurosurgery 84: 671-676.*

Mackinnon SE (2002). *"Pathophysiology of nerve compression." Hand Clinics 18: 231-241.*

Madison R, da Silva C, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL, (1985). *"Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel." Experimental Neurology 88: 767-772.*

Madison RD, da Silva CF, Dikkes P, (1988). *"Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve distance successfully bridged with tubular prostheses." Brain Research 447: 325-334.*

Madison RD, Archibald SJ, Krarup C (1992). Peripheral Nerve Injury. In Cohen IK, Diegelman F, Lindbald WJ, editors. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. WB Saunders: Philadelphia, 450-487.*

Madison RD, Archibald S, Brushart TM (1996). *"Reinnervation accuracy of the rat femural nerve by motor and sensory neurons." The Journal of Neuroscience 16 (18): 5698-5703.*

Madison RD, Archibald SJ, Lacin R, Krarup C, (1999). *"Factors Contributing to Preferential Motor Reinnervation in the Primate Peripheral Nervous System." The Journal of Neuroscience 19(24): 11007-11016.*

Madison R D, Zomorodi A, Robinson G A, (2000). *"Netrin-1 and Peripheral Nerve Regeneration in the Adult Rat." Experimental Neurology 161: 563-570.*

Madorsky SJ, Swett J, Crumley RL, (1998*). "Motor versus sensory neuron regeneration through collagen tubes." Plastic and Reconstrutuive Surgery 102: 430-438.*

Maeda T, Mackinnon SE, Best TJ, Evans PJ, Hunter DA, Rajiv Midha RT, (1993). *"Regeneration across "stepping-stone" nerve grafts." Brain Research 1993: 196-202.*

Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S, (1999). *"Effects of Tension at the Site of Coaptation on Recovery of Sciatic Nerve Function after Neurorrhaphy: Evaluation by Walking-Track*

*Measurement, Electrophysiology, Histomorphometry, and Electron Probe X-Ray Microanalysis." Microsurgery **19**: 200-207.*

Marmor L (1964). *"The repair of peripheral nerve by irradiated homografts." Clinical Orthopaedics and related research 34: 161-169.*

Martini R, Schachner M, Brushart TM, (1994). *"The L2/HNK-1 carbohydrate is preferentially expressed by previously motor axon-associated Schwann cells in reinnervated peripheral nerves." The Journal of Neuroscience 14: 7180-7191.*

Martins RS, Siqueira M, Da Silva CF, Plese JPP, (2005). *"Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of a the techniques in a rat model. Which is the ideal choice?" Surgical Neurology 64: 10-16.*

Masaki T, Matsumura K , Hirata A, Yamada H, Hase A, Arai K, Shimizu T, Yorifuji H, Motoyoshi K, Kamakura K (2003). *"Expression of dystroglycan and the laminin-alpha 2 chain in the rat peripheral nerve during development." Acta neurologica 99: 289-295.*

Masters DB, Berde C, Dutta SK, Griggs CT, Hu D, Kupsky W, Langer R (1993). *"Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthesic from a biodegradable polymer matrix." Anesthesiology 79: 340-346.*

Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Nakamura T, Endo K, Shimizu Y (2000). *"Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regeneted nerves." Brain Research 868: 315-328.*

Matsuyama T, Mackay M, Midha R, (2000). *"Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review." Neurologia Medico-Chirurgica 40: 187-199.*

Mauritz C, Grothe C, Haastert K, (2004). *"Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells." Journal of neuroscience research 77: 453-461.*

McConnell MP, Dhar S, Naran S, Nguyen T, Bradshaw RA, Evans GR, (2004). *"In vivo induction and delivery of nerve growth factor, using HEK-293 cells." Tissue Engineering 10: 1492-1501.*

McLauglin RM (2001). *"Kinetic and Kinematic gait analysis in dog." Journal of North America: Small Animal Practice 31: 193-201.*

Mears S, Schachner M., Brushart TM, (2003). *"Antobodies to myelin-associated glycoprotein accelerate preferential motor reinnervation." Journal Peripheric Nervosous System 8: 91-9.*

Meek MF, Den Dunnen W, Bartels HL, Pennings AJ, Robinson PH, Schakenraad JM, (1997). *"Peripheral nerve regenration and funcional nerve recovery after recosntrution with-walled biodegradable poly (DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guide." Cells and Materials 7: 53-62.*

Meek MF, Den Dunnen W, Robinson PH, Schakenraad JM (1999). *"Long-term evaluation of funcional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly(DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guide, using walking-track analysis and electrostimulation tests." Microsurgery 19: 247-253.*

Meek MF, Van Der Werff JFA, Nicolai J-P A, Gramsbergen A, (2001). *"Biodegradable p(DLLA-ε-CL) Nerve Guides Versus Autologous Nerve Grafts: Electromyographic and Video Analysis." Muscle & Nerve 24: 753-759.*

Meek MF, Coert J, Nicolai JP, (2001). *"Amnion tube for nerve regeneration." Plastic and Reconstrutuive Surgery 107: 622-623.*

Meek MF, Coert J H (2002). *"Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: Review of the literature." Journal of Reconstrutive Microsurgery 18: 97-109.*

Meek MF, Varejão A, Geuna S, (2002). *"Muscle grafts and alternatives for nerve repair." Journal of Oral Maxillofacial Surgery 60: 1095-1096.*

Meek MF, Varejão A, Geuna S, (2004). *"Use of Skeletal Muscle Tissue in Peripheral Nerve Repair: Review of the Literature." Tissue Engineering 10 N.º7: 1027-1036.*

Meek MF, Koning MAJ, Nicolai J-PA, Gramsbergen (2004). *"Rehabilitation strategy using enhanced housing environment during neural regeneration." Journal of Neuroscience Methods 136: 179-185.*

Mendonça AC, Barbieri C, Mazzer N (2003). *"Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats." Journal of Neuroscience Methods 129: 183-190.*

Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS, (1989). *"Complication from silicon polymer entubulization of nerves." Microsurgery 10: 130-133.*

Metz GAS, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K, (2000). *"Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats." Brain Reserch 883: 165-177.*

Meyer RS, Abrams RA, Botte MJ, Davey JP, Bodine-Fowler SC (1997). *Functional recovery following neurorrhaphy of the rat sciatic nerve by epineurial repair compared with tubulization. The Journal of Orthopaedic Research 15: 664-669.*

Millesi H (1970). *"Interfascicular nerve grafting." The Orthopedic clinics of North America 2: 419-435.*

Millesi H, Meissl G, Berger A, (1976). *"Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar, and radical nerves." The Journal of bone and joint surgery. American volume 58: 209-218.*

Millesi H (1990). *Progress in peripheral nerve reconstruction. World Journal of Surgery 14: 733-747.*

Millesi H (2006). *"Factors Affecting the Outcome of Peripheral Nerve Surgery." Microsurgery 26: 295-302.*

Mirsky R, Winter J., Abney ER, Pruss RM, Gavrilovic J, Raff MC (1980). *"Myelin-specific Proteins and Glicolipids in Rat Schwann Clles and Oligodendrocytes in Culture." The Journal of Cell Biology 84: 483-494.*

Miyamoto Y (1979). *"Experimental study of results of nerve suture under tension vs. nerve grafting." Plastic and Reconstrutuive Surgery 64(4): 540-549.*

Mitchell SW (1872). *“Injuries of Nerves and their consequences” Lippincott, Philadelphia, PA.*

Mligiliche N, Endo K, Okamoto K, Fujimoto E, Ide C, (2002). *"Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration." Journal of biomedical materials research 63: 591-600.*

Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I, (1982). *"Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube." Muscle & Nerve 5: 54-57.*

Monassi CR, Bandler R, Keay KA, (2003). *"A subpopulation of rats show social and sleep-waking changes typical of chronic neuropathic pain following peripheral nerve injury." The European journal of neuroscience 17(9): 107-1920.*

Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, Terenghi G, (2002). *"Effect of Allogeneic Schwann Cell Transplantation on Peripheral Nerve Regeneration." Experimental Neurology 173: 213-223.*

Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M, (2003). *"Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair." Brain Research 974: 17-24.*

Naff NJ, Ecklund J (2001). *"History of peripheral nerve surgery techniques." Neurosurgery clinics of North America 12: 197-209.*

Nakamura H, Moroji T, Nohara S, Nakamura H, Okada A. (1990). *"Effects of whole-body vibration stress on substance P- and neurotensin-like immunoreactivity in rat brain." Environmental Research 52(2): 155-163.*

Navarro X, Verdi E, Butí M, (1994). *"Comparison of Regenerative and Reinnervating Capabilities of Different Functional Types of Nerve Fibers." Experimental Neurology 1994: 217-224.*

Navarro X, Rodríguez J., Labrador RO, Butí M, Ceballos N, Gómez N, Cuadras J, Perego G, (1996). *"Peripheral nerve regeneration through bioresorbable and durable nerve guides." Journal of Peripheral Nerve System 1: 53-64.*

Newman JP, Verity A, Hawatmeh S, Fee WE Jr, Terris DJ, (1996). *"Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration." Archives Otolaryngology Head Neck Surgery 122: 399-403.*

Nichols CM, Brenner M, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR, Mackinnon SE, (2004). *"Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration." Experimental Neurology 190(2): 347-355.*

Nichols CM, Myckatyn T, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnom SE, (2005). *"Choosing the correct functional assay: A comprehensive assessment of functional tests in the rat." Behaviuoral Brain Research 163: 143-158.*

Nicoli Aldini N, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R, (2000). *"Guided regeneration wit resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries." International Orthopaedics 24: 121-125.*

Nie X, Zhang J, Tian D, Dong J, Chen W, Jin Y, (2007). *"Improvement of peripheral nerve regenetation by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells." International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 36: 32-38.*

Nigg BM, Cole GK, (1994) *Measuring techniques, in Biomechanics of the musculo-skeletal system, W. Herzog, Editor. John Wiley & Sons: Chichester, England.*

Ngo TB, Waggoner P, Romero AA, Nelson KD, Eberhart RC, Smith GM, (2003). *"Poly (L-Lactide) Micrifilaments Enhance Peripheral Nerve Regeneration Across Extended Nerve Lesions." Journal of Neuroscience Research 72: 227-238.*

Ogata T, Iijima S, Hoshikawa S, Miura T, Yamamoto S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, (2004). *"Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control Schwann cell myelination." Journal of Neuroscience 24: 6724-6732.*

Ohara H, Kawamura M, Namimatsu A, Miura T, Yoneda R, Hata T. (1991). *"Mechanism of hyperalgesia in SART stressed (repeated cold stress) mice: Antinociceptive effect of neurotropin." The Japanese Journal of Pharmacology 57: 243-250.*

Okamoto H, Oka Y, (1990). *"Experimental study on tension and stretching to peripheral nerve." Nippon Seikeideka Gakkai Zasshi 64(5): 472-484.*

Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M, (2001). *"Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the sciatic nerve following crush injury; experimental study." Neurosurgery clinics of North America 17(1): 69-75.*

Patrick CW, Zheng B, Schmidt M, Herman PS, Chauvin BP, Fan Z, Stark B, Evans GR, (2001). *"Dermal fibroblasts genetically engineered to release NGF." Annals of plastic surgery 47: 660-665.*

Peker F, Solakoglu C, Yuksel F, Kutlay M, (2005). *"Effects of time lapse on reuslts of partial nerve injury repair." Journal of Reconstrutive Microsurgery 21(2): 145-149.*

Perry J, (1992) *Gait analysis: normal and pathological function. Grove Road: SLACK.*

Pfister L A, Papaloïzos M, Merkle H P, Gander B, (2007). *"Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair." Journal of Peripheral Nerve System 12: 65-82.*

Pogrel MA, Maghen A (2001). *"The use of Autogenous Vein Gratfs for Inferior Alveolar and Lingual Nerve Reconstruction." Journal of Oral Maxillofacial Surgery 59: 985-988.*

Polgár E, Hughes D, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskár Z, Todd AJ, (2003). *"Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain." Pain 104: 229-239.*

Raso VVM, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan V S, (2005). *"Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves?" Journal of Neuroscience Methods 142: 185-192.*

Ratner BP, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, (2004). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Editor Elsevier Academic Press.*

Ravi V. Bellamkonda (2006). *"Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy." Biomaterials 27: 3515-3518.*

Ravinet-Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P, (2005). *"CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resitance to diet-inducet obesity and enhanced leptin sensitivity." International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity 28: 640-648.*

Redett R, Jari R, Crawford T, Chen Y-G, Rohde C, Brushart TM, (2005). *"Peripheral Pathways Regulate Motoneuron Collateral Dynamics." The Journal of Neuroscience 25(41): 9406-9412.*

Rich KM, Alexander T, Pryor LC, Hollowell JP, (1989). *"Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers." Experimental Neurology 105: 162-170.*

Ridding MC, Brouwer B, Miles TS, Pitcher JB, Thompson PD, (2000). *"Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in humans subjects." Experimental Brain Research 131: 135-143.*

Risitano G, Cavallaro G, Merrino T, Coppolino S, Ruggeri F, (2002). *"Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologus vein graft in emergency hand reconstruction." Chirurgie de la main 21: 194-197.*

Robertson DGE, Caldwell GE, Hamill J, Kamen G, Wittlesey SN, (2004). *Research Methods in Biomechanics. Champaingn: Human Kinetics.*

Rodrigues JM, Luís AL, Lobato JV, Pinto MV, Lopes MA, Freitas M, Geuna S, Santos JD, Maurício AC, (2005a). *"Determination of the intracellular Ca^{2+} concentration in the N1E-115 neuronal cell line in perspective of its use for peripheric nerve regeneration." Bio-Medical Material and Engineering 15: 455-465.*

Rodrigues JM, AL Luís, JV Lobato, MV Pinto, A Faustino, NS Hussain, MA Lopes, AP Veloso, M Freitas, S Geuna, JD Santos, AC Maurício (2005b). *Intracellular Ca^{2+} Concentration in the N1E-115 Neuronal Cell Line and its use for Peripheric Nerve Regeneration. Acta Médica Portuguesa 18: 323-328*

Rodriguez JF, Gómez N, Perego G, Navarro X (1999). *"Highly permeable polylactide-caprolactona nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps." Biomaterials 20: 489-1500.*

Rodríguez JF, Verdú E, Ceballos D,Navarro X, (2000). *"Nerve Guides Seeded with Autologous Schwann Cells Improve Nerve Regeneration." Experimental Neurology 161: 571-584.*

Rodriguez JF, Valero-Cabré A., Navarro X, (2004). *"Regeneration and funcional recovery following peripheral nerve injury." Drugs Discovery Today: Disease Models 1, No.2: 177-185.*

Robinson GA, Madinson R, (2003). *"Preferential Motor Reinnervation in the Mouse: Comparison of Femoral Nerve Repair Using a Fibrin Sealant or Suture." Muscle & Nerve 28: 227-231.*

Robinson GA, Madison R, (2004). *"Motor neurons can preferentially reinnervate cutaneous pathways." Experimental Neurology 190: 407-413.*

Robinson GA, Madison R (2005). *"Manipulations of the mouse femoral nerve influence the accuracy of pathway reinnervation by motor neurons." Experimental Neurology 192: 39-45.*

Robinson GA, Madison R (2006). *"Developmentally regulated changes in femoral nerve regeneration in the mouse and rat." Experimental Neurology 197: 341-346.*

Rogister B, Delree P, Leprince P, Martin D, Sadzot C, Malgrange B, Munaut C, Rigo JM, Lefebvre PP, Octave JN, *et al.*, (1993). *"Transforming growth factor beta as a neuronoglial signal during peripheral nervous system response to injury." Journal of Neuroscience Research 34: 32-43.*

Rovak JM, Cederna PS, Kuzon WM Jr, (2001). *"Terminolateral neurorrhaphy: a review of the literature." Journal of reconstructive microsurgery 17(10): 615-624.*

Rushton R, Steinberg H, Tinson C, (1963). *"The effects of a single experience on subsequent reactions to drugs." British Journal of Pharmacology 29: 99-105.*

Sagiv P, Shabat S, Mann M, Ashur H, Nysha M, (2002). *"Rehabilitation process and funcional results of pacients with amputated fingers." Plastic and Reconstrutuive Surgery 110: 497-503.*

Saito F, Moore S, Barresi R, Henry MD, Messing A, Ross-Barta SE, Cohn RD, Williamson RA, Sluka KA, Sherman DL, Brophy PJ, Schmelzer JD, Low PA, Wrabetz L, Feltri ML, Campbell KP. (2003). *"Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization." Neuron 38: 747-758.*

Santos X, RodrigoJ, Hontanilla B, Bilbao G, (1998). *"Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system." Journal of Neuroscience Methods 85: 119-127.*

Schmidt CE, Sastri V, Vacanti JP, Langer R, (1997). *"Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 8948-8953.*

Schmidt CE, Leach JB (2003). *Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. Annual Review of Biomedical Engineer 5: 293 – 347.*

Schmitz C (1998). *"Variation of fractionator estimates and its prediction." Anatomy and Embryology 198: 371-397.*

Schouenborg J, Kalliomaki J (1990). *"Funcional organization of the nociceptive withdrawl reflexes. Activation of hindlimb muscles in the rat." Experimental Brain Res 83: 67-78.*

Seckel BR, Ryan SE, Gagne RG, Chiu TH, Watkins E, (1986). *"Target-specific nerve regeneration." Plastic and Reconstrutuive Surgery 78: 793-800.*

Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD, (1995). *"Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat." Journal of Neuroscience Research 40: 318-324.*

Seddon H (1943). *"Three types of nerve injury." Brain 66: 237-288.*

Seddon HJ, Medawar P, Smith H, (1943). *"Rate of Regenration of Peripheral Nerves in Man." The Journal of Physiology 102: 191-215.*

Seddon H (1972). *"Surgical disorders of the peripheral nerves." Churchill-Livingstone: Edinburgh.*

Seeley RR, Stephens TD, Tate P, Anatomy & Physiology. 3th ed: Mosby-Year Book, Inc. 1995.

Selander D, Sjostrand J (1978). *"Longitudinal spread of intraneurally injected local anesthesics." Acta Anaesthesiologica 22: 622-634.*

Sen SK, Lowe JB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, (2005). *"Assessment of the immune response to dose of nerve allografts." Plastic and reconstructive surgery 115(3): 823-830.*

Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA, (1992). *"Brain derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section." Nature 360: 757.759.*

Senes FM, Campus R, Becchetti F, Catena N, (2007). *"Lower limb nerve injuries in children." Microsurgery 10: in press.*

Shen N, Zhu J (1995). *"Application of sciatic Funcional Index in Nerve Functional Assessment." Microsurgery 16: 552-555.*

Shiraishi E, Shibata M, Takahashi HE, (1998). *"Rat tibial nerve regeneration after postoperative administration of cis-diaminedichloroplatinum." Plastic and Reconstrutuive Surgery 101: 1039-1044.*

Siegel SG, Patton B, English AW, (2000). *"Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting." Experimental Neurology 166: 205-212.*

Siemionow M, Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, (2002). *"Epineural sleeve neurorrhaphy: Surgical technique and funcional results - A preliminary report." Annals of plastic surgery 48: 281-285.*

Simões MJ, Shirosaki Y, Gil da Costa RM, Luís AL, Cortez PP, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka , Gartner F, Varejão ASP, Santos JD, Maurício AC (2008). *Chitosan Membranes Test in Rats for Nerve Reconstruction. Journal Bio-medical Material and Enginnering (aceite para pulicação).*

Smith KJ and Hall SM (1988). *"Peripheral demyelination and remyelination by the calcium-sensitive ionophore ionomycin: in vivo observations." Journal of the Neurological Sciences 83: 37-53.*

Smith KG, Robinson P (1995). *"An Experimental Study of Three Methods of Lingual Nerve Defect Repair." Journal of Oral Maxillofacial Surgery 53: 1052-1062.*

Snyder CC, Hezog B, Johnson EA, (2007). *"Epineural cuff neuropathy." The Journal of bone and joint surgery. American volume (56): 1092.*

Soldani G, Varelli G, Minnocci A, Dario P, (1998). *"Manutacturing and microscopical Charaterisation of polyurethane nerve guidance channel featuring a highly smooth internal surface." Biomaterials 19: 1919-1924.*

Sondell M, Lundborg G, Kanje M, (1998). *"Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction." Brain research 795: 44-54.*

Sondell M, Lundborg G, Kanje M, (1999). *"Vascular endothelial growth factor growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acelular nerve grafts." Brain Research 846 (219-228).*

Song XY, Zhou F, Zhong JH, Wu LL, Zhou XF, (2006). *"Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice." Journal of Neurochemique 96: 833-842.*

Sosa I, Reyes O., Kuffler DP, (2005). *"Immunosuppressants: Neuroprotection and promoting neurological recovery following peripheral nerve and spinal cord lesions." Experimental Neurology 195: 7-15.*

Spiegel DA, Seaber A, Chen LE, Urbaniak JR, (1993). *"Recovery following strech injury to the sciatic nerve of the rat: an in vivo study." Journal of Reconstrutive Microsurgery 9(1): 69-74.*

Stark B, Carlstedt T, Risling M (2001). *"Distribution of TGF-β, TGF-β type I receptor and the R-II receptor in peripheral nerve and mechanoreceptors; observations on changes after traumatic injury." Brain Research 913: 47-56.*

Steuer H, Fadale R, Muller E, Muller HW, Planck H, Schlosshauer B (1999). *Biohybride nerve guide for regeneration: degradable polylactide fibers coated with rat Schwann cells. Neuroscience Letters 277(3): 165 –168.*

Stoll G, Jander S, Myers RR, (2002). *"Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller´s observations to neuroinflammation." Journal of the Peripheral Nervous System 7: 13-27.*

Suematsu N (1989). *"Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility." Microsurgery 10: 71-74.*

Sulaiman OA, Gordon T (2000). *"Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination and size." Glia 32: 234-246.*

Sulaiman OAR, Voda J, Gold BG, Gordon T, (2002). *"FK 506 Increases Peripheral Nerve Regeneration after Chronic Axotomy but Not after Chronic Schwann Cell Denervation." Experimental Neurology 175: 127-137.*

Sulaiman OA, Gordon T (2002). *"Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo." Glia 37: 206-218.*

Sunderland S (1951). *"A classification of peripheral nerve injuries producing loss of funcion." Brain 78: 491-516.*

Sunderland S, B. H. (1961). *"Stress-starin phenomena in human peripheral nerve trunks." Brain 84: 102-119.*

Sunderland S (1978). *Nerves and nerve injury. 2nd Ed.: Churchill Livingstone: Edinburgh.*

Sunderland S (1985). *Nerve and Nerve Injury,, second Ed.: Churchill Livingstone: London.*

Sunderland S (1990). *"The anatomy and physiology of nerve injury." Muscle & Nerve 13: 771-784.*

Suzuki G, Ochi M, Shu N, (1998). *"Sensory neurons regenerate more dominantly than motoneurons during the initial stage of the regenerating process after peripheral axotomy." Neuroreport 9: 3487-92.*

Terenghi G (1999). *"Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors." Journal of Anatomy 194: 1-14.*

Terenghi G (1999). *"Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors." Journal of Anatomy 194: 1-14.*

Terris DJ, Cheng ET, Utley DS, Tarn DM, Ho PR, Verity NA, (1999). *"Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and a phosphate buffered solution." Auris, Nasus, Larynx 26: 117-122.*

Terzis J, Faibisoff B, Williams B, (1975). *"The nerve gap: suture under tensão versus graft." Plastic and Reconstrutuive Surgery 56(2): 166-170.*

Tesco G, Latorraca S, Pietsanti S, Amaducci L, Sorbi S, (1992). *"Protection from oxygen radical damage in human diploid fibroblasts by acetyl-L-carnitine." Dementia 3: 58-60.*

Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M, (2002). *"Conventional versus epineural sleeve neurorhaphy technique: Funcional and histomorphometric analysis." Annals of plastic surgery 49: 397-403.*

Thanos PK, Berthold C-H, Ochoa J, (1993). *"Microscocpic anatomy of the peripheral nervous system: nerve trunks and spinal roots." In Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, editors. Peripheral neurpathy, 3rd Ed. WB Saunders Company: Philadelphia, 28-91.*

Tohill M, Terenghi G (2004). *"Stem cell plasticity and therapy for injury of the peripheral nervous system." Biotechnology and applied biochemistry 40: 17-24.*

Tong X-J, Hirai K.-I., Shimada H, Mizutani Y, Izumi T, Toda N, Yu P, (1994). *"Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats." Brain Research 663(1): 155-162.*

Torch S, Stoeber P, Usson Y, D`Aubigny GD, Saxod R, (1989). *"There is no simple adequate sampling scheme for estimating the myelinated fibre size distributionin human peripheral nerve: a statisticalultrastrutural study." Journal of Neuroscience Methods 27: 149-164.*

Torigoe K, Lundborg G. (1998). *"Selective inhibition of early axonl regeneration by myelin-associeted glycoprotein." Experimental Neurology 151: 254-62.*

Tos P, Calcagni M, Gino-Benato D, Geuna S, Battiston B, (2004). *"Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: experimental results." Microsurgery 24: 459-464.*

Tos P, Battiston B, Nicolino S, Raimondo S, FornaroM, Lee JM, Chirila L, Geuna S, Perroteau I, (2007). *"Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve." Microsurgery 27: 48-55.*

Tria MA, Fusco M, Vantini G, Mariot R, (1994). *"Pharmacokinetics of nerve growth fctor (NGF) following different routes of administration to adult rats." Experimental Neurology 127: 178-183.*

Tyner TR, Parks N, Fariab S, Simonsb M, Stappb B, Curtis B, Sian K, Yamaguchi KT, (2007). *"Effects of collagen nerve guide on neuroma formation and neuropathic pain in a rat model." The American Journal of Surgery 193: 1-6.*

Udina E, Voda J, Gold BG, Navarro X, (2003). *"Comparative dose-dependence study of FK506 on transected mouse sciatic nerve repaired by allograft or xenograft." Journal of the Peripheral Nervous System 8: 145-154.*

Udina E, Verdú E, Navarro X (2004). *"Effects of the immunophilin ligand FK 506 on nerve gereneration in collagen guides seeded with Schwann cells in rats." Neuroscience Letters 357: 99-102.*

UIdina E, Rodriguez F, Verdú E, Espejo M, Gold BG, Navarro X (2004). *"FK506 Enhances Regeneration of Axons Across Long Peripheral Nerve Gaps Repaired With Collagen Guides Seeded With Allogeneic Schwwann Cells." Glia 47: 120-129.*

Valair (1882). *"Nouvelles recherches expérimentales sur la régènération des nerfes" Arch. Biol. Paris 6:127-235.*

Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Perego G, Navarro X, Neiss WF, (2000). *"Superior muscle reinnervation after autologous nerve graft or poly-L-lactide-epsilon-caprolactone (PLC) tube implantation in comparison to silicone tube repair." Journal of Neuroscience Research 63: 214-223.*

Valero-Cabré A, Navarro X (2001). *"H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair." Brain Research 919: 302-312.*

Varejão ASP, Cabrita AM, Patrício JA, Bula-Cruz J, Gabriel RC, Melo-Pinto P, Couto PA, Meek MF (2001). *"Functional Assessment of Peripheral Nerve Recovery in the Rat: Gait Kinematics." Microsurgery 21: 383-388.*

Varejão ASP, Meek M, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS (2001). *"Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis." Journal of Neuroscience Methods 108: 1-9.*

Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Filipe VM, Melo-Pinto P, Winter DA (2002). *"Motion of the Foot and Ankle During the Stance Phase in Rats." Muscle & Nerve 26: 630-635.*

Varejão, ASP (2003). Regeneração do Nervo Periférico. Recuperação funcional num modelo experimental. Dissertação de Doutoramento submetida à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Patrício JA, Azevedo H, Ferreira AJ, Meek MF (2003). *"Functional Assessment of Sciatic Nerve Recovery: Biodegradable Poy(DLLA-ε-CL) Nerve Guide Filled with Fresh Skeletal Muscle." Microsurgery 23: 346-353*.

Varejão ASP, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A, Meek MF (2003). *"Toe out angle: a funcional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model." Experimental Neurology 183.*

Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi G, (2004a). *"Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciat Nerve Crush Injury with a Non-Serrated Clamp." Journal of Neurotrauma 21,N.º11: 1652-1670.*

Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J (2004b). *"Methods for the experimental funcional assessment of rat sciatic nerve regeneraction." Neurolgical Research 26: 186-194.*

Verge VMK, Xu Z, Xu X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T, (1992). *"Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: In situ hybridization and funcional studies." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 11617-11621.*

Voinesco F, Glauser L, Kraftsik R, Barakat-Walter I, (1998). *"Local administration of thyroid hormones in silicone chamber increases regeneration of rat transected sciatic nerve." Experimental Neurology 150: 69-81.*

Wagner R, M. R. (1996). *"Schwann cells produce TNF-□. Expression in injured and non-injured nerves." Neuroscience 73: 625-629.*

Walker JL, Resig P, Guarnieri S, Sisken BF, Evans JM, (1994a). *"Improved footprint analysis using video recording to assess functional recovery following injury to the rat sciatic nerve." Restorative Neurology and Neuroscience 6: 189-193.*

Waller A (1850). *"Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerve of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres." Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Biological Sciences) 140: 423-429.*

Wang L, Brown A. (2002). *"Rapid movement of microtubules in axons." Current Biology 12: 1496-1501.*

Watson NC, Jejurikar S, Kalliainen LK, Calderon MS, Urbanchek MG, Eguchi T, Kuzon WM JR (2001). *"Range of motion physiotherapy reduces the force deficit in antagonists to denervated rat muscles." Journal Of Surgical Research 99: 156-160.*

Westerga J, Gramsbergen A.(1990). *"Development of locomotion in the rat." Dev Brain Res 57:163-174.*

Wewetzer K, Verdu E, Angelov DN, Navarro X, (1999). *"Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind?" Cell and Tissue Research 309: 337-345.*

Whitworth IH, Brown R, Doré C, Green CJ, Terenghi G (1995). *"Oriented mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair." Journal of Hand Surgery Br. 20(4): 429-436.*

Whitworth IH, Doré CJ, Green CJ, Terenghi G (1995). *"Increased Axonal Regeneration Over Long Nerve Gaps Using Autologous Nerve-Muscle Sandwich Grafts." Microsurgery 16: 772-778.*

Widenfalk J, Abrams M (2005). *"Emerging strategies to promote improved funcional outcome after periferal nerve injury." Restorative Neurology and Neuroscience 23: 367-382.*

Williams AC, Brophy P (2002). *"The function of the Periaxin gene during nerve repair in a model of CMT4F." Journal of anatomy 200: 323-330.*

Williams LR, Varon S (1985). *"Modification of the fibrin matrix formation in siyu enhances nerve regeneration in silicone chambers." J Comp Neurol 231: 209-220.*

Williams LR, Danielsen N, Muller H, Varon S, (1987). *"Exogenous matrix precursors promote funcional nerve regeneration across a 15 mm gap within a silicone chamber in the rat." Journal of Comparative Neurology 26: 284-290.*

Winter DA (1990). *Biomechanics and motor control of human movement, 2nd ed. New York: Jonh Wiley & Sons, Inc.*

Witzel C, Rohde C, Brushart TM, (2005). *"Pathway Sampling by Regenarating Peripheral Axons." The Journal of Comparative Neurology 485: 183-190.*

Wolman M (1992). *"Patterns of spread of diferent demyelinating." Progress in Neurobiology 38: 511-521.*

Yan Y-H, Yan J-G, Sanger JR, Zhang L-L, Riley DA, Matioub HS, (2002). *"Nerve repair at Different Angles of Attachment: Experiment in Rats." Journal of reconstructive microsurgery 18: 703-708.*

Yoshii S, Oka M (2001). *"Peripheral nerve regeraration along collagen fillaments." Brain Research 888: 158-162.*

Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M (2002). *"30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments." Brain Research 949: 202-208.*

Young RC, Wiberg M, Terenghi G (2002). *"Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves." British Journal of Plastic Surgery 55: 235-240.*

Yu P, Matloub H, Sanger JR, Narini P, (2001). *"Gait analysis in rats with peripheral nerve injury." Muscle & Nerve 24: 231-239.*

Yuan Y, Z. P., Yang Y Wang X, Gu X, (2004). *"The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro." Biomaterials 25: 4273-4278.*

Yuen EC (2001). *"The role of neurothrophic factors in disorders of peripheral nerves and motor neurons." Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America 12: 293-306.*

Zakaria Z A, Sulaiman M R, Somchit M N, Jais A M M, Ali D I, (2005). *"The effects of l-arginine, d-arginine, l-name and methylene blue on channa striatus- induced peripheral antinociception in mice." Journal of Pharmcy & Pharmaceutical Sciences 8(2): 199-206.*

Zellem RT, M iller DW, Kenning JA, Hoening EM, Buchheit WA, (1989). *"Experimental peripheral nerve repair: environmental control directed at the cellular level." Microsurgery 10: 290-301.*

Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF, (2000). *"Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents." Journal of Neuroscience 12: 4171-4180.*

Zhang P, He X, Zhao F, Zhang D, Fu Z, Jiang B, (2005). *"Bridging Small-Gap Periferal Nerve Defects Using Biodegradable Chitin Conduits with Cultured Shwann and Bone Marrow Stromal Cells in Rats." Journal of reconstructive microsurgery 21: 565-572.*