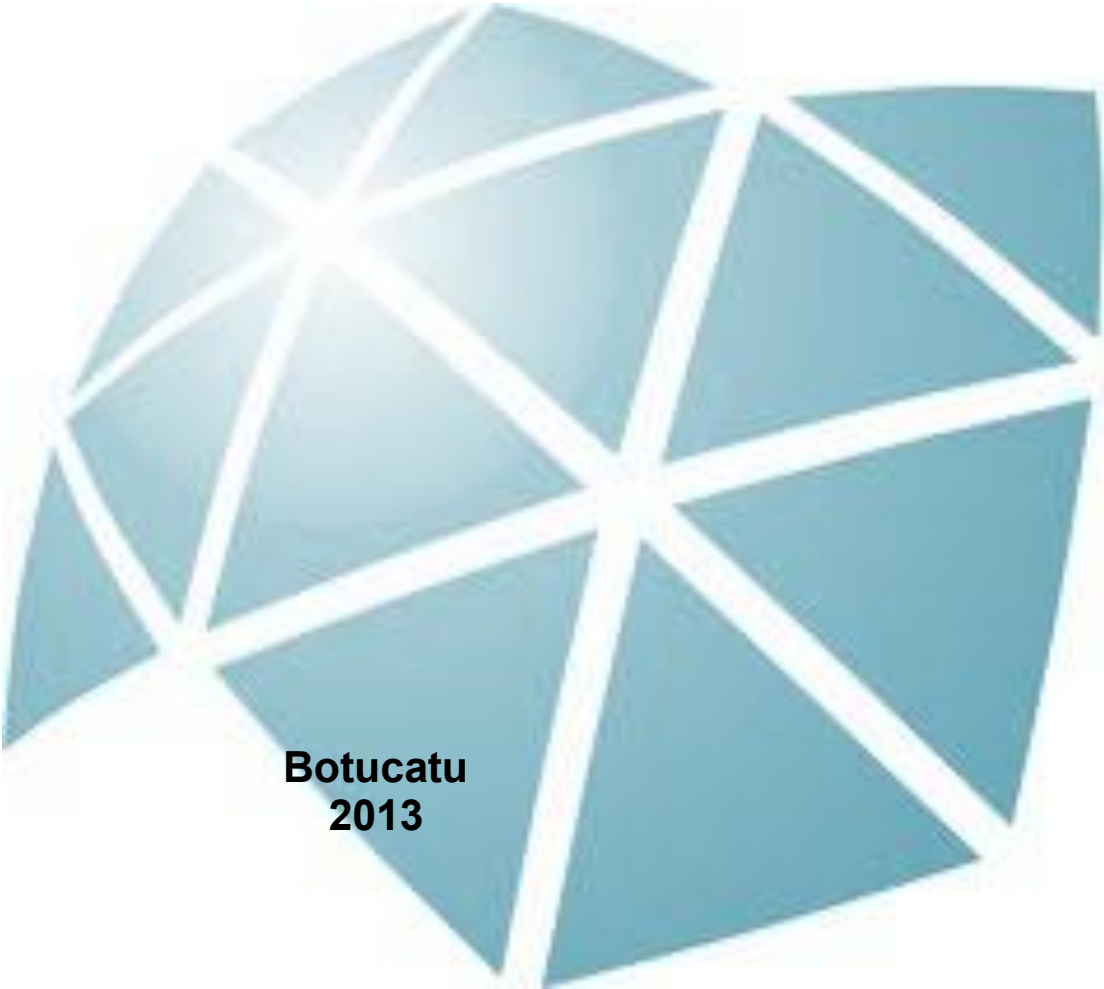


**REPARO DE NERVO PERIFÉRICO UTILIZANDO A VEIA
JUGULAR COMO TUBO ASSOCIADO À CULTURA DE
CÉLULAS-TRONCO EXTRAÍDAS DE TECIDO ADIPOSEO.
ESTUDO NO RATO.**



**Botucatu
2013**

GERALDO MARCO ROSA JUNIOR

**REPARO DE NERVO PERIFÉRICO UTILIZANDO A VEIA
JUGULAR COMO TUBO ASSOCIADO À CULTURA DE
CÉLULAS-TRONCO EXTRAÍDAS DE TECIDO ADIPOSEO.
ESTUDO NO RATO.**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo

**Botucatu
2013**

GERALDO MARCO ROSA JUNIOR

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Adj. Fausto Viterbo.

Comissão Examinadora:

Prof. Adj. Fausto Viterbo
Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP

Prof. Livre-Docente Antonio de Castro Rodrigues
Faculdade de odontologia de Bauru – FOB/USP

Prof. Livre-Docente Jesus Carlos Andreo
Faculdade de odontologia de Bauru – FOB/USP

Prof.^a Livre-Docente Valéria Paula Sassoli Fazan
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

Botucatu, 26 de agosto de 2013.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, amor verdadeiro e incondicional...

Ao meu pai, **Geraldo Marco Rosa**, obrigado pelos ensinamentos, pelo exemplo de homem, de pai, de irmão, de filho, obrigado pela presença alegre em minha vida, sempre com um sorriso no rosto, com uma palavra de apoio e incentivo. Guardo no meu coração cada palavra, cada detalhe, cada instante de felicidade junto de ti. Te amo!

À minha mãe, **Saete Ap. Bortolucci Rosa**, obrigado pela educação e renúncias para que pudesse participar ativamente da minha vida, tenha a certeza que a sua presença tornou o meu caminho mais seguro! Guardo no meu coração todo apoio, todo carinho, cada instante de felicidade junto de ti. Te amo!

À minha irmã, **Vívian Cristina Rosa**, obrigado pela convivência, pela partilha, pelas brigas, pelas diferenças, minha Tese é dedicada a você por acreditar no seu potencial! Mantenha-se no caminho que nossos pais sempre nos ensinaram, e se precisar de apoio, olhe para o lado que estarei presente! Te amo!

À minha noiva, **Natalia Pinheiro Orti**, pelos anos de convivência e crescimento, por acreditar no meu potencial e me incentivar sempre, obrigado pela presença ao meu lado, pela amizade e amor. Te amo!

“Deus, em sua infinita sabedoria, criou a família, para que os seres humanos tivessem um lugar de apoio, de encorajamento mútuo, consolo nas horas difíceis. Enfim, um espaço para rir, chorar e sonhar. Na família, devemos ser aceitos, respeitados pelo que somos, amados, mesmo sabendo que temos falhas e cometemos erros”.

Agradecimentos

“Devemos ser grato a Deus pelos pequenos detalhes. Nos detalhes descobrimos o valor de uma realidade. Olhar as miudezas da vida faz a diferença”.

Agradeço a **Deus** por compreender o meu anseio e ter me dado força e coragem para alcançar os meus objetivos.

Ao **Prof. Dr. Fausto Viterbo**, pela competente orientação, pelo crescimento profissional durante o período do doutorado, pelo profissionalismo e apoio que me levaram à execução e conclusão desta Tese. Obrigado pela oportunidade de desenvolver minha Tese na FMB/UNESP com sua orientação.

Ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, e ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, pelos anos de aprendizado profissional e pessoal, desde a época de estagiário na FOB/USP, pelos ensinamentos na nobre arte de lecionar, pela sabedoria e exemplo de vida, pelo profissionalismo, apoio e incentivo, pelo companheirismo e amizade.

À **Profª Dr.ª Elenice Defune**, por possibilitar a realização da parte de cultura celular no Hemocentro de Botucatu, obrigado pelo incentivo para a realização do projeto, correções e participação ativa na Tese.

À banca do exame de doutorado, **Prof.ª Livre-Docente Valéria Paula Sassoli Fazan** e **Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior**, pela disponibilidade, interesse e certamente pelas grandes contribuições.

À equipe da seção de pós-graduação, **Regina Célia Spadin, Lilian Cristina Nadal Bianchi, Janete Ap. Herculano Nunes Silva, Andréa Paula Longo Devidé, Márcia M. F. F. Quadros, Diego Cezario B. Oliveira, Vanessa Moraes Braite**, que sempre estavam prontos para ajudar de forma competente e educada, exemplo de trabalho e competência.

À secretária do programa **Marcia Fonseca Piagentini Cruz**, pelo atendimento prestado, pelos esclarecimentos, pelo trabalho eficiente e competente.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental, em especial ao funcionário **Bardella** pelo acompanhamento e apoio nas cirurgias.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Urologia, em especial ao funcionário **Lucas** pelo processamento histológico das amostras, pelos cortes, morfometrias e colorações.

Aos funcionários do GAP-Comissão de Ética no uso de animais, **Kleber** e **Alberto**, pelos auxílios na documentação de regularização da Comissão de Ética, sempre de forma educada e prestativa.

Aos Docentes do Programa Bases Gerais da Cirurgia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Ao colega de pós-graduação **Andrei**, que foi o bolsista técnico do projeto, e pode auxiliar durante grande parte do experimento.

Ao **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, pelo incentivo a docência e pesquisa, pelas conversas, parcerias, apoio, companheirismo e amizade.

À **Prof.^a Dr.^a Sandra Saes** e **Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão**, pelas oportunidades, pelo apoio, paciência e incentivo.

À **Prof.^a Dr.^a Leila Maria Vieira**, pelo apoio, incentivo e confiança depositada no meu trabalho. Agradeço a convivência e oportunidade de aprendizado.

Ao Corpo Diretivo e aos Docentes da Universidade do Sagrado Coração – USC, em especial ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth**, **Prof. Me. Dorival Jose Coral**, **Prof.^a Dr.^a Maricê Heubel** e **Prof.^a Dr.^a Rosangela Martinez**, aos eternos mestres meu agradecimento pela formação, apoio, incentivo e companheirismo. Tenho muito orgulho de ser Biólogo pela USC, pois tive mestres competentes onde pude construir uma base sólida.

Ao **Grupo de Estudos da Interação Mioneural – GEIM**, pelo aprendizado e pelo comprometimento. Muitas vezes me senti fortalecido, com energia renovada para seguir em frente, pois podia observar a vontade de vocês. *“Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender”*.

Aos amigos e Professores **Me. Carlos Henrique Fachin Bortoluci** e **Me. Luis Henrique Simionato**, pela dedicação, apoio, ajuda e companheirismo. *“Quero a certeza dos loucos que brilham. Pois se o louco persistir na sua loucura, acabará sábio”*.

Ao casal de amigos **Daniel Ventura Dias** e **Letícia Rossi Daré**, escrever algo para vocês seria pouco, obrigado pelo companheirismo, pelos conselhos, parcerias, choros e risos! *“A amizade preenche nosso coração de modo em que ele fique cheio de alegria, bons sentimentos e orgulho”*.

Ao amigo e orientado **Cleuber Rodrigo de Souza Bueno**, pela força, incentivo, pelas horas de dedicação no laboratório, pela confiança e companheirismo. *“O verdadeiro discípulo é aquele que supera o mestre”*.

Aos amigos pós-graduandos da FOB/USP:

À **Jéssica Oliveira**, pela amizade, pelo exemplo de força e determinação, obrigado pelas horas de descontração, pelas risadas e apoio. A rotina ficou mais leve com sua presença.

À **Iris**, pela alegria de viver, pelo trabalho competente, pelas conversas incentivadoras, sempre disposta a ajudar e apoiar. Obrigado pela convivência sempre alegre no laboratório e pelas longas horas de correções das referências.

À **Karina Puzipe**, pelo exemplo de coragem, sempre passando muita força, apoiando, incentivando a continuar, obrigado pelos momentos de descontração.

À **Marcelie**, pela força de vontade, pelas palavras amigas, e por dar continuidade nas pesquisas com reparo de nervo periférico. Muito orgulho!

Ao **Juninho e Mizael**, obrigado pelo companheirismo, pelos auxílios, pelos questionamentos, pelas idéias de projetos para desvendar o misterioso segredo da interação mioneural.

Grande respeito por vocês que vivem a rotina da pesquisa diariamente. *"Que coleção de cicatrizes você tem? Nunca se esqueça de quem lhe deu as melhores. E seja grato. Nossas cicatrizes têm o poder de nos fazer lembrar que o passado foi real"*.

À minha prima, **Fabiane Bortolucci**, pelo incentivo, conversas, orientações, e apoio, sempre presente na minha caminhada.

Aos meus avós que sempre estarão presentes na minha vida (mesmo que na lembrança), **Ismar Bortolucci (in memorian)**, **Luiza Portella Bortolucci (in memorian)**, **Vicente Rosa (in memorian)**, **Maria José Prudente Rosa**, **Doraci Baptista**, **Nelci Baptista**, **Maria de Lima** e **Euclides Pinheiro de Lima** pelo exemplo de vida e dedicação, pelo carinho, orações e sabedoria.

Ao **Luiz Vitório Orti**, **Eunice Pinheiro de Lima Orti**, e ao **Vítor Orti** pela atenção, pelas palavras de apoio e conselhos, carinho e incentivo. Obrigado pela confiança e pelas "criações de memórias".

Ao amigo **Paulo César**, obrigado pelo exemplo de vida pessoal e profissional, pelas conversas, apoio e conselhos, sempre presente multiplicando a alegria e dividindo as dificuldades. *"A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você"*.

Aos amigos, **Lucas**, **Leire**, **Matheus**, **Kali** e **Raquel Ieiri**, obrigado pelo carinho, obrigado pela possibilidade de compartilhar a minha vida sem medo, sempre presentes nos momentos felizes e de superação, tenho muita admiração por vocês! *"A amizade, nem mesmo a força do tempo irá destruir"*.

Aos meus tios, em especial ao **Pedro e Maria, Lei e Bete, Marco e Ivone, Mario e Clarice**, pelo carinho, pela preocupação e pelo incentivo.

Aos meus primos, em especial a **Mariana Macedo**, sempre incentivando e apoiando. Continue sempre com muita vontade, muito orgulho da sua trajetória!

Aos familiares, amigos, colegas e conhecidos que participam, vibram e acreditam no meu potencial, agradeço de coração, pois sempre aumentam a minha vontade de vencer.

Ao **Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

Meu eterno agradecimento!

Επιγραφή

“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo e, sim, um hábito”.

Aristóteles, 384-322 a. C.

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

1	Introdução.....	27
2	Objetivos.....	38
3	Materiais e Método.....	40
	3.1- Animais.....	41
	3.2- Critérios de Exclusão dos Grupos de Estudo.....	43
	3.3- Preparo do Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	44
	3.4- Obtenção de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.....	44
	3.5- Contagem Celular.....	48
	3.6- Viabilidade Celular.....	48
	3.7- Citometria de Fluxo.....	48
	3.8- Procedimento Cirúrgico.....	50
	3.9- Coleta das Amostras.....	56
	3.10- Teste da marcha.....	56
	3.11- Processamento Histológico dos Músculos.....	57
	3.12- Processamento Histológico dos Nervos.....	58
	3.13- Processamento para Análise Morfométrica.....	59
	3.14- Atributos Avaliados.....	60

3.15-	Teste Eletrofisiológico.....	61
3.16-	Análise Estatística.....	61
4	Resultados.....	62
4.1-	Plasma rico em plaquetas.....	63
4.2-	Expansão e caracterização das células-tronco.....	63
4.3-	Observações macroscópicas.....	65
4.4-	Procedimentos Cirúrgicos.....	66
4.5-	Observações histomorfológicas.....	67
4.6-	Avaliação Inicial e Final da Massa dos Animais.....	75
4.7-	Avaliação da Massa do Músculo Tibial Cranial.....	77
4.8-	Morfometria das Fibras Nervosas.....	80
4.9-	Morfometria dos Axônios.....	83
4.10-	Morfometria da Bainha de Mielina.....	85
4.11-	Morfometria das Fibras Musculares.....	87
4.12-	Análise Eletrofisiológica.....	89
4.13-	Análise Funcional.....	91
5	Discussão.....	93
6	Conclusão.....	111
	Referências.....	113
	Anexos.....	138

Resumo

As lesões de nervos periféricos representam um grande desafio para a medicina. Inúmeras técnicas visam solucionar a regeneração do nervo periférico. Os protocolos de recuperação funcional destes nervos são diversos e os resultados nem sempre apresentam soluções que promovam a regeneração da via motora e sensitiva. Com o advento da engenharia tecidual, a partir da diferenciação de células-tronco, surgiu uma nova alternativa terapêutica para a regeneração de nervos. O objetivo deste trabalho é estudar a regeneração de nervo mediante tubulização por enxerto de veia autóloga e verificar se o uso da combinação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) e plasma rico em plaquetas (PRP) na tubulização do nervo fibular comum altera a morfologia e fisiologia deste nervo e de músculos inervados por ele. Os animais foram divididos em seis grupos, sendo três controles e três experimentais. O G1 (n=10) representou o controle inicial. Os grupos G2, G3 e G4 (n=20) representaram os Grupos Experimentais e receberam, após ressecção do segmento nervoso, enxerto de veia jugular externa de 20 mm tubulizando os dois cotos do nervo, sendo que G2 não recebeu preenchimento, G3 foi preenchido com PRP, G4 foi preenchido com PRP e células tronco, G5 (n=10) representou o controle final e o G6 (n=20) representou o controle de desnervação. Foram obtidas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) do mesmo animal, com caracterização fenotípica, utilizando CD90 e CD44 identificando a expressão média de 86,5%. As CTM-TA foram expandidas em cultura e aplicadas na concentração de 5×10^6 por animal. O índice funcional foi avaliado pela marcha, testes eletrofisiológicos de latência e amplitude e ainda foi realizada a análise morfométrica das fibras nervosas, observando o diâmetro mínimo da fibra, diâmetro mínimo do axônio, área das fibras, área do axônio, área da bainha de mielina e espessura da bainha de mielina. Na análise do músculo foram mensuradas a área das fibras do músculo Tibial Cranial e a massa dos músculos da pata operada e da pata contralateral. Os resultados encontrados demonstraram diferença estatisticamente significativa entre todas as variáveis quando comparamos os grupos experimentais. O Grupo com Células-tronco obteve melhores resultados atingindo a semelhança com o Grupo Controle Final em cinco variáveis. Com os dados apresentados conclui-se que a combinação de CTM-TA associada ao PRP propicia o reparo de lesões nervosas periféricas em nível morfométrico e funcional utilizando a veia jugular como tubo.

Palavras-chave: Células-tronco; Nervos Periféricos; Regeneração Nervosa; Nervo Fibular; Ratos.

Abstract

Peripheral nerves injuries represent an enormous clinical challenge in medicine. Numerous techniques aim for regeneration of peripheral nerves. Nowadays, there are different protocols concerning to its functional retrieval and the results of current researches do not always show solutions to promote a regeneration of motor and sensory via. With the advent of tissue engineering, from the stem cells differentiation, arise a new therapeutic alternative in nerve regeneration. The aim of this study was to analyze the nerve regeneration by tubulization technique using autologous graft, as well as to verify whether the combination of mesenchymal stem cells from fat tissue (CTM-TA) and platelet-rich plasma (PRP) in tubulization of Common Peroneal Nerve modify the morphology and physiology of this nerve nor muscles that it innervates. Animals were divided into six groups, consisting in three control and three experimental groups. G1 group (n=10) represented the Initial Control Group. G2, G3 and G4 group (n=20) corresponded to the experimental groups and also receive, after resection of the nerve, an external jugular vein graft of 20 mm, thereby performing a tubulization of the two nerve stumps, where G2 was not filled; G3 was filled with PRP; G4 was filled with PRP and stem cells; G5 (n = 10) represented the Final Control Group and G6 (n = 20) symbolized the Control Denervation Group. It was obtained mesenchymal stem cells from fat tissue (MSC-FT) from the same animal, with phenotypic characterization using CD90 and CD44, thus identifying the average expression of 86.5%. MSC-FT were expanded in culture and applied at a concentration of 5×10^6 per animal. The functional index was evaluated by walking tracks analysis, electrophysiological latency test and amplitude, besides the morphometric analysis of nerve fibers (observing the minimum diameter of the fiber), the minimum diameter of the axon, fiber area, axon area, myelin area and myelin sheath thickness. The muscle analysis was conducted by the measurement of the area of Cranial Tibial muscle fibers and muscle mass of surgical and contra-lateral rat's paw. The results demonstrated a statistically significant difference between all variables comparing to the experimental groups. The stem cells Group showed better results, similar to the Final Control Group in five variables. From the data obtained, we conclude that the combination of MSC-FT associated with PRP promotes the repair of peripheral nerve injuries in functional and morphometric level using jugular vein as a tube.

Keywords: Stem Cells, Peripheral Nerve, Nerve Regeneration; Peroneal Nerve; Rats.

Lista de Ilustrações

Figura 1-	Desenvolvimento da célula de Schawn e classificação axonal....	30
Figura 2-	Esquema das cirurgias dos grupos.....	43
Figura 3-	Câmara de fluxo laminar classe II A.....	45
Figura 4-	Sala de Cultura Celular com estufa e microscópio de luz invertido com controle de fase - Zeiss®.....	47
Figura 5-	Microscópio de luz invertido com controle de fase - Zeiss®.....	47
Figura 6-	Citometria de fluxo – BDFACSCalibur.....	49
Figura 7-	Laboratório de cirurgia no laboratório de cirurgia experimental FMB/UNESP.....	51
Figura 8-	Tricotomia realizada na face ventral do pescoço dos animais dos grupos experimentais.....	52
Figura 9-	Tricotomia realizada na face dorso-lateral do membro pélvico direito dos animais de todos os grupos.....	52
Figura 10-	Procedimento cirúrgico durante a retirada da veia jugular externa.....	54
Figura 11-	Fio ortodôntico inoxidável de 0,06mm, utilizado para realizar a retirada da veia jugular externa.....	54
Figura 12-	Procedimento cirúrgico para exposição do nervo isquiático.....	55
Figura 13-	Aparelho de Criostato Leica CM1850 utilizado para obtenção dos cortes histológicos musculares.....	58
Figura 14-	Micrótomo Leica RM2265 utilizado para obtenção dos cortes histológicos dos nervos, acoplado com lupa de aumento Leica MZ6.....	59
Figura 15-	Sistema de análise de imagem microcomputador com software de captura e análise de imagem, acoplado ao microscópio Leica DMLS.....	60
Figura 16-	Gráfico de dispersão e histogramas de marcação.....	64
Figura 17-	Fotomicrografia Invertida da cultura celular com CTM	65
Figura 18-	Pata com aspecto exterior normal.....	66
Figura 19-	Aspecto degenerado do coto nervoso distal de animal do GCD.....	68
Figura 20-	Aspecto da região média do enxerto de veia em animal do GSP.....	68
Figura 21-	Aspecto da da região média do enxerto de veia em animal do GPRP.....	69

Figura 22-	Aspecto da região média do enxerto de veia em animal do GCT+PRP.....	69
Figura 23-	Aspecto da região do nervo fibular comum em animal do grupo GCI.....	70
Figura 24-	Aspecto da região do nervo fibular comum em animal do GCF.....	71
Figura 25-	Aspecto do músculo tibial cranial em animal do GCD.....	72
Figura 26-	Aspecto do músculo tibial cranial em animal do GSP.....	72
Figura 27-	Aspecto do músculo tibial cranial em animal do GPRP.....	73
Figura 28-	Aspecto do músculo tibial cranial em animal do GCT+PRP.....	73
Figura 29-	Aspecto do músculo tibial cranial em animal do grupo GCI.....	74
Figura 30-	Aspecto do músculo tibial cranial em animal do GCF.....	74
Figura 31-	Gráfico da média da massa (g) inicial dos grupos estudados.....	76
Figura 32-	Gráfico da média da massa (g) final dos grupos estudados.....	76
Figura 33-	Gráfico da média da massa (g) do músculo Tibial Cranial.....	78
Figura 34-	Gráfico da média da massa (g) da diferença de massa dos músculos T. C. direito e esquerdo.....	79
Figura 35-	Gráfico da média (μm^2) da área das fibras nervosas.....	81
Figura 36-	Gráfico da média (μm) do diâmetro mínimo das fibras nervosas..	81
Figura 37-	Gráfico da média (μm^2) das áreas dos axônios.....	83
Figura 38-	Gráfico da média (μm) do diâmetro mínimo dos axônios.....	83
Figura 39-	Gráfico da média (μm^2) das áreas das bainhas de mielina.....	85
Figura 40-	Gráfico da média (μm) das espessuras das bainhas de mielina...	86
Figura 41-	Gráfico da média (μm^2) das áreas das fibras musculares do músculo T.C.....	87
Figura 42-	Gráfico da média (mV) da amplitude.....	89
Figura 43-	Gráfico da média (ms) da latência.....	90

Figura 44-	Gráfico da média da análise funcional dos grupos.....	91
------------	---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Média de intensidade de fluorescência (MIF)%.....	63
Tabela 2-	Média (g) e desvio padrão da massa inicial e final dos grupos estudados e percentagem (%) de ganho de massa dos grupos. Média das massas iniciais e finais de todos os animais utilizados no experimento e respectivo desvio padrão.....	75
Tabela 3-	Média (g) e desvio padrão da massa do músculo Tibial Cranial dos grupos estudados e diferença das massas dos músculos direito e esquerdo.....	78
Tabela 4-	Média (μm^2) e desvio padrão da área das fibras nervosas e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor das fibras nervosas.....	80
Tabela 5-	Média (μm^2) e desvio padrão da área dos axônios e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor dos axônios.....	82
Tabela 6-	Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina e média (μm) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina.....	85
Tabela 7-	Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das fibras musculares do m. TC.....	87
Tabela 8-	Média (mV) e desvio padrão da amplitude captada pela análise eletrofisiológica e Média (ms) e desvio padrão da latência captada pela análise eletrofisiológica.....	89
Tabela 9-	Média e desvio padrão do teste da marcha.....	91

1. Introdução

As células-tronco (CT) foram obtidas pela primeira vez pelo cientista russo Aleksandr Fridenshtein, nos anos 60 do século passado. São células capazes de promover a regeneração tecidual após trauma, envelhecimento ou doença (BRÄNEMARK, 1969; HEUBACH, et. al., 2004; LEE, et al., 2003; ZUR NIEDEN, et. al., 2003; SCHAAKXS, et. al., 2013; HU, et. al., 2013; NISHIMURA, et. al., 2013; SEKIGUCHI, et. al., 2013; GHOREISHIAN, et. al., 2013; CHENG, et. al., 2013; MITEVA, et.al., 2013).

Estas células podem provir de tecido embrionário ou de tecido adulto, como medula óssea (BOELONI, et. al., 2013; MÜLLER, et. al., 2013), líquido amniótico (DE VITA, 2013), do sangue do cordão umbilical (ROMANOV, et. al., 2003), sangue periférico (PITTENGER, et. al., 1999), tecido adiposo (DIETRICH, 2004; SAFFORD, et. al., 2004) e tecido neural (LEE, et. al., 2003). Além disso, dependendo da fonte, as células-tronco podem ser totipotentes (provenientes de embriões), pluripotentes (proveniente do blastocito) ou multipotentes (vindas do tecido adulto). Há dois tipos celulares multipotentes na medula óssea: as estromais e as mesenquimais. As células mesenquimais *in vivo*, podem ser induzidas a diferenciação em osteoblastos (OLMSTED-DAVIS, et. al., 2003), em células de Schwann, cartilagem, tendões, músculo cardíaco (BARBASH, et. al., 2003; HEUBACH, et. al., 2004) e estroma medular (HEIM, et. al., 2004; SOARES, et. al., 2004; ZAYZAFOON, et. al., 2004), além de sofrer hematopoiese (BADDOO, et. al., 2003; BANFI, et. al., 2000; CASTRO, et. al., 1980).

Estudos comprovam a diferenciação da célula de Schwann a partir de células-tronco da medula óssea de adulto humano. Os receptores NGFR (nerve growth factor receptor), S100, GFAP (Glial fibrillary acidic proteíne) e SCIP (Suppressed,

cAMP-inducible POU-domain protein) são usados como marcadores celulares para avaliar a diferenciação das células nervosas (WANG & LIU, 2003).

A célula de Schwann é a célula mielinizadora do sistema nervoso periférico (SNP) e possui uma série de propriedades e processos no desenvolvimento similar aos oligodendrócitos do Sistema Nervoso Central (SNC). Ao alcançarem o fenótipo de célula não mielinizante, as células se mantêm neste estágio, podendo diferenciar-se mais tarde. O fenótipo pré-mielizante, torna-se mielizante no SNP (estágio seis). Os fatores de crescimento são FGF (Fibroblast Growth Factor), PDGF (platelet-derive growth factor), TGF β . (Transforming growth factor beta) (SEBBEN, et. al., 2011; FREITAS, et. al., 2011; BATISTA, et. al., 2010).

No sistema nervoso periférico, as células gliais mielinizadoras são dependentes do tamanho do axônio em que estão associadas, podendo permanecer não mielinizadoras (axônios pequenos) ou mielinizadoras, produzindo proteínas associadas à mielina e à bainha (axônios grandes). O último estágio envolve a proliferação de células de Schwann pré-mielinizadoras que expressam genes mielínicos como P0, (peripheral myelin protein), MBP (myelin basic protein) e MAG (myelin associated glycoprotein). A célula de Schwann jovem possui dois passos de diferenciação, conforme demonstrado na Figura 1. Inicialmente, ambos os axônios de pequeno e grande calibre são envolvidos pela célula de Schwann jovem. Esta ilustração mostra uma secção transversal através de uma única célula. Durante o período de proliferação, os axônios de grande calibre são separados dos axônios pequenos por um processo de interação axônio/Schwann desconhecido. Na maturação das células de Schwann, os axônios são envolvidos na superfície celular formando a bainha de mielina. No entanto, em axônios de pequeno calibre, não há formação da bainha de mielina, pois estes ficam completamente envolvidos em sulcos separados na superfície da célula de Schwann. Desta forma, os nervos apresentam dois fenótipos de células de Schwann, um mielizante e outro não mielinizante. (LINHAGENS..., c2013).

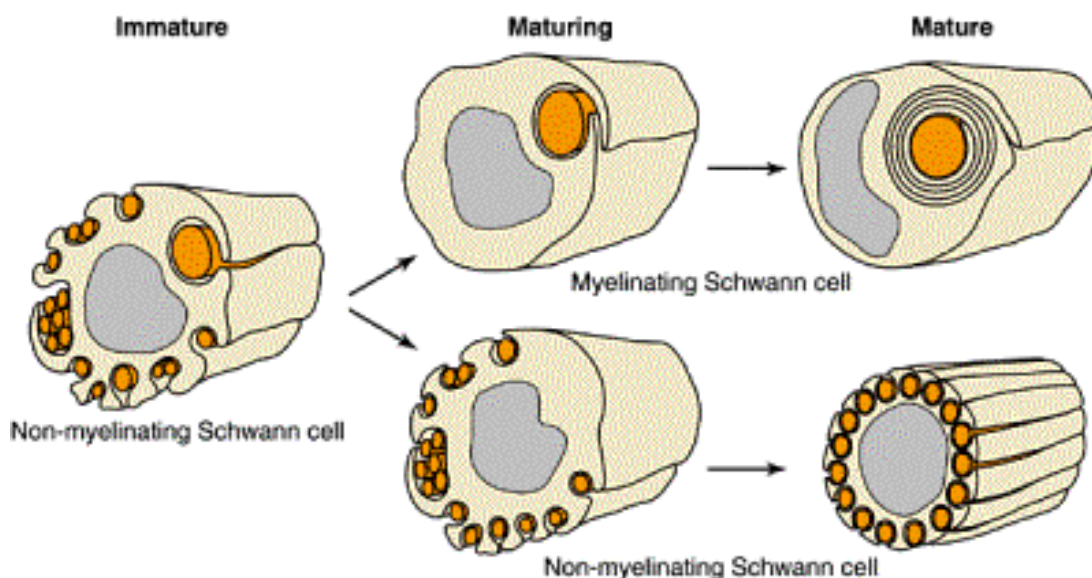


Figura 1- Desenvolvimento da célula de Schwann e classificação axonal.
 Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupoc/Gd2Grupo3.htm>>
 Acesso em: 16 jul. 2013.

A célula de Schwann é usada como terapia para a regeneração de nervos periféricos (FANSA et al., 2001; TOHILL, et. al., 2004; TOHILL & TERENCEHI, 2004), e são consideradas como alternativa aos enxertos autólogos e heterólogos (FANSA et al., 2001). Na engenharia tecidual, os enxertos venosos servem como suporte para a regeneração axonal. A regeneração do nervo isquiático de ratos já foi obtida através da implantação de células de Schwann cultivadas, tendo como suporte o enxerto de veia (WANG & LIU, 2003).

Ao longo da história, a recuperação das lesões nervosas sempre foram limitadas (BRUNELLI, et. al., 1985; MCQUARRIE, 1985), quer por deficiência de técnica operatória, quer por necessidade de melhor entendimento dos fatores biológicos e metodológicos envolvidos na avaliação da regeneração neural (BABCOCK, 1927; BORA-JUNIOR, 1978; BORA-JUNIOR, et. al., 1987; ROULEAU, et. al., 1981; VITERBO, et .al., 1989; VITERBO et al., 1992; ROSS, et. al., 1995; NOAH et al., 1997; QATTAN & AL THUNIAN, 1998).

Em 1851, Waller cita os princípios para que ocorra regeneração do nervo pélvico e relata a degeneração do coto distal de um nervo seccionado, caso não seja colocado em contato com outro nervo.

Desde a primeira neurorrafia realizada em Bolonha, vários autores tentam unir os cotos de nervos seccionados de várias formas (NAFFZIGER, 1921; LUNDBORG, et. al., 1982; LUNDBORG, et. al., 1982; POLITIS, 1985; DELLON, et. al., 1989). Os métodos mais comuns são a sutura epineural (SUNDERLAND & RAY, 1947; BORA, 1967; BORA-JUNIOR, et. al., 1976; HAKSTIAN, 1968), a perineural ou interfunicular (BRUNELLI, 1969; GRABB, et. al., 1970; MILLESI, et. al., 1972; HAKSTIAN, 1973; FERREIRA, et. al., 1974; DANIEL & TERZIS, 1977; VAN DULKEN & THOMMER, 1978) e endoneural (FULLERTON, 1915; ELSERG, 1919; WEISS, 1944; FULLERTON, 1981; ELY & CALTEUX, 1983). Há outros métodos como o envelope venoso (WEISS, 1941; CHIU, et. al., 1980; CHIU, et. al., 1988), o envelope arterial (WEISS, 1944b; WEISS & TAYLOR, 1946), a cola de fibrina (YOUNG & MEDAWAR, 1940; TARLOV & BOERNSTEIN, 1948; EPSTEIN, 1949; KLINE & HAYES, 1963; BENTO & MINITI, 1989; MARAGH, et. al., 1990; MATTAR, et. al., 1990), a cola acrílica (FREEMAN, 1965; DUCKER & HAYES, 1968; ROSEN, et. al., 1990; HENTZ, et. al., 1991) e as bainhas de tântalo (WEISS, 1944a).

Vários pesquisadores afirmam que, em geral, secções nervosas transversais que provoquem perda de tecido superior a 3 cm de comprimento são inadequadas para simples conexões, como as suturas epineurais, sendo mais indicado o enxerto autólogo de um nervo sensitivo, como o nervo sural (SUNDERLAND & RAY, 1983; HUDSON et al., 1979; MILLESI, 1986). Entretanto essa técnica possui algumas limitações, como o calibre do nervo lesado, levando à utilização dos chamados “cable graft”, em que diversos segmentos do nervo doador são utilizados. A grande

desvantagem desta técnica é a necessidade de um grande número de suturas que, via de regra, resulta na formação de cicatriz com consequente isquemia na região do implante. Além disso, o emprego de grande quantidade de “nervo doador” leva a uma perda de sensibilidade na região previamente innervada pelo mesmo (FAWCET & KEYNES, 1986; MAGILL et al., 2007).

Diante dessas situações adversas, numerosos laboratórios têm voltado suas atenções na busca de soluções no reparo de nervos periféricos. Tais pesquisas envolvem a utilização de materiais biológicos (colágeno, artérias, veias, moléculas de adesão celular) e não biológicos (tubos de silicone e polietileno) (FIELDS et al., 1989).

Guda et. al. (1993), estudaram a regeneração do nervo safeno em coelhos utilizando enxerto venoso e não obtiveram resultados satisfatórios. Estes autores consideraram a hipótese de que o contato entre as células endoteliais do segmento venoso transplantado e o tecido nervoso tenha estimulado o desenvolvimento de fibrose na parede do vaso, o que culminou com a constrição periférica do nervo antes deste iniciar sua regeneração.

Itoh et. al. (1996), estudaram a regeneração do nervo isquiático em ratos utilizando enxerto arterial e também não obtiveram resultados satisfatórios devido, segundo eles, à deficiência de laminina na membrana basal para acelerar a neurotização.

Outros autores concordam que a utilização de enxertos venosos pode ser útil apenas em secções nervosas de reduzido tamanho e em nervos monofasciculados (WALTON et al., 1989). Entretanto, ao utilizar enxertos venosos ao avesso em nervos mistos, como o nervo isquiático, foi observada grande melhora na

capacidade regenerativa das fibras nervosas (WANG et al., 1993; FERRARI et al., 1999).

O colágeno e a laminina têm um efeito benéfico na regeneração nervosa periférica (LANDER et al., 1985; VALENTINI et al., 1987). FERRARI et al. (1999), demonstraram que o enxerto venoso ao avesso, expondo a túnica adventícia ao contato direto com axônios seccionados, constitui num bom conduto para a regeneração de nervos sensitivos, como o nervo safeno. Segundo estes autores, tal conduto, além de permeável a fatores externos, encontram-se “carregados” com fatores tróficos - tais como colágeno, laminina e fibronectina - em proporções ideais, propiciando um micromeio altamente favorável à regeneração axonal.

Várias formas de tratamento são propostas em caso de intervalo, ou seja, onde há falha do nervo, sendo o enxerto de nervo autólogo o método mais utilizado. (ELSBERG, 1919; BENTLEY & HILL, 1936; LERICHE, 1940; WEISS & TAYLOR, 1946; HOLMES, 1947; SEDDON, 1947a; SUNDERLAND & RAY, 1947; SPEIGEL, 1949; SEDDON, 1963; MILLESI, et. al., 1972; KLEINERT & GRIFFIN, 1973; MACKINNON, et. al., 1985; MILLESI, 1986; WONG & SCOTT, 1991; VITERBO, 1992b). Os enxertos de nervos heterólogos e homólogos (BENTLEY & HILL, 1940; SEDDON, 1947b), devido à rejeição imunológica, estavam praticamente abandonados (MARMOR, 1963; BAIN, et. al., 1988, ZELLEM, et. al., 1989). Com o advento de drogas imunossupressoras estes enxertos ganharam novo alento (BODIAN, 1943; LUNDBORG et al., 1994). Além dos enxertos, foram descritos também retalhos de nervo e bainha de epineuro do coto distal para tratar o intervalo. Entretanto, em algumas situações a quantidade de nervo disponível para ser enxertado não é suficiente, sendo utilizado então a técnica de neurorrafia término-lateral, na qual tem demonstrado resultados promissores (VITERBO, 1992a).

No intuito de solucionar estes casos, surgiram estudos para determinar a regeneração nervosa a partir de diversos materiais, dentre eles, os tubos de silicone ou de outros materiais aloplásticos (KLINE & HAYES, 1964; MERLE, et. al., 1968; MIDGLEY & SCARAVILLI, 1984; ASHUR, et. al., 1987; BORA-JUNIOR, et. al., 1987; MULLER, et. al., 1987, LE BEAU, et. al., 1988; GIBSON & DANILOFF, 1989; GIBSON, et. al., 1991; PHAM, et. al., 1991), tubos de material sintético biodegradável (WEISS, 1943; UNDBORG, et. al., 1981; MOLANDER, et. al., 1982; SECKEL, et. al., 1984; MADISON, et. al., 1985; RENDE, et. al., 1991; DIETRICH, 2004), tubos pseudossinoviais (BRAUN, 1966), tubos de colágeno (COLIN & DONOFF, 1984; ARCHIBALD, et. al., 1991) ou mesmo artérias e veias (MATSON, et. al., 1948). Na literatura, há propostas mais radicais para resolver o “gap” de nervo, como a que promove o encurtamento ósseo do úmero ou do fêmur (DANDY, 1943).

Durante um processo regenerativo, as fibras musculares apresentam modificações na sua estrutura, pois atrofiam rapidamente nos períodos iniciais de desnervação. Nos primeiros 60 dias a área de secção transversal média de uma fibra está reduzida em até 70%. O processo torna-se mais lento após este período, avançando apenas mais 10% em 120 dias, e a partir deste momento a atrofia varia de 80 a 90%. Em todo o estágio de desnervação, a percentagem de diminuição do diâmetro da fibra muscular supera a percentagem da perda de peso de todo o músculo. Esta diferença entre redução de peso e de calibre se explica por um aumento relativo no volume de tecido conjuntivo, que compensa de alguma forma a maior atrofia das fibras (SUNDERLAND & RAY, 1950).

O músculo estriado esquelético é constituído por fibras musculares associadas a tecido conjuntivo, que agrupa um conjunto de células musculares em

um determinado local do músculo, formando os fascículos musculares. Embora os músculos desenvolvam-se inicialmente sem influência neural, o início da atividade do sistema nervoso e a força mecânica interferem no estágio pós-maturação das fibras musculares (KINGHAM et al., 2005).

As características que distinguem os músculos desnervados dos músculos innervados normalmente são as mudanças de cor e uma redução de volume e peso. Estas alterações têm sido tema de várias investigações que abrangem diversos tipos de músculos e animais. A atrofia é detectada a partir do terceiro dia e estabilizada a partir do segundo mês mantendo apenas 20% a 40% da massa muscular original (SUNDERLAND & RAY, 1950).

A atrofia se inicia na periferia das miofibras, mas após o primeiro mês de degeneração se torna visível em seu interior. Durante a primeira semana, a mitocôndria de ambas as fibras, vermelhas e brancas, aumentam em seu eixo longitudinal. Conseqüentemente, as organelas agrupam-se; algumas mitocôndrias sofrem diminuição de número e tamanho e são digeridas por vacúolos autofágicos. Simultaneamente, o retículo sarcoplasmático a princípio aumenta e depois diminui, embora menor do que a própria fibra. Na microscopia eletrônica observa-se também anormalidades na banda Z, e um aumento do número de ribossomos pode ser encontrado entre as miofibrilas e a superfície da membrana (MCCOMAS, 2006).

As mudanças não incluem todas as fibras musculares de maneira uniforme. A mudança mais precoce e característica na morfologia das fibras desnervadas é a perda do sarcoplasma, a redução de seu calibre e a desorganização ultraestrutural das fibras (SUNDERLAND & RAY, 1950; PELLEGRINO & FRANZINI, 1963; TOMANEK & LUND, 1973; LU et al., 1997). Outra característica notável encontrada em um quadro de desnervação é a proliferação de tecido conjuntivo, que aparece

em primeiro lugar no perimísio e que logo afeta o endomísio, no qual o depósito de novo material fibroso em ambas as regiões são sempre precedidas de um importante aumento no número de fibroblasto (SUNDERLAND & RAY, 1950). Em nenhum estágio é observado a substituição de tecido muscular por tecido fibroso, mas é encontrado tecido adiposo em alguns músculos desnervados (RODRIGUES et al., 2007; BOWDEN & GUTMANN, 1944).

A área em secção transversal é uma das aferições mais importantes dos músculos estriados esqueléticos, porque é usada como um dos parâmetros para se determinar a força máxima que um músculo pode produzir sob condições isométricas (WOLEDGE et al., 1985; CAIOZZO, 2002). A área em secção transversal de uma fibra muscular é regulada por várias vias e/ou mecanismos. Estudos têm mostrado uma relação direta entre a área em secção transversal de uma fibra muscular e o número de mionúcleos (ALLEN et al., 1976; ROSSER et al., 2002). Assim, a condição de hipertrofia está associada a um aumento de mionúcleos enquanto que a atrofia das fibras musculares está associada com a perda de mionúcleos (ALLEN et al., 1995; SCHMALBRUCH & LEWIS, 2000).

Hoje se sabe que a redução na área em secção transversal das miofibras é maior nas fibras de contração rápida do que nas de contração lenta (LU et al., 1997; DUPONT-VERSTEEGDEN et al., 1998; WALTERS et al., 2000; DAVATZ, et. al., 2007).

Se a desnervação ocorrer por um período mais longo, pode induzir as miofibras à apoptose (DAVATZ, et. al., 2007; YOSHIMURA & HARII, 1999) e ativação e proliferação das células satélites, que são células miogênicas precursoras do músculo estriado esquelético adulto (MURRAY & ROBBIS, 1982; SNOW, 1983; VIGUIE et al., 1997).

Apesar de alguns pesquisadores considerarem que a atividade neural aumentada induz a hipertrofia muscular (ROY et al., 1982; ISHIHARA et al., 1998), enquanto que sua ausência, tais como desnervação, resulta em atrofia muscular (VIGUIE et al., 1997; HYATT et al., 2003), outros afirmam que após a desnervação de um músculo ocorre um aumento na proliferação e diferenciação de células satélites (MURRAY & ROBBINS, 1982; SNOW, 1983; ANZIL & WERNIG, 1989; MCGEACHIE, 1989; DEDKOV et al., 2001), mas que o tecido muscular não pode ser mantido após um longo período de desnervação (IRINTCHEV et al., 1990).

Com o advento da engenharia tecidual, a partir de diferenciação de células-tronco, surgiu uma nova alternativa terapêutica para a regeneração de nervos. Vários pesquisadores utilizam as células-tronco como alternativa de reparo de tecidos (SCHAAKXS, et. al., 2013; HU, et. al., 2013; NISHIMURA, et. al., 2013; SEKIGUCHI, et. al., 2013; GHOREISHIAN, et. al., 2013; CHENG, et. al., 2013).

Tendo em vista as inúmeras técnicas que visam solucionar o problema da regeneração do nervo, as células-tronco extraídas do tecido adiposo mostraram-se como uma promissora opção para estudo de regeneração nervosa.

2. Objetivos

Geral

Estudar a regeneração de nervo periférico mediante tubulização por enxerto venoso preenchido ou não com células-tronco extraídas de tecido adiposo autólogo e PRP.

Específicos:

- Verificar a eficácia da utilização das células-tronco e PRP no reparo morfológico das estruturas nervosas e musculares;
- Verificar a eficácia da utilização das células-tronco e PRP na recuperação funcional;
- Verificar se os resultados morfológicos e funcionais apresentam resultados semelhantes.

3. Materiais e Método

Todos os procedimentos experimentais realizados estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo nº 481, aprovado em reunião da Comissão de Ética na Experimentação Animal.

3.1 - Animais

Foram utilizados 100 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 180 – 200 gramas, com 80 dias de vida, provenientes do Biotério Central da UNESP – campus de Botucatu - SP. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas (quatro animais por caixa) recebendo água e ração “*ad libitum*”, sem restrições na movimentação, respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 24°C. O rato foi escolhido para este estudo devido ao fato que essa espécie, em especial o macho, é o mais usado na investigação de reparo de nervos periféricos.

Os 100 animais foram distribuídos em três grupos controles e três grupos experimentais, assim constituídos:

1. Grupo Controle Desnervação (GCD): Constituído de 20 animais. Os animais passaram por procedimento cirúrgico de desnervação e foram eutanasiados com 230 dias. Por meio desse grupo, foram obtidos os dados das fibras nervosas e musculares dos animais com cento e cinquenta dias de desnervação.
2. Grupo Controle Inicial (GCI): Constituído de 10 animais. Os animais não passaram por procedimento cirúrgico e foram eutanasiados com 80 dias de

vida. Por meio desse grupo, foram obtidos dados das fibras nervosas e musculares dos animais no início do experimento.

3. Grupo Controle Final (GCF): Constituído de 10 animais. Os animais não passaram por procedimento cirúrgico e foram eutanasiados com 230 dias de vida. Por meio desse grupo, foram obtidos dados das fibras nervosas e musculares dos animais no final do experimento.
4. Grupo Sem Preenchimento (GSP): Constituído de 20 animais. Os animais com 80 dias de vida passaram por procedimento cirúrgico de reparo de lesão de nervo periférico através da técnica de tubulização e foram eutanasiados com 230 dias de vida.
5. Grupo Plasma Rico em Plaquetas (GPRP): Constituído de 20 animais. Os animais com 80 dias de vida passaram por procedimento cirúrgico de reparo de lesão de nervo periférico através da técnica de tubulização, com preenchimento de PRP e foram eutanasiados com 230 dias de vida.
6. Grupo Células-Tronco e PRP (GCT+PRP): Constituído de 20 animais. Os animais com 80 dias de vida passaram por procedimento cirúrgico de reparo de lesão de nervo periférico através da técnica de tubulização, com preenchimento de PRP associado com células-tronco e foram eutanasiados com 230 dias de vida.

Os esquemas das cirurgias realizadas nos grupos controles e experimentais estão apresentados na figura 2.

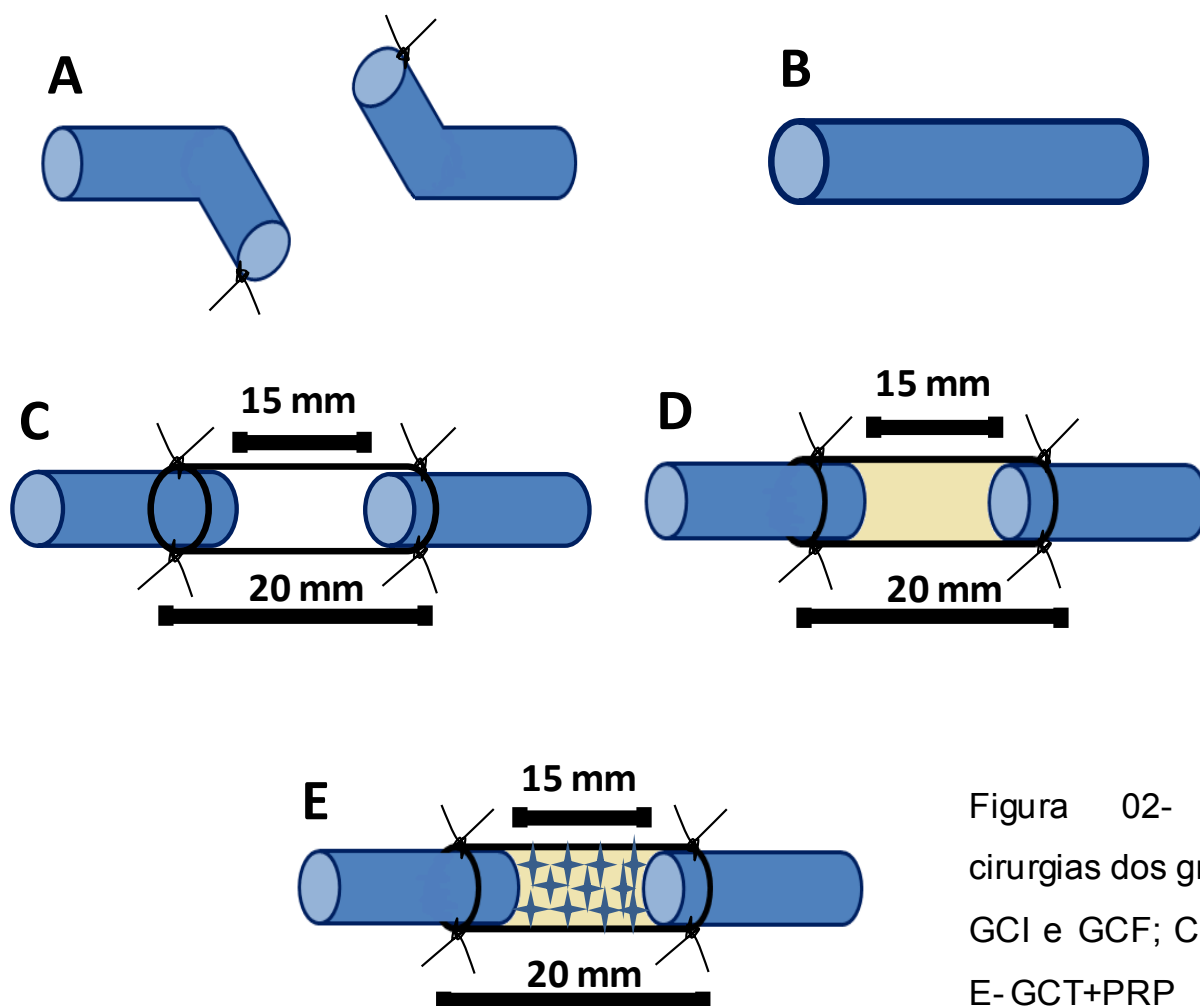


Figura 02- Esquemas das cirurgias dos grupos. A- GCD; B- GCI e GCF; C- GSP; D- GPRP; E- GCT+PRP

Figura 2– Esquema das cirurgias dos grupos. A- GCD; B- GCI e GCF; C- GSP; D- GPRP; E- GCT + PRP.

3.2 Critérios de exclusão para todos os grupos de estudo

- § Animais que se apresentavam previamente doentes na avaliação clínica do bioterista;
- § Animais com alteração de pelagem como falha, escabiose e prurido intenso;

- § Animais com baixo peso médio previsto para a idade ou menos de 180 g;
- § Animais que apresentavam autofagia.

3.3 Preparo do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Foram obtidas amostras de 5 mL de sangue de 5 diferentes ratos por punção cardíaca em seringa heparinizada. Foi realizado hemograma para verificar possíveis anormalidades eritrocitárias ou leucocitárias e verificar a hematimetria do Sangue total e do próprio PRP. Após o hemograma o sangue foi centrifugado e as alíquotas de PRP foram mantidas em tubos criogênicos a -80°C para todo procedimento.

O protocolo segue o procedimento operacional padrão (POP) do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

No momento da utilização do PRP foi adicionado gluconato de cálcio a 1% e trombina humana purificada, promovendo a gelificação das Células-tronco em um processo denominado microencapsulação.

3.4 Obtenção de Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo:

As células foram extraídas do tecido adiposo da região inguino-crural dos ratos. Para isto, após anestesia com ketamina (0,3 mL/kg, I.M.) e xilasina (0,3 mL/kg, I.M.), foi feita incisão de 1 cm nesta região e retirada de um bloco com massa aproximada de 1 g de tecido adiposo. A incisão na pele foi suturada com fio mononáilon 4-0 com pontos separados. O tecido foi assepticamente transferido para recipiente contendo solução tampão fosfato, refrigerado a 4 °C. Depois foi imediatamente levado para o Laboratório de Engenharia Celular para o processamento. Na câmara de fluxo

laminar (Fig. 3) em condições assépticas o tecido foi lavado em solução tampão fosfato até a eliminação do conteúdo sanguíneo visível.

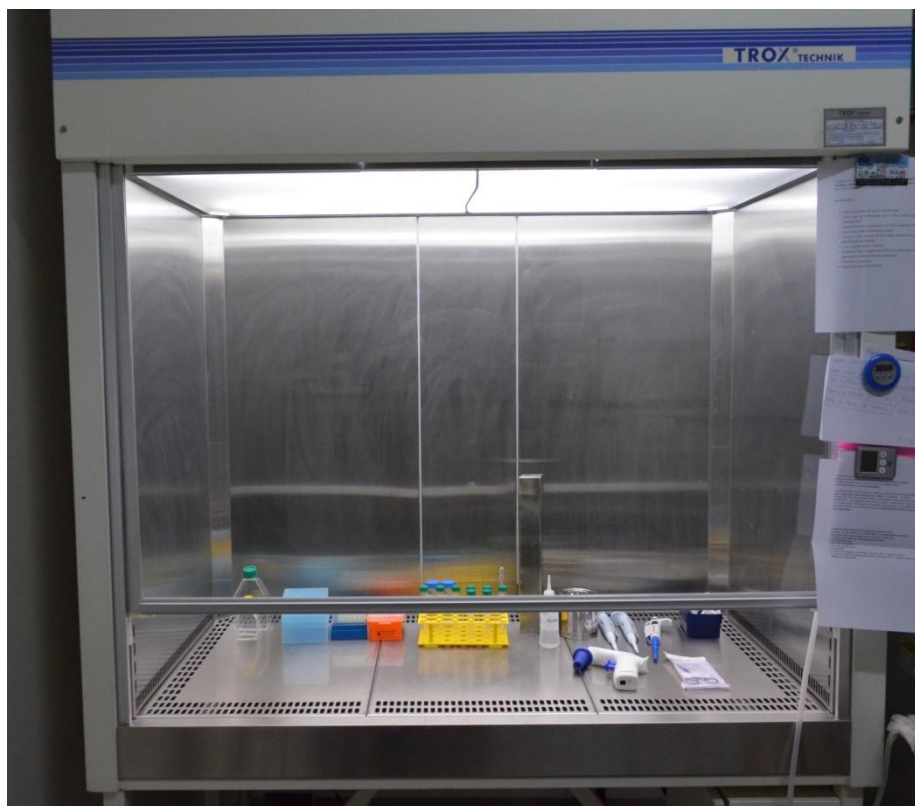


Figura 3 – Câmara de fluxo laminar classe II A.

O tecido foi submetido à digestão enzimática em agitação constante durante 50 minutos, a 37 °C, em solução contendo 2 mL por grama de tecido de meio de Dubelcco, 2 mg/mL de collagenase tipo A, 20 mg/mL de albumina sérica bovina, fração 5, penicilina 124 micrograma/mL. Decorrido o tempo de digestão, o processo foi interrompido por adição de volume igual a 10% do total do soro fetal bovino, previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 56 °C, durante 20 minutos. A suspensão de células foi centrifugada por 5 minutos. O sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado e o precipitado, contendo a fração estroma vascular foi re-suspenso em DMEM contendo 10 % de soro fetal bovino.

As células presentes foram contadas sob microscópio invertido com auxílio de câmara de Neubauer (Figs. 4 e 5). As células foram então semeadas em placa de cultura de 100 mm de diâmetro, à razão de $2,5 \times 10^5$ células por placas e cultivadas em meio DMEM contendo 10 % de soro fetal bovino, suplementado com penicilina 62 micrograma/mL e estreptomicina e bFGF recombinante humano. Dois dias depois, a placa foi cuidadosamente lavada várias vezes com solução tampão para remover hemácias e outras células não aderentes, antes da substituição do meio. A cada dois dias o meio foi trocado, até que as células atingissem aproximadamente 70 % de confluência, quando foram submetidas à tripsinização com 1 mL de solução de tripsina a 2 %. A placa foi mantida a 37 °C por 2 a 3 minutos até que as células se liberem do plástico completamente. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 10 mL de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. As células das placas foram re-suspensas, contadas e novamente semeadas à razão de $2,5 \times 10^5$ por placa de 100 mm de diâmetro.



Figura 4 – Sala de Cultura com estufa e microscópio de luz invertido com controle de fase - Zeiss®.



Figura 5 – Microscópio de luz invertido com controle de fase - Zeiss®.

3.5 Contagem Celular:

As amostras foram encaminhadas ao laboratório de hematologia do hemocentro, e dosadas espectrofotometricamente no período de até uma hora após a coleta no contador automatizado Cell Dyn 3500 pelo método da cianohemoglobina modificado.

3.6 Viabilidade Celular:

Para utilização das células-tronco obtidas foi necessária a avaliação da estimativa da viabilidade celular pela coloração do azul de tripano a 0,3 %.

As células viáveis excluem o corante devido à integridade de sua membrana plasmática, aparecendo claras e brilhantes em microscopia óptica. As células mortas incorporam o corante em virtude da fragmentação/desnaturação de sua membrana plasmática, tornando-se maiores e escuras. O resultado é expresso em percentagem de células viáveis segundo a fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células vivas} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{n}^{\circ} \text{ células mortas}}$$

3.7 Citometria de Fluxo:

A técnica de citometria de fluxo (Fig. 6) foi utilizada para determinação dos marcadores das células-tronco adultas hematopoiéticas e das células mesenquimais. Através do uso de um conjunto de anticorpos monoclonais disponíveis no mercado e de passagem das células, uma a uma, por um sensor eletrônico e emissão de luz, é possível mensurar vários parâmetros citológicos, tamanho, granulosidade, expressão ou não de determinados antígenos. Neste caso,

a necessidade recai sobre parâmetros extrínsecos, isto é, referentes à estrutura membranária (CD) que faz uma ligação covalente com proteínas específicas marcadas (anticorpos monoclonais específicos anti CD34, CD44, CD45 e CD90). Estes anticorpos são marcados com flurocromo. O isotiocinato de fluoroceína foi o fluorocromo eleito para os anticorpos adquiridos, pois no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu é o mais utilizado. A ligação desses anticorpos marcados acontece através de ligações covalentes com estruturas/receptores da membrana da célula e detectados pelo sensor eletrônico do aparelho. Nesta análise, ainda é possível detectar-se parâmetros intrínsecos importantes como, por exemplo, o tamanho celular, identificando a presença de populações mistas e caracterizando estas populações quanto à variação de tamanho e volume.

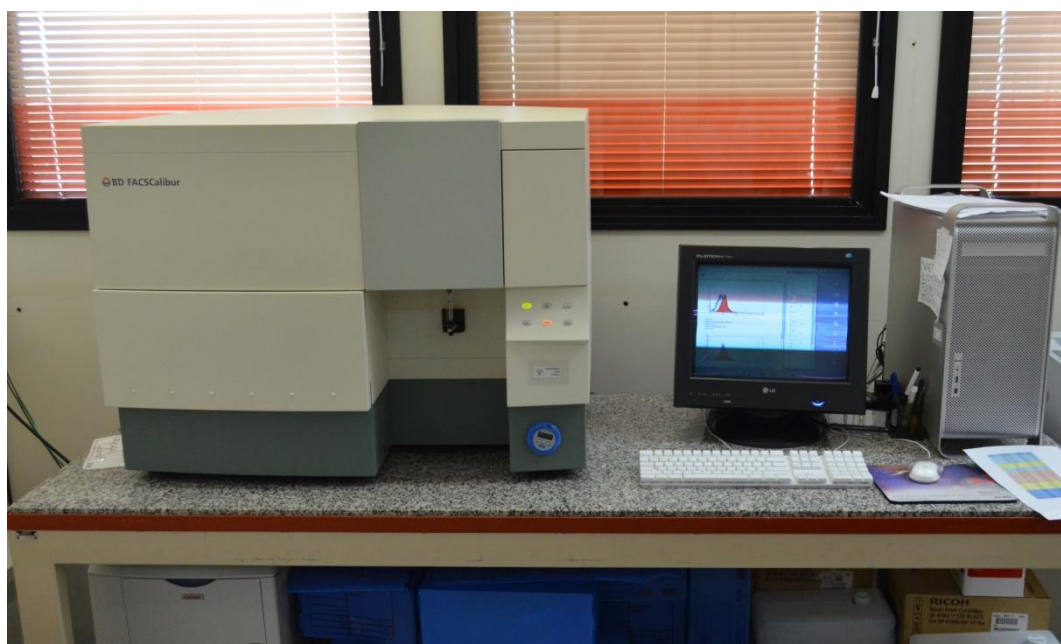


Figura 6 – Citometria de fluxo – BDFACSCalibur.

As alíquotas de CTAH ou CTATA foram incubadas com anticorpos já descritos. As suspensões celulares foram ajustadas a uma concentração entre 5×10^5 a 5×10^6 células/mL.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo provido de laser de argônio a 480 nm, de 15 mw. O programa de leitura foi otimizado para análise das amostras. O volume aspirado de cada amostra foi de 100 µl com taxa de fluxo de 50 µl/minuto. A interpretação utilizou dois histogramas, a saber:

Histograma 1 – dispersão de luz dianteira, FS (foreside scatter) X e logaritmo da dispersão lateral LSS (logarithm side scatter), 64 x 64 canais, onde a população a ser estudada é graficamente delimitada por um bitmap.

Histograma 2 – utilizou a contagem de células (count-eventos) X o logaritmo da fluorescência, LFL1 (logarithm fluorescence), 1024 x 1024 canais. As concentrações dos anticorpos foram preparadas segundo as recomendações dos respectivos fabricantes.

3.8 Procedimentos Cirúrgicos:

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de cirurgia do laboratório de cirurgia experimental da FMB/UNESP (Fig. 7).

Os animais tiveram sua massa aferida previamente e submetidos à anestesia geral, através de injeção intramuscular de ketamina (0,3 mL/kg) associada à xilasina (0,3 mL/kg). A anestesia foi aplicada na pata contralateral para não interferir nos resultados do lado operado.



Figura 7 – Sala de cirurgia no laboratório de cirurgia experimental FMB/UNESP.

Após ser realizada a tricotomia (Figs. 8 e 9) e serem adotadas técnicas de antissepsia para procedimentos cirúrgicos, os animais foram fixados pelas patas em placas de cortiça.



Figura 8 – Foto da tricotomia realizada na face ventral do pescoço do animal realizada nos grupos experimentais.



Figura 9 – Foto da tricotomia da face dorso-lateral do membro pélvico direito realizada em todos os grupos.

Nos animais dos Grupos Experimentais foi realizada uma incisão paramediana unilateral de aproximadamente 2,5 cm no pescoço dos animais, onde foi retirado 2,0 cm da veia Jugular Externa com auxílio de um fio ortodôntico inoxidável de 0,06 mm. (Figs. 10 e 11). No segundo tempo cirúrgico, foi efetuada uma incisão longitudinal na face dorso-lateral da coxa direita, com aproximadamente 2,5 cm de comprimento. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas e os músculos subjacentes divulsionados para exposição e dissecação do nervo fibular comum (Fig. 12). Com auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm de comprimento do referido nervo em questão. Após a secção, o nervo fibular comum direito recebeu o enxerto da veia jugular externa sem preenchimento, com preenchimento de PRP ou com preenchimento de PRP associado com células-tronco, restabelecendo a comunicação entre o coto proximal e distal com espaço entre os cotos de 15 mm. A incisão foi suturada com pontos simples utilizando fio monofilamentar de náilon 4-0.

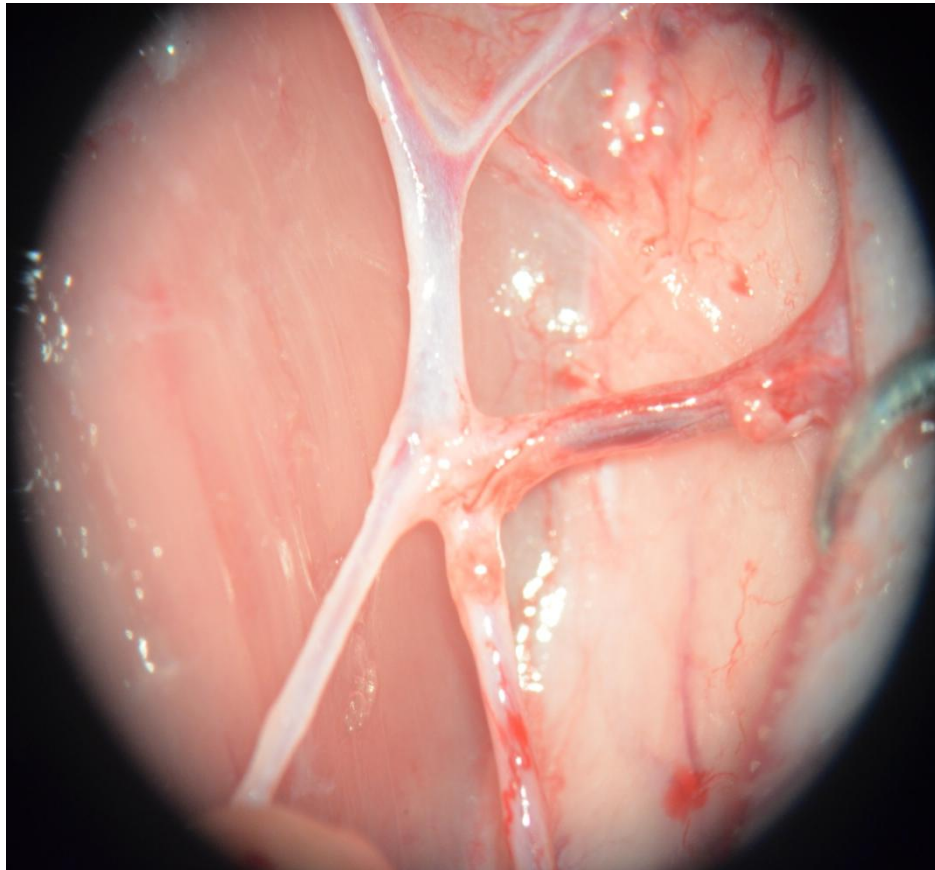


Figura 10 – Foto do procedimento cirúrgico durante a retirada da veia jugular externa.



Figura 11 - Fio ortodôntico inoxidável de 0,06 mm, utilizado para realizar a retirada da veia jugular externa.

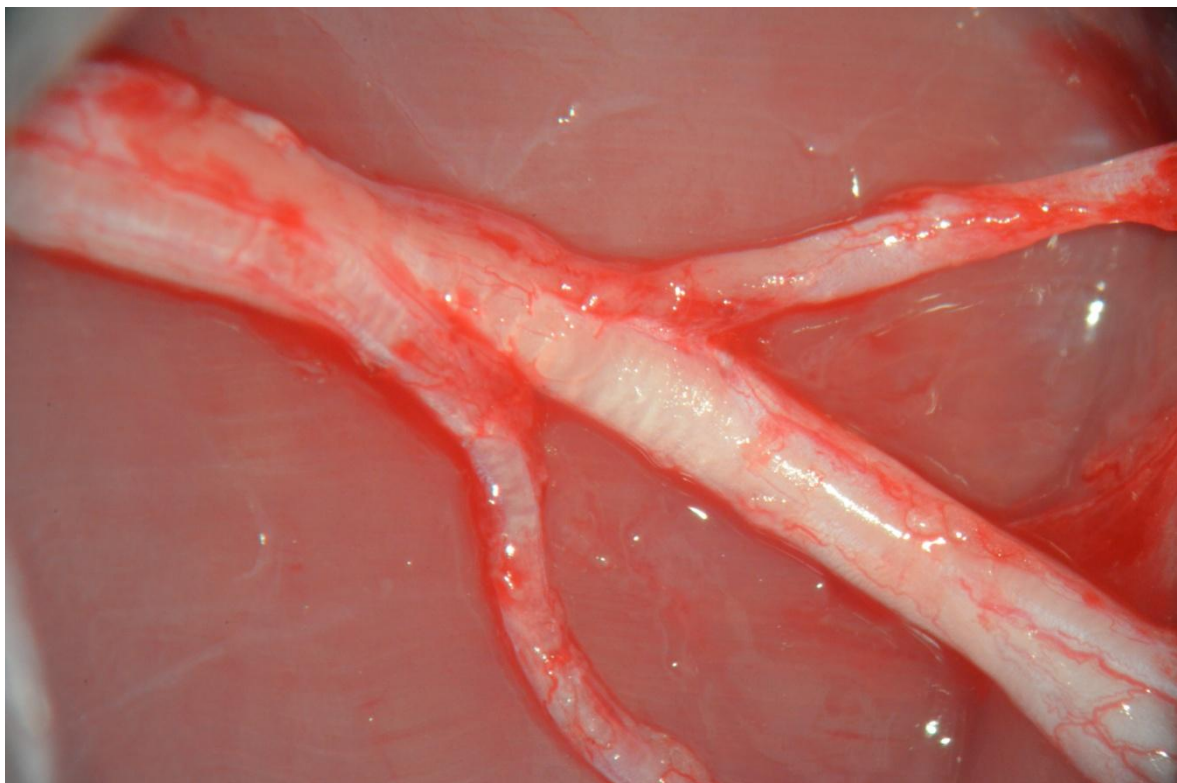


Figura 12 – Foto durante procedimento cirúrgico de exposição do nervo isquiático para realização das cirurgias experimentais.

Os animais dos Grupos Controles (GCI e GCF) não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico. O objetivo dos grupos controles era obter dados no início e término do experimento.

Nos animais do Grupo Desnervado (GCD) foi efetuada uma incisão longitudinal na face dorso-lateral da coxa direita, com aproximadamente 2,5 cm de comprimento. A pele e a tela subcutânea foram rebatidas e os músculos subjacentes divulsionados para exposição e dissecação do nervo fibular comum. Com auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) foi seccionado e retirado um segmento de aproximadamente 0,5 cm de comprimento do referido nervo em questão. Após a retirada, o coto proximal foi suturado com ponto simples utilizando fio monofilamentar 4-0 na musculatura adjacente e o coto distal na tela subcutânea. Esse procedimento se faz necessário para que não ocorra a reinervação

espontânea. A incisão foi suturada com pontos simples utilizando fio monofilamentar de náilon 4-0.

3.9 Coletas das Amostras:

Com 230 dias de vida, os animais dos grupos GCF, GCD, GSP, GPRP e GCT+PRP foram submetidos à anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina (0,3 mL/Kg) e xilasina (0,3 mL/Kg).

Realizou-se a tricotomia e a antissepsia da região dorso lateral dos membros pélvicos com exposição dos nervos isquiático, fibular comum, tibial e sural. Dos grupos experimentais foram retirados os segmentos relativos aos enxertos de veia no nervo fibular comum, do grupo controle final foi retirado um segmento de 15 mm de nervo fibular comum e do grupo desnervado foi retirado um segmento de 15 mm do coto distal do nervo fibular comum, todas as amostras do lado direito do animal. Após a retirada das amostras de nervos, os músculos TC foram retirados de ambos os lados do animal.

Os animais do GCI foram eutanasiados com 80 dias de vida, onde novamente foi realizado a tricotomia e antissepsia da região dorso lateral dos membros pélvicos com nova exposição dos nervos e músculo e retirada de uma amostra de 15mm do nervo fibular comum direito e do músculo TC de ambos os lados.

3.10 Teste de Marcha

Antes dos animais serem eutanasiados para coleta do material, foram submetidos à avaliação funcional. Para esta avaliação os animais foram imobilizados, e a região plantar de suas patas posteriores foram pintadas com tinta de carimbo. No assoalho de uma canaleta de madeira, foi colocada uma faixa de

papel para que os animais de todos os grupos caminhassem e deixando as impressões de sua marcha. Este procedimento foi repetido duas vezes com cada animal. A distância entre as impressões dos membros posteriores foram avaliadas segundo a equação descrita por Bain, Mackinon e Hunter (1989), com base nos estudos de De Medinaceli, Fred e Wyat (1982). As impressões com dificuldades de serem avaliadas foram descartadas, e as demais foram escaneadas e digitalizadas, obedecendo a um padrão de calibração para cada imagem. As medições foram feitas com auxílio do programa Image Pro-plus 4.6.2, e os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico obedecendo ao índice de $P < 0,05$ para todas as amostras.

3.11 Processamento Histológico dos Músculos:

Para o tratamento histológico, as amostras do músculo Tibial Cranial, passaram por um protocolo de criopreservação em nitrogênio líquido, onde os músculos retirados foram reduzidos a fragmentos cilíndricos e envoltos em talco cirúrgico e imersos em nitrogênio líquido até que a efervescência cessa-se, após esse processo foi usado um adesivo especial chamado O.C.T. (Optimal Critical Temperature), como meio de inclusão. Após a inclusão, os músculos foram mantidos em um freezer à -80°C até o momento que foi obtido os cortes histológicos de dez micrômetros de espessura em criostato marca Leica - Modelo CM 1850 (Fig. 13), a -20°C , e feita a coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) e submetidas a morfometria da área de secção transversal das fibras musculares



Figura 13- Aparelho de Criostato Leica CM1850 utilizado para obtenção dos cortes musculares.

3.12 Processamento Histológico dos Nervos:

Para o tratamento histológico, as amostras dos nervos Fíbular Comum passaram por protocolo de inclusão em historesina para obtenção em micrótomo Leica (Fig. 14) de cortes semifinos de $0,5\ \mu\text{m}$, e corados em solução de tetróxido de ósmio a 1 %. Posteriormente as lâminas foram submetidas à morfometria das fibras nervosas.



Figura 14 - Micrótomo Leica RM2265 utilizado para obtenção dos cortes histológicos dos nervos, acoplado com lupa de aumento Leica MZ6.

3.13 Processamento para análise morfométrica:

Foi realizada a morfometria do músculo TC e do nervo Fibular Comum com mensuração de 220 fibras de cada músculo e nervo por animal de cada grupo utilizando um micro computador com o software de captura e análise de imagem (Fig. 15), acoplado ao microscópio óptico (Leica DMLS). As variáveis morfométricas estudadas nos músculos foram: área das fibras e nos nervos foram: área das fibras, área dos axônios, diâmetro mínimo das fibras, diâmetro mínimo dos axônios, área da bainha de mielina e espessura da bainha de mielina.



Figura 15- Sistema de análise de imagem - Micro computador com o software de captura e análise de imagem, acoplado ao microscópio Leica DMLS.

3.14 Atributos avaliados:

- a) Massa do rato antes da cirurgia e antes do sacrifício.
- b) Massa do músculo tibial cranial (TC) direito e esquerdo.
- c) Análise morfométrica da área das fibras dos músculos tibiais craniais.
- d) Análise morfométrica da fibra nervosa e aferição de seus diâmetros mínimos da fibra e do axônio, da área da fibra e do axônio e da área e espessura da bainha de mielina.
- e) Teste da marcha (Walking Tracking Analysis)

3.15 Teste Eletrofisiológico:

Para a realização do teste eletrofisiológico a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25 °C. O teste eletrofisiológico foi realizado imediatamente antes do sacrifício dos animais.

Para o estudo eletrofisiológico, os animais foram anestesiados com ketamina (0,3 mL/kg, i.m.) associada à xilasina (0,3 mL/kg, i.m.), e imobilizados em placas de cortiça em decúbito ventral. Foi realizada assepsia e ampla incisão no membro posterior direito permitindo acesso aos nervos isquiático, fibular comum e tibial e músculo tibial cranial. O potencial de ação composto foi registrado por eletrodos de agulha ativo e de referência. O eletrodo ativo foi implantado no centro do músculo tibial cranial, e o de referência próximo ao tendão de inserção do músculo. A avaliação das propriedades funcionais do músculo foi feita através de estímulos elétricos deflagrados por um eletrodo bipolar, especialmente desenvolvido para este propósito, cujo cátodo e ânodo estavam distantes 2 mm. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo isquiático, anterior à região da tubulização, e a estimulação foi feita proximal à neurorrafia, possibilitando a propagação dos impulsos elétricos através dela. A frequência do estímulo foi fixada em 1 pps e a duração em 100 μ s. A intensidade de estímulo utilizada, constante em todos os animais, foi de 5,1 volts. Os dados de amplitude e latência foram comparados entre os seis grupos. Foi utilizado o eletromiógrafo da marca Sapphire II 4ME.

3.16 Análise Estatística:

Quando comparados os grupos entre si foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

4. Resultados

4.1 Plasma Rico em Plaquetas:

O PRP obtido levou em consideração os parâmetros de hematimetria do sangue total e do próprio PRP. O hemograma realizado no sangue antes da manipulação não evidenciou anormalidades eritrocitárias ou leucocitárias.

4.2 Expansão e Caracterização das Células-tronco:

As células obtidas foram contadas obtendo valor médio de $5 \times 10^5/\text{mL}$, das quais alíquotas foram analisadas pós citometria de fluxo para determinação de fenótipo e posteriormente plaqueadas. A tabela 1 mostra as médias de intensidades de fluorescência e a figura 16 o Gráfico de dispersão e histogramas de marcação. A figura 17 apresenta as fotomicrografias do cultivo durante o período da cultura.

Tabela 1 - Média de intensidade de fluorescência (MIF) %.

nº eventos	CTLE neg	CD34	CD45	CD44	CD90
12568	1,01	1,33	23,14	18,75	98,9
7778	0,98	1,98	37,11	17,93	97,3
6782	1,64	1,66	43,15	19,45	96,78
10358	1,99	1,97	42,11	17,21	99,3
8976	1,81	1,99	39,17	18,44	95,49

CTLE negativo = CTM sem anticorpo = controle de autofluorescência; CD45 = mouse anti-rat – FITC; CD44 = mouse anti-rabbit com reação cruzada com rato; CD90 = mouse anti-rat FITC, após primeira passagem (cultura celular).

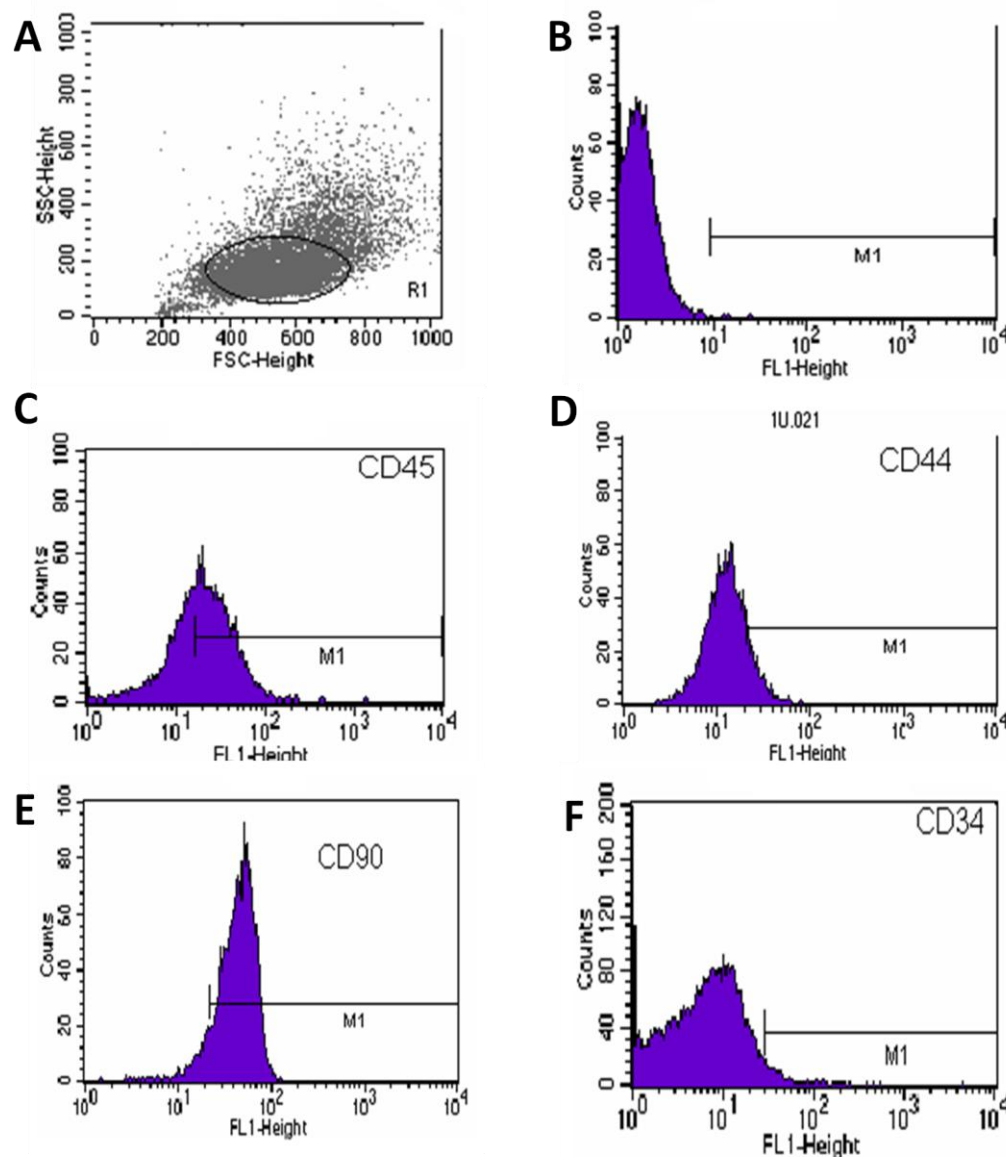


Figura 16 - Gráfico de Dispersão e Histogramas de marcação.

A= Gráfico de dispersão das células por tamanho e granulosidade; B = Controle negativo, CTM sem marcador, controle de autofluorescência, barra M1 delimita área de positividade; C= Histograma da marcação com CD45-FITC; D= Histograma da marcação com CD44-FITC; E = histograma de marcação com CD90-FITC, evidenciando deslocamento do pico de células, com 99,7% de positividade; F = histograma de marcação com anti-CD34-FITC.

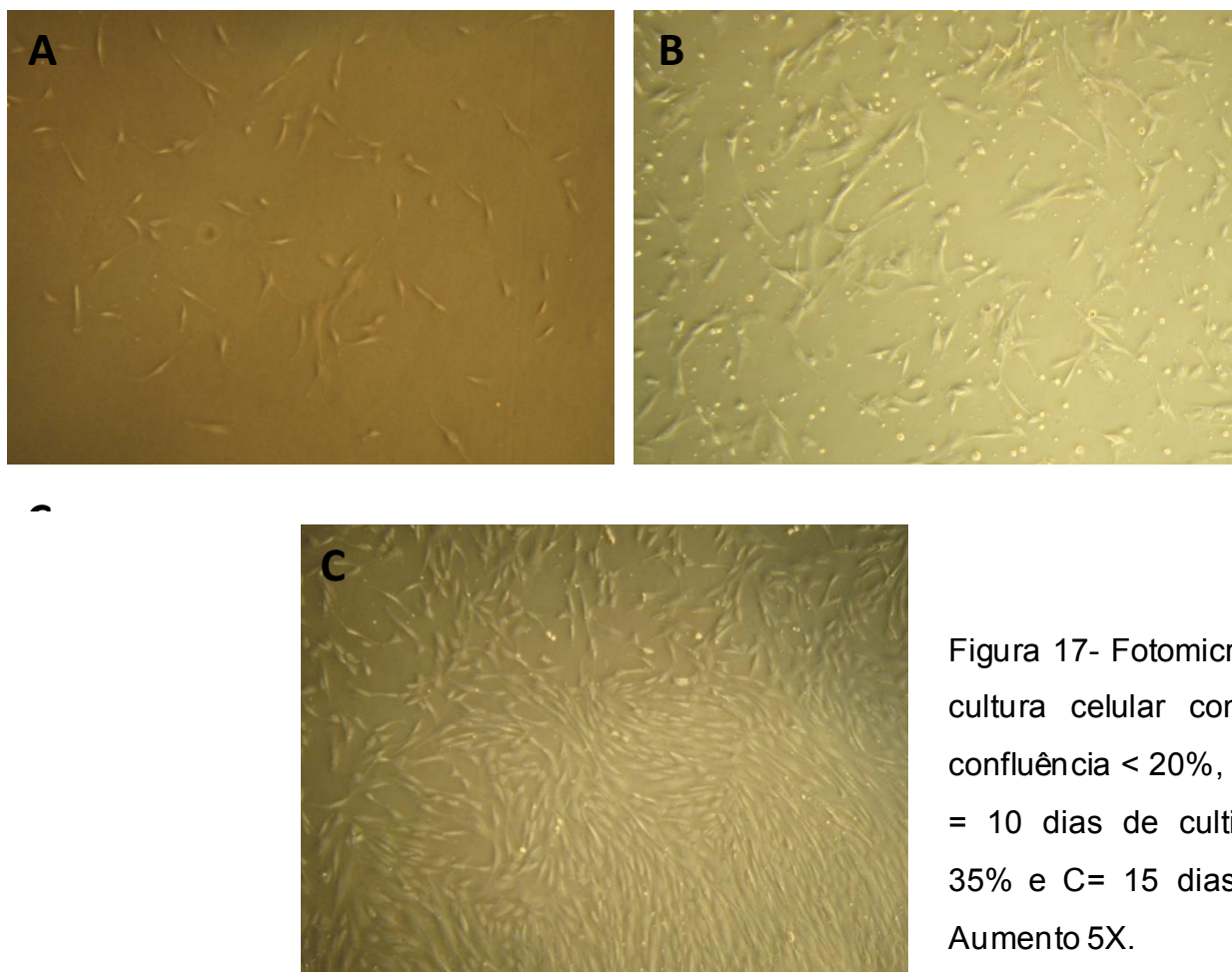


Figura 17- Fotomicrografia i
cultura celular com CTM.
confluência < 20%, 5 dias de
= 10 dias de cultivo, confl
35% e C= 15 dias, conflue
Aumento 5X.

Figura 17- Fotomicrografia invertida da cultura celular com CTM.
A= 5 dias de cultivo, confluência < 20%. B= 10 dias de cultivo, confluência de 35% e
C= 15 dias de cultivo, confluência 80%. Aumento 5x.

4.3 Observações Macroscópicas:

Todos os animais mantiveram a posição normal das patas e não observou-se autofagia em nenhum dos animais conforme evidenciado na figura 18.



Figura 18 – Pata com aspecto exterior normal.

4.4 Procedimentos Cirúrgicos:

Observações macroscópicas durante a dissecação do nervo fibular comum para a realização da técnica de tubulização evocaram a atenção para a variação anatômica apresentada na trifurcação do nervo em questão. Alguns animais apresentaram o nervo fibular comum já isolado desde a sua origem no plexo sacral.

Em três animais do GSP, dois do GPRP e dois do GCT+PRP foi observada fibrose justaposta ao tecido adjacente à região onde foi realizada a cirurgia.

Em todos os animais dos grupos experimentais a cirurgia de tubulização foi mantida e apresentava os cotos proximais e distais unidos.

Não foi possível observar macroscopicamente alteração na espessura do nervo fibular comum quando comparado entre os grupos experimentais e GCF. Quando

comparamos com o segmento distal do GCD observamos diferença macroscópica, sendo o GCD apresentado com menor espessura.

Do total de 20 ratos operados do GCT+PRP, 3 foram descartados, pois ocorreu contaminação da cultura celular. Os animais descartados foram substituídos para que não ocasionasse prejuízo na análise estatística.

No GSP ocorreu a perda de 2 dos 20 animais, um ocasionado pela anestesia, e outro pela perfuração da veia jugular no momento da retirada. Os animais foram substituídos para que não ocasionasse prejuízo na análise estatística.

4.5 Observações Histomorfológicas:

Para observar a morfologia das fibras nervosas, foram utilizado cortes transversais no terço médio do enxerto. A análise foi iniciada com auxílio da objetiva de 10x com aumento de 100x, passando pela objetiva de 20x com aumento de 200x chegando a objetiva de 40x com aumento de 400x. Durante o processo de análise foi observada a ausência das camadas das veias jugulares utilizadas como tubo.

Todos os animais do GCD apresentaram nas secções transversais do coto distal um aspecto de tecido conjuntivo denso, em substituição ao tecido nervoso, garantindo que a desnervação foi efetiva (Fig. 19).

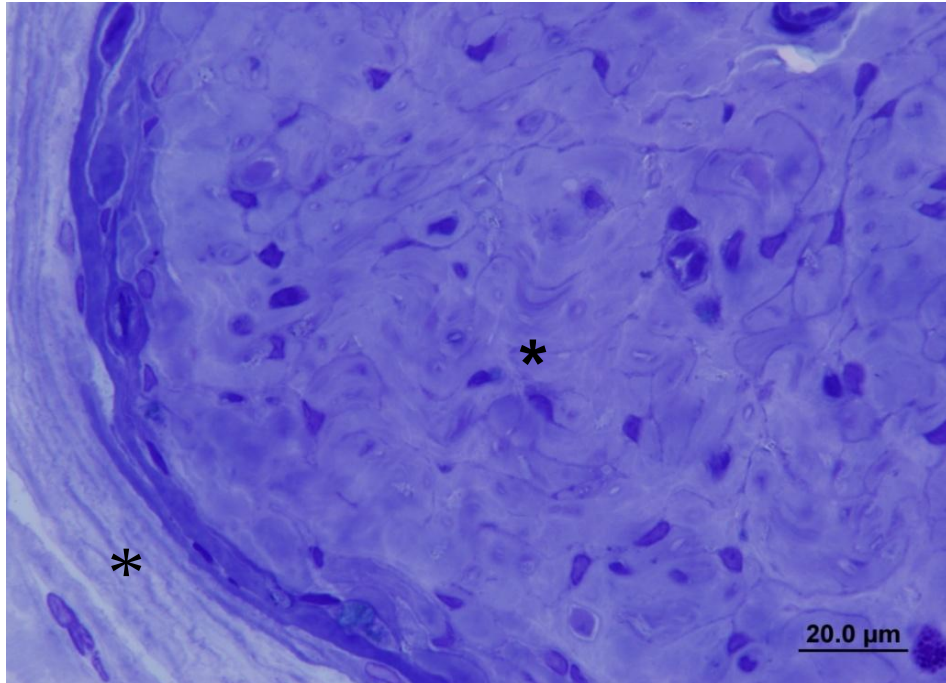


Figura 19 – Aspecto degenerado do coto distal do GCD.

Podemos observar a presença do Epineuro (*) e a invasão de tecido conjuntivo (*).

Todos os animais dos grupos experimentais apresentaram regeneração nervosa na região média do enxerto de veia, e sempre apresentou a formação de apenas um fascículo com as fibras nervosas (Figs. 20 - 22).

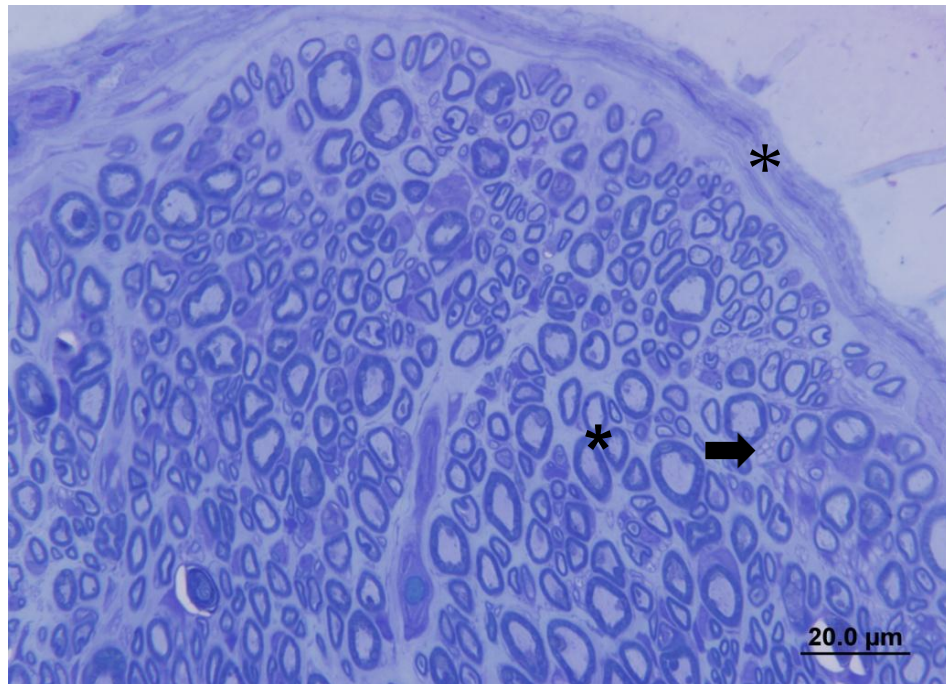


Figura 20 – Aspecto da região média do enxerto do GSP.

Podemos observar a presença do Epineuro (*), as fibras mielínicas (*) e as fibras amielínicas (➡).

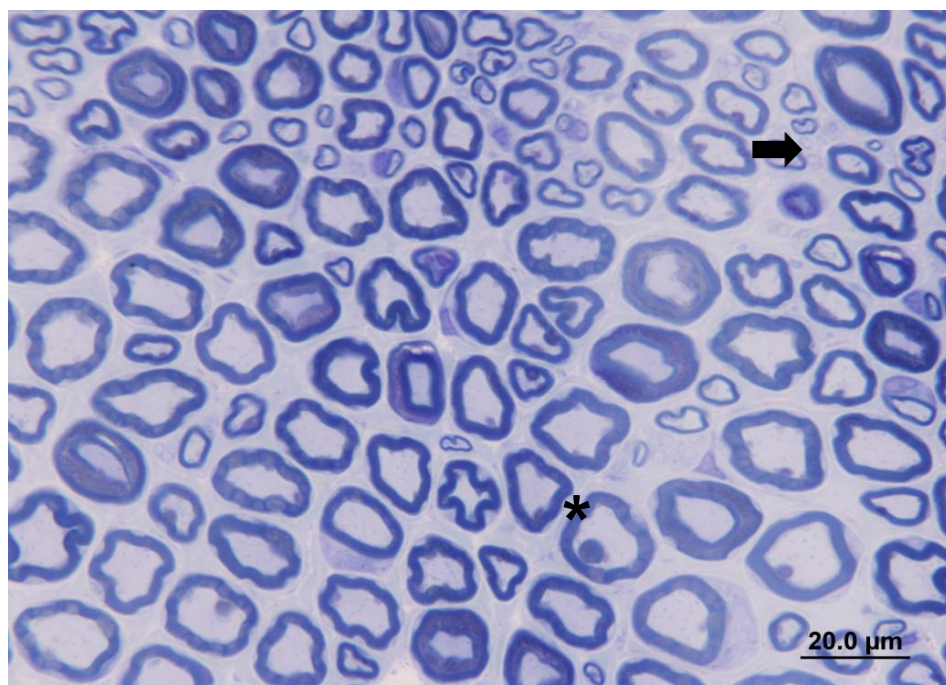


Figura 21 – Aspecto da região média do enxerto do GPRP.

Podemos observar a presença das fibras mielínicas (*) e das fibras amielínicas (➡).

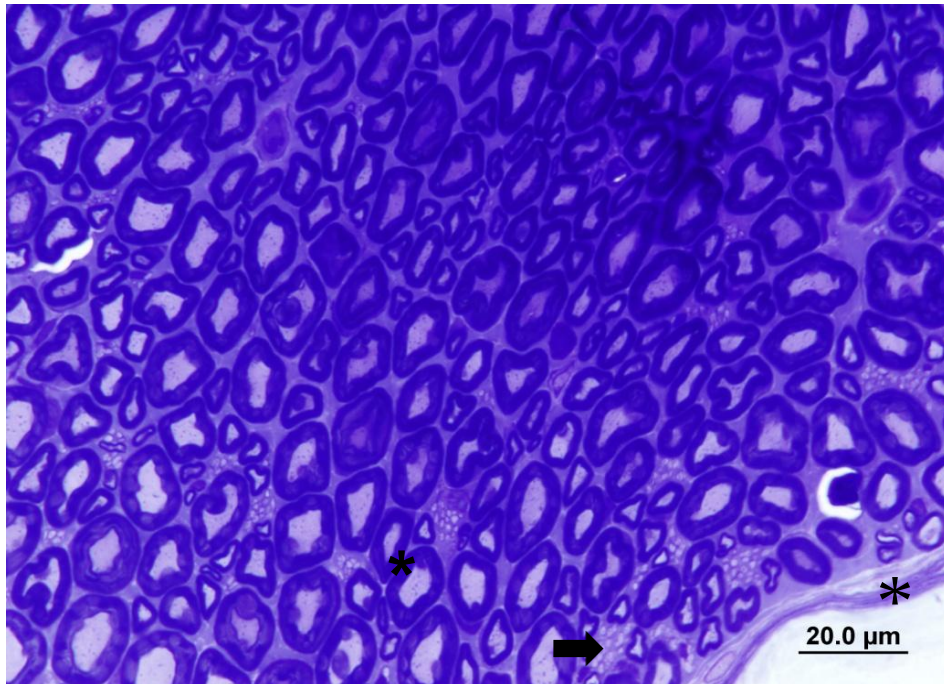


Figura 22 – Aspecto da região média do enxerto do GCT+PRP.

Podemos observar a presença do Epineuro (*), as fibras mielínicas (*) e as fibras amielínicas (➡).

As fibras nervosas dos grupos experimentais apresentavam uma grande heterogenicidade nas fibras mielínicas. Essa característica pode ser mais observada no GSP (Fig. 20). Fibras amielínicas também puderam ser observadas através da microscopia de luz em todos os grupos experimentais e controles (Figs. 20 a 24), com exceção do GCD que obteve degeneração total das fibras nervosas (Fig 19).

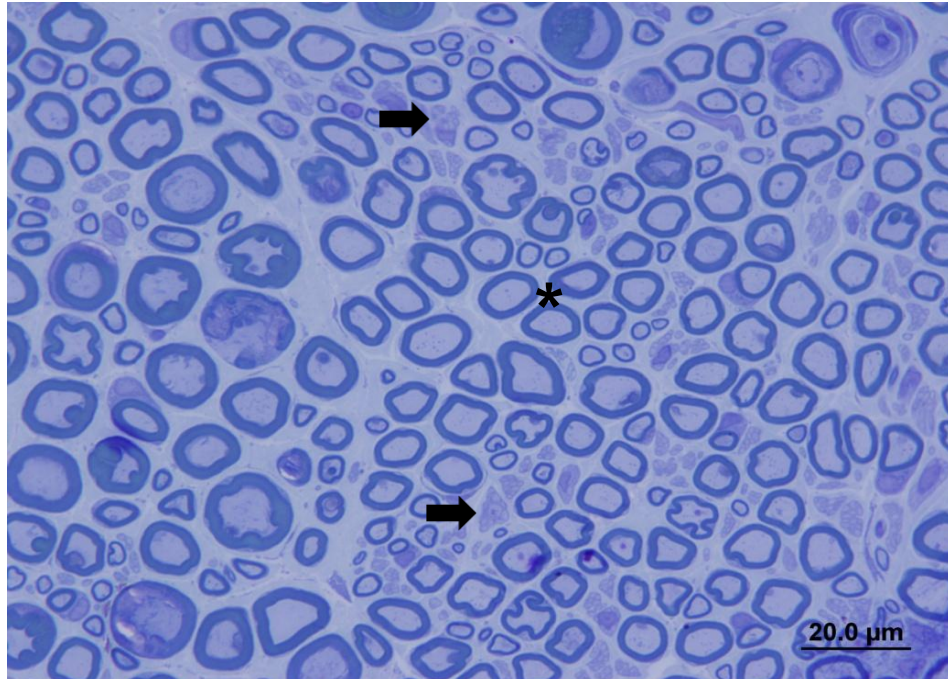


Figura 23 – Aspecto da região do nervo fibular comum do GCI.

Podemos observar a presença das fibras mielínicas (*) e as fibras amielínicas (➡).

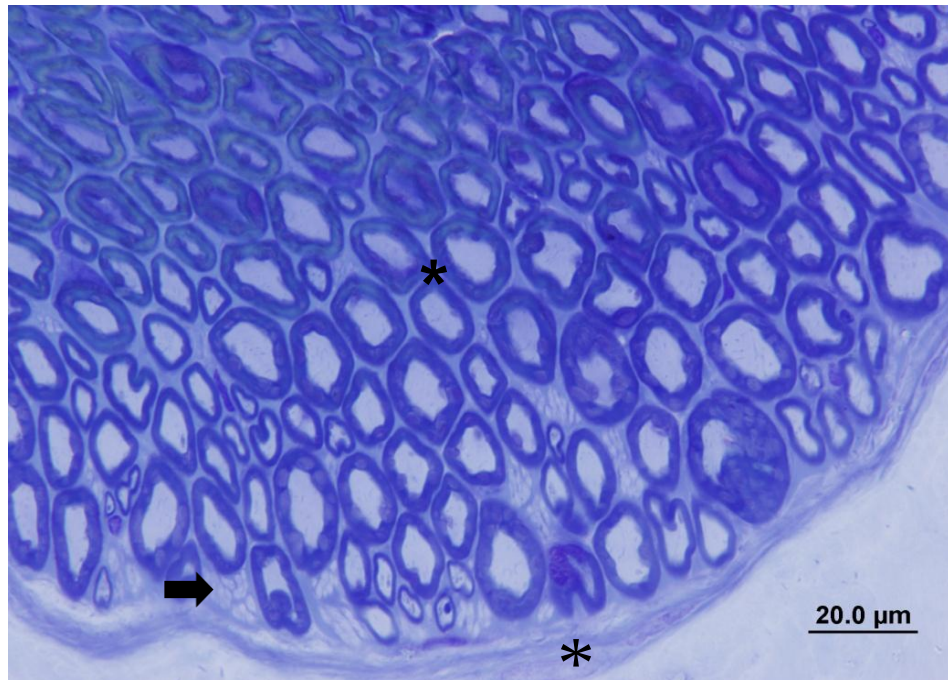


Figura 24 – Aspecto da região do nervo fibular comum do GCF.

Podemos observar a presença do Epineuro (*), as fibras mielínicas (*) e as fibras amielínicas (➡).

O GCD obteve maior invasão de tecido conjuntivo e as fibras perderam sua forma padrão, é possível observar as fibras espaçadas com área reduzida (Fig. 25). As fibras musculares dos Grupos Experimentais mantiveram seu padrão poligonal (Figs. 26, 27 e 28). Podemos observar mais invasão de tecido conjuntivo entre os fascículos no GSP. Nas observações histológicas do grupo controle em cortes transversais, verificam-se fibras musculares poligonais, com núcleos periféricos, padrão fascicular normal, com arquitetura histológica organizada pela presença de envoltórios conjuntivos, perimísio e endomísio delimitando cada fascículo e fibra muscular, respectivamente, evidenciando a morfologia normal do tecido muscular esquelético (Figs. 29 e 30).

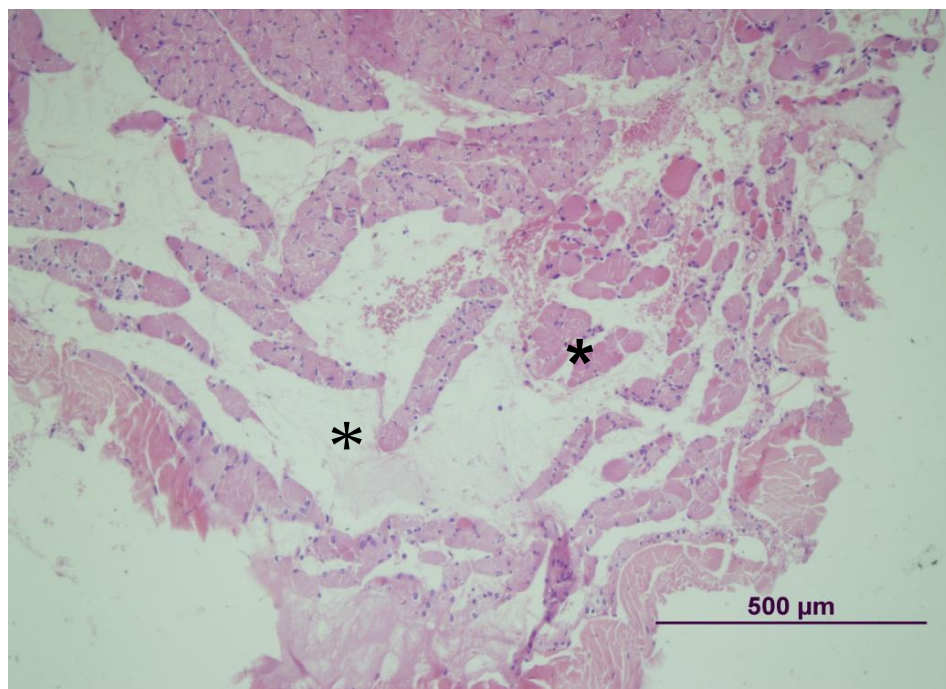


Figura 25 – Aspecto do músculo Tibial Cranial do GCD.
Podemos observar a invasão de tecido conjuntivo (*) e a presença de fibras musculares irregulares (*).

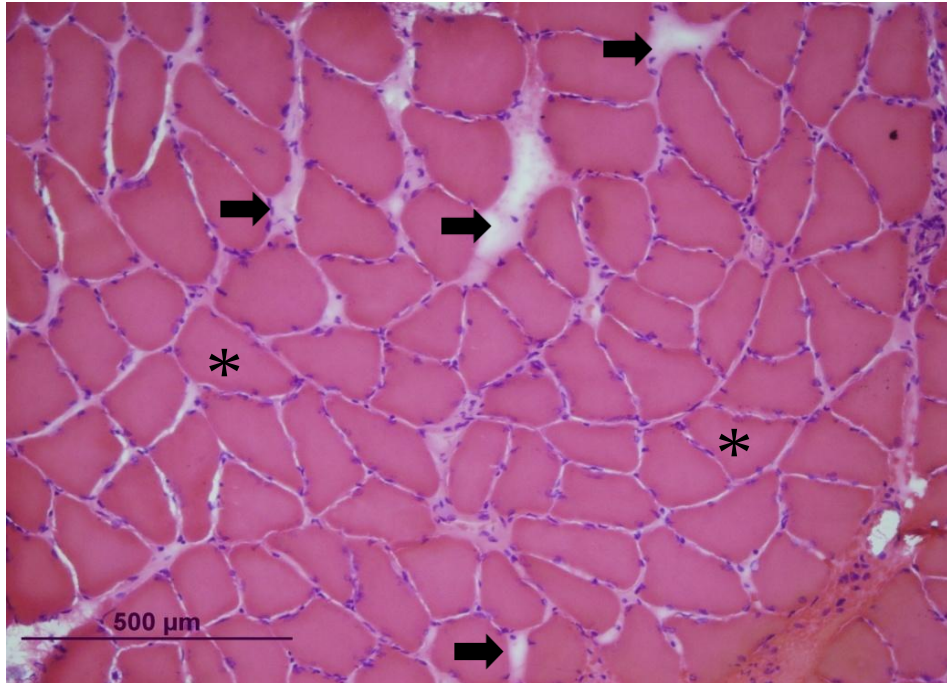


Figura 26 – Aspecto do músculo Tibial Cranial do GSP.

Podemos observar a presença das fibras musculares com núcleo periférico (*) e espaços de tecido conjuntivo entre as fibras musculares (➡).

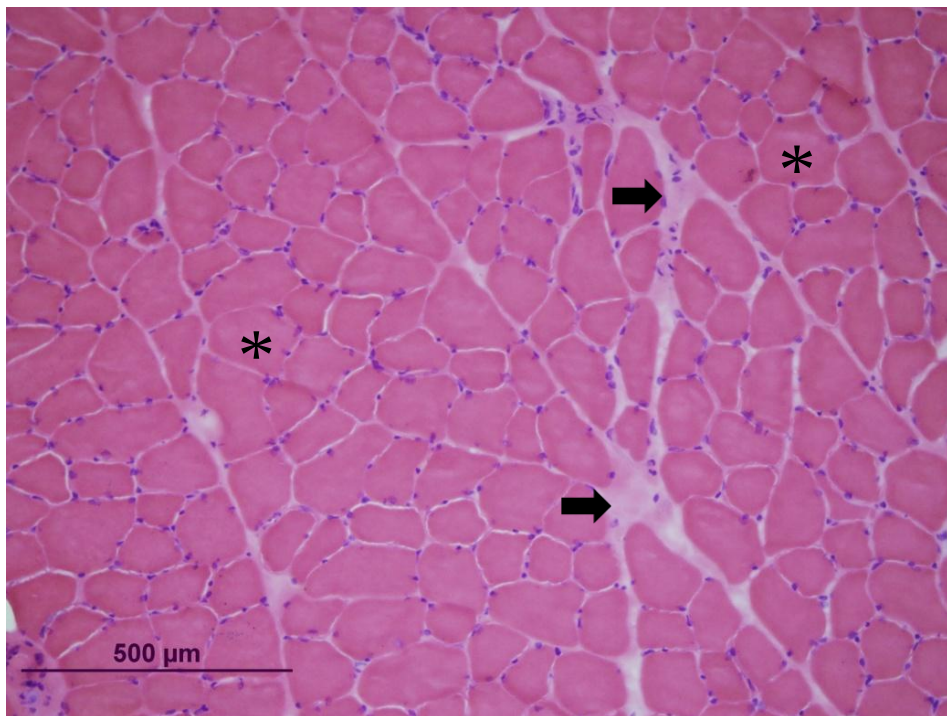


Figura 27 – Aspecto do músculo Tibial Cranial do GPRP.

Podemos observar a presença das fibras musculares com núcleo periférico (*) e espaços de tecido conjuntivo entre as fibras musculares (➡).

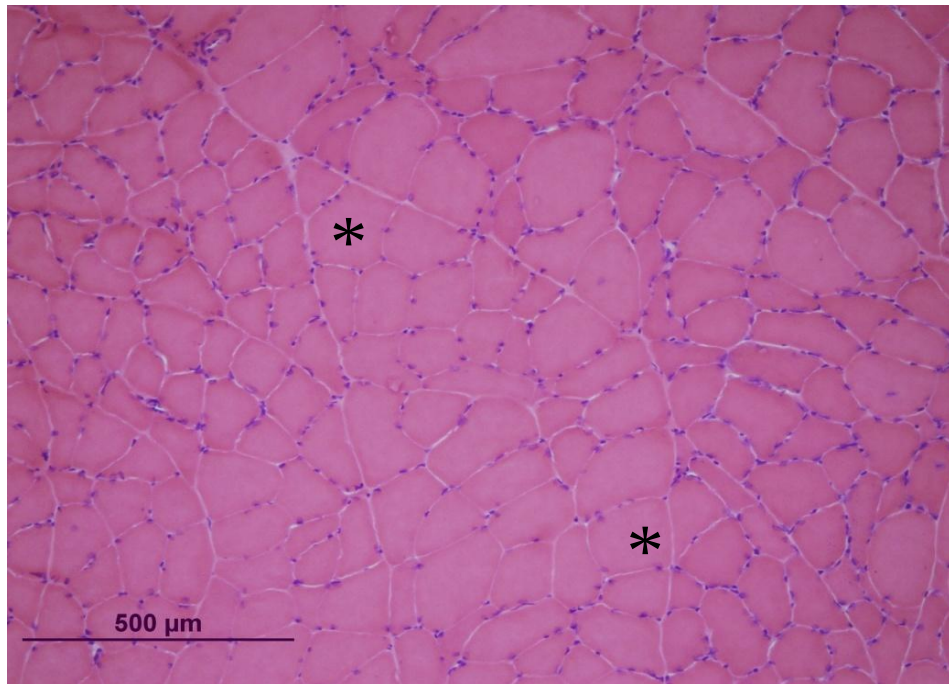


Figura 28 – Aspecto do músculo Tibial Cranial do GCT+PRP. Podemos observar a presença das fibras musculares com núcleo periférico (*) e ausência de espaços entre as fibras musculares.

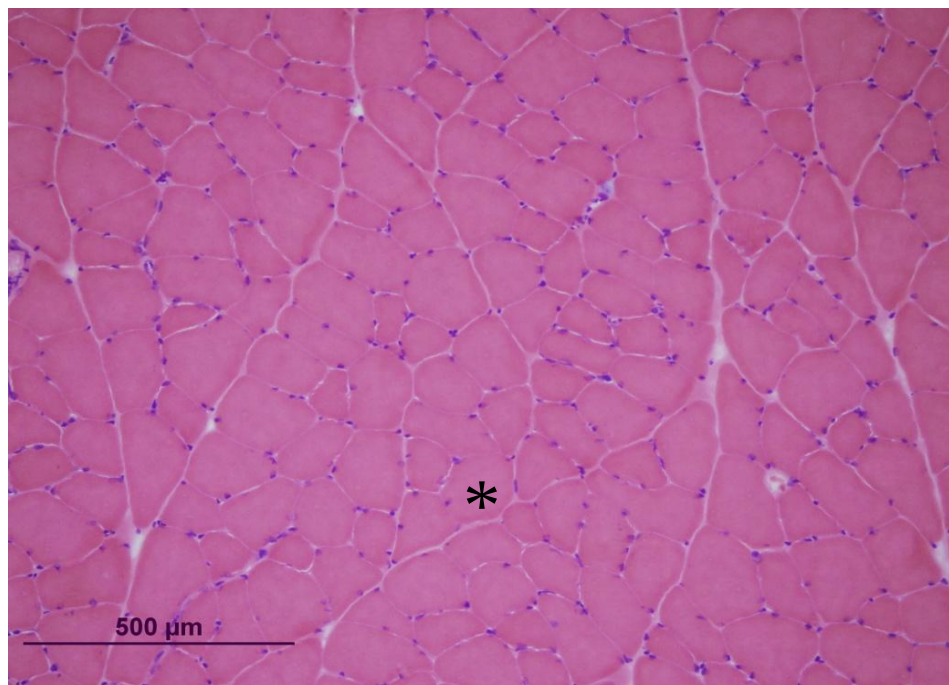


Figura 29 – Aspecto do músculo Tibial Cranial do GCI. Podemos observar a presença das fibras musculares com núcleo periférico (*) e ausência de espaços entre as fibras musculares.

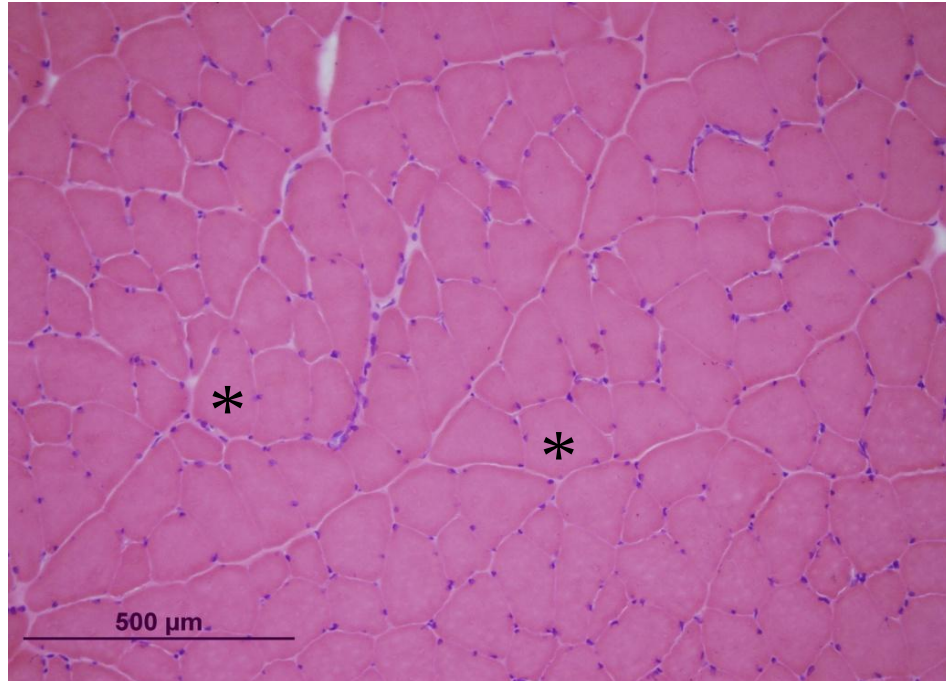


Figura 30 – Aspecto do músculo Tibial Cranial do GCF.

Podemos observar a presença das fibras musculares com núcleo periférico e com maior área (*).

4.6 Avaliação Inicial e Final da Massa dos Animais

As médias da massa inicial e final dos grupos não apresentaram diferença estatística, atingindo a média de 226,43 g (+/- 2,23) e 400,58 g (+/- 5,30) respectivamente. Os dados, mostrando a equivalência entre as massas iniciais e finais dos grupos estão apresentados na tabela 2 e nas figuras 31 e 32. O GCI não apresentou resultados final da massa, pois os animais foram eutanasiados no início do experimento.

Tabela 2 – Média (g) e desvio padrão da massa inicial e final dos grupos estudados e percentagem (%) de ganho de massa dos grupos.

Média das massas iniciais e finais de todos os animais utilizados no experimento e respectivo desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Massa Inicial		Massa Final		% Ganho de Massa
	Média	DP	Média	DP	
GCI	229,20 ^a	6,30	0,00 ^a	0,00	0,00
GSP	224,60 ^a	11,16	403,75 ^b	14,67	79,76
GPRP	225,00 ^a	7,99	394,50 ^b	11,40	75,33
GCT+PRP	223,80 ^a	10,24	402,65 ^b	16,15	79,92
GCF	228,00 ^a	8,12	406,50 ^b	14,57	78,29
GCD	228,00 ^a	9,82	395,50 ^b	24,85	73,46
GERAL	226,43	2,23	400,58	5,30	

Avaliando a massa inicial, GCI=GSP=GPRP=GCT+PRP=GCF=GCD. Avaliando a massa final, GSP=GPRP=GCT+PRP=GCF=GCD. Teste One-way ANOVA e Tukey.

$p < 0,05$

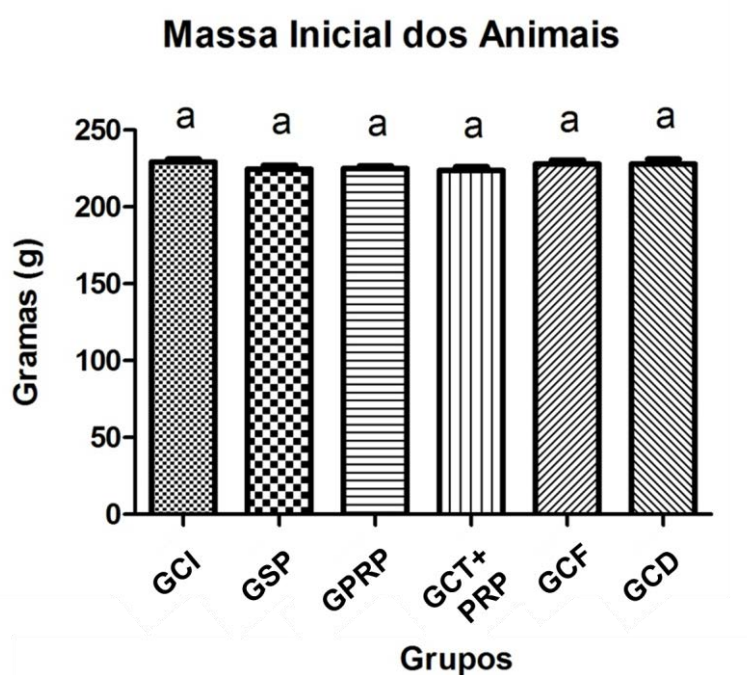


Figura 31 – Gráfico da média da massa (g) inicial dos grupos estudados. Letras diferentes indicam diferença estatística.

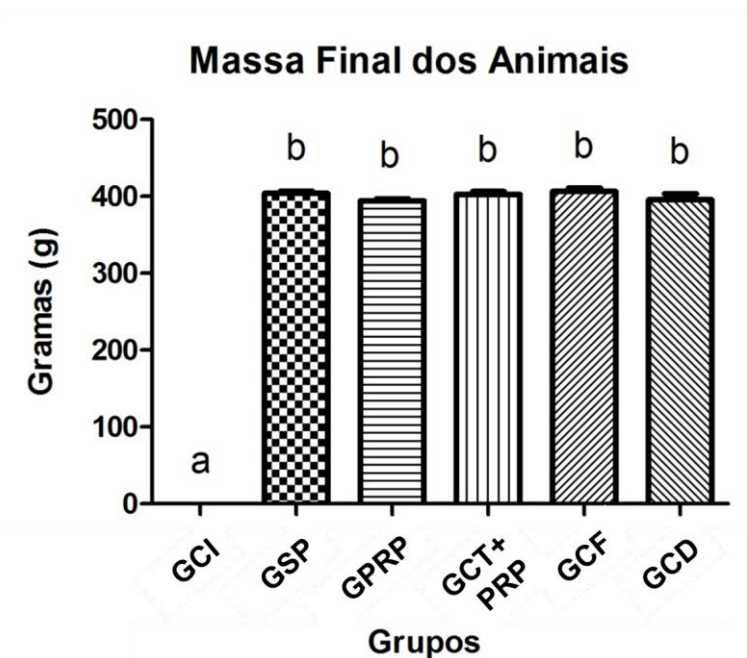


Figura 32 – Gráfico da média da massa (g) final dos grupos estudados. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.7 Avaliação da Massa do Músculo Tibial Cranial

Após decorrido o tempo determinado para a eutanásia dos animais, aferimos a massa dos músculos para verificar se os dados apresentavam variáveis significantes. Os Grupos GCT+PRP e GPRP não apresentaram diferença significante quando comparados com o GCF, atingindo as médias de 1,127 g, 1,052 g e 1,113 g respectivamente. Na sequência os grupos GSP e GCI apresentaram as médias de 0,669 g e 0,642 g sem diferença estatística respectivamente, e o GCD com 0,156 g, sendo o grupo que apresentou a menor massa muscular. Com finalidade de observar a diferença da massa do músculo TC direito quando comparado ao esquerdo, ambos os músculos foram aferidos as massas para que pudessemos verificar as diferenças entre eles. Quanto menor a diferença melhor o resultado, dessa forma, quando comparamos os Grupos Experimentais, o GCT+PRP e GPRP apresentaram os melhores resultados com 0,149 g e 0,216 g respectivamente, o GSP obteve o pior resultado atingindo 0,500 g. O GCT+PRP ainda apresentou resultado não significante quando comparado com o GCF, que obteve o valor de 0,038 g de diferença. Os dados da massa do músculo TC e da diferença da massa entre os músculos direito e esquerdo podem ser visualizados na tabela 3 e nas figuras 33 e 34.

Tabela 3 – Média (g) e desvio padrão da massa do músculo tibial cranial dos grupos estudados e diferença das massas dos músculos direito e esquerdo. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Massa M. TC Direito		Diferença da Massa do M. TC	
	Média	DP	Média	DP
GCI	0,642 ^a	0,067	0,001 ^a	0,019
GSP	0,669 ^a	0,040	0,500 ^b	0,137
GPRP	1,052 ^b	0,093	0,216 ^c	0,077
GCT+PRP	1,127 ^b	0,108	0,149 ^{cd}	0,084
GCF	1,113 ^b	0,165	0,038 ^{ad}	0,118
GCD	0,156 ^c	0,035	0,917 ^e	0,237

Avaliando a massa do m. TC direito, GCF=GCT+PRP=GPRP>GSP=GCI>GCD.

Avaliando a diferença da massa do m. TC, GCD>GCI=GCF, GCF=GCT+PRP, GCT+GPRP=GPRP>GSP. Teste One-way ANOVA e Tukey. $p<0,05$.

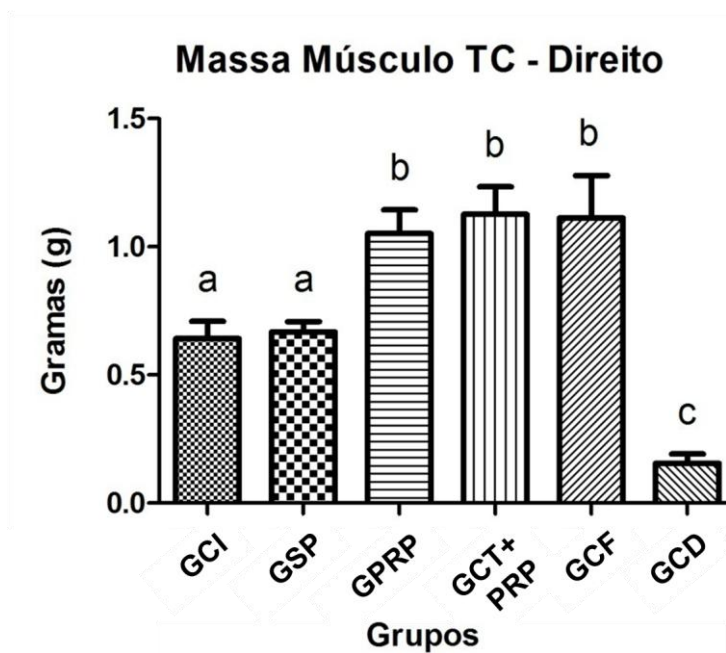


Figura 33 – Gráfico da média da massa (g) do músculo TC direito. Letras diferentes indicam diferença estatística.

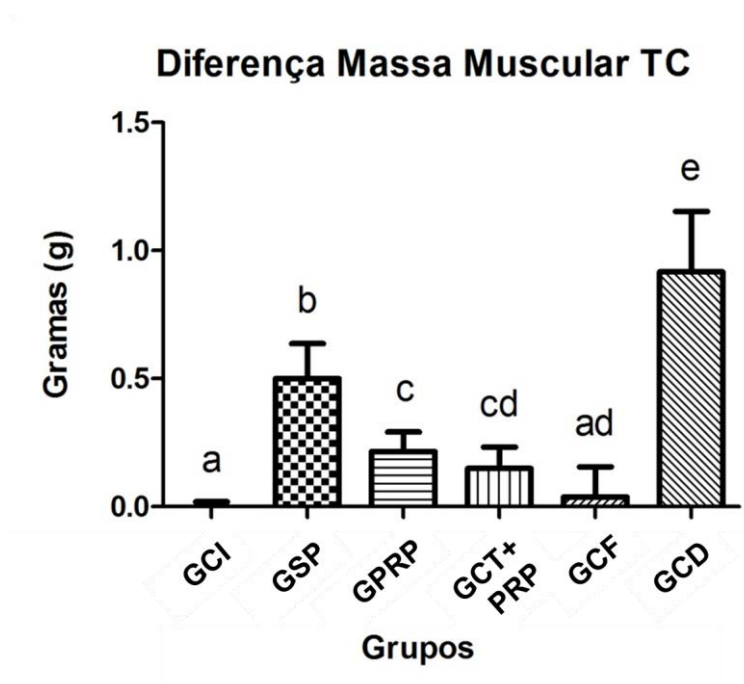


Figura 34 – Gráfico da média (g) da diferença de massa do músculo TC direito e esquerdo. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.8 Morfometria das Fibras Nervosas

Na morfometria das fibras nervosas foram analisadas duas variáveis, área da Fibra Nervosa e Diâmetro Mínimo da Fibra Nervosa. Quando avaliamos a área, observamos diferença significativa entre todos os grupos, sendo o GCT+PRP com melhor resultado, atingindo $47,56 \mu\text{m}^2$, valor próximo do GCF que atingiu $50,76 \mu\text{m}^2$. Na sequência encontramos o GPRP com $28,42 \mu\text{m}^2$, o GCI com $20,12 \mu\text{m}^2$ e o GSP com $14,47 \mu\text{m}^2$. O valor encontrado no GSP é menor do que o encontrado no GCI, que apresenta dados no início do experimento. Quando analisamos o Diâmetro das Fibras Nervosas observamos novamente que o GCT+PRP obteve o melhor resultado dos grupos experimentais, atingindo $6,96 \mu\text{m}$ de diâmetro, e foi o grupo que mais se aproximou do GCF que obteve $8,05 \mu\text{m}$. Na sequência é apresentado o GPRP com $5,02$, o GSP e GCI com $3,97 \mu\text{m}$ e $3,95 \mu\text{m}$ respectivamente. O GCD não apresentou resultados, pois as Fibras Nervosas se degeneraram por completo.

Os dados da área e diâmetro podem ser visualizados na tabela 4 e nas figuras 35 e 36.

Tabela 4 – Média (μm^2) e desvio padrão da área das fibras nervosas e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Área da Fibra Nervosa		Diâmetro da Fibra Nervosa	
	Média	DP	Média	DP
GCI	20,12 ^a	1,77	3,95 ^a	0,22
GSP	14,47 ^b	2,18	3,97 ^a	0,14
GPRP	28,42 ^c	1,82	5,02 ^b	0,20
GCT+PRP	47,56 ^d	3,52	6,96 ^c	0,21
GCF	50,76 ^e	3,27	8,05 ^d	0,45
GCD	0,00 ^f	0,00	0,00 ^e	0,00

Avaliando a área da fibra nervosa,
 GCF>GCT+GPRP>GPRP>GCI>GSP>GCD. Avaliando o diâmetro da fibra
 nervosa, GCF>GCT+PRP>GPRP>GSP=GCI>GCD.
 Teste One-way ANOVA e Tukey. $p<0,05$.

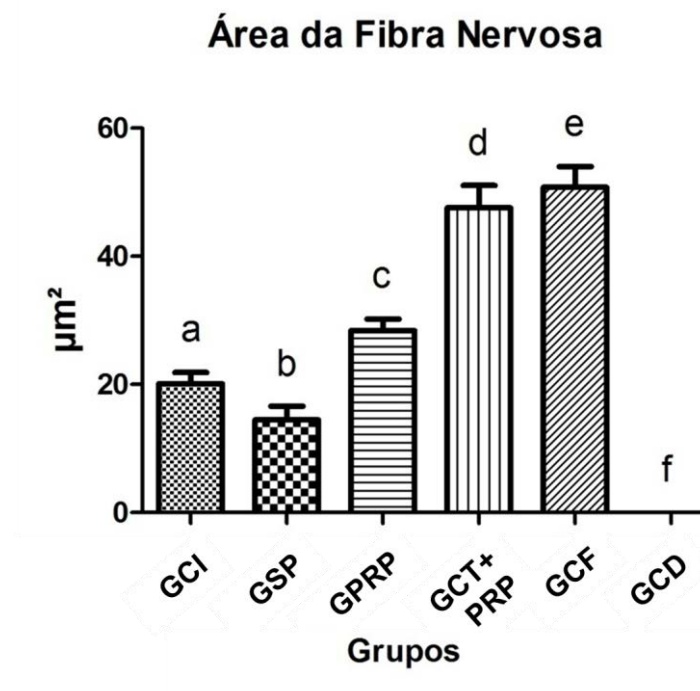


Figura 35 – Gráfico da média (μm²) da área das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

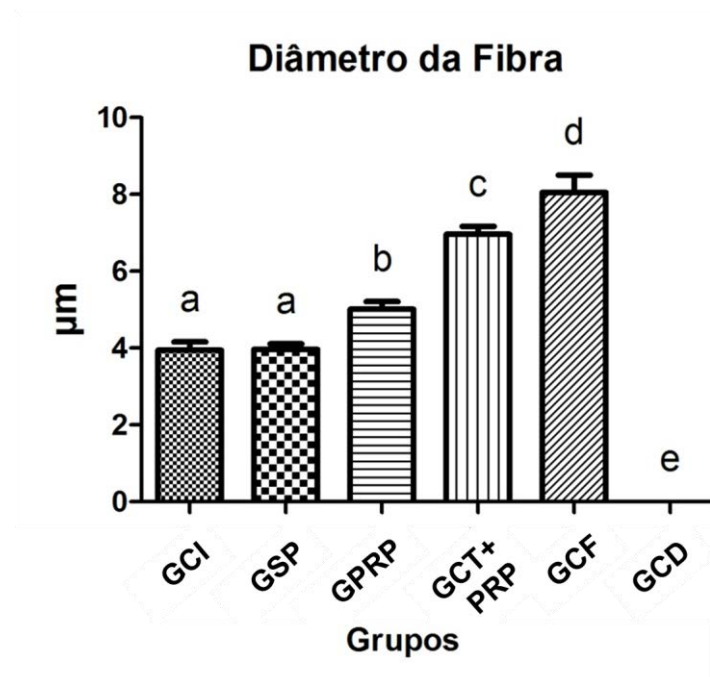


Figura 36 – Gráfico da Média (μm) do diâmetro das fibras nervosas. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.9 Morfometria dos Axônios

Com a morfometria dos axônios pudemos avaliar as variáveis de área e diâmetro. Quando avaliamos a Área, observamos que todos os grupos apresentaram diferença significativa, com exceção dos grupos GSP e GCI. Novamente o GCT+PRP obteve melhor resultado, atingindo a área de $12,46 \mu\text{m}^2$, aproximando do GCF que obteve a área de $15,06 \mu\text{m}^2$. Na sequência temos o GPRP com $8,17 \mu\text{m}^2$ e GSP e GCI com $6,75 \mu\text{m}^2$ e $7,05 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Na análise do Diâmetro do Axônio, obtivemos resultados semelhantes, com o GCT+PRP atingindo $3,36 \mu\text{m}$, aproximando do GCF com $4,37 \mu\text{m}$, seguido pelo GPRP com $2,86 \mu\text{m}^2$, GSP e GCI com $2,15 \mu\text{m}$ e $2,13 \mu\text{m}$ respectivamente. Os dados da Área e Diâmetro podem ser visualizados na tabela 5 e nas figuras 37 e 38.

Tabela 5 – Média (μm^2) e desvio padrão da área dos axônios e média (μm) e desvio padrão do diâmetro menor dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Área do Axônio		Diâmetro do Axônio	
	Média	DP	Média	DP
GCI	7,05 ^a	0,80	2,13 ^a	0,18
GSP	6,75 ^a	0,88	2,15 ^a	0,22
GPRP	8,17 ^b	0,65	2,86 ^b	0,31
GCT+PRP	12,46 ^c	0,67	3,36 ^c	0,32
GCF	15,06 ^d	1,24	4,37 ^d	0,56
GCD	0,00 ^e	0,00	0,00 ^e	0,00

Avaliando a área do axônio e o diâmetro do axônio, GCF>GCT+PRP>GPRP>GSP=GCI>GCD. Teste One-way ANOVA e Tukey. $p<0,05$.

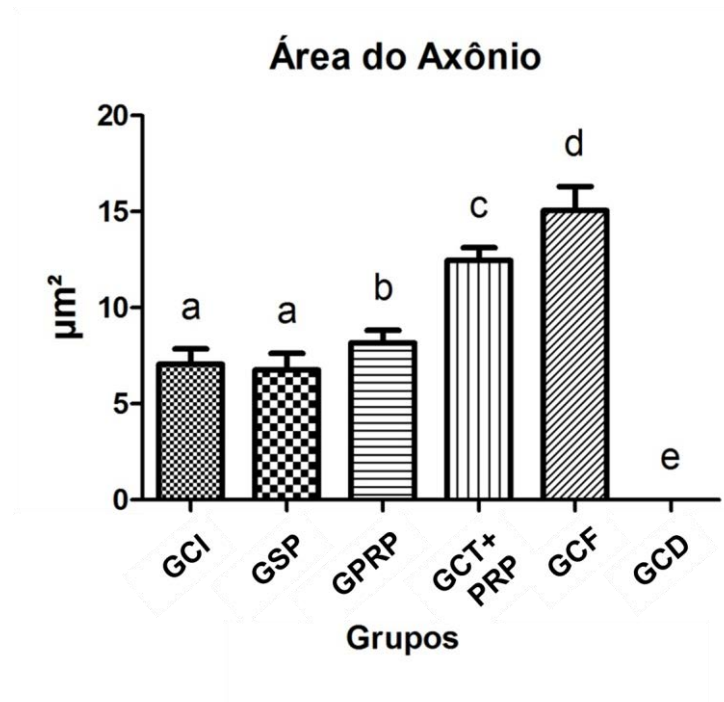


Figura 37 – Gráfico da média (μm²) das áreas dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

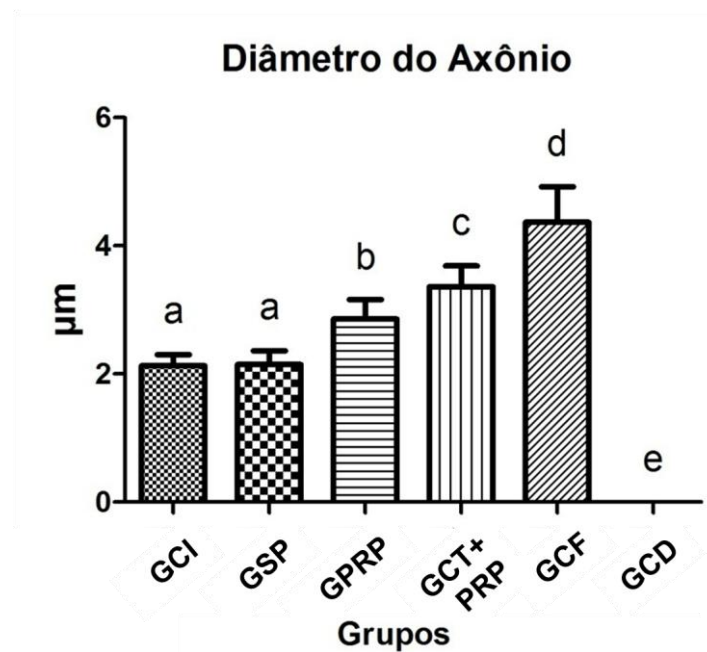


Figura 38 – Gráfico da média (μm) do diâmetro dos axônios. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.10 Morfometria da Bainha de Mielina

Com a morfometria da Bainha de Mielina pudemos observar os dados referentes à área e espessura da bainha. Quando avaliamos a Área observamos que o GCT+PRP não apresentou diferença significativa quando comparado com o GCF, atingindo os valores de 35,10 μm^2 e 35,70 μm^2 respectivamente. Os demais grupos apresentam os resultados de 20,25 μm^2 para o GPRP, 13,07 μm^2 para o GCI e 7,72 μm^2 para o GSP. Novamente o GSP apresentou resultado abaixo do GCI. Quando avaliamos a Espessura da bainha de mielina observamos que o GCT+PRP não apresentou diferença significativa ao GCF, atingindo os valores de 3,60 μm e 3,93 μm respectivamente. Na sequência é apresentado o GPRP, GSP e GCI que não obtiveram diferença significativa. O GCD não apresentou resultados, pois ocorreu a degeneração total das fibras nervosas. Os dados da área e espessura da bainha podem ser visualizados pela tabela 6 e pelas figuras 39 e 40.

Tabela 6 – Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das bainhas de mielina e média (μm) e desvio padrão das espessuras das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Área da Bainha de Mielina		Espessura da Bainha de Mielina	
	Média	DP	Média	DP
GCI	13,07 ^a	1,80	1,82 ^a	0,33
GSP	7,72 ^b	2,56	1,82 ^a	0,25
GPRP	20,25 ^c	1,74	2,16 ^a	0,37
GCT+PRP	35,10 ^d	3,66	3,60 ^b	0,45
GCF	35,70 ^d	3,93	3,68 ^b	0,82
GCD	0,00 ^e	0,00	0,00 ^c	0,00

Avaliando a área da bainha de mielina,

GCF=GCT+PRP>GPRP>GCI>GSP>GCD. Avaliando a espessura da bainha de mielina, GCF=GCT+PRP>GPRP=GSP=GCI>GCD. Teste One-way ANOVA e Tukey. $p<0,05$.

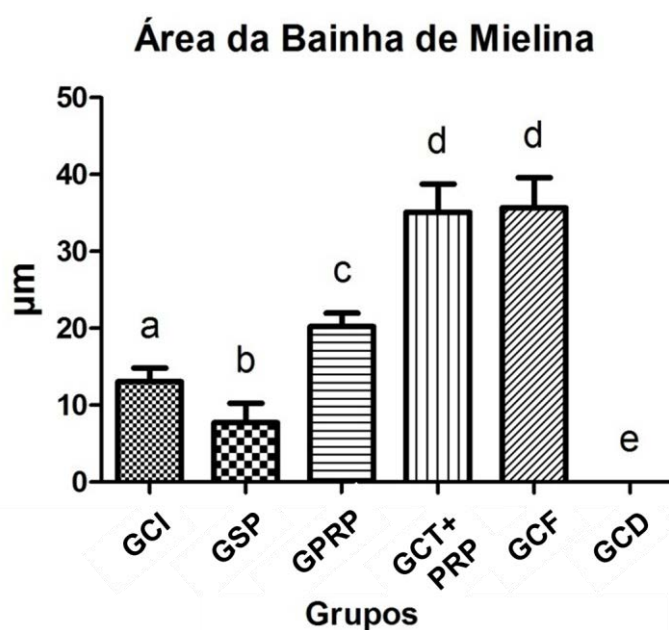


Figura 39 – Gráfico da média (μm^2) das áreas das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

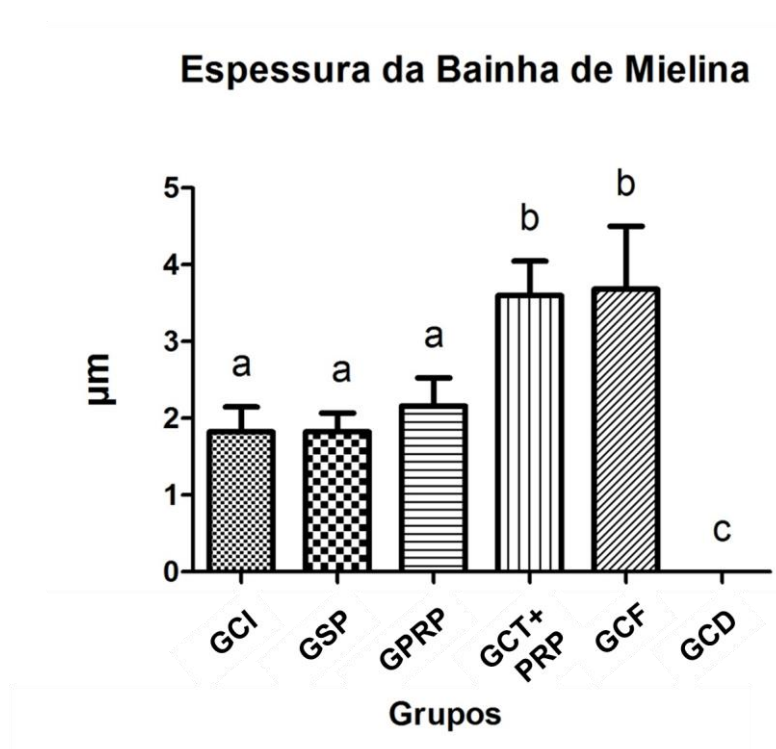


Figura 40 – Gráfico da média (μm) das espessuras das bainhas de mielina. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.11 Morfometria das Fibras Musculares

Quando analisamos os resultados da morfometria das fibras musculares podemos observar que todos os grupos apresentaram diferença significativa na área das fibras, sendo o GCF como base para comparação, atingindo $4.417,70 \mu\text{m}^2$. Analisando os grupos experimentais, podemos verificar que o GCT+PRP obteve o melhor valor, atingindo $3.939,80 \mu\text{m}^2$, seguido pelo GPRP com $3.242,90 \mu\text{m}^2$, GSP com $1.634,55 \mu\text{m}^2$. O GSP apresentou novamente valor abaixo do GCI, que obteve a média de $2.459,20 \mu\text{m}^2$. O GCD apresentou o valor mais baixo, atingindo a média de $193,00 \mu\text{m}^2$, pelo procedimento cirúrgico de desnervação que ocasionou em atrofia muscular. Os dados das áreas das fibras musculares podem ser visualizadas na tabela 7 e na figura 41.

Tabela 7 – Média (μm^2) e desvio padrão das áreas das fibras musculares do m. TC. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Morfometria das Fibras Musculares do M. TC		
	Média	DP
GCI	2459,20 ^a	167,37
GSP	1634,55 ^b	150,61
GPRP	3242,90 ^c	171,86
GCT+PRP	3939,80 ^d	211,91
GCF	4417,70 ^e	270,36
GCD	193,00 ^f	7,23

Avaliando a área das fibras musculares do m. TC,
GCF>GCT+PRP>GPRP>GCI>GSP>GCD.

Teste One-way ANOVA e Tukey. $p<0,05$.

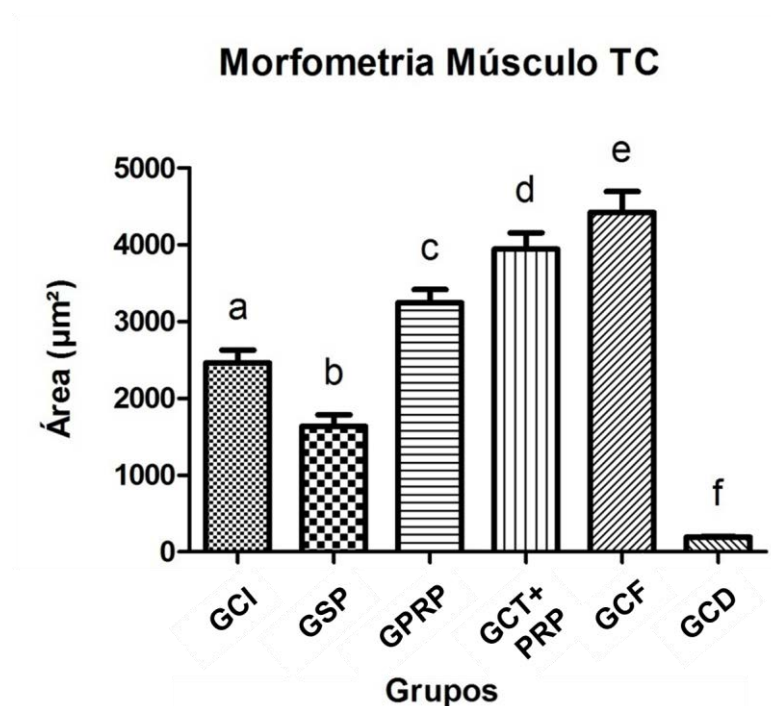


Figura 41 – Gráfico da média (μm^2) das áreas das fibras musculares do m. TC. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.12 Análise Eletrofisiológica

Quando avaliamos a amplitude observamos que todos os grupos experimentais apresentaram valores abaixo dos GCI e GCF. Entre os grupos experimentais, o GCT+PRP e GPRP não apresentaram diferença significativa, atingindo os valores de 17,30 mV e 15,90 mV respectivamente. O GSP obteve o pior índice, atingindo 13,20mV. O GCD não obteve valores, pois o nervo encontrava-se seccionado.

Na avaliação da latência observamos que os grupos GCT+PRP e GPRP não apresentaram diferença quando comparados com o GCF, apresentando os valores de 1,82 ms, 1,82 ms e 1,88 ms respectivamente. O GSP obteve a pior média dos Grupos experimentais com o valor médio de 1,37 ms, o resultado apresentado ainda foi menor quando comparado com o GCI que obteve a média de 1,74 ms. No GCD foi atribuído o valor de 10,00 ms, pois o músculo não apresentou resposta devido ao procedimento cirúrgico de desnervação, o valor atribuído tem finalidade apenas para análise estatística. Os valores das aferições eletrofisiológicas podem ser observados na tabela 8 e nas figuras 42 e 43.

Tabela 8 – Média (mV) e desvio padrão da amplitude captada pela análise eletrofisiológica e média (ms) e desvio padrão da latência captada pela análise eletrofisiológica.

Letras diferentes indicam diferença estatística.

	Amplitude		Latência	
	Média	DP	Média	DP
GCI	20,50 ^a	2,72	1,74 ^a	0,05
GSP	13,20 ^b	1,40	1,37 ^b	0,06
GPRP	15,90 ^c	1,20	1,82 ^c	0,03
GCT+PRP	17,30 ^c	0,82	1,82 ^c	0,07
GCF	20,60 ^a	2,07	1,88 ^c	0,05
GCD	0,00 ^d	0,00	10,00 ^d	0,00

Avaliando a amplitude, GCF=GCI>GCT+PRP=GPRP>GSP>GCD. Avaliando a latência, GCD>GCF=GCT+PRP=GPRP>GCI>GSP. Teste One-way ANOVA e Tukey. $p<0,05$.

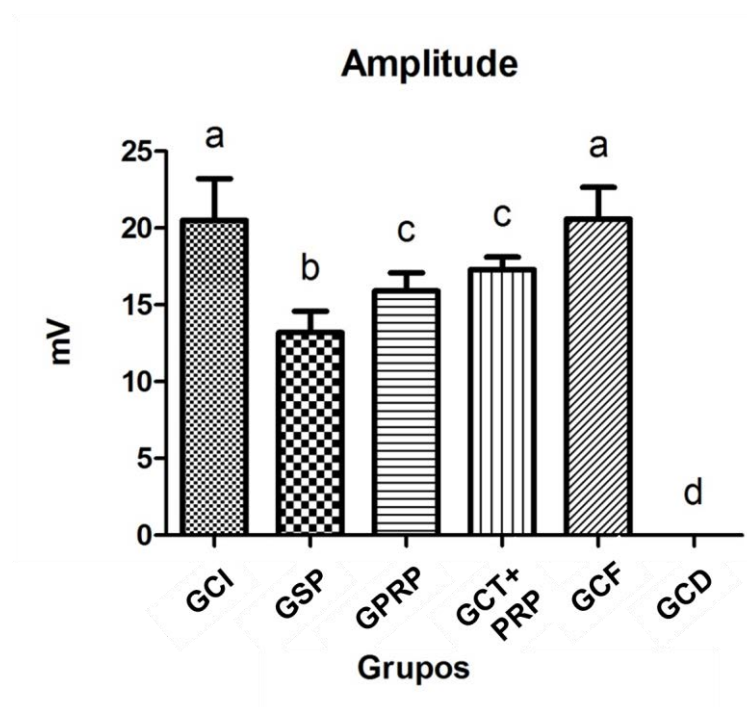


Figura 42 – Gráfico da média (mV) da amplitude. Letras diferentes indicam diferença estatística.

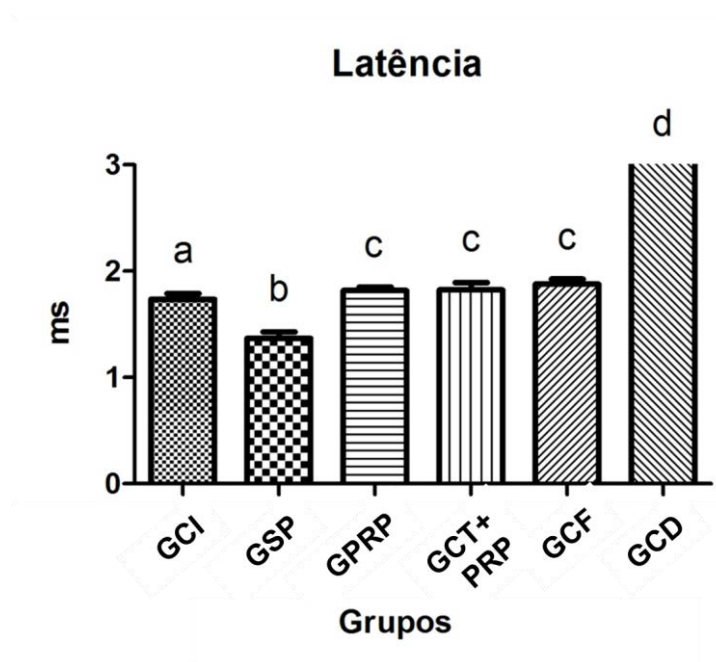


Figura 43 – Gráfico da média (ms) da latência. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.13 Teste da Marcha

Quando avaliamos funcionalmente os grupos estudados, podemos observar que os Grupos Controles GCI e GCF não apresentaram diferença significativa, pois não passaram por procedimento cirúrgico, atingindo os valores de -14,11 e -14,90 respectivamente. Quando avaliamos os grupos experimentais, observamos que o GCT+PRP obteve o melhor resultado com o valor de -39,32, na sequência temos o GPRP com -57,51 e o GSP com -72,81, todos os valores apresentam diferença significativa. O GCD obteve o pior resultado, atingindo o valor de -92,86. Os dados funcionais podem ser visualizados na tabela 9 e na figura 44.

Tabela 9 – Média e desvio padrão do teste de marcha
Letras diferentes indicam diferença estatística.

Análise Funcional		
	Média	DP
GCI	-14,11 ^a	1,78
GSP	-72,81 ^b	7,33
GPRP	-57,51 ^c	6,45
GCT+PRP	-39,32 ^d	4,12
GCF	-14,90 ^a	2,81
GCD	-92,86 ^e	7,83

Avaliando o teste de marcha, $GCD > GSP > GPRP > GCT+PRP > GCF = GCI$.

Teste One-way ANOVA e Tukey. $p < 0,05$.

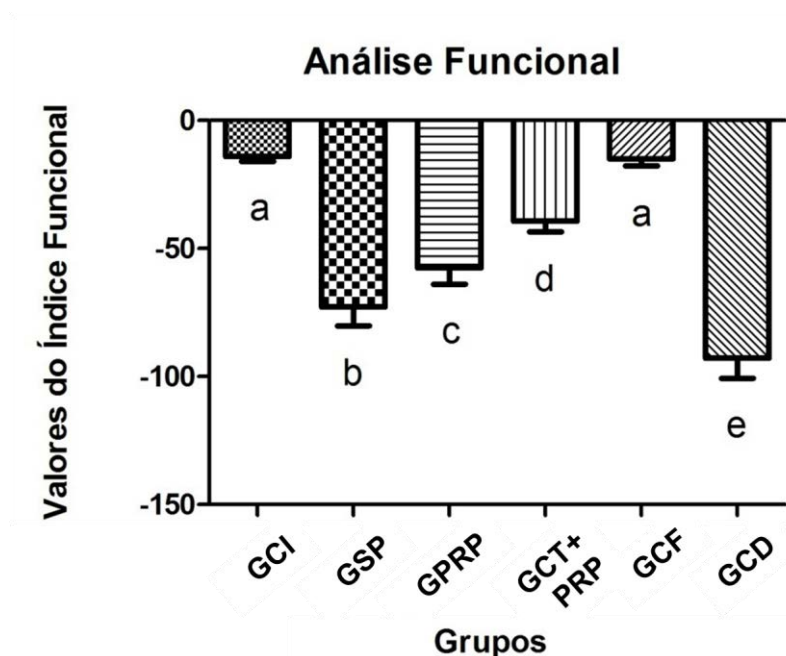


Figura 44 – Gráfico da média do teste de marcha.
Letras diferentes indicam diferença estatística.

5. Discussão

5.1 Método

No momento do delineamento do projeto, vários fatores foram abordados para que fosse possível obter resultados confiáveis. Todos os procedimentos realizados foram cuidadosamente pensados e padronizados, todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador. Os animais foram distribuídos de forma aleatória, por meio de sorteio nos grupos experimentais e controles. O PRP utilizado foi extraído das mesmas amostras de sangue. Os fios de sutura foram utilizados com a mesma numeração. A mesma ração foi oferecida aos animais do início ao término do experimento. O ciclo de luz mantido estável 12h claro e 12h escuro, com temperatura controlada. As amostras foram retiradas e processadas seguindo o protocolo do Laboratório de Urologia Experimental. A infraestrutura do laboratório e Biotério da Cirurgia Experimental, bem como a experiência prévia da realização de pesquisas na mesma linha da Tese, contribuíram para a obtenção de resultados confiáveis.

Para a realização do experimento foi utilizado o rato como modelo animal (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, pois são resistentes, permitem fácil manipulação, apresentam baixo custo de manutenção e têm sido modelos frequentemente utilizados em estudos envolvendo reparo e regeneração de lesões nervosas periféricas (CLOUTIER, et. al., 2013; KOWALSKA-LUDWICKA, et. al., 2013; JUNXIONG, et. al., 2013; ZHIYONG, et. al., 2013; SUMIYUKI, et. al., 2013; MERIANDA, et. al., 2013; GEORGIU, et. al., 2013; KUFFLER, et. al., 2013; NACHON, et.al., 2013; HUNDESHAGEN, et. al., 2013; SU, et. al., 2013; TAMAKI, et. al., 2013).

Os animais utilizados eram todos machos, adultos, jovens, pois estes não apresentam variáveis dos ritmos hormonais que ocorrem com frequência nas

fêmeas. A designação dos animais ao acaso foi possível, pois os mesmos eram da mesma espécie e apresentavam pesos similares (210 g a 235 g). Foram utilizados animais jovens, pois alguns estudos demonstram que com o avançar da idade os aspectos envolvidos no processo de reparo nervoso periférico são mais demorados, a velocidade de regeneração nervosa apresenta-se diminuída e ocorre uma diminuição dos fatores neurotróficos (ZOU, et. al., 2013; PELLEGRINO, et. al., 2013; MEDRANO, et. al., 2013; SAYGILI, et. al., 2012).

O tamanho da amostra foi definido em 20 animais para os grupos experimentais e grupo controle desnervado e 10 animais para os grupos controles inicial e final, para que tivéssemos uma margem de segurança caso alguma eventualidade pudesse comprometer o resultado final e pela variabilidade de resultados em regeneração nervosa periférica serem grandes e heterogêneas. Além disso, o número indicado tem permitido análise estatística consistente. O número de animais nos grupos experimentais e controle desnervado eram maiores, pois passaram por procedimentos cirúrgicos mais invasivos e eram os animais com maior possibilidade de variação, pois estavam em processo nervoso regenerativo ou degenerativo, além da maior possibilidade de evolução para óbito, no pós-operatório. Os grupos controles inicial e final permaneceram com número menor, pois a possibilidade de apresentar variações era menor, já que não passaram por procedimento cirúrgico. Não ocorreu óbito de nenhum animal no pós-operatório antes do período previsto.

A presença do Grupo Controle Inicial no trabalho possibilitou verificar o desenvolvimento normal do nervo e músculo estudado, essa observação é possível, pois podemos comparar os dados do grupo controle inicial com os dados do grupo controle final. Ainda podemos verificar se o estágio de recuperação dos animais dos grupos experimentais apresentaram evolução, pois podemos comparar os dados

dos grupos experimentais com o grupo inicial e verificar se os valores apresentados são superiores.

O período pós-operatório determinado para a eutanásia foi de 150 dias, pois alguns autores apresentam dados que a melhora morfofuncional atinge seu valor máximo por volta da 12ª semana (MOIMAS, et. al., 2013; LICHTENFELS, et. al., 2013; LI, et. al., 2013). Com o período de 150 dias de pós-operatório pudemos verificar diferenças significantes entre os grupos experimentais estudados. Acreditamos que as respostas funcionais e histomorfométricas já estão estabelecidas, portanto, podemos obter valores reais da resposta neuromuscular mediante a nova inervação.

A anestesia utilizada foi administrada por via intramuscular associando a ketamina com a xilasina (0,3 mL/Kg) por propiciarem adequada analgesia e sedação aos animais. Vários autores utilizam o mesmo produto, entretanto, podemos encontrar outras drogas e outras técnicas anestésicas (AKGUL, et. al., 2013; GEORGIU, et.al., 2013; KOWALSKA-LUDWICKA, et. al., 2013)

Optou-se pela lesão nervosa no nervo fibular comum do membro pélvico direito do animal e retirada da veia jugular do mesmo lado para realizar a técnica de tubulização. A escolha do antímero direito para realizar o procedimento cirúrgico foi devido a facilidade de acesso e desenvolvimento da cirurgia por parte do operador. Embora encontremos diferenças nos antímeros, não foram encontradas na literatura diferenças no processo regenerativo nervoso periférico entre os antímeros de ratos.

O nervo fibular comum foi selecionado, pois tem a função de inervar o músculo tibial cranial em sua totalidade, dessa forma podemos avaliar o processo regenerativo com mais fidelidade, pois não tivemos interferência de outros nervos na inervação do músculo alvo.

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de microscópio cirúrgico, pois garante maior precisão cirúrgica, menor movimentação e diminuição de possíveis traumas secundários. Outros autores realizam o procedimento de reparo com instrumental semelhante (TANG, et.al., 2013; JAMINET, et. al., 2013; KILIC, et.al., 2013; GÜRBÜZ, et.al., 2012).

Optou-se pela lesão classificada como neurotmese por ser esta o pior tipo de lesão, com necessidade de intervenção cirúrgica e maior dificuldade de reparo morfofuncional. Neste tipo de lesão é necessária a utilização de um tubo ou da técnica de tubulização para guiar os brotamentos axonais do coto proximal até o coto distal ou realizar a colocação de enxerto nervoso.

Na literatura foram observadas variáveis de 5 mm a 15 mm de distância entre os cotos. Optamos pela distância maior, ou seja, 15 mm por ser uma lesão mais extensa e de menor chance de regenerar espontaneamente (KONOFAOS, et. al., 2013; FÉLIX, et. al., 2013; ZHANG, et.al., 2013; PAPALIA, et.al., 2013; TOS, et. al., 2013; YANG, et. al., 2011).

É sabido que a tensão gerada no sítio da sutura do enxerto com o nervo é prejudicial a regeneração, pois o tecido cicatricial acaba obstruindo a passagem da nova inervação (FÉLIX, et.al., 2013; ZHAO et al., 1997; MILLESI, 1981). Neste trabalho foi utilizada a veia jugular de 20 mm de comprimento, os cotos proximal e distal foram suturados dentro do enxerto, determinando uma distância de 15 mm entre os mesmos. Retiramos apenas 5 mm do nervo para provocar a lesão, pois quando realizamos a secção do nervo, automaticamente ocorre retração dos cotos. Portanto, retirando um segmento de nervo menor diminuimos a possibilidade do enxerto permanecer tensionado no sítio da sutura.

Neste estudo, o espaço não poderia ser aumentado, pois existe a limitação imposta pelo tamanho da veia. Conseguimos retirar a veia com 20 mm de comprimento, possibilitando a sutura sem tração e garantindo o espaço de 15 mm entre os cotos. O espaço foi aferido com uso de um paquímetro digital. Em estudo piloto anterior, foi feita a tentativa de retirar a veia jugular dos dois antimeros, com finalidade de induzir um maior espaço entre os cotos, entretanto no pós cirúrgico o animal evoluiu para óbito.

A utilização da veia como enxerto se deve ao fato segundo a literatura consultada, apresentarem resultados superiores a materiais não biológicos (PAPALIA, et. al., 2013; TOS, et. al., 2012; TERZIS & KOSTA, 2007; BATTISTON et al., 2005; LEE et al., 2006; Geuna et al., 2007). Para a retirada da veia jugular externa do animal, foi utilizado um fio ortodôntico inoxidável de 0,06 mm de diâmetro dobrado, de modo que sua ponta ficasse “romba”. Alguns pesquisadores (Roque, 2007) e (Roque, 2008), utilizaram outra técnica para retirada da veia, por meio de instrumental odontológico. Nesse trabalho utilizamos o fio ortodôntico que possibilitou um melhor manuseio do enxerto. Foi utilizada a veia jugular externa pelo fácil acesso e manipulação, pelo seu calibre e pouca morbidade (MOHAMMADI, et. al., 2013; MATHIEU, et. al., 2012; ULKUR et al., 2003; KELLEHER et al., 2001).

Os resultados de enxertos de veias na literatura são insatisfatórios quando a veia utilizada não apresenta preenchimento. A justificativa apresentada pelos autores tem relação com o colapso da veia, impossibilitando ou dificultando o brotamento axonal dentro do tubo. Quando os enxertos de veia foram preenchidos, os resultados obtidos eram melhores (KONOFAOS, et. al., 2013; LICHTENFELS, et. al., 2013). Em nosso estudo apresentamos os mesmos resultados, já que o grupo experimental sem preenchimento apresentou os piores resultados.

A sutura foi realizada utilizando fio monofilamentar 10-0. Na literatura encontramos suturas realizadas com fios de diferentes espessuras, como o 11-0 utilizado por Caplan et al., (1993), e 12-0 utilizado por Schults et al., (2001). Acredita-se que o fio 10-0 atende as necessidades cirúrgicas e apresenta-se economicamente mais interessante que outros fios com espessuras menores.

O uso da técnica de tubulização possibilita a utilização de diversos materiais de preenchimento com fatores que estimulam o processo de reparo tecidual. Foi utilizado como preenchimento o PRP e as células-tronco associadas ao PRP. A utilização do PRP associado com as células-tronco se tornou viável, pois em testes realizados no laboratório de engenharia tecidual foi possível observar que as células-tronco mantiveram-se vivas neste meio.

O PRP foi utilizado por diversos pesquisadores como preenchimento em lesão nervosa periférica, entretanto as lesões utilizadas apresentavam espaço entre os cotos menores. Independente do espaço os resultados com o preenchimento de PRP mostraram-se promissores (ROQUE, 2008; ROQUE, 2007).

As amostras de PRP foram congeladas com intuito de promover a ruptura da membrana plaquetária e aumentar a concentração de fatores de crescimento.

As células-tronco se apresentam como uma promissora capacidade de reparo de tecidos. Foi possível encontrar na literatura diversos autores que desenvolvem pesquisas em reparo nervoso periférico com uso de células-tronco (SCHAACKXS, et. al., 2013; HU, et. al., 2013; NISHIMURA, et. al., 2013; SEKIGUCHI, et. al., 2013; GHOREISHIAN, et. al., 2013; CHENG, et. al., 2013).

Atualmente a técnica mais indicada para reparar uma lesão nervosa periférica é a utilização de enxerto autólogo. O enxerto autólogo provoca um déficit na área doadora, pois um segmento nervoso é retirado com finalidade de reparar outra

região. Com o uso de veia, esse déficit é menor, pois sua coleta não leva a um prejuízo muito grande no seu local de retirada, não é gerado um trauma em outro nervo, e pode ser encontrado em abundância. O organismo responde com maior facilidade ao processo de angiogênese quando comparado ao processo regenerativo de uma lesão nervosa periférica (CHUN, et. al., 2013; KULISZEWSKI, et. al., 2011).

A presença do grupo desnervado em nosso estudo possibilita verificar dois aspectos interessantes. O primeiro é a capacidade degenerativa do coto distal e da musculatura inervada por ele. O segundo é a possibilidade de utilizar esses valores para comparar com os grupos experimentais. Para garantir uma desnervação eficiente, tivemos o cuidado de utilizar a técnica de inverter em 180 ° o coto proximal e sutura-lo na musculatura adjacente e suturar o coto distal na tela subcutânea. Dessa forma pode ser garantida a ausência de reinervação espontânea conforme dados morfométricos apresentados pelo GCD em nível nervoso e muscular.

O processamento histológico foi padronizado para evitar diferenças de fixação, coloração e espessuras de corte. Para as análises de nervos utilizamos a variável de diâmetro mínimo, pois no momento do corte histológico não ocorre variação dos valores apresentados.

5.2 Observações Macroscópicas

Conforme apresentado nos resultados, todos os animais mantiveram a posição normal das patas, provavelmente pela lesão provocada apenas no nervo fibular comum. Entretanto os animais do GSP apresentavam os dedos mais fechados e a marcha prejudicada quando comparado aos animais do GPRP e GCT+PRP.

Outros pesquisadores evidenciam a ocorrência de autofagia realizada pelos animais quando utilizado o modelo de lesão de neurotmesa (GUO, et. al., 2013; ROSA-JUNIOR, 2010). Durante o período pós-cirúrgico, nenhum animal realizou a autofagia. Acredita-se que esse comportamento foi encontrado, pois trabalhamos com a secção apenas do nervo fibular comum. Outros autores que descrevem o comportamento de autofagia trabalharam com o Nervo isquiático e consequentemente promoveram a desnervação conjunta do nervo sural, responsável pela inervação sensitiva da região dorso lateral da pata do animal. Com a ausência de sensibilidade na região acabaram realizando a autofagia da pata do membro pélvico operado.

Observações macroscópicas durante a dissecação do nervo fibular comum para a realização da técnica de tubulização evocaram a atenção para a variação anatômica apresentada na trifurcação do nervo em questão. Alguns animais apresentaram o nervo fibular comum já isolado desde a sua origem no plexo sacral. Não foi encontrado na literatura outros pesquisadores evidenciando essa variação e acredita-se que a presença da variação anatômica não causa variável na técnica utilizada, uma vez que a cirurgia no nervo fibular comum ocorreu após a trifurcação do nervo isquiático.

No dia da eutanásia para coleta das amostras nervosas e musculares, foi observado que os animais dos grupos experimentais não apresentaram diferença na espessura do nervo fibular comum quando foi comparado ao controle final. Quando comparamos com o segmento distal do grupo desnervado, observamos diferença macroscópica, sendo o GCD apresentado com menor espessura. Não foi realizado aferições para realizar análise estatística na espessura do nervo, entretanto a

grande diferença pode ser observada sem o uso de microscópio cirúrgico ou lentes de aumento.

5.3 Observações Histológicas

Pode observar a presença de vasos sanguíneos na porção média do enxerto de veia. A distribuição dos vasos ocorreu na periferia e parte central em todos os grupos estudados. Sabendo que a presença de vasos sanguíneos é um fator importante para a regeneração de nervos periféricos, poderíamos ter realizado a contagem dos vasos em corte transversal e comparar os valores entre os grupos experimentais, assim poderíamos verificar se o preenchimento teve influência na quantidade de vasos neoformados.

O padrão de constituição das fibras nervosas no grupo controle inicial mostrou-se diferenciado ao grupo controle final. Em ambos os grupos foi apresentado um predomínio de fibras nervosas mielínicas, mas também foi encontrado fibras nervosas amielínicas. Quando comparamos os diâmetros das fibras, pudemos observar que o grupo GCI apresentou fibras mais heterogêneas e o GCF apresentou fibras maiores e mais homogêneas.

Em todos os grupos experimentais foram encontrados fibras nervosas no terço médio do enxerto, garantindo que ocorreu uma regeneração proveniente do coto proximal do nervo fibular comum seccionado. Os perineuros na região do enxerto nos grupos GSP e GPRP apresentavam-se mais irregulares quando comparado ao grupo GCT+PRP. Em todos os grupos foi apresentado um único fascículo na região do enxerto, provavelmente pela cirurgia ter sido realizada apenas no nervo fibular comum. Outros autores observaram a presença de mais fascículos na região do enxerto, entretanto o nervo estudado era o isquiático, que possui um

maior calibre e maior quantidade de fascículos no seu interior (ROQUE, 2007; ROQUE, 2008).

Ao analisarmos os diâmetros das fibras nervosas do terço médio dos enxertos dos grupos, podemos observar que o GSP apresenta fibras menores e mais heterogêneas quando comparado ao GPRP e GCT+PRP. Também pudemos observar a presença de espaços ocupados por tecido conjuntivo maiores entre as fibras nervosas no GSP.

Alguns autores utilizam a contagem do número absoluto de fibras nervosas como variável para avaliar a regeneração nervosa (COLOMÉ, et. al., 2008). Não foi realizada a contagem de número absoluto de fibras nervosas na porção média do enxerto. Após 150 dias da cirurgia, não observamos a presença da veia nos cortes transversais realizados nos nervos de todos os grupos experimentais. Na literatura não foi encontrado informações sobre a ausência do enxerto venoso no término do período pós-cirúrgico. Acreditamos que ocorreu uma reabsorção do enxerto venoso a medida que o crescimento nervoso acontecia.

5.4 Avaliação da Massa

A massa foi avaliada para que pudéssemos apresentar alguns dados que certificam o padrão de igualdade dos animais e utilizar os valores para comparações com os grupos experimentais e controles. Utilizamos duas variáveis, a massa dos animais e a massa do músculo tibial cranial.

5.4.1 Massa dos Animais

Pudemos observar que as médias das massas dos animais no momento inicial (pré-cirúrgico) foram iguais em todos os grupos, mostrando a homogeneidade

das amostras. Este detalhe é muito importante em estudos de regeneração de nervo periférico e de seu respectivo músculo, pois a massa dos músculos sofre influência com a massa dos animais.

Quando avaliamos a massa final, verificou-se novamente que todos os grupos apresentaram ganho de massa semelhantes. Esse atributo é importante, pois através dele podemos comprovar que o pós-operatório, assim como os procedimentos realizados nos diversos grupos não afetaram a massa dos animais e não prejudicaram seu desenvolvimento.

5.4.2 Massa do músculo Tibial

Utilizamos a massa do músculo tibial cranial direito, pois o mesmo estava no mesmo antímero do membro pélvico operado. Antes de iniciar o procedimento de coleta, observamos que poderiam ocorrer erros na análise estatística, pois um animal poderia ter adquirido maior massa muscular pelo fator genético.

Utilizamos os valores das diferenças das massas entre os músculos do mesmo animal, entretanto de antímeros diferentes. Para obtenção dos valores, subtraímos a massa do músculo tibial cranial esquerdo do músculo tibial cranial direito.

Os dados obtidos nas duas variáveis apresentam divergências de resultados. Se avaliarmos a massa do músculo tibial cranial direito, temos o resultado igual entre os grupos experimentais. Ao analisarmos a diferença entre as massas dos músculos tibial cranial, verificamos que os grupos experimentais apresentam valores diferentes. Acreditamos que a melhor variável para verificar a massa seja a diferença entre as massas dos músculos dos antímeros direito e esquerdo.

Não é apresentada na literatura a relação da diferença de massa entre os antímeros como variável estudada em pesquisas de reparo nervoso periférico. Acreditamos que a avaliação da diferença da massa complementa os resultados morfológicos e funcionais da pesquisa, e ainda é uma variável fácil de ser estudada.

5.5 Resultados Morfométricos

A discussão dos resultados morfométricos foi realizada com base nas médias obtidas dos cortes nervosos e musculares. Optamos por realizar a discussão por variáveis visando tornar a discussão mais didática.

O GCT+PRP obteve os melhores resultados morfométricos em todas as análises das variáveis morfométricas do nervo fibular comum e músculo tibial.

5.5.1 Fibra Nervosa

Para analisar a fibra nervosa utilizamos duas variáveis, a área da fibra nervosa e o diâmetro mínimo da fibra nervosa. Os dados foram obtidos através de aferição de 220 fibras nervosas de cada animal de forma aleatória.

Quando analisamos a área da fibra nervosa, observamos um crescimento de 152 % no decorrer do experimento, esse valor pode ser verificado, pois encontramos a média de 20,12 ($\pm 1,77$) μm^2 no GCI e a média de 50,76 ($\pm 3,27$) μm^2 no GCF. Entre os grupos experimentais, o GCT+PRP obteve a melhor média, atingindo 47,56 ($\pm 3,52$) μm^2 .

O diâmetro menor da fibra nervosa também apresentou crescimento, entretanto o valor alcançado foi menor quando comparado com a área da fibra nervosa, atingindo 103 %, sendo que o GCI atingiu a média de 3,95 ($\pm 0,22$) μm , e o GCF a média de 8,05 ($\pm 0,45$) μm . O GCT+PRP obteve a melhor média, atingindo

6,96 ($\pm 0,21$) μm . A diferença no crescimento da área e do diâmetro pode ser explicada pelas possíveis variações de angulação dos cortes histológicos, uma vez que nessas condições apenas o diâmetro mínimo permanece estável.

5.5.2 Axônios

Para analisar os axônios utilizamos duas variáveis, a área do axônio e o diâmetro mínimo do axônio. Os dados foram obtidos através de aferição de 220 fibras nervosas de cada animal.

Na análise da área do axônio, observamos um crescimento de 113 % no decorrer do experimento, sendo que o GCI atingiu a média de 7,05 ($\pm 0,80$) μm^2 e o GCF a média de 15,06 ($\pm 1,24$) μm^2 . O GCT+PRP obteve o melhor valor atingindo 12,46 ($\pm 0,67$) μm^2 . Todos os grupos experimentais atingiram a média acima do GCI, com exceção do GSP, que atingiu a média de 6,75 ($\pm 0,88$) μm^2 , sendo o único grupo com igualdade ao GCI.

No diâmetro menor observamos um crescimento de 105 % no decorrer do experimento, sendo que o GCI obteve a média de 2,13 ($\pm 0,18$) μm e o GCF a média de 4,37 ($\pm 0,56$) μm . O GCT+PRP obteve a média de 3,36 ($\pm 0,32$) μm , sendo a maior apresentada entre os grupos experimentais. Novamente todos os grupos experimentais atingiram a média acima do GCI, com exceção do GSP, que atingiu a média de 2,15 ($\pm 0,22$) μm^2 , sendo o único grupo com igualdade ao GCI.

5.5.3 Bainha de Mielina

Para analisar a bainha de mielina utilizamos duas variáveis, a área da bainha e a espessura da bainha. Os dados foram obtidos através de aferição de 220 fibras nervosas de cada animal.

Obtivemos os dados da área da bainha de mielina através dos valores de cada área da fibra nervosa subtraindo o valor da área do axônio. A espessura da bainha foi calculada através do diâmetro menor de cada fibra nervosa subtraindo o diâmetro menor do axônio.

Na análise da área da bainha de mielina, observamos um crescimento de 173 % no decorrer do experimento, sendo que o GCI atingiu a média de 13,07 ($\pm 1,80$) μm^2 e o GCF a média de 35,70 ($\pm 3,93$) μm^2 . O GCT+PRP obteve resultado estatisticamente semelhante ao GCF com a média de 35,10 ($\pm 3,66$). O Grupo GSP foi o único grupo experimental com média abaixo do GCI, atingindo 7,72 ($\pm 2,56$).

Na análise da espessura da bainha de mielina, observamos um crescimento de 102 % no decorrer do experimento, sendo que o GCI obteve a média de 1,82 ($\pm 0,33$) μm e o GCF a média de 3,68 ($\pm 0,82$) μm . Nesta variável novamente o GCT+PRP obteve o resultado estatisticamente semelhante ao GCF, atingindo a média de 3,60 ($\pm 0,45$). Todos os grupos experimentais atingiram a média acima do GCI, com exceção do GSP, que atingiu a média de 1,82 ($\pm 0,25$) μm^2 , sendo o único grupo com igualdade ao GCI.

5.5.4 Fibras Musculares

Para analisar as fibras musculares utilizamos a variável de área em corte transversal, aferindo 220 fibras musculares de cada animal.

Ao analisarmos a área, observamos um crescimento de 79 % no decorrer do experimento, sendo que o GCI atingiu a média de 2459,20 ($\pm 167,37$) μm^2 e o GCF a média de 4417,70 ($\pm 270,36$) μm^2 . O GCT+PRP obteve o melhor resultado entre os grupos experimentais com a média de 3939,80 ($\pm 211,91$) μm^2 . Todos os grupos

experimentais atingiram a média acima do GCI, com exceção do GSP, que atingiu a média de 1634,55 ($\pm 150,61$) μm^2 , sendo o único grupo abaixo do GCI.

5.6 Eletrofisiologia

Para realizar a análise da eletrofisiologia utilizamos a variável de amplitude e a variável de latência. A variável de amplitude representa o deslocamento que o impulso percorreu. A latência determina o tempo inicial do impulso até o momento de ser capturado na musculatura.

Avaliando a variável de amplitude observamos uma igualdade entre a média de 17,30 ($\pm 0,82$) mV do GCT+PRP e 15,90 ($\pm 1,20$) mV do GPRP. Na avaliação da latência a igualdade se repete, com a média de 1,82 ($\pm 0,07$) ms do GCT+PRP e 1,82 ($\pm 0,03$) do GPRP. De acordo com os dados apresentados, na avaliação eletrofisiológica os diferentes preenchimentos não apresentaram diferença significativa. Acreditamos que não foi apresentada diferença, pois a análise eletrofisiológica é um atributo pouco preciso para determinar diferença entre os grupos.

5.7 Teste da Marcha

Através da análise da marcha podemos avaliar os parâmetros finais, sendo, portanto, o teste mais completo para determinar a recuperação funcional dos animais. Para a avaliação funcional dos animais, utilizamos a técnica baseada nos estudos de De Medinaceli, (1982), que também foi utilizada por Brown (1989, 1991), De Medinacelli (1990) e Hare (1992). Atualmente novas técnicas são aplicadas e que garantem mais facilidade de tabulação dos dados, como o equipamento

denominado de *catwalk* utilizado em outros trabalhos (PARVATHY, et. al., 2013; DEUMENS, et. al., 2013; MIYAGI, et. al., 2011).

Durante a análise da marcha, foi possível verificar que os grupos não apresentaram alterações, entretanto ao ser utilizado o índice funcional do isquiático para verificar os valores reais da marcha, foi possível observar que o GCT+PRP obteve o melhor índice quando comparado aos outros grupos experimentais e os valores mais próximos ao grupo controle final.

A utilização das células-tronco associadas ao PRP demonstrou que foi o fator que influenciou diretamente na melhora funcional. O GCT+PRP foi superior ao GPRP. Rosa-Junior (2010), apresentou dados funcionais inferiores quando utilizou a técnica de tubulização com preenchimento de tecido adiposo no nervo isquiático, demonstrando novamente que as CTM foram determinantes para a melhora funcional.

5.8 Considerações Gerais

Embora não utilizado análises moleculares neste estudo, acreditamos que as mesmas poderiam ter trazido contribuições. Diversos autores utilizam como base a expressão de neurotrofinas (IKEDA et al., 2013; MANNI et al., 2013; MEDRANO et al., 2013; TANG et al., 2013; NIE et al., 2013; PELLEGRINO & HABECKER, 2013).

Este foi o primeiro trabalho realizado com cultura de células-tronco extraídas de tecido adiposo autólogo em preenchimento com 15 mm de distância entre os cotos com resultados satisfatórios. Papalia et. al., (2013) realizaram trabalho semelhante com tecido adiposo extraído de lipoaspiração em espaço de 10 mm no nervo mediano, entretanto não apresentaram resultados funcionais promissores.

Os resultados encontrados no presente trabalho apresentam perspectivas de recuperação nervosa. O tecido adiposo é de fácil obtenção e isento de reações antigênicas. A utilização das células-tronco do tecido adiposo apresentou um grande avanço na recuperação de nervos periféricos, pois mesmo utilizando a lesão mais grave (neurotmeze) com espaço de 15 mm entre os cotos obtivemos resultados superiores em todas as variáveis e ainda algumas variáveis apresentaram dados semelhantes ao GCF.

Trabalhos futuros podem buscar a associação das células-tronco com técnicas pós cirúrgicas como eletroterapia, laserterapia ou exercício físico na tentativa de potencializar a recuperação funcional do indivíduo.

6. Conclusão

Com o modelo experimental utilizado pudemos concluir que:

O GCT+PRP apresentou benefícios na regeneração do nervo fibular comum e do músculo tibial cranial, atingindo semelhança com o GCF nas variáveis de diferença da massa do músculo tibial cranial, área da bainha de mielina, espessura da bainha de mielina e latência, obteve semelhança com o GPRP nas variáveis de diferença da massa do músculo tibial cranial, amplitude e latência.

O GCT+PRP apresentou os melhores resultados funcionais quando comparados aos outros grupos experimentais, entretanto não atingiu os valores do GCF.

Os resultados morfológicos e funcionais apresentam divergências, portanto, se faz necessário a avaliação funcional nos grupos estudados.

Referências

AKGUL, T.; GULSOY, M.; GULCUR, H.O. Effects of early and delayed laser application on nerve regeneration. **Lasers Med Sci.**, 2013. In press.

ALLEN D.L; MONKE S.R.; TALMADGE R.J; ROY R.R ; EDGERTON V. R. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol.**, v.78, n.5, p.1969-1976, 1995.

ANZIL A.P; WERNIG A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. **J Neurocytol.**, v.18, n.6, p.833–845, 1989.

ARCHIBALD, S.J.; KRARUP, C.; SHEFNE, J.; LI, S.T.; MADISON, R.D. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. **J Comp Neurol.**, v.306, n.4, p.685-696, 1991.

ASHUR, H.; VILNER, Y.; FINSTERBUSH, A.; ROUSSO, M.; WEINBERG, H.; DEVOR, M. Extent of fiber regeneration after peripheral nerve repairs: silicone splint vs. Suture, gap repair vs. graft. **Exp Neurol.**, v.97, n.2, p.365-74, 1987.

BABCOCK, W.A. standard technique for operations on peripheral nerves with special reference to the closure of large gaps. **Surg Gynecol Obstet.**, v.45, p.364-78, 1927.

BADDOO, M.; HILL, K.; WILKINSON, R.; GAUPP, D.; HUGHES, C.; KOPEN, G.C.; PHINNEY, D.G. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **J Cell Bioch.**, v.89, n.6, p.1235-1249, 2003.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; FALK, R.E.; FALK, J.A.; HUNTER, D.A. The peripheral nerve allograft: a dose-response curve in the rat immunosuppressed with cyclosporin A. **Plast Reconstr Surg.**, v.82, n.3, p.447-455, 1988.

BAIN, J.R.; MACKINNON, S.E.; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg.**, v.83, n.1, p. 129, 1989.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. **Experim Hematol.**, v.28, n.6, p.707-715, 2000.

BARBASH, I.M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M.S.; ETZION, S.; TESSONE, A.; MILLER, L.; GUETTA, E.; ZIPORI, D.; KEDES, L.H.; KLONER, R.A.; LEOR, J. Systemic Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Myocardium: Feasibility, Cell Migration, and Body Distribution. **Circulation**, v.108, n.7, p.863-868, 2003.

BATISTA; TORRES, K.; ARAUJO, H. J. Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo periférico do membro superior. **Rev. Bras. Cir. Plast.**, v. 25, n. 4, p. 708-714, 2010.

BENTLEY, F.H.; HILL, M. Nerve grafting. **Br. J. Surg.**, v.24, p.368-387, 1936.

BENTLEY, F.H.; HILL, M. The possibilities of nerve grafting. **Br. Méd. Surg.**, v.14, n.2, p.352-353, 1940.

BENTO, R.F.; MINITI, A. Comparison between fibrin tissue adhesive, epineural suture and natural union in intratemporal facial nerve os cats. **Acta. Oto-Laryngol.**, v.465, p.5-36, 1989.

BODIAN, D. Repair of traumatic gaps in nerves. **JAMA**, v.121, p.662-664, 1943.

BOELONI; NEVES, J.; OCARINO, N. M.; GOES, A. M.; SERAKIDES, R. Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 62-70, 2013.

BORA, W. Peripheral nerve repair in cats: the fascicular stitch. **J. Bone. Joint. Surg.**, v.49, n.4, p.659-666, 1967.

BORA-JUNIOR, F.W. A comparison of epineural, perineural and epineural methods of nerve suture. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.133, p.91-94, 1978.

BORA-JUNIOR, F.W.; BEDNAR, J.M.; OSTERMAN, A.L.; BROWN, M.J.; SUMNER, A.J. Prosthetic nerve grafts: a resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. **J. Hand. Surg.**, v.12, n.5, p.685-692, 1987.

BORA-JUNIOR, F.W.; PLEASURE, D.E.; DIDIZIAN, N.A. A study of nerve regeneration and neuroma formation after nerve suture by various techniques. **J. Hand. Surg.**, v.1, n.2, p.138-143, 1976.

BOWDEN REM; GUTMANN E. Denervation and re-innervation of human voluntary muscle. **Brain Res.**, v.64, n.4, 1944.

BRÄNEMARK, P.I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B.O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v.3, n.2, p.81-100, 1969.

BRAUN, R.M. Comparative studies of neurorrhaphy and sutureless peripheral nerve repair. **Sur. Gynecol. Obst.**, v.36, n.1, p.15-18, 1966.

BROWN, C.J.; EVANS, P.J.; MACKINNON, S.E.; BAIN, J.R.; MAKINO, A.P.; HUNTER, D.A.; HARE, G. Inter and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. **Microsurgery**, v.12, n.2, p.76-79, 1991.

BROWN, C.J.; MACKINNON, S.E.; EVANS, P.J.; BAIN, J.R.; MAKINO, A.P.; HUNTER, D.A.; HARE, G.M. Self evaluation of walking track measurements using a sciatic function index. **Microsurgery**, v.10, n.3, p. 226-235, 1989.

BRUNELLI, G. Attuali orientamenti per la riparazione dei nervi della mano. **Riv. Chir. Mano.**, v.7, p.40, 1969.

BRUNELLI, G.; MONINI, L.; BRUNELLI, F. Problems in nerve lesions surgery. **Microsurgery**, v.6, n.4, p.187-198, 1985.

CAIOZZO V. J. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. **Muscle Nerve**, v.26, n.6, p.740-768, 2002.

CASTRO, H.M.; GAY, R.E.; RESNICK, G.; KAPOOR, N.; MEYERS, P.; CHIARIERI, D.; MCKENZIE, S.; BROXMEYER, H.E.; MOORE, M.A. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v.56, p.289-301, 1980.

CHENG, F. C.; SHEU, M. L.; SU, H.L.; CHEN, Y. J.; CHEN, C. J.; CHIU, W. T.; SHEEHAN, J.; PAN, H. C. The effect of exercise on mobilization of hematopoietic progenitor cells involved in the repair of sciatic nerve crush injury. **J. Neurosurg.**, Taiwan, v. 118, n. 3, p. 594-605, Mar. 2013.

CHIU, D.T.W.; JANECKA, I.P.; KRIZEK, T.J.; WOLFF, M.; LOVELACE, R.E. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. **Surg. Forum.**, v.31, n.2, p.550-551, 1980.

CHIU, D.T.W.; LOVELACE, R.E.; YU, L.T.; WOLFF, M.; STENGEL, S.; MIDDLETON, L.; JANECKA, I.P.; KRIZEK, T.J. Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study. **J. Reconstr. Microsur.**, v.4, n.4, p.303-309, 1980.

CHU, J.L.; O'BRIEN, R.; SONG, M.H.; WONDRASCH, B.F.; BERRY, S.E. Injection of vessel-derived stem cells prevents dilated cardiomyopathy and promotes angiogenesis and endogenous cardiac stem cell proliferation in mdx/utrn^{-/-} but not aged mdx mouse models for duchenne muscular dystrophy. **Stem Cells Transl. Med.**, v. 2, n. 1, p. 68-80, 2013.

CLOUTIER, F.C.; ROULEAU, D.M.; HÉBERT-DAVIES, J.; BEAUMONT, P.H.; BEAUMONT, E. Atorvastatin is beneficial for muscle reinnervation after complete sciatic nerve section in rats. **J. Plast. Surg. Hand. Surg.**, 2013. In press.

COLIN, W.; DONOFF, R.B. Nerve regeneration through collagen tubes. **J. Dent. Res.**, v.63, n.7, p.987-993, 1984.

COLOMÉ, L. M.; GOMES, C.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A. H.; LUGO, A. A.; GUIMARÃES, K. M.; FOERSTROW, L.P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D. L.; MEURER, L.; PASSOS, E. P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E. A.; LIMA, E. O. C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Cienc. Rural**, v. 38, n. 9, p. 2529-2534, 2008.

DANDY, WE. A method of restoring nerves requiring resection. **JAMA**, Chicago, v.122, n.1, p.35-36, 1943.

DANIEL, R.K.; TERZIS, J.K. **Reconstructive Microsurgery**, Boston: Little Brown, 1977.

DAVATZ, C.G.; ANDREO, J.C.; RODRIGUES, A.C.; ROSA-JÚNIOR, G.M. & MORAES, L.H.R. Apoptosis in denervated skeletal muscle. **Int. J. Morphol.**, v.25, n.3, p.529-536, 2007.

DE MEDINACELLI, L. Use of sciatic function index and walking track assessment. **Microsurgery**, v.11, n.2, p.191-192, 1990.

DE MEDINACELLI, L.; FREED, W.J.; WYATT, R.J. Na index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.**, v.77, n.3, p.634-43, 1982.

DE VITA, B.; CAMPOS, L. L.; LISTONI, A. J.; MAIA, L.; SUDANO, M.J.; CURCIO, B.R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PRESTES, N.C. Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 535-542, 2013.

DELLON, A.L.; MACKINNON, S.E. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.82, n.5, p.849-856, 1988.

DEUMENS, R.; VAN GORP, S.F.; BOZKURT, A.; BECKMANN, C.; FÜHRMANN, T.; MONTZKA, K.; TOLBA, R.; KOBAYASHI, E.; HESCHEL, I.; WEIS, J.; BROOK, G.A. Motor outcome and allodynia are largely unaffected by novel olfactory ensheathing cell grafts to repair low-thoracic lesion gaps in the adult rat spinal cord. **Behav. Brain. Res.**, v. 15, n. 237, p. 185-189, 2012.

DIETRICH, I. **Influência da composição de carreador biodegradável na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano**. 2004, 83f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DUCKER, T.B.; HAYES, G. Experimental improvements in the use of silastic cuff of peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, v.28, n.6, p.582-587, 1968.

ELSBERG, C.A. Technique of nerve suture and nerve grafting. **JAMA**, v.8, p.1422-1427, 1919.

ELY, J.B., CALTEUX, N. Envelope venoso. Contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. **Ver. Amrigs.**, v.27, n.4, p.447-453, 1983.

EPSTEIN, J.A. Neurography following experimental nerve suture and crush injury. **J. Neuropathol. Exp. Neur.**, v.8, n.4, p.419-427, 1949.

FANSA, H.; KEILHOFF, G.; WOLF, G.; SCHNEIDER, W. Tissue Engineering of Peripheral Nerves: A Comparison of Venous and Acellular Muscle Grafts with Cultured Schwann Cells. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.107, n.2, p.485-494, 2001.

FAWCETT J.W; KEYNES R.J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. **J. Neurosurg.**, v.65, n.3 354-463, 1986.

FÉLIX, S.P.; PEREIRA LOPES, F.R.; MARQUES, S.A.; MARTINEZ, A. M. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. **Microsurgery**, Rio de Janeiro, 2013. In press.

FERRARI F; RODRIGUES A.C.; MALVEZZI C.K.; SILVA M.D.P.; PADOVANI C.R. Inside-out vs. Standard Vein Graft to Repair a Sensory Nerve in Rats. **The Anatomical Record**, V.256, n.3, p.227-232, 1999.

FERREIRA, M.C.; ERHART, E.A.; MARCHESE, A.T. Microcirurgia de nervos periféricos. Nova técnica. **Ver. Paul. Méd.**, v.84, p.52-53, 1974.

FIELDS, R.D.; LE BEAU J.M.; LONGO F.M.; ELLISMAN M.H. Nerve regeneration through artificial tubular implants. **Progr. Neurobiol.**, v.33, n.2, p.87-134, 1989.

FREEMAN, B.S. Adhesive neural anastomosis. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.35, p.167-176, 1965.

FREITAS, V.A.; MESQUITA, R.M.; WERKEMA, F.S.; OLIVEIRA, J.B. de.; GUIMARÃES, C.C. Schwannoma do espaço parafaríngeo: Relato de caso. **Rev. Bras. Cir. cabeça pescoço**, v.40, n.1, p. 37-39, 2011.

FULLERTON, A. On the use of a sleeve of vein in nerve suture. **Br. Med. J.**, v.28, n.2852, p.320, 1915.

GARCÍA MEDRANO, B.; BARRIO SANZ, P.; SIMÓN PÉREZ, C.; LEÓN ANDRINO, A.; GARROSA GARCÍA, M.; MARTÍN FERRERO, M. A.; GAYOSO RODRÍGUEZ, M.J. Regeneration of critical injuries of the peripheral nerve with growth factors. **Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.**, v. 57, n. 3, p. 162-169, 2013.

GEORGIOU, M.; BUNTING, S.C.; DAVIES, H.A.; LOUGHLIN, A.J.; GOLDING, J.P.; PHILLIPS, J.B. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. **Biomaterials**, v. 34, n. 30, p.7335–7343, 2013.

GHOREISHIAN, M.; REZAEI, M.; BENI, B. H.; JAVANMARD, S. H.; ATTAR, B. M.; ZALZALI, H. Facial nerve repair with Gore-Tex tube and adipose-derived stem cells: an animal study in dogs. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 71, n. 3, p. 577-587, 2013.

GIBSON, K.L.; DANILOFF, J.K. Comparison of sciatic nerve regeneration through silicone tubes and nerve allografts. **Microsurgery**, v.10, n.2, p.126-129, 1989.

GIBSON, K.L.; REMSON, L.; SMITH, A.; SATTERLEE, N.; STRAIN, G.M.; DANILOFF, J.K. Comparison of nerve regeneraton through different types of neural prostheses. **Microsurgery**, v.12, n.2, p.80-85, 1991.

GRABB, W.C.; BEMENT, S.L.; KOEPKE, G.H.; GREEN, R.A. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.46, n.1, p.31-38, 1970.

GUDA C. M. H.; PIETER J. K. ; RICHARD P.D. Vein graft conduits versus conventional suturing in peripheral nerve reconstructions. **Microsurgery**, v.14, n.9, p.584-588, 1993.

GUO, J.; QIU, W.; SOH, S. L.; WEI, S.; RADDA, G. K.; ONG, W. Y.; PANG, Z.P. HAN, W. Motor neuron degeneration in a mouse model of seipinopathy. **Cell Death. Dis.**, v. 7, n. 4, 2013.

GÜRBÜZ, Y.; SÜGÜN, T.S.; ÖZAKSAR, K.; KAYALAR, M.; TOROS, T.; ADEMOĞLU, Y. Peroneal nerve injury surgical treatment results. **Acta Orthop. Traumatol. Turc.**, v. 46, n. 6, p. 438-442, 2012.

HAKSTIAN, R.W. Funicular orientation by direct stimulation. An aid to peripheral nerve repair. **J. Bone. Joint. Surg.**, v.50, p.1178-1186, 1968.

HAKSTIAN, R.W. Perineural neurorrhaphy. **Orthop. Clin. North. Am.**, v.4, n.4, p.945-956, 1973.

HARE, G.M.; EVANS, P.J.; MACKINNON, S.E.; BEST, T.J.; BAIN, J.R.; SZALAI, J.P.; HUNTER, D.A. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.89, n.2, p.251-258, 1992.

HEIM, M.; FRANK, O.; KAMPMANN, G.; SOCHOCKY, N.; PENNIMPEDE, T.; FUCHS, P.; HUNZIKER, W.; WEBER, P.; MARTIN, I.; BENDIK, I. The Phytoestrogen Genistein Enhances Osteogenesis and Represses Adipogenic Differentiation of Human Primary Bone Marrow Stromal Cells. **Endocrinology** v.145, n.2, p.848-859, 2004.

HENTZ, V.R.; ROSEN, J.M.; XIAO, S.J.; MCGILL, K.C.; ABRAHAM, G.A. comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. **J. Hand. Surg.**, v.16, n.2, p.251-261, 1991.

HEUBACH, J.F.; GRAF, E.M.; LEUTHEUSER, J.; BOCK, M.; BALANA, B.; ZAHANICH, I.; CHRIST, T.; BOXBERGER, S.; WETTWER, E.; RAVENS, U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. **J. Physiol.**, v.554, p.659-672, 2004.

HOLMES, W. Histological observations on the repair of nerves by autografts. **Brit. J. Surg.**, v.35, n.138, p.167-173, 1947.

HU, N.; WU, H.; XUE, C.; GONG, Y.; WU, J.; XIAO, Z.; YANG, Y.; DING, F.; GU, X. Long-term outcome of the repair of 50 mm long median nerve defects in rhesus monkeys with marrow mesenchymal stem cells-containing, chitosan-based tissue engineered nerve grafts. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 100-111, 2013.

HUDSON A. R.; HUNTER D. ; KLINE D. G.; BRATTON, B.R. Histological studies of experimental interfascicular graft repair. **J. Neurosurg.**, v.51, n.3, p.333-340, 1979.

HUNDESHAGEN, G.; SZAMEIT, K.; THIEME, H.; FINKENSIEPER, M.; ANGELOV, D. N.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; IRINTCHEV, A. Deficient functional recovery after facial nerve crush in rats is associated with restricted rearrangements of synaptic terminals in the facial nucleus. **Neuroscience**, v. 248, p. 307-318, 2013.

HYATT J. P.; ROY R.R.; BALDWIN K.M.; & EDGERTON V.R. Nerve activity independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.285, n.5, 2003.

IKEDA, M.; UEMURA, T.; TAKAMATSU, K.; OKADA, M. KAZUKI, K.; TABATA, Y. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, 2013. In press.

IRINTCHEV, A.; DRAGUHN, A.; WERNIG, A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. **Neuroscience**, v.39, n.1, p. 231- 243, 1990.

ISHIHARA, A.; ROY, R.R.; OHIRA, Y.; IBATA, Y.; EDGERTON, V.R. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. **J. Appl. Physiol.**, v.84, n.6, p.2183–2189, 1998.

ITO, T.; HIROTANI, H.; YAMAMOTO, K. Peripheral nerve repairs by the funicular suture technique. **Acta Orthop. Scand.**, v.47, n.3, p.283-289, 1976.

ITOH S.; SHINOMIYA K.; SAMEJIMA H.; OHTA T.; ISHIZUKI M.; ICHINOSE S. Experimental study on nerve regeneration through the basement Membrane tubes of the nerve, muscle, and artery. **Microsurgery**, v.17, n.10, p.525-534, 1996.

JAMINET, P.; KÖHLER, D.; RAHMANIAN-SCHWARZ, A.; LOTTER, O.; MAGER, A.; FORNARO, M.; RONCHI, G.; GEUNA, S.; ROSENBERGER, P.; SCHALLER, H.E. Expression patterns and functional evaluation of the UNC5b receptor during the early phase of peripheral nerve regeneration using the mouse median nerve model. **Microsurgery**, v. 33, n.3, p. 216-22, 2013.

KILIC, A.; OJO, B.; RAJFER, R.A.; KONOPKA, G.; HAGG, D.; JANG, E.; AKELINA, Y.; MAO, J.J.; ROSENWASSER, M.P.; TANG, P. Effect of white adipose tissue flap and insulin-like growth factor-1 on nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v. 33, n. 5, p. 367-375, 2013.

KINGHAM, P.J.; BIRCHALL, M.A.; BURT, R.; JONES, A.; TERENCEHI, G. Reinnervation of laryngeal muscles: a study of changes in myosin heavy chain expression. **Muscle Nerve**, v.32, n.6, p.761–766, 2005.

KLEINERT, H.E.; GRIFFIN, J.M. Technique of nerve anastomosis. **Orthop. Clin. North. Am.**, v.4, p.907-915, 1973.

KLINE, D.G.; HAYES, G.J. Na experimental evaluation of the effect of a plastic adhesive, methyl 2-cyanoacrilate, on neural tissue. **J. Neurosurg.**, v.20, p.647-654, 1963.

KLINE, D.G.; HAYES, G.J. The use of a resorbable wrapper for peripheral nerve repair. Experimental studies in chimpanzees. **J. Neurosurg.**, v.21, p.737-750, 1964.

KONOFAOS, P.; VER HALEN, J.P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 29, n.3, p. 149-164, 2013.

KOWALSKA-LUDWICKA, K.; CALA, J.; GROBELSKI, B.; SYGUT, D.; JESIONEK-KUPNICKA, D.; KOLODZIEJCZYK, M.; BIELECKI, S.; PASIEKA, Z. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. **Arch. Med. Sci.**, v. 9, n.3, p. 527-534, 2013.

KUFFLER, D.P. Platelet-Rich Plasma and the Elimination of Neuropathic Pain. **Mol. Neurobiol.**, San Juan, 2013. In press.

KULISZEWSKI, M.A.; KOBULNIK, J.; LINDNER, J.R.; STEWART, D.J.; LEONG-POI, H. Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle. **Mol. Ther.**, v.19, n.5, p.895-902, 2013.

LANDER, A.D.; FUJII, D.K.; REICHARDT, L.F. Laminin is associated with the "neurite outgrowth-promoting factors" found in conditioned media. **Proc. Natl. Sci.**, v.82, n.7, p.2183-2187, 1985.

LANDESBER, G.; TAKEUCHI, E.; PUZAS, J.E. Cellular, biochemical and molecular characterization of the bovine temporomandibular joint disc. **Arch. Oral. Biol.**, v.41, n.8-9, p.761-767, 1996.

LE BEAU, J.M.; ELLISMAN, M.H.; POWELL, H.C. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. **J. Neurocytol.**, v.17, n.2, p.161-172, 1988.

LEE, J.; ELKAHLOUN, A.G.; MESSINA, S.A.; FERRARI, N.; XI, D.; SMITH, C.L.; COOPER, R JR.; ALBERT, P.S.; FINE, H.A. Cellular and Genetic Characterization of Human Adult Bone Marrow-Derived Neural Stem-Like Cells: A Potential Antiglioma Cellular Vector. **Cancer Res.**, v.63, n.24, p.8877-8889, 2003.

LERICHE, R. Dès causes d'échec des sutures nerveuses. **Presse. Med.**, v.48, p.345-348, 1940.

LI, Y.; ZHANG, Y.; HAN, W.; HU, F.; QIAN, Y.; CHEN, Q. TRO19622 promotes myelin repair in a rat model of demyelination. **Int. J. Neurosci.**, 2013. In press.

LICHTENFELS, M.; COLOMÉ, L.; SEBBEN, A. D.; BRAGA-SILVA, J. Effect of platelet rich plasma and platelet rich fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. **Microsurgery**, v. 33, n. 5, p. 383-390, 2013.

LINHAGENS celulares do sistema nervoso. **www.icb.ufmg.br**, c2013. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupoc/Gd2Grupo3.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

LU, D.X.; HUANG, S.K.; CARLSON, B.M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. **Anat. Rec.**, v.248, n.3, p.355–365, 1997.

LUNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; HANSSON, H.A.; JOHANNESSEN, A.; LONGO, F.M.; VARON, S. Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. **J. Hand. Surg.**, v.7, n.6, p.580-587, 1982.

LUNDBORG, G.; LONGO, F.; VARON, S. Nerve regeneration model and neuronotrophic factors in vivo. **Brain Res.**, v.232, n.1, p.157-161, 1982.

LUNDBORG, G.; ZHAO, Q.; KANGE, M.; DANIELSEN, N.; KERNS, J.M. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerves by end-to-side anastomosis? **J. Hand. Surg.**, v.19B, n.3, p.277-82, 1994.

MA, J.; LIU, J.; WANG, Q.; YU, H.; CHEN, Y.; XIANG, L. The beneficial effect of ginsenoside rg1 on schwann cells subjected to hydrogen peroxide induced oxidative injury. **Int. J. Biol. Sci.**, v.9, n.6, p. 624-636, 2013.

MACKINNON, S.E.; HUDSON, A.R.; FALK, R.E.; FALK, R.E.; HUNTER, D.A. The nerve allograft response –an experimental model in the rat. **Ann. Plast. Surg.**, v.14, n.4, p.334-339, 1985.

MADISON, R.; SILVA, C.F. da; DIKKES, P.; CHIU, T.H.; SIDMAN, R.L. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioabsorbable nerve guides and laminin containing gel. **Exp. Neurol.**, v.88, n.3, p.767-772, 1985.

MAGILL, C. K.; TONG, A.; KAWAMURA, D.; HAYASHI, A.; HUNTER, A.P.; MACKINNON, S.E.; MYCKATYN, T. M. Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: A confocal microscopic study in transgenic mice. **J. Exp. Neurol.**, v.207, n.1, p.64-74, 2007.

MANNI, L.; ROCCO, M.L.; BIANCHI, P.; SOLIGO, M.; GUARAGNA, M.; BARBARO, S.P.; ALOE, L. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. **Growth Factors**, 2013. In press.

MARAGH, H.; MEYER, B.S.; DAVENPORT, D.; GOULD, J.D.; TERZIS, J.K. Morphofunctional evaluation of fibrin glue versus microsuture nerve repairs. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.6, n.4, p.331-377, 1990.

MARMOR, L. Regeneration of peripheral-nerve defects by irradiated homografts. **Lancet**, v.1, p.1191-1192, 1963.

MATHIEU, L.; ADAM, C.; LEGAGNEUX, J.; BRUNEVAL, P.; MASMEJEAN, E. Reduction of neural scarring after peripheral nerve suture: an experimental study about collagen membrane and autologous vein wrapping. **Chir. Main.**, v. 31, n. 6, p.311-317, Dec. 2013.

MATSON, D.D.; ALEXANDER, E.; WEISS, P. Experiments on the bridging of gaps in severed peripheral nerves of monkeys. **J. Neurosurg.**, v.5, p.230-48, 1948.

MATTAR, JR.R.; AZZE, R.J.; FERREIRA, M.C. Fibrin glue versus conventional epineural suture for peripheral nerve repair: a comparative experimental study. **Res. Soc. Brás. Cir. Plast.**, v.5, p.34-43, 1990.

MCCOMAS A.J. **Skeletal muscle: form and function**. United States of America: Human Kinetics, 2006. 424p.

MCGEACHIE J.K. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. **Cell Tissue Res.**, v.257, n.2, p.455-457, 1989.

McQUARRIE, I.G. Peripheral nerve surgery. **Neurol. Clin.**, v.3, p.453-466, 1985.

MEDRANO B.G.; SANZ P.B.; PÉREZ C.S.; ANDRINO A.L.; GARCÍA M. G.; FERRERO M.A.M.; RODRÍGUEZ M.J.G. Regeneración de las lesiones críticas del nervio periférico con factores de crecimiento. Estudio experimental. **Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.**, v.57, n.3, p.162---169, 2013.

MERIANDA, T.; TWISS, J. Peripheral nerve axons contain machinery for co-translational secretion of axonally-generated proteins. **Neurosci. Bull.**, 2013. In press.

MERLE, M.; MIDGLEY, R.; WOODHOUSE, F. Silicone sheathing technique for anastomosis of nerves and tendon. **Can. Medic. Assoc. J.**, v. 98, p.550-551, 1968.

MIDGLEY, R.; WOODHOUSE, F. Silastic sheathing technique for the anastomoses of nerves and tendon: a preliminary report.. **Can. Med. Assoc. J.**, v.98, n. 11, p.550-551, 1969.

MII, S.; UEHARA, F.; YANO, S.; TRAN, B.; MIWA, S.; HIROSHIMA, Y.; AMOH, Y.; KATSUOKA, K.; HOFFMAN, R. M. Nestin-Expressing Stem Cells Promote Nerve Growth in Long-Term 3-Dimensional Gelfoam®-Supported Histoculture. **PLoS. One**, v.8, n.6, 2013.

MILLES, H. Reappraisal of nerve repair. **Surg. Clin. North. Am.**, v.61, n.2, p.321-340, 1981.

MILLES, H. The nerve gap. Theory and clinical practice. **Hand. Clin.**, v.2, n.4, p.651-663, 1986.

MILLES, H.; MEISSEL, G.; BERGER, A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. **J. Bone. Joint. Surg.**, v.54, n.4, p.727-750, 1972.

MITEVA, K.; VAN LINTHOUT, S.; VOLK, H.D.; TSCHÖPE, C. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells revisited in the context of inflammatory cardiomyopathy. **Stem Cells Int.**, 2013. In press.

MIYAGI, M.; ISHIKAWA, T.; KAMODA, H.; ORITA, S.; KUNIYOSHI, K.; OCHIAI, N.; KISHIDA, S.; NAKAMURA, J.; EGUCHI, Y.; ARAI, G.; SUZUKI, M.; AOKI, Y.; TOYONE, T.; TAKAHASHI, K.; INOUE, G.; OHTORI, S. Assessment of gait in a rat model of myofascial inflammation using the Cat Walk system. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 36, n. 21, p. 1760-1764, 2011.

MOHAMMADI, R.; AMINI, K.; ESKAFIAN, H. Betamethasone-enhanced vein graft conduit accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve gap. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 71, n. 4, p. 786-792, 2013.

MOIMAS, S.; NOVATI, F.; RONCHI, G.; ZACCHIGNA, S.; FREGNAN, F.; ZENTILIN, L.; PAPA, G.; GIACCA, M.; GEUNA, S.; PERROTEAU, I.; ARNEŽ, Z. M.; RAIMONDO, S. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. **Gene Ther.**, 2013. In press.

MOLANDER, H.; OLSSON, Y.; ENKVIST, O.; BOWALD, S.; ERIKSSON, I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. **Muscle Nerve**, v.5, n. 1, p.54-57, 1982.

MÜLLER, D.C.M.; PIPPI, N.L.; BASSO, P.C.; TEIXEIRA, L.V.; SPRADA, A. G.; GRAÇA, D. L.; LOPES, S. T. A. Fração total de células mononucleares intra-articular em cães submetidos à reconstrução do ligamento cruzado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 309-316, 2013.

MÜLLER, H.; SHIBIB, K.; FRIEDRICH, H.; MODRACK M. Evoked muscle action potentials from regenerated rat tibial and peroneal nerves: synthetic versus autologous interfascicular grafts. **Exp. Neurol.**, v.95, n.1, p.21-33, 1987.

MURRAY M.A; ROBBINS N. Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells. **Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 1823–1833, 1982.

NACHON, F.; BRAZZOLOTTO, X.; TROVASLET, M.; MASSON, P. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. **Chem. Biol. Interact.**, 2013. In press.

NAFFZIGER, H.C. Methods to secure end-to-end suture of peripheral nerves. **Sug. Gynecol. Obstetr.**, v.32, n. p.193-204, 1921.

NARAKAS, A. Les greffes nerveuses, expérience clinique. **Ann. Chir. Main.**, v.8, p.302-311, 1989.

NIE, X.; DENG, M.; YANG, M.; LIU, L.; ZHANG, Y.; WEN, X. Axonal Regeneration and Remyelination Evaluation of Chitosan/Gelatin-Based Nerve Guide Combined with Transforming GrowthFactor-b1 and Schwann Cells. **Cell Biochem. Biophys.**, 2013. In press.

NISHIMURA, S.; YASUDA, A.; IWAI, H.; TAKANO, M.; KOBAYASHI, Y.; NORI, S.; TSUJI, O.; FUJIYOSHI, K.; EBISE, H.; TOYAMA, Y.; OKANO, H.; NAKAMURA, M. Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neuralstem cell transplantation for spinal cord injury. **Mol. Brain.**, v. 6, n. 3, 2013.

NOAH, E.M.; WILLIAMS, A.; JORGENSON, C.; SKOULIS, T.G.; TERZIS, J.K. End-to-side neurorrhaphy: a histologic and morphometric study of axonal sproutin into na and-to-side nerve graft. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.13, n.2, p.99-105, 1997.

OLMSTED-DAVIS, E.A.; GUGALA, Z.; CAMARGO,F.; GANNON, FH.; JACKSON, K.; KIENSTRA, K.A.; SHINE, H.D.; LINDSEY, R.W.; HIRSCHI, K.K.; GOODELL, M.A.; BRENNER, M.K.; DAVIS, A.R. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.100, n.26, p.15877-15882, 2003.

PAPALIA, I.; RAIMONDO, S.; RONCHI, G.; MAGAUDDA, L.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G.; GEUNA, S. Repairing nerve gaps by vein conduits filled with lipoaspirate-derived entire adipose tissue hinders nerve regeneration. **Ann. Anat.**, v. 195, n. 3, p. 225-230, 2013.

PAPALIA, I.; RAIMONDO, S.; RONCHI, G.; MAGAUDDA, L.; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G.; GEUNA, S. Repairing nerve gaps by vein conduits filled with lipoaspirate-derived entire adipose tissue hinders nerveregeneration. **Ann. Anat.**, v. 195, n. 3, p. 225-230, 2013.

PARVATHY, S.S.; MASOCHA, W. Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the Cat Walk system. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v.8, n. 14, p. 14, 2013.

PELLEGRINO, C.; FRANZINI, C. An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibres. **F. Cell. Biol.**, v. 17, n. 2, p. 327-349, 1963.

PELLEGRINO, M.J.; HABECKER, B.A. STAT3 integrates cytokine and neurotrophin signals to promote sympathetic axon regeneration. **Mol. Cell. Neurosci.**, 2013. In press.

PHAM, H.N.; PADILLA, J.A.; NGUYEN, K.D.; ROSEN, J.M. Comparison of nerve repair techniques: suture vs. avitene-polyglycolic acid tube. **J. Reconstr. Microsurg.**, v.7, n.1, p.31-36, 1991.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v.284, n. 5411, p.143-147, 1999.

POLITIS, M.J. Specificity in mammalian peripheral nerve regeneration at the level of the nerve trunk. **Brain Res.**, v.328, n. 2 p.271-276, 1985.

QATTAN, M.M.; AL THUNIAN, A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. **Br. J. Plast. Surg.**, v.51, n. 3, p.238-41, 1998.

RENDE, M.; GRANATO, A.; LO MONACO, M.; ZELANO, G.; TOESCA, A. Accuracy of reinnervation by peripheral nerve axons regenerating across a 10-mm gap within a impermeable chamber. **Exp. Neurol.**, v.111, n. 3, p.32-339, 1991.

RODRIGUES, A.C.; ANDREO, J.C.; ROSA-JUNIOR, G.M.; SANTOS, N.B.; MORAES, L.H.R.; LAURIS, J.R.P. Fat cell invasion in long-term denervated skeletal muscle. **Microsurgery**, v.27, p. 664-667, 2007.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. **Stem. Cells.**, v.21, n. 1, p.375-387, 1990.

ROQUE, D.D. **Enxerto venoso ao avesso e normal com ou sem preenchimento de músculo , em regeneração nervosa de ratos**. 2008. 130f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.

ROQUE, J.S. **Enxerto venoso ao avesso e normal, preenchidos com plasma rico em plaquetas em nervo misto de rato**. 2007. 139f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2007.

ROSA-JUNIOR, G.M. **Enxerto venoso preenchido com gordura no reparo de nervos periféricos. Uma nova proposta**. 2010. 115f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2010.

ROSEN, J.M, PADILLA, J.A, NGUYEN, K.D, PADILLA, M.A, SABELMAN, E.E, PHAM, H.N. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. **Ann. Plast. Surg.**, v.25, n.5, p.375-387, 1990.

ROSS, A.; MATSUDA, H.; ZUKER, R.M. End-to-side nerve coaptation for muscle reinnervation. **Plast. Reconstr. Aesthetic. Surg.**, v.2, p.104-5, 1995.

ROSSER, B.W.; DEAN, M.S.; BANDMAN, E. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. **Int. J. Dev. Biol.**, v.46, n.5, p.747-754, 2002.

ROULEAU, M.; CREPEAU, J.; TETREAULT, L.; LAMARCHE, J. Facial nerve sutures: epineural versus perineural sutures. **J. Otolaryngol.**, v.10, n.5, p.338-342, 1981.

ROY, R.R.; MEADOWS, I.D.; BALDWIN, K.M.; EDGERTON, V.R. Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. **J. Appl. Physiol.**, v.52, n.2, p.473–478, 1982.

SAFFORD, K.M.; SAFFORD, S.D.; GIMBLE, J.M.; SHETTY, A.K.; RICE, H.E. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adult adipose-derived stromal cells. **Exper. Neurol.**, v.187, n.2, p.319-28, 2004.

SANTOS ROSA, D.; CASTRO CAPUZZO, R. de.; TEBCHERANI, A.J.; ELIAS, K.M.; LEDO KANDA, J.; PINTO, F. R. Schwannoma de palato duro - relato de caso / Hard palate schwannoma - case report. **Rev. Bras. Cir. Cab. Pesc.**, Brasil, v. 42, n. 1, 2013.

SAYGILI, E.; KLUTTIG, R.; RANA, O. R.; SAYGILI, E.; GEMEIN, C.; ZINK, M. D.; RACKAUSKAS, G.; WEIS, J.; SCHWINGER, R. H.; MARX, N.; SCHAUERTE, P. Age-related regional differences in cardiac nerve growth factor expression. **Age (Dordr)**, v.34, n.3, p. 659-667, 2012.

SCARAVILLI, F. Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in a nerve encased in a plastic tube. **J. Anat.**, v.139, p.411-424, 1984.

SCHAAKXS, D.; KALBERMATTEN, D.F.; RAFFOUL, W.; WIBERG, M.; KINGHAM, P.J. Regenerative cell injection in denervated muscle reduces atrophy and enhances recovery following nerve repair. **Muscle Nerve**, v.47, n.5, p.691-701, 2013.

SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle Nerve**, v.23, n.4, p.617-626, 2000.

SEBBEN, A. D.; LICHTENFELS, M.; SILVA, J. L. B.da. Regeneração de nervos periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. **Rev. Bras. Ortop.**, Brasil, v. 46, n. 6, p. 643-649. 2011.

SECKEL, B.R.; CHIU, T.H.; NYILAS, E.; et al. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.74, p.173-81, 1984.

SEDDON, H.J. Nerve grafting. **J. Bone Joint. Surg.**, v.45, p.447-461, 1963.

SEDDON, H.J. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. **Brit. J. Surg.**, v.35, p.151-167, 1947a.

SEDDON, H.J. Three types of nerve injury. **Brain.**, v.66, p.237-288, 1947b.

SEKIGUCHI, H.; LI, M.; JUJO, K.; THORNE, T.; ITO, A.; KLYACHKO, E.; HAMADA, H.; KESSLER, J. A.; TABATA, Y.; KAWANA, M.; ASAH, M.; HAGIWARA, N.; LOSORDO, D. W. Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve. **Angiogenesis**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 45-58, 2013.

SNOW M. H. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. **Anat. Rec.** v. 207, p. 593–604, 1983.

SOARES, M.B.P.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; et al. Transplanted Bone Marrow Cells Repair Heart Tissue and Reduce Myocarditis in Chronic Chagasic Mice. **Am. J. Pathol.**, v.164, p.441-447, 2004.

SPEIGEL, I.J. Full autogenous nerve graft. **J. Neurosurg.**, v.6, p.421-422, 1949.

SU, H.; YUAN, Q.; QIN, D.; YANG, X.; WONG, W. M.; SO, K. F.; WU, W. Ventral root re-implantation is better than peripheral nerve transplantation for motoneuron survival and regeneration after spinal root avulsion injury. **BMC Surg.**, v. 13, n. 1, p. 21-34, 2013.

SUNDERLAND S.; RAY L. J. Denervation changes in mammalian striated muscles. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, v. 13, p. 159–177, 1950.

SUNDERLAND, S.; RAY, L.J. The selection and use of autografts for bridging gaps in injured nerves. **Brain.**, v.70, p.75-92, 1947.

SUNDERSLAND, S. Funicular suture and funicular exclusion in repair of severed nerves. **Brit. J. Surg.**, v.40, p.580-628, 1983.

TANG, S.; ZHU, J.; XU, Y.; XIANG, A. P.; JIANG, M. H.; QUAN, D. The effects of gradients of nerve growth factor immobilized PCLA scaffolds on neurite outgrowth in vitro and peripheral nerve regeneration in rats. **Biomaterials**, China, v. 34, n. 29, p. 7086-96, 2013.

TARLOV, I.M.; BOERNSTEIN, W. Nerve regeneration: a comparative experimental study following suture by colt thread. **J. Neurosurg.**, v.5, p.62-83, 1948.

TERZIS, J. K.; KOSTAS, I. Vein grafts used as nerve conduits for obstetrical brachial plexus palsy reconstruction. **Plast Reconstr Surg**, Norfolk, v. 120, n. 7, p. 1930-1941, 2007.

TOHILL, M.; MANTOVANI, C.; WIBERG, M.; et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. **Neurosci. Lett.**, v.27, n.3, p.362-373, 2004.

TOHILL, M.; TERENCEHI, G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.40, p.17-24, 2004.

TOMANEK R.J.; LUND D. D. Degeneration of different types of skeletal muscle fibres. **I. Denervation. F. Anat.**, v. 116, p.395-407, 1973.

TOS, P.; BATTISTON, B.; CICLAMINI, D.; GEUNA, S.; ARTIACO, S. Primary repair of crush nerve injuries by means of biological tubulization with muscle-vein-combined grafts. **Microsurgery**, v. 32, n. 5, p. 358-363, 2012.

UNDBORG, G.; DAHLIN, L.B.; DANIELSEN, N.; et al. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium, and epineurium in preformed mesothelial tubes – an experimental study on the sciatic nerve of rats. **J. Neurosci. Res.**, v.6, p.265-281, 1981.

VALENTINI R. F.; AEBISCHER P.; WINN S.R.; GALLETTI P.M. Collagen-and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. **Exp. Neurol.**, v. 98, p. 350-356, 1987.

VAN DULKEN, H.; THOMEER, T.W.M. Recent developments in peripheral nerve surgery. Management of open traumatic peripheral nerve lesions. **Arch. Chir. Neerl.**, v.30, p.91-99, 1978.

VIGUIE C. A.; LU D. X.; HUANG S. K.; RENGEM H.; CARLSON B. M. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. **Anat Rec.**, v. 248, p. 346–354, 1997.

VITERBO, F. **Neurorrafia terminolateral, estudo experimental no rato**. 1992, Tese (Doutorado). 1992. Universidade Estadual Paulista. UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 1992.

VITERBO, F. Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of epineural sheath: experimental study in rats. **Br. J. Plast. Surg.**, v.47, p.75-80, 1992.

VITERBO, F.; TRINDADE, J.C.; HOSHINO, K.; MAZZONI, A.N. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath: a experimental study in rats. **São Paulo Méd. J.**, v.110, p.267-75, 1992.

VITERBO, F.; TRINDADE, J.C.S.; DAL PAI, V.; et al. Contagem do número de fibras musculares por campo microscópico: um método simples e eficiente no estudo da desnervação. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.**, v.4, p. 4- 12, 1989.

WALLER, A.V. Nouvelle méthode pour l'étude de système nerveux applicable à l'investigation de la distribution anatomique des cordons nerveux. **C.R. Acad. Sci.**, v.33, p.606-11, 1851.

WALTON R. L.; BROWN R. E.; MATORY W. E. J. R.; BORAH G. L.; DOLPH J. L. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 84, p. 944-952, 1989.

WANG, J.; LIU, K. Method of differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cell into Schwann-like cells in vitro. Institute of Hematology, Beijing University People's Hospital, China. **Beij. Da Xue Xue Bao.**, v.18, n.2, p.202-206, 2003.

WANG, Z.; ZHANG, P.; KOU, Y.; YIN, X.; HAN, N.; JIANG, B. Hedysari extract improves regeneration after peripheral nerve injury by enhancing the amplification effect. **PLoS One**, Beijing, v. 8, n. 7, 2013.

WEISS, P. Nerve regeneration in the rat following tubular splicing of severed nerves. **Arch. Surg.**, v.46, p.525-527, 1943.

WEISS, P. Reunion of stumps of small nerves by tubulation instead of suture. **Science.**, v.93, p.66-68, 1941.

WEISS, P. Sutureless reunion of severed nerves with elastic cuffs tantalun. **J. Neurosurg.**, v.1, p.219-225, 1944a.

WEISS, P. The technology of nerve regeneration: a review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repairs. **J. Neurosurg.**, v.1, p.400-449, 1944b.

WEISS, P.; TAYLOR, C. Guides for nerve regeneration across gaps. **J. Neurosurg.**, v3, p.375-389, 1946.

WOLEDGE RC; CURTIN NA; HOMSHER E. Energetic aspects of muscle contraction. **Monogr Physiol Soc.**,v. 41, p.341-357, 1985.

WONG, A.Y.C.; SCOTT, J.J.A. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. **Exp. Neurol.**, v.114, p.364-366, 1991.

YANG, M.; RAWSON, J. L.; ZHANG, E. W.; ARNOLD, P. B.; LINEAWEAVER, W.; ZHANG, F. Comparisons of outcomes from repair of median nerve and ulnar nerve defect with nerve graft and tubulization: ameta-analysis. **J. Reconstr. Microsurg.**, Mississippi, v. 27, n. 8, p. 451-460, 2011.

YONG, J.Z.; MEDAWAR, P.B. Fibrin sutures of peripheral nerves. **Lancet.**, v.3, p.126-128, 1940.

YOSHIMURA K; HARII K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. **J. Surg. Res.**, v. 81, p.139–146, 1999.

ZAYZAFOON, M.; ABDULKADIR, S.A.; MCDONALD, J.M. Notch Signaling and ERK Activation Are Important for the Osteomimetic Properties of Prostate Cancer Bone Metastatic Cell Lines. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.3662-3670, 2004.

ZELLEM, R.T.; MILLER, D.W.; KENNING, J.A.; et al. Experimental peripheral nerve repair: enviromental control directed at the cellular level. **Microsurgery.**, v.10, p.290-301, 1989.

ZHANG, P.; HAN, N.; WANG, T.; XUE, F.; KOU, Y.; WANG, Y.; YIN, X.; LU, L.; TIAN, G.; GONG, X.; CHEN, S.; DANG, Y.; PENG, J.; JIANG, B. Biodegradable conduit small gap tubulization for peripheral nerve mutilation: a substitute for traditional epineurialneurorrhaphy. **Int. J. Med. Sci.**, v. 10, n. 2, p. 171-175, 2013.

ZOU, Y.; CHIU, H.; ZINOVYEVA, A.; AMBROS, V.; CHUANG, C. F.; CHANG, C. Developmental decline in neuronal regeneration by the progressive change of two intrinsic timers. **Science**, Ohio, v. 340, n. 6130, p. 372-376, 2013.

ZUR NIEDEN, N.I.; KEMPKA, G.; AHR, H.J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. **Differentiation.**, v.71, n.1, p.18-27, 2003.

Anexos

Anexos I – Análise Estatística – Massa Inicial

```

1way ANOVA of Massa Inicial dos Animais.txt
Parameter
Table Analyzed Massa Inicial dos Animais

One-way analysis of variance
P value      0,5820
P value summary      ns
Are means signif. different? (P < 0.05)      No
Number of groups      6
F      0,7588
R square      0,04322

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)      4,922
P value      0,4255
P value summary      ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)      No

ANOVA Table      SS      df      MS
Treatment (between columns)      334,0      5      66,79
Residual (within columns)      7394      84      88,02
Total 7728      89

Tukey's Multiple Comparison Test      Mean Diff.      q      Significant? P <
0.05?      Summary 95% CI of diff
CI vs SP      4,600      1,790      No      ns      -6.027 to 15.23
CI vs PRP      4,200      1,635      No      ns      -6.427 to 14.83
CI vs CT      5,400      2,102      No      ns      -5.227 to 16.03
CI vs CF      1,200      0,4045      No      ns      -11.07 to 13.47
CI vs CD      1,200      0,4045      No      ns      -11.07 to 13.47
SP vs PRP      -0,4000      0,1907      No      ns      -9.077 to 8.277
SP vs CT      0,8000      0,3813      No      ns      -7.877 to 9.477
SP vs CF      -3,400      1,323      No      ns      -14.03 to 7.227
SP vs CD      -3,400      1,323      No      ns      -14.03 to 7.227
PRP vs CT      1,200      0,5720      No      ns      -7.477 to 9.877
PRP vs CF      -3,000      1,168      No      ns      -13.63 to 7.627
PRP vs CD      -3,000      1,168      No      ns      -13.63 to 7.627
CT vs CF      -4,200      1,635      No      ns      -14.83 to 6.427
CT vs CD      -4,200      1,635      No      ns      -14.83 to 6.427
CF vs CD      0,0      0,0      No      ns      -12.27 to 12.27

```

Anexos II – Análise Estatística – Massa Final

```

1way ANOVA of Massa Final dos Animais.txt
Parameter
Table Analyzed Massa Final dos Animais

One-way analysis of variance
P value < 0.0001
P value summary ****
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 1263
R square 0,9869

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 1,427e+006 5 285447
Residual (within columns) 18988 84 226,1
Total 1,446e+006 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff Mean Diff. q Significant? P <
CI vs SP -403,8 98,06 Yes *** -420.8 to -386.7
CI vs PRP -394,5 95,81 Yes *** -411.5 to -377.5
CI vs CT -402,7 97,79 Yes *** -419.7 to -385.6
CI vs CF -406,5 85,50 Yes *** -426.2 to -386.8
CI vs CD -395,5 83,18 Yes *** -415.2 to -375.8
SP vs PRP 9,250 2,751 No ns -4.656 to 23.16
SP vs CT 1,100 0,3272 No ns -12.81 to 15.01
SP vs CF -2,750 0,6679 No ns -19.78 to 14.28
SP vs CD 8,250 2,004 No ns -8.781 to 25.28
PRP vs CT -8,150 2,424 No ns -22.06 to 5.756
PRP vs CF -12,00 2,914 No ns -29.03 to 5.031
PRP vs CD -1,000 0,2429 No ns -18.03 to 16.03
CT vs CF -3,850 0,9350 No ns -20.88 to 13.18
CT vs CD 7,150 1,736 No ns -9.881 to 24.18
CF vs CD 11,00 2,314 No ns -8.665 to 30.67

```

Anexos III – Análise Estatística – Massa Músculo T.C. Direito

```

1way ANOVA of Massa Músculo TC - Direito.txt
Parameter
Table Analyzed Massa Músculo TC - Direito

One-way analysis of variance
P value < 0.0001
P value summary ****
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 211,1
R square 0,9263

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected) 36,46
P value < 0.0001
P value summary ****
Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 8,938 5 1,788
Residual (within columns) 0,7114 84 0,008469
Total 9,650 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP -0,02650 1,051 No ns -0.1307 to 0.07774
CI vs PRP -0,4095 16,25 Yes *** -0.5137 to -0.3053
CI vs CT -0,4845 19,22 Yes *** -0.5887 to -0.3803
CI vs CF -0,4710 16,18 Yes *** -0.5914 to -0.3506
CI vs CD 0,4860 16,70 Yes *** 0.3656 to 0.6064
SP vs PRP -0,3830 18,61 Yes *** -0.4681 to -0.2979
SP vs CT -0,4580 22,26 Yes *** -0.5431 to -0.3729
SP vs CF -0,4445 17,64 Yes *** -0.5487 to -0.3403
SP vs CD 0,5125 20,34 Yes *** 0.4083 to 0.6167
PRP vs CT -0,07500 3,645 No ns -0.1601 to 0.01011
PRP vs CF -0,06150 2,440 No ns -0.1657 to 0.04274
PRP vs CD 0,8955 35,53 Yes *** 0.7913 to 0.9997
CT vs CF 0,01350 0,5357 No ns -0.09074 to 0.1177
CT vs CD 0,9705 38,51 Yes *** 0.8663 to 1.075
CF vs CD 0,9570 32,89 Yes *** 0.8366 to 1.077

```

Anexos IV – Análise Estatística – Diferença da Massa do Músculo T.C.

```

1way ANOVA of Diferença Massa Muscular TC.txt
Parameter
Table Analyzed Diferença Massa Muscular TC

One-way analysis of variance
P value < 0.0001
P value summary ****
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 92,53
R square 0,8463

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected) 47,40
P value < 0.0001
P value summary ****
Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 6,786 5 1,357
Residual (within columns) 1,232 84 0,01467
Total 8,018 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP -0,4990 15,04 Yes *** -0.6362 to -0.3618
CI vs PRP -0,2145 6,467 Yes *** -0.3517 to -0.07731
CI vs CT -0,1480 4,462 Yes * -0.2852 to -0.01081
CI vs CF -0,0370 0,9661 No ns -0.1954 to 0.1214
CI vs CD -0,9160 23,92 Yes *** -1.074 to -0.7576
SP vs PRP 0,2845 10,51 Yes *** 0.1725 to 0.3965
SP vs CT 0,3510 12,96 Yes *** 0.2390 to 0.4630
SP vs CF 0,4620 13,93 Yes *** 0.3248 to 0.5992
SP vs CD -0,4170 12,57 Yes *** -0.5542 to -0.2798
PRP vs CT 0,06650 2,456 No ns -0.04551 to 0.1785
PRP vs CF 0,1775 5,352 Yes ** 0.04031 to 0.3147
PRP vs CD -0,7015 21,15 Yes *** -0.8387 to -0.5643
CT vs CF 0,1110 3,347 No ns -0.02619 to 0.2482
CT vs CD -0,7680 23,15 Yes *** -0.9052 to -0.6308
CF vs CD -0,8790 22,95 Yes *** -1.037 to -0.7206

```

Anexos V – Análise Estatística – Área das Fibras Nervosas

```

1way ANOVA of Area da Fibra Nervosa.txt
Parameter
Table Analyzed Area da Fibra Nervosa

One-way analysis of variance
P value P<0.0001 ***
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 818,5
R squared 0,9799

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 24960 5 4992
Residual (within columns) 512,3 84 6,099
Total 25470 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP 5,652 8,356 Yes *** 2.854 to 8.449
CI vs PRP -8,304 12,28 Yes *** -11.10 to -5.506
CI vs CT -27,44 40,58 Yes *** -30.24 to -24.65
CI vs CF -30,64 39,23 Yes *** -33.87 to -27.41
CI vs CD 20,12 25,76 Yes *** 16.89 to 23.35
SP vs PRP -13,96 25,27 Yes *** -16.24 to -11.67
SP vs CT -33,09 59,93 Yes *** -35.38 to -30.81
SP vs CF -36,29 53,66 Yes *** -39.09 to -33.49
SP vs CD 14,47 21,39 Yes *** 11.67 to 17.26
PRP vs CT -19,14 34,66 Yes *** -21.42 to -16.86
PRP vs CF -22,34 33,02 Yes *** -25.13 to -19.54
PRP vs CD 28,42 42,02 Yes *** 25.63 to 31.22
CT vs CF -3,196 4,726 Yes * -5.993 to -0.3986
CT vs CD 47,56 70,32 Yes *** 44.76 to 50.36
CF vs CD 50,76 64,99 Yes *** 47.53 to 53.99

```

Anexos VI – Análise Estatística – Diâmetro das Fibras Nervosas

```

                                1way ANOVA of Diâmetro da Fibra.txt
Parameter
Table Analyzed Diâmetro da Fibra

One-way analysis of variance
P value          P<0.0001
P value summary  ***
Are means signif. different? (P < 0.05)    Yes
Number of groups      6
F          1783
R squared    0,9907

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary      ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)    No

ANOVA Table      SS      df      MS
Treatment (between columns)  450,9    5      90,18
Residual (within columns)    4,248   84      0,05057
Total 455,1    89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP      -0,0230  0,3735  No    ns    -0.2777 to 0.2317
CI vs PRP     -1,071   17,38   Yes   ***   -1.325 to -0.8158
CI vs CT      -3,015   48,95   Yes   ***   -3.269 to -2.760
CI vs CF      -4,104   57,71   Yes   ***   -4.398 to -3.810
CI vs CD      3,946   55,49   Yes   ***   3.652 to 4.240
SP vs PRP     -1,048   20,83   Yes   ***   -1.255 to -0.8395
SP vs CT      -2,992   59,49   Yes   ***   -3.199 to -2.784
SP vs CF      -4,081   66,27   Yes   ***   -4.336 to -3.826
SP vs CD      3,969   64,45   Yes   ***   3.714 to 4.224
PRP vs CT     -1,944   38,66   Yes   ***   -2.152 to -1.736
PRP vs CF     -3,034   49,26   Yes   ***   -3.288 to -2.779
PRP vs CD     5,017   81,46   Yes   ***   4.762 to 5.271
CT vs CF      -1,090   17,69   Yes   ***   -1.344 to -0.8348
CT vs CD      6,961   113,0   Yes   ***   6.706 to 7.215
CF vs CD      8,050   113,2   Yes   ***   7.756 to 8.344

```


Anexos VII – Análise Estatística – Área dos Axônios

```

1way ANOVA of Area do Axônio.txt
Parameter
Table Analyzed Area do Axônio

One-way analysis of variance
P value P<0.0001 ***
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 511,4
R squared 0,9682

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 1551 5 310,2
Residual (within columns) 50,96 84 0,6066
Total 1602 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP 0,3025 1,418 No ns -0.5798 to 1.185
CI vs PRP -1,121 5,253 Yes ** -2.003 to -0.2382
CI vs CT -5,411 25,37 Yes *** -6.293 to -4.528
CI vs CF -8,006 32,51 Yes *** -9.025 to -6.987
CI vs CD 7,054 28,64 Yes *** 6.035 to 8.073
SP vs PRP -1,423 8,171 Yes *** -2.143 to -0.7026
SP vs CT -5,713 32,80 Yes *** -6.433 to -4.993
SP vs CF -8,309 38,95 Yes *** -9.191 to -7.426
SP vs CD 6,752 31,65 Yes *** 5.869 to 7.634
PRP vs CT -4,290 24,63 Yes *** -5.010 to -3.570
PRP vs CF -6,886 32,28 Yes *** -7.768 to -6.003
PRP vs CD 8,175 38,32 Yes *** 7.292 to 9.057
CT vs CF -2,596 12,17 Yes *** -3.478 to -1.713
CT vs CD 12,46 58,44 Yes *** 11.58 to 13.35
CF vs CD 15,06 61,14 Yes *** 14.04 to 16.08

```

Anexos VIII – Análise Estatística – Diâmetro dos Axônios

```

1way ANOVA of Diâmetro do Axônio.txt
Parameter
Table Analyzed Diâmetro do Axônio

One-way analysis of variance
P value P<0.0001 ***
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 257,1
R squared 0,9387

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 118,3 5 23,65
Residual (within columns) 7,726 84 0,09198
Total 126,0 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff Mean Diff. q Significant? P <
CI vs SP -0,02050 0,2468 No ns -0.3640 to 0.3230
CI vs PRP -0,7330 8,825 Yes *** -1.077 to -0.3895
CI vs CT -1,239 14,92 Yes *** -1.583 to -0.8955
CI vs CF -2,244 23,40 Yes *** -2.641 to -1.847
CI vs CD 2,125 22,16 Yes *** 1.728 to 2.522
SP vs PRP -0,7125 10,51 Yes *** -0.9930 to -0.4320
SP vs CT -1,219 17,97 Yes *** -1.499 to -0.9380
SP vs CF -2,224 26,77 Yes *** -2.567 to -1.880
SP vs CD 2,146 25,83 Yes *** 1.802 to 2.489
PRP vs CT -0,5060 7,462 Yes *** -0.7865 to -0.2255
PRP vs CF -1,511 18,19 Yes *** -1.855 to -1.167
PRP vs CD 2,858 34,41 Yes *** 2.514 to 3.202
CT vs CF -1,005 12,10 Yes *** -1.349 to -0.6615
CT vs CD 3,364 40,50 Yes *** 3.020 to 3.708
CF vs CD 4,369 45,56 Yes *** 3.972 to 4.766

```

Anexos IX – Análise Estatística – Área da Bainha de Mielina

```

1way ANOVA of Area da Bainha de Mielina.txt
Parameter
Table Analyzed Area da Bainha de Mielina

One-way analysis of variance
P value P<0.0001 ***
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 403,2
R squared 0,9600

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 14490 5 2899
Residual (within columns) 603,9 84 7,189
Total 15100 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP 5,349 7,285 Yes *** 2.312 to 8.386
CI vs PRP -7,183 9,782 Yes *** -10.22 to -4.146
CI vs CT -22,03 30,00 Yes *** -25.07 to -19.00
CI vs CF -22,63 26,69 Yes *** -26.14 to -19.13
CI vs CD 13,07 15,41 Yes *** 9.558 to 16.57
SP vs PRP -12,53 20,90 Yes *** -15.01 to -10.05
SP vs CT -27,38 45,67 Yes *** -29.86 to -24.90
SP vs CF -27,98 38,11 Yes *** -31.02 to -24.94
SP vs CD 7,716 10,51 Yes *** 4.679 to 10.75
PRP vs CT -14,85 24,77 Yes *** -17.33 to -12.37
PRP vs CF -15,45 21,04 Yes *** -18.49 to -12.41
PRP vs CD 20,25 27,57 Yes *** 17.21 to 23.29
CT vs CF -0,6005 0,8178 No ns -3.638 to 2.437
CT vs CD 35,10 47,80 Yes *** 32.06 to 38.13
CF vs CD 35,70 42,10 Yes *** 32.19 to 39.21

```

Anexos X – Análise Estatística – Espessura da Bainha de Mielina

```

1way ANOVA of Espessura da Bainha de Mielina.txt
Parameter
Table Analyzed Espessura da Bainha de Mielina

One-way analysis of variance
P value P<0.0001 ***
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 129,5
R squared 0,8851

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 112,8 5 22,56
Residual (within columns) 14,64 84 0,1743
Total 127,5 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff Mean Diff. q Significant? P <
CI vs SP -0,002500 0,02187 No ns -0.4754 to 0.4704
CI vs PRP -0,3375 2,952 No ns -0.8104 to 0.1354
CI vs CT -1,776 15,53 Yes *** -2.248 to -1.303
CI vs CF -1,860 14,09 Yes *** -2.406 to -1.314
CI vs CD 1,821 13,79 Yes *** 1.275 to 2.367
SP vs PRP -0,3350 3,588 No ns -0.7211 to 0.05114
SP vs CT -1,773 18,99 Yes *** -2.159 to -1.387
SP vs CF -1,858 16,25 Yes *** -2.330 to -1.385
SP vs CD 1,824 15,95 Yes *** 1.351 to 2.296
PRP vs CT -1,438 15,40 Yes *** -1.824 to -1.052
PRP vs CF -1,523 13,32 Yes *** -1.995 to -1.050
PRP vs CD 2,159 18,88 Yes *** 1.686 to 2.631
CT vs CF -0,08450 0,7390 No ns -0.5574 to 0.3884
CT vs CD 3,597 31,45 Yes *** 3.124 to 4.069
CF vs CD 3,681 27,88 Yes *** 3.135 to 4.227

```

Anexos XI – Análise Estatística – Morfometria das Fibras Musculares

```

1way ANOVA of Morfometria Músculo TC.txt
Parameter
Table Analyzed Morfometria Músculo TC

One-way analysis of variance
P value < 0.0001
P value summary ****
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 927,2
R square 0,9822

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected) 53,53
P value < 0.0001
P value summary ****
Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 1,521e+008 5 3,042e+007
Residual (within columns) 2,756e+006 84 32808
Total 1,549e+008 89

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff Mean Diff. q Significant? P <
CI vs SP 824,6 16,62 Yes *** 619.5 to 1030
CI vs PRP -783,7 15,80 Yes *** -988.9 to -578.5
CI vs CT -1481 29,85 Yes *** -1686 to -1275
CI vs CF -1959 34,19 Yes *** -2195 to -1722
CI vs CD 2266 39,56 Yes *** 2029 to 2503
SP vs PRP -1608 39,71 Yes *** -1776 to -1441
SP vs CT -2305 56,92 Yes *** -2473 to -2138
SP vs CF -2783 56,11 Yes *** -2988 to -2578
SP vs CD 1442 29,06 Yes *** 1236 to 1647
PRP vs CT -696,9 17,21 Yes *** -864.4 to -529.4
PRP vs CF -1175 23,68 Yes *** -1380 to -969.6
PRP vs CD 3050 61,48 Yes *** 2845 to 3255
CT vs CF -477,9 9,634 Yes *** -683.1 to -272.7
CT vs CD 3747 75,53 Yes *** 3542 to 3952
CF vs CD 4225 73,76 Yes *** 3988 to 4462

```

Anexos XII – Análise Estatística – Amplitude

```

1way ANOVA of Amplitude.txt

Parameter
Table Analyzed  Amplitude

One-way analysis of variance
P value          < 0.0001
P value summary  ****
Are means signif. different? (P < 0.05)    Yes
Number of groups      6
F          225,1
R square      0,9542

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary      ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)    No

ANOVA Table
      SS      df      MS
Treatment (between columns)  2949      5      589,8
Residual (within columns)    141,5     54      2,620
Total 3091      59

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP      7,300  14,26  Yes  ***  5.158 to 9.442
CI vs PRP     4,600  8,986  Yes  ***  2.458 to 6.742
CI vs CT      3,200  6,251  Yes  ***  1.058 to 5.342
CI vs CF     -0,1000  0,1954  No   ns   -2.242 to 2.042
CI vs CD     20,50  40,05  Yes  ***  18.36 to 22.64
SP vs PRP    -2,700  5,275  Yes  **   -4.842 to -0.5584
SP vs CT     -4,100  8,009  Yes  ***  -6.242 to -1.958
SP vs CF     -7,400  14,46  Yes  ***  -9.542 to -5.258
SP vs CD     13,20  25,79  Yes  ***  11.06 to 15.34
PRP vs CT    -1,400  2,735  No   ns   -3.542 to 0.7416
PRP vs CF    -4,700  9,182  Yes  ***  -6.842 to -2.558
PRP vs CD     15,90  31,06  Yes  ***  13.76 to 18.04
CT vs CF     -3,300  6,447  Yes  ***  -5.442 to -1.158
CT vs CD     17,30  33,80  Yes  ***  15.16 to 19.44
CF vs CD     20,60  40,24  Yes  ***  18.46 to 22.74

```

Anexos XIII – Análise Estatística – Latência

```

1way ANOVA of Latência.txt
Parameter
Table Analyzed Latência

One-way analysis of variance
P value < 0.0001
P value summary ****
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 46400
R square 0,9998

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected)
P value
P value summary ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05) No

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 572,3 5 114,5
Residual (within columns) 0,1332 54 0,002467
Total 572,4 59

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP 0,3680 23,43 Yes *** 0.3023 to 0.4337
CI vs PRP -0,08200 5,221 Yes ** -0.1477 to -0.01629
CI vs CT -0,08600 5,476 Yes ** -0.1517 to -0.02029
CI vs CF -0,1400 8,914 Yes *** -0.2057 to -0.07429
CI vs CD -8,263 526,1 Yes *** -8.329 to -8.197
SP vs PRP -0,4500 28,65 Yes *** -0.5157 to -0.3843
SP vs CT -0,4540 28,91 Yes *** -0.5197 to -0.3883
SP vs CF -0,5080 32,34 Yes *** -0.5737 to -0.4423
SP vs CD -8,631 549,5 Yes *** -8.697 to -8.565
PRP vs CT -0,004000 0,2547 No ns -0.06971 to 0.06171
PRP vs CF -0,05800 3,693 No ns -0.1237 to 0.007710
PRP vs CD -8,181 520,9 Yes *** -8.247 to -8.115
CT vs CF -0,05400 3,438 No ns -0.1197 to 0.01171
CT vs CD -8,177 520,6 Yes *** -8.243 to -8.111
CF vs CD -8,123 517,2 Yes *** -8.189 to -8.057

```

Anexos XIV – Análise Estatística – Análise Funcional

```

1way ANOVA of Análise Funcional.txt
Parameter
Table Analyzed Análise Funcional

One-way analysis of variance
P value < 0.0001
P value summary ****
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
Number of groups 6
F 327,4
R square 0,9681

Bartlett's test for equal variances
Bartlett's statistic (corrected) 23,12
P value 0,0003
P value summary ***
Do the variances differ signif. (P < 0.05) Yes

ANOVA Table
SS df MS
Treatment (between columns) 50359 5 10072
Residual (within columns) 1661 54 30,77
Total 52021 59

Tukey's Multiple Comparison Test
0.05? Summary 95% CI of diff
CI vs SP 58,70 33,46 Yes *** 51.36 to 66.04
CI vs PRP 43,39 24,74 Yes *** 36.06 to 50.73
CI vs CT 25,21 14,37 Yes *** 17.87 to 32.54
CI vs CF 0,7850 0,4475 No ns -6.553 to 8.123
CI vs CD 78,75 44,89 Yes *** 71.41 to 86.09
SP vs PRP -15,31 8,725 Yes *** -22.64 to -7.967
SP vs CT -33,49 19,10 Yes *** -40.83 to -26.16
SP vs CF -57,91 33,02 Yes *** -65.25 to -50.58
SP vs CD 20,05 11,43 Yes *** 12.71 to 27.39
PRP vs CT -18,19 10,37 Yes *** -25.53 to -10.85
PRP vs CF -42,61 24,29 Yes *** -49.95 to -35.27
PRP vs CD 35,35 20,16 Yes *** 28.02 to 42.69
CT vs CF -24,42 13,92 Yes *** -31.76 to -17.08
CT vs CD 53,54 30,53 Yes *** 46.20 to 60.88
CF vs CD 77,96 44,45 Yes *** 70.62 to 85.30

```


Anexos XIV – Aprovação do Comitê de Ética

**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

Botucatu, 17 de setembro de 2012.

Of. 25/12-CEEAA

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Fausto Viterbo Neto
Departamento de Cirurgia e Ortopedia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Dr. Fausto,

Informo que o (Protocolo CEEA 481/2005) "Uso de tecidos na regeneração de nervo: enxerto de veia preenchido por cultura de células tronco diferenciada em célula de schwann em intervalo de 15mm. Estudo no rato", orientado por Vossa Senhoria teve o título alterado para "Reparo de nervo periférico utilizando a veia jugular como tubo associado a cultura de células-tronco extraídas de tecido adiposo. Estudo no Rato", o projeto está sendo conduzido pelo aluno Geraldo Marco Rosa Junior, a nível de doutorado.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª. Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEEA

Anexos XV – Tabela de Resumo dos Resultados

GRUPOS	ATRIBUTOS ESTUDADOS						
	Massa Inicial	Massa Final	Massa do m. IC	Diferença da Massa do m. IC	Area da Fibra Nervosa	Diâmetro da Fibra Nervosa	Area do Axônio
GCI	229,20 ^a	0,00 ^a	0,642 ^a	0,001 ^a	20,12 ^a	3,95 ^a	7,05 ^a
GSP	224,60 ^a	403,75 ^b	0,669 ^a	0,500 ^b	14,47 ^b	3,97 ^a	6,75 ^a
GPRP	225,00 ^a	394,50 ^b	1,052 ^b	0,216 ^c	28,42 ^c	5,02 ^b	8,17 ^b
GCT+PRP	223,80 ^a	402,65 ^b	1,127 ^a	0,149 ^{bc}	47,56 ^d	6,96 ^d	12,46 ^c
GCF	228,00 ^a	406,50 ^b	1,113 ^a	0,038 ^{ac}	50,76 ^e	8,05 ^d	15,06 ^a
GCD	228,00 ^a	395,50 ^b	0,156 ^c	0,917 ^e	0,00 ^f	0,00 ^e	0,00 ^e

Diâmetro do Axônio	Area da Bainha de Mielina		Espessura da Bainha de Mielina		Morfometria das Fibras Musculares		Amplitude		Latência		Teste da Marcha	
GCI	2,13 ^a	13,07 ^a	1,82 ^a	1,82 ^a	2459,20 ^a	20,50 ^a	1,74 ^a	1,74 ^a	1,74 ^a	1,74 ^a	-14,11 ^a	-14,11 ^a
GSP	2,15 ^a	7,72 ^b	1,82 ^a	1,82 ^a	1634,55 ^b	13,20 ^b	1,37 ^b	1,37 ^b	1,37 ^b	1,37 ^b	-72,81 ^b	-72,81 ^b
GPRP	2,86 ^b	20,25 ^c	2,16 ^a	2,16 ^a	3242,90 ^c	15,90 ^c	1,82 ^c	1,82 ^c	1,82 ^c	1,82 ^c	-57,51 ^c	-57,51 ^c
GCT+PRP	3,36 ^c	35,10 ^c	3,60 ^b	3,60 ^b	3939,80 ^d	17,30 ^c	1,82 ^c	1,82 ^c	1,82 ^c	1,82 ^c	-39,32 ^d	-39,32 ^d
GCF	4,37 ^d	35,70 ^c	3,68 ^b	3,68 ^b	4417,70 ^e	20,60 ^a	1,88 ^c	1,88 ^c	1,88 ^c	1,88 ^c	-14,90 ^a	-14,90 ^a
GCD	0,00 ^e	0,00 ^a	0,00 ^c	0,00 ^c	193,00 ^f	0,00 ^d	10,00 ^d	10,00 ^d	10,00 ^d	10,00 ^d	-92,86 ^e	-92,86 ^e

Letras diferentes apresentam diferença estatística. Realce em verde quando o GCT+PRP obteve semelhança ao GCF; Realce em amarelo quando o GCT+PRP obteve o melhor resultado quando comparado com os grupos experimentais; Realce em azul quando o GCT+PRP obteve semelhança com GPRP.