

**ESTUDO DA VASCULARIZAÇÃO DOS NERVOS
PERIFÉRICOS E DA SUA INFLUÊNCIA
NA REGENERAÇÃO NERVOSA
ESTUDO EXPERIMENTAL E NO CADÁVER HUMANO**

**MARIA ANGÉLICA RATO DA SILVA ROBERTO, Assistente Graduada Sênior de
Cirurgia Plástica e Reconstructiva do Centro Hospitalar de Lisboa Central**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA na Especialidade em
CIRURGIA E MORFOLOGIA HUMANA (CIRURGIA) na Faculdade de Ciências
Médicas**

Setembro, 2015



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS
MÉDICAS**

UNIVERSIDADE
NOVA DE LISBOA



FACULDADE DE
**CIÊNCIAS
MÉDICAS**

UNIVERSIDADE
NOVA DE LISBOA

**ESTUDO DA VASCULARIZAÇÃO DOS NERVOS
PERIFÉRICOS E DA SUA INFLUÊNCIA
NA REGENERAÇÃO NERVOSA
ESTUDO EXPERIMENTAL E NO CADÁVER HUMANO**

**Autora: Maria Angélica Rato da Silva Roberto, Assistente Graduada Sénior de Cirurgia
Plástica e Reconstructiva do Centro Hospitalar de Lisboa Central**

**Orientador: Doutor João Erse Goyri O'Neill, Professor Catedrático da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa**

**Co-orientador: Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante, Professor Catedrático da
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA na Especialidade em
CIRURGIA E MORFOLOGIA HUMANA (CIRURGIA) na Faculdade de Ciências
Médicas**

Setembro , 2015



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS
MÉDICAS**

**UNIVERSIDADE
NOVA DE LISBOA**

“ Vascularização do Nervo Periférico e a sua Influência na Regeneração Nervosa”

Copyright© - Todos os direitos reservados. Maria Angélica Rato da Silva Roberto; Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências Médicas e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos, reproduzidos em papel ou formato digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória

Aos meus filhos Nuno Filipe, Ana Miguel e Vasco Maria,

Aos meus meninos Matias, Matilde, Maria Inês, Catarina e Tiago,

Ao meu irmão Amílcar, sempre presente,

Aos meus saudosos pais, Engrácia e Teófilo, e em sua memória.

Nunca esquecerei os valores de vida que me ensinaram.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Prof. Doutor João Erse de Goyri O'Neill pelo apoio incondicional, pela disponibilidade e pelo incentivo que me deu na orientação desta tese, bem como, a confiança que depositou nos meus trabalhos. Os seus conselhos e comentários foram imprescindíveis para a finalização desta tese. Tudo o que eu possa acrescentar para expressar o meu agradecimento é insuficiente, por isso, digo apenas Muito Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante, agradeço pela acessibilidade e pela disponibilidade imediata em ser o meu co-orientador nesta tese. Não posso deixar de realçar, de uma forma muito especial, as palavras de ânimo e de confiança que sempre me ofereceu e os conselhos prestados ao longo dos trabalhos. A sua amizade incondicional contribui para que estivesse presente neste episódio importante da minha vida profissional. Revelo, aqui, a minha enorme gratidão.

Ao Prof. Doutor João A. B. Patrício estou particularmente agradecida e quero salientar a importância que teve na implementação deste projecto, sempre com palavras de entusiasmo inigualável. Obrigada, Prof. Patrício.

Ao Exmo. Professor Doutor José António Rebocho Esperança Pina, quero expressar, aqui, um agradecimento muito especial pelo seu acolhimento desde o primeiro dia, no Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas que, na altura, dignamente dirigia. Quero também salientar o entusiasmo e o interesse que implementou em alguns aspectos deste estudo, que, para mim, tiveram um interesse extraordinário.

Ao Prof. Doutor Diogo de Freitas Branco Pais, quero agradecer pelos conselhos dados, importantes para a aprovação deste projecto pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas.

Ao Prof. Doutor Miguel Correia, quero expressar o meu agradecimento pela sua importante colaboração neste estudo, e também, pela grande disponibilidade que expressou.

À Professora Paula Videira, um Muito Obrigada pela sua afável e importante colaboração neste projecto.

À Professora Doutora Vassilenko, um Muito Obrigada pela amizade e pela disponibilidade oferecidas para a realização dos exames de electrofisiologia.

Ao Dr. Diogo Casal estarei sempre grata pela sua participação neste estudo. Devido à admiração que sinto por si e à nossa amizade incomensurável, é impossível encontrar palavras que possam revelar o quanto lhe estou grata.

Ao Centro Hospitalar de Lisboa Central, representado pela Exma. Presidente do Conselho de Administração, Dra. Teresa Sustelo, quero deixar um agradecimento particular pelo suporte dispensado, indispensável para a realização deste projecto. Foi também de acordo com a minha vontade que decidi contribuir para a actividade de investigação desta instituição com a qual tenho ligações muito fortes e inquebráveis.

Ao Dr. Mário Ferraz de Oliveira, Director do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Central, agradeço pela colaboração e pela gentileza, com que aceitou a realização dos exames histológicos deste projecto.

À Dra. Manuela Mafra, que durante muito tempo tem colaborado em diversos estudos já realizados por nós, sempre com uma grande disponibilidade, quase para além das suas próprias possibilidades. Aceitou, uma vez mais, a realização dos exames histológicos deste projecto, que, sem dúvida, foi um trabalho de grande volume (de quase 5 000 cortes histológicos). Quero deixar-lhe, aqui, o meu Muito Obrigado por este trabalho e pela sua amizade.

Ao Dr. Luís Mascarenhas Lemos, expressei também o meu agradecimento pela sua ajuda e pela colaboração nos exames realizados.

À Dra. Eduarda Silva, agradeço muito sinceramente por toda a simpatia, gentileza e disponibilidade oferecidas que se traduziram no desenvolvimento de um enorme trabalho. As fotografias realizadas a todo o estudo histológico desta tese quase que se aproximaram das 10 000.

À Dra. Ana Farinho, agradeço pela sua participação e pelo trabalho meritório oferecido a este projecto.

A todos os meus colegas e colaboradores do Serviço de Cirurgia Plástica e Reconstructiva e da Unidade de Queimados do Centro Hospitalar de Lisboa Central, o meu Muito Obrigada pela amizade e pelo carinho, pela ajuda, pelo suporte e pelo entusiasmo que me expressaram, mesmo nas horas mais difíceis. Nunca esquecerei o que todos significam para mim.

À Sara Quintela, jovem escritora, quero expressar o meu enorme agradecimento pelo trabalho inigualável realizado nas revisões desta tese. Aproveito também para agradecer aos pais e para felicitá-los pela riqueza que representa a vossa filha, na área das artes.

Ao Filipe Franco, felicito pelo seu mérito relevante na ilustração científica, que se traduz no preciosismo extraordinário dos seus trabalhos, como o exemplo das ilustrações que realizou para esta tese. Obrigada por esta colaboração preciosa.

Ao Nuno Peixoto, *designer*, com o cargo actual de director criativo, quero agradecer pela sua colaboração.

Ao Sr. Carlos Lopes, que foi um técnico exímio do Laboratório de Anatomia e Cirurgia Experimental do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, um enorme agradecimento por tudo aquilo que me ensinou e pelos conselhos que me deu, sempre de uma forma afável e com uma disponibilidade sem limites. Recordarei para sempre o grande amigo Carlos.

Ao Sr. Marco Costa, assistente técnico do Laboratório de Anatomia Experimental, agradeço o empenho e o entusiasmo que revelou na sua colaboração na última fase do trabalho experimental.

Ao Sr. Octávio Jordão Chaveiro, técnico de Microscopia Electrónica, de competência notável, sempre disponível para colaborar, devo-lhe um enorme agradecimento pelo que me ensinou na observação em Microscopia electrónica de varrimento. Agradeço também pela amizade e pelo acolhimento afável que sempre me ofereceu.

Aos técnicos do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Central, agradeço pela importante e imprescindível colaboração para esta tese, com o número elevado de

peças histológicas que foram preparadas neste serviço. Quero destacar, de forma especial, José Martins Ferreira, Sara Alves, Cláudia Pen, Luísa Pereira, Carina Santos, Carla Lopes e Elsa Mesquita.

Às minhas colaboradoras do secretariado do Serviço de Cirurgia Plástica Carla Barbosa, Alexandra Pires Duarte e Patrícia Mello, um Muito Obrigada pelo vosso apoio e pela vossa amizade.

Ao Sr. Virgílio Moreno, carpinteiro do Centro Hospitalar de Lisboa Central, quero agradecer a sua disponibilidade incondicional para aceitar o nosso pedido, para a execução das peças em madeira, para a realização de testes específicos aos animais de experimentação. Tenho a obrigação de realçar o valor destas peças, assim como o seu preciosismo e o rigor da sua execução relativamente às medidas exigidas para a validação destes testes. Obrigada, Sr. Virgílio, pelo seu profissionalismo, pela sua amizade e pela colaboração preciosa neste estudo.

Agradeço ainda à *Mundinter* pela disponibilização gentil do aparelho *Neuromatic 2000*, com o qual foi possível efectuar a electroneurografia.

À CellImaging Unit do Instituto Gulbenkian de Ciência, agradeço a disponibilização do microscópio de fluorescência (*Leica DMIRE 2*) para a realização de imagens deste estudo.

Durante os momentos difíceis da finalização de uma tese apercebemo-nos de como são importantes os bons amigos.

Àqueles que de uma forma discreta me acompanharam neste percurso e que eu ter-me-ei esquecido de nomear, dirijo-vos um especial agradecimento.

Por último, quero agradecer, com destaque, à *NOVA Medical School* pela possibilidade que me foi dada de realizar este estudo.

Resumo

Na clínica, a recuperação funcional que se segue a uma lesão nervosa raramente é atingida na sua totalidade. A reinervação, quer motora, quer sensitiva, ocorre geralmente com maior ou menor *deficit*. Interessa, então, identificar os factores que podem interferir na regeneração nervosa.

O neurónio é a unidade anatómica fundamental do sistema nervoso periférico e é muito vulnerável à isquemia pela grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axónio, que pode ser de apenas alguns milímetros ou até atingir um metro. É, por isso, fundamental o estudo da vascularização do nervo periférico e da sua influência na regeneração nervosa. O resultado deste estudo pode levar ao desenvolvimento de técnicas cirúrgicas que criem as condições que garantam, por sua vez, a revascularização precoce do nervo periférico em caso de lesão, ou mesmo em caso de doenças, nas quais a vascularização do nervo está alterada como, por exemplo, na neuropatia diabética.

O estudo da vascularização do nervo periférico realizou-se através da investigação da vascularização do nervo mediano do cadáver humano, pela investigação da vascularização do nervo isquiático do rato Wistar e do Plexo Braquial (PB) do mesmo. A vascularização do PB do rato não é muito diferente daquela que é reportada na espécie humana, existindo uma homologia entre o rato e o Homem no que diz respeito à morfologia e à vascularização do PB.

Através da comparação angiomorfológica entre o nervo isquiático do rato e o nervo mediano humano, concluiu-se que a microvascularização do nervo isquiático do rato e do mediano humano são muito semelhantes, o que suporta a utilização do rato como modelo experimental de lesões do nervo mediano humano.

Para a avaliação da influência da vascularização na regeneração nervosa foi feita a análise da eficácia de enxerto de tubo de membrana amniótica humana imunologicamente inerte, de enxerto de veia jugular externa autóloga e de auto-enxerto de nervo, na reparação de um defeito de 10 milímetros no nervo isquiático do rato, na presença de um fornecimento vascular axial, comparando-se com os mesmos procedimentos em estudos realizados anteriormente, sem suprimento vascular.

Os ratos foram avaliados funcionalmente através do estudo das pegadas, da electroneurografia e da força de flexão ao nível do tornozelo, e estruturalmente, através das avaliações histológicas e morfométricas, da taxa de recuperação do peso dos músculos gastrocnémio e solhear e da marcação axonal retrógrada com *True Blue* às 4, 8 e 12 semanas. Os nervos reconstruídos apresentaram uma arquitectura normal, incluindo a arquitectura vascular. A membrana amniótica foi bem tolerada, persistindo imunologicamente em torno do nervo até à 12.^a semana.

Concluiu-se também que, na presença de um suprimento vascular axial local, a membrana amniótica humana e as veias autólogas são, pelo menos, tão eficazes como os auto-enxertos nervosos na reconstrução de defeitos nervosos de 10 milímetros.

Palavras-Chave: rato; vasos sanguíneos; regeneração nervosa; nervo isquiático; recuperação da função; nervo mediano; plexo braquial; veia/membrana amniótica.

Abstract

At the clinic, the functional recovery that follows a nerve lesion is rarely achieved in full.

The neuron is very vulnerable to ischemia that's why it is essential to study the vascularization of the peripheral nerve and its influence on the nerve's regeneration.

The outcome of this study may lead to the development of surgical techniques that create the conditions which are necessary to ensure an early revascularization in case of a peripheral nerve injury.

This study investigated the vascularization of the median nerve of the human cadaver and the vascularization of the sciatic nerve of the Wistar rat and his Brachial Plexus (BP) through animal experimentation. The mouse's BP vascularization is not so different from the one that is reported in the human species.

An angiomorphological comparison between the mouse sciatic nerve and the human median nerve concluded that the microvascularizations are very similar, which supports the use of the mouse as an experimental model for the study of median nerve's lesions.

To evaluate the influence of vascularization in the nerve's regeneration, it was made an assessment of the effectiveness of the human amniotic immuno-inert membrane grafts, of the autologous external jugular vein grafts and of the nerve auto-graft in the repair of a defect of 10 mm on the sciatic nerve of the rat, in the presence of an axial vascular supply, comparing these with the same procedures that were adopted in the previous studies, without vascular supply.

The rats were functionally assessed and structurally evaluated (through histological and morphometric evaluations) at the 4.th, 8.th and 12.th weeks. The nerves reconstructed presented a normal architecture, including vascular architecture. The amniotic membrane was well-tolerated immunologically, persisting around the nerve until the 12.th week.

As a result, it was also concluded that in the presence of a local axial vascular supply, the human amniotic membrane and the autologous veins are, at least, as effective as the nerve auto-grafts in the reconstruction of the nerve's defects of 10 mm.

Keywords: *rat/mouse; blood vessels; nerve regeneration; sciatic nerve; recovery of function; median nerve; brachial plexus; veins/amniotic membrane.*

Índice de Conteúdos

Capítulo I	1
1. INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO HISTÓRICA DA REPARAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO	
1	
1.1. Introdução	1
1.2. Breve Revisão Histórica	2
1.3. Morfologia e Fisiologia do Nervo Periférico	4
1.3.1. Fibra Nervosa	5
1.3.2. Vascularização do nervo periférico (breve referência)	7
1.4. As Lesões dos Nervos Periféricos	7
1.4.1. Classificação das Lesões do Nervo Periférico	8
1.5. Fisiopatologia do Nervo Periférico	9
1.5.1. Regeneração Axonal	9
1.6. Referências Bibliográficas	10
Capítulo 2	13
2. MATERIAIS E TÉCNICAS DE ESTUDO	13
2.1. Materiais de Estudo	13
2.1.1. A Vascularização do Nervo Mediano do Cadáver Humano	13
2.1.1.1. Considerações Éticas sobre a Utilização de Cadáver Humano para Investigação .	14
2.1.1.2. Técnica de Embalsamamento de Cadáveres	15
2.1.1.3. Parecer da Comissão de Ética	16
2.1.2. A Vascularização do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial do Rato Wistar	16
2.1.2.1. Considerações Éticas e do Bem-Estar Animal	17
2.1.2.2. Princípios Cirúrgicos Básicos no Animal de Experimentação	18
2.1.3. Regeneração Nervosa na Reconstrução de Defeito Nervoso por Diferentes Conduitos, na presença de um fornecimento vascular axilar; Estudo Experimental no Rato Wistar	21
2.1.4. Membrana Amniótica Humana Imunoinerte	21
2.1.4.1. Considerações Gerais	21
2.1.5. Protocolo da Colheita de Membrana Amniótica Humana para Transplantação	22
2.1.5.1. Acto de Colheita da MAH	23
2.1.5.2. Uso e Transplante de MAH	23
2.2. Técnicas de Estudo	24
2.2.1. Técnica da Injecção-dissecção dos Vasos do Nervo Mediano do Cadáver Humano	24
2.2.2. Técnica Cirúrgica para a Injecção dos Vasos do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial no Rato Wistar para o estudo por diafanização	25
2.2.3. Técnica Cirúrgica para a Injecção dos Vasos do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial no Rato Wistar para o estudo em Microscopia Electrónica de Varrimento	26

2.2.4.	Técnicas de Avaliação Morfológica/Morfométrica e Estrutural do Nervo Humano, do Nervo do Animal de Experimentação e da Regeneração Nervosa na Reconstrução de Defeito de Nervo Isquiático do Rato Wistar	27
2.2.4.1.	Técnica de Diafanização	28
2.2.4.2.	Técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento em Moldes Vasculares	28
2.2.4.3.	Técnica Histológica para Marcadores Específicos	29
2.2.4.3.1.	Técnica de Marcação Axonal Retrógrada com Marcador Fluorescente <i>True Blue</i>	30
2.2.5.	Técnicas de Avaliação Funcional na Regeneração Nervosa.....	31
2.2.5.1.	Índice de Funcionalidade do Isquiático: <i>sciatic functionality index</i> (SFI)	31
2.2.5.2.	Avaliação da Velocidade de Condução Nervosa Motora (MNCV) e da força de flexão ao nível do tornozelo.....	32
2.3.	Referências Bibliográficas	32
Capítulo 3	37
3.	A VASCULARIZAÇÃO DO NERVO MEDIANO DO CADÁVER HUMANO	37
3.1.	Considerações gerais.....	37
3.2.	Anatomia Vasculardo Nervo Periférico	38
3.2.1.	Conceito de Angiosoma	38
3.2.2.	A Vascularização Arterial do Nervo Periférico	38
3.2.3.	A Vascularização Venosa do Nervo Periférico	40
3.3.	Estrutura do Nervo Periférico	42
3.3.1.	As Bainhas de Tecido Conjuntivo do Nervo Periférico	42
3.3.2.	A Microcirculação do Nervo Periférico	44
3.4.	A Macrovascularização do Nervo Mediano Humano	45
3.5.	A Microvascularização do Nervo Mediano Humano	48
3.5.1.	A Microvascularização do Nervo Mediano Humano pela Técnica de Diafanização.....	49
3.5.2.	Microvascularização do Nervo Mediano Humano pela Técnica da Microscopia Electrónica de Varrimento	51
3.5.2.1.	Breves Considerações sobre a Identificação e a Interpretação de Moldes Vasculares Observados em Microscopia Electrónica de Varrimento	51
3.5.2.2.	A Microvascularização do Nervo Mediano Humano	57
3.5.3.	A Microvascularização do Nervo Mediano Humano pela Técnica Histológica	61
3.6.	Referências Bibliográficas	63
Capítulo 4	65
4.	A VASCULARIZAÇÃO DO PLEXO BRAQUIAL DO RATO WISTAR	65
4.1.	Introdução.....	65
4.2.	Materiais e Métodos	66
4.3.	Morfologia do Plexo Braquial no Rato Wistar.....	66
4.4.	A Vascularização do Plexo Braquial no Rato Wistar	69
4.4.1.	A Macrovascularização	69

4.4.2. A Microvascularização.....	73
4.5. Referências Bibliográficas.....	78
Capítulo 5.....	81
5. A VASCULARIZAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DO RATO WISTAR E COMPARAÇÃO ANGIOMORFOLÓGICA COM O NERVO MEDIANO HUMANO.....	81
5.1. Introdução.....	81
5.2. Material e Métodos.....	82
5.3. A Macrovascularização do Nervo Isquiático do Rato Wistar.....	82
5.4. A Microvascularização do Nervo Isquiático do Rato Wistar.....	89
5.5. Referências Bibliográficas.....	92
Capítulo 6.....	95
6. Reconstrução de defeito de nervo periférico com utilização de diferentes condutos e na presença de um fornecimento vascular axial; modelo animal o rato Wistar.....	95
6.1. Introdução.....	95
6.2. Material e Métodos.....	97
6.2.1. Obtenção e preparação dos diferentes condutos.....	97
6.2.1.1. Obtenção da veia jugular externa.....	97
6.2.1.2. Elaboração de tubo de Membrana Amniótica Humana Imunoinerte.....	97
6.3. Procedimentos Cirúrgicos para a Reconstrução do Defeito Nervoso.....	98
6.3.1. Considerações gerais.....	98
6.3.2. Princípios Básicos Cirúrgicos no Animal de Experimentação.....	99
6.3.3. Procedimentos Cirúrgicos.....	100
6.4. Avaliação da Regeneração Nervosa.....	103
6.4.1. Avaliação Funcional.....	104
6.4.1.1. Análise do Traçado da Marcha e Cálculo do SFI.....	104
6.4.1.2. Medição da Velocidade de Condução Nervosa Motora (Motor Nerve Conduction Velocity) - MNCV.....	108
6.4.1.3. Avaliação da Força de Flexão.....	108
6.4.1.4. Pesagem dos músculos gêmeos e solhear.....	108
6.4.2. Avaliação estrutural.....	109
6.4.2.1. Análise Morfológica e Morfométrica.....	109
6.4.2.2. Marcação Axonal Retrógrada com Marcador Fluorescente True Blue.....	120
6.4.2.3. Metodologia de Avaliação Histomorfológica.....	120
6.4.2.4. Análise Estatística.....	120
6.5. Resultados.....	121
6.5.1 Avaliação Funcional.....	121
6.5.1.1 Traçado da Marcha e Cálculo do Índice de Funcionalidade do Isquiático: sciatic functionality index (SFI);.....	121
6.5.1.2. Velocidade de Condução Nervosa Motora (Motor Nerve Conduction Velocity) - MNCV.....	122

6.5.1.3. Pesagem dos músculos gêmeos e solhear.....	122
6.5.1.4. Avaliação da Força de Flexão.....	123
6.5.2 Avaliação estrutural.....	124
6.5.2.1 Análise Morfológica por dissecação, MEV e Diafanização.....	124
6.5.2.2. Análise Morfológica por Microscopia de luz.....	126
6.5.2.3. Microscopia de Fluorescência.....	129
6.5.2.4. Análise Morfométrica.....	130
6.5.2.4.1. Metodologia de Avaliação Histomorfométrica.....	130
6.5.2.4.3 Avaliação histomorfométrica com marcação imunohistoquímica para Acetilcolinesterase.....	133
6.5.2.4.3 Avaliação Histomorfométrica com marcação imunohistoquímica para Periferina.....	136
6.5.2.4.4. Resumo analítico da avaliação histomorfométrica.....	138
6.6. Referências Bibliográficas.....	139
Capítulo 7.....	143
7.1. Discussão.....	143
7.1.1. A vascularização do nervo mediano humano e a comparação com a vascularização do nervo isquiático do rato Wistar.....	143
7.1.2. Vascularização do Plexo Braquial do Rato Wistar.....	145
7.1.3. Reconstrução de Defeito no Nervo Periférico através da utilização de diferentes condutos e na presença de um fornecimento vascular axial; modelo animal: o rato Wistar ..	147
7.2. Conclusões e Perspetivas de Futuro.....	149
7.3. Referências Bibliográficas.....	150

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 - Nódulo de Ranvier (1) e Internódulo (2) do nervo isquiático do Rato Wistar.....	Pág. 5
Figura 1.2 - Corte histológico transversal de nervo isquiático corado com hematoxilina-eosina onde se pode observar: endonervo (1), arteríola (2), núcleo de célula de Schwann (3), axónio mielínico (4) e axónio amielínico.....	Pág. 6
Figura 1.3 - Corte histológico transversal de nervo isquiático corado com azul de toluidina demonstrando fibras mielínicas (1) com uma espessa bainha de mielina e com fibras amielínicas (2) sem espessura de mielina nas suas bainhas.....	Pág. 6
Figura 1.4 - Esquema da anatomia do Nervo.....	Pág. 7

Capítulo 2

Figura 2.1 - Rato em posição cirúrgica.....	Pág. 19
Figura 2.2 - Músculo Bicípíte Femoral seccionado.....	Pág. 19
Figura 2.3 - Nervo isquiático exposto.....	Pág. 19
Figura 2.4 - A - Injecção de <i>Micropaque</i> na aorta abdominal; B e C - Aspecto do rato após a injecção.....	Pág. 26

Capítulo 3

Figura 3.1 - Representação esquemática do suprimento vascular dos nervos periféricos.....	Pág. 39
Figura 3.2 - Diagrama simplificado que ilustra o suprimento vascular arterial dos nervos periféricos do membro superior.....	Pág. 40
Figura 3.3 - Diagrama esquemático dos quatro tipos de drenagem venosa.....	Pág. 41
Figura 3.4 - Representação esquemática dos tipos de drenagem venosa do nervo periférico.....	Pág. 42
Figura 3.5 - Representação esquemática das estruturas do nervo periférico.....	Pág. 43
Figura 3.6 - Imagens das ultra-estruturas do nervo periférico em MEV.....	Pág. 43
Figura 3.7 - Nervo Mediano Humano, após injecção arterial de <i>Micropaque</i> , e diafanização, observado em lupa estereoscópica e transiluminação.....	Pág. 44
Figura 3.8 - Fotografia de aspecto medial da dissecação do braço direito.....	Pág. 46
Figura 3.9 - Fotografias do nervo mediano humano (A e B), injectado previamente com um contraste colorido intravascular.....	Pág. 47
Figura 3.10 - Nervo Mediano (seta 1) e a sua drenagem venosa indirecta (seta 2) para a veia próxima, derivada de um músculo; drenagem venosa do tipo B.....	Pág. 48
Figura 3.11 - A - Fotografia da Diafanização do Nervo Mediano Humano.....	Pág. 49
Figura 3.11 - B - Fotografia da Diafanização do Nervo Mediano Humano onde se identificam os vasos epineurais (1) emitindo múltiplos ramos oblíquos que suprimem os plexos perineurais (2) e endoneurais (3).....	Pág. 50
Figura 3.11 - C - Fotografia de corte transversal da Diafanização do Nervo Mediano Humano.....	Pág. 50
Figura 3.12 A - Impressão dos núcleos das células endoteliais da arteríola.....	Pág. 52
Figura 3.12 B - Impressão dos núcleos das células endoteliais da arteríola, numa ampliação 50 x.....	Pág. 52
Figura 3.13 - Impressão do núcleo das células endoteliais da veia, numa ampliação 500 x.....	Pág. 53
Figura 3.14 - Origem dos capilares. Ampliação 100 x.....	Pág. 53
Figura 3.15 - Fotografia da origem dos capilares.....	Pág. 54
Figura 3.16 A - Origem dos capilares, numa ampliação 100 x.....	Pág. 54
Figura 3.16 B - Fotografia de pormenor da origem dos capilares.....	Pág. 55
Figura 3.17 - Válvula venosa.....	Pág. 55
Figura 3.17 A - Válvulas da íntima.....	Pág. 56
Figura 3.17 B - Pormenor da Figura 3.17 A.....	Pág. 56
Figura 3.18 - Imagens de Capilares. Ampliação 500 x.....	Pág. 57
Figura 3.19 - Grande ampliação de um corte transversal de nervo observado em MEV (ponto crítico) demonstrando o plexo vascular endoneural.....	Pág. 58
Figura 3.20 - Grande ampliação de um corte transversal de um nervo observado em MEV (ponto crítico) demonstrando um fascículo (F) com o perinervo (P) e a sua vascularização (A), e o plexo vascular endoneural (B e C), numa ampliação 200 x.....	Pág. 58
Figura 3.21 - Molde vascular após a injecção arterial de <i>Mercox</i>	Pág. 59
Figura 3.22 - Nervo mediano humano no braço observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 100 x; barra 100 µm).....	Pág. 59
Figura 3.23 - Nervo mediano humano no braço observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 75 x; barra 100 µm).....	Pág. 60

Figura 3.24 – Outra imagem do nervo mediano humano no braço, observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 75 x; barra 100 µm).....	Pág. 60
Figura 3.25 - Nervo mediano no braço, observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 50 x; barra 500 µm).....	Pág. 61
Figura 3.26 - Nervo mediano humano em microscopia óptica; coloração com hematoxilina-eosina (A) demonstrando os vasos.....	Pág. 62
Figura 3.27 – Uma secção de nervo mediano humano (B) em microscopia óptica (ampliação 100 x).....	Pág. 62

Capítulo 4

Figura 4.1 A - Habitual disposição dos elementos constituintes do plexo braquial (PB) no rato Wistar.....	Pág. 67
Figura 4.1 B - Desenho esquemático da disposição mais habitual dos constituintes do PB do rato Wistar, de acordo com o nosso estudo.....	Pág. 68
Figura 4.1 C - Aspecto ventral da dissecção da pata esquerda expondo a anastomose usual entre o segundo nervo intercostal e os nervos cutâneo braquial medial e cutâneo antebraquial.....	Pág. 68
Figura 4.2 A - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito do rato expondo a vascularização arterial do plexo a partir das artérias vizinhas ao nível das raízes (ampliação 16 x).....	Pág. 69
Figura 4.2 B - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito do rato demonstrando a vascularização arterial do plexo a partir das artérias vizinhas ao nível dos troncos (ampliação 16 x).....	Pág. 69
Figura 4.2 C - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito do rato expondo a vascularização arterial do plexo a partir das artérias vizinhas dos ramos terminais (ampliação 25 x).....	Pág. 70
Figura 4.3 A - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito demonstrando a vascularização arterial (vermelho) e venosa (azul) para os elementos nervosos.....	Pág. 70
Figura 4.3 B - Pormenor do nervo escapular dorsal, ilustrando o facto de que, frequentemente os nervos que entram nos músculos recebem ramos arteriais e venosos dos vasos que irrigam os músculos vizinhos.....	Pág. 71
Figura 4.4 A - Foto da dissecção da pata direita demonstrando a dissecção do nervo cutâneo medial braquial (ampliação 10 x).....	Pág. 72
Figura 4.4 B - Foto de grande ampliação demonstrando o paralelismo entre o nervo cutâneo braquial e uma artéria e veia com origem e término, respectivamente, nos vasos axilares (ampliação 40 x).....	Pág. 72
Figura 4.4 C - Dissecção do PB esquerdo demonstrando a vascularização arterial (vermelho) e venosa (azul) dos elementos nervosos.....	Pág. 73
Figura 4.5 - Imagens de microscopia óptica da vascularização do plexo braquial.....	Pág. 74
Figura 4.6 - Num segmento de um molde vascular de corrosão do plexo braquial do rato (antes da metalização) do tronco superior é possível observar uma densa rede vascular intraneural - o plexo vascular intraneural (ampliação 40 x).....	Pág. 74
Figura 4.7 - Plexo Braquial do rato num segmento de um molde vascular de corrosão do tronco superior onde é possível observar uma densa rede vascular epineural (A) com múltiplas anastomoses em direcção ao plexo vascular intraneural (B) (ampliação 75 x - barra 100 µm).....	Pág. 75
Figura 4.8 A - Imagens de Microscopia electrónica de varrimento da vascularização do plexo braquial do rato.....	Pág. 75
Figura 4.8 B - Um segmento do tronco superior sem corrosão demonstrando vasos numerosos a suprimir a superfície do tronco nervoso e a formar um plexo vascular epineural (35 x - barra 500 µm).....	Pág. 76
Figura 4.8 C - Um segmento sem corrosão de corte transversal da raiz C7 do PB, demonstrando uma artéria epineural (seta) a percorrer obliquamente por cima do nervo e a formar parte do plexo epineural (ampliação 50 x - barra 100 µm).....	Pág. 76
Figura 4.8 D - Numa secção transversa dum molde vascular com corrosão do tronco superior é possível observar o denso plexo vascular intraneural interligado aos vasos extraneurais vizinhos (ampliação 50 x - barra 100 µm).....	Pág. 77
Figura 4.9 - Numa secção transversa do tronco superior sem corrosão é possível observar o denso plexo vascular epineural (1), intraepineural (2), perineural (3) e endoneural (4).....	Pág. 77

Capítulo 5

Figura 5.1 A - Percurso e distribuição do nervo isquiático.....	Pág. 83
Figura 5.1 B - Fotografia de um dos ramos terminais do nervo isquiático ilustrando o contributo, dos inúmeros vasos em redor, neste caso, dos vasos poplíteos e dos ramos dos vasos que suprimem os músculos vizinhos, para o plexo epineural.....	Pág. 84
Figura 5.1 C - Fotografia realçando a proximidade topográfica entre o nervo isquiático, o nervo peroneal comum e os vasos maiores no dorso do membro, os quais fornecem ramos para os nervos.....	Pág. 84
Figura 5.1 D - Ampliação de 25 x demonstrando os vasos epineurais com um ramo transverso anastomótico entre eles.....	Pág. 85
Figura 5.1 E - Exemplo do contributo, para os vasos epineurais, dos ramos dos grandes vasos vizinhos e dos vasos fornecidos pela vascularização dos músculos inervados por aquele nervo.....	Pág. 85
Figura 5.1 F - Área incluída na caixa representada na Figura 5.1 E.....	Pág. 86

Figura 5.2 - Fotografia da dissecação do nervo isquiático ilustrando os vasos epineurais e as anastomoses entre eles.....	Pág. 86
Figura 5.3 - Fotografia da dissecação do nervo isquiático ilustrando os vasos epineurais e as anastomoses entre eles.....	Pág. 87
Figura 5.4 A - Fotografia de um molde vascular de corrosão do nervo isquiático: grande artéria isquiática comitante, artéria anastomótica suprimindo o nervo, (3) artéria poplítea.....	Pág. 87
Figura 5.4 B - Porção mediana do nervo isquiático demonstrando os vasos epineurais e perineurais com origem na artéria isquiática comitante	Pág. 88
Figura 5.5 A - Fotografia do nervo isquiático do rato em diafanização, injectado com um contraste colorido intravascular, demonstrando o plexo vascular longitudinal epineural.....	Pág. 88
Figura 5.5 B - Fotografia do nervo isquiático do rato em diafanização, injectado com um contraste colorido intravascular, demonstrando múltiplos vasos anastomóticos epineurais transversos e oblíquos na superfície do epinervo.....	Pág. 89
Figura 5.5 C - Fotografia em diafanização, de um corte transverso do nervo isquiático do rato.....	Pág. 89
Figura 5.6 - Imagens de microscopia electrónica de varrimento da vascularização do nervo isquiático do rato.....	Pág. 90
Figura 5.7 A - Fotografia da vascularização do nervo isquiático do rato em microscopia óptica, numa ampliação 40 x da secção do nervo, corada com hematoxilina-eosina para mostrar os vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais.....	Pág. 91
Figura 5.7 B - Fotografia de ampliação 100 x de uma secção do nervo isquiático do rato com imunocorante CD-31 para mostrar os vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais.....	Pág. 91

Capítulo 6

Figura 6.1. - A - Membrana amniótica humana; B - Tubo de Membrana amniótica humana.....	Pág. 98
Figura 6.2. - C - Tubo de membrana amniótica humana interposto entre as extremidades do nervo isquiático.....	Pág. 98
Figura 6.3 A - Plexo vascular epineural; B - Excisão de 7 mm de nervo isquiático com preservação do plexo epineural.....	Pág. 100
Figura 6.4 - Exemplo de auto enxerto de nervo com plexo epineural preservado; anastomose epineural com pontos separados de <i>Nylon 10/0</i>	Pág. 101
Figura 6.5 - Representação esquemática de enxerto autólogo de nervo com anastomoses epineurais.....	Pág. 101
Figura 6.6 - Exemplo de enxerto de veia jugular externa autóloga do rato Wistar.....	Pág. 102
Figura 6.7 - Exemplo de reconstrução com conduto de membrana amniótica humana.....	Pág. 103
Figura 6.8 - Fotografia do corredor de madeira onde se pode ver a impressão das pagadas ao caminhar ao longo do corredor.....	Pág. 104
Figura 6.9 A - Exemplo da impressão das patas do nervo isquiático normal e do nervo isquiático experimental; B - Fotografia da parte plantar da pata normal: representação anatómica dos parâmetros para a obtenção do índice de funcionalidade do isquiático - <i>sciatic functionality index</i> (SFI).....	Pág. 105
Figura 6.10 - A Representação prática dos parâmetros numa pegada normal; B - A mesma pegada normal sem a marcação dos parâmetros.....	Pág. 106
Figura 6.11 - A - Exemplo de representação dos parâmetros nas pegadas em marcha para o cálculo do SFI às 12 semanas num animal do Grupo A; N - pata normal; E - pata experimental resultante de enxerto de nervo autólogo com preservação da plexo epineural; B - O mesmo registo da impressão das pegadas em marcha sem a representação dos parâmetros.....	Pág. 106
Figura 6.12 A - Exemplo de representação dos parâmetros nas pegadas em marcha para o cálculo do SFI às 12 semanas num animal do Grupo B; N - pata normal; E - pata experimental resultante de enxerto de veia autóloga com preservação da plexo epineural; B - O mesmo registo da impressão das pegadas em marcha sem a representação dos parâmetros.....	Pág. 107
Figura 6.13 - A - Exemplo de representação dos parâmetros nas pegadas em marcha para o cálculo do SFI às 12 semanas num animal do Grupo C; N - pata normal; E - pata experimental resultante de enxerto de MAH com preservação do plexo epineural; B - O mesmo registo da impressão das pegadas em marcha sem a representação dos parâmetros.....	Pág. 107
Figura 6.14 - Fotografia do rato em posição exemplificativa para a obtenção da MNCV.....	Pág. 108
Figura 6.15 - Fotografia de exemplo do grupo de músculos gêmeos e solhear.....	Pág. 109
Figura 6.16 - Fotografia de regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto autólogo de nervo com a vascularização extrínseca preservada (Grupo A).....	Pág. 110
Figura 6.17 - Fotografia de regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto veia jugular autóloga (Grupo B), com a vascularização extrínseca preservada.....	Pág. 110
Figura 6.18 A - Fotografia da regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto com MAH com a vascularização extrínseca preservada (Grupo C)	Pág. 111
Figura 6.18 B - Pormenor da Figura 6.17 - Fotografia da regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto com MAH com vascularização extrínseca preservada (Grupo C).....	Pág. 111
Figura 6.19 - A - colagénio-1 ant-humano; B - colagénio-1 ant-rato.....	Pág. 112
Figura 6.20 - Fotografia de coloração com hematoxilina-eosina a expor a presença da MAH.....	Pág. 112

Figura 6.21 - Fotografias de histologias do Grupo A; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo autólogo, na presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 113
Figura 6.22 - Fotografias de histologias do Grupo A; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo autólogo na presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 114
Figura 6.23 - Fotografias de histologias do Grupo B; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de veia autóloga na presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 114
Figura 6.24 - Fotografias de histologias do Grupo B; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de veia autóloga na presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 115
Figura 6.25 - Fotografias de histologias do Grupo C; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de MAH, na presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 115
Figura 6.26 - Fotografias de histologias do Grupo C; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de MAH, na presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 116
Figura 6.27 - Fotografias de histologias do Grupo D; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo autólogo sem a presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 117
Figura 6.28 - Fotografias de histologias do Grupo E; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de veia autóloga sem a presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 118
Figura 6.29 - Fotografias de histologias do Grupo F; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de conduto de MAH sem a presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 119
Figura 6.30 - Fotografias de histologias do Grupo F; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto conduto de MAH, sem a presença de vascularização epineural extrínseca.....	Pág. 119
Figura 6.31 - Fotografia das patas posteriores onde se expõe úlcera da pata dt. referente ao nervo isquiático dt. operado.....	Pág. 121
Figura 6.32 - A - Exemplo da medida típica da força de flexão ao nível do tornozelo do membro posterior do rato submetido a reconstrução do nervo com enxerto de veia (Grupo B); B - Medida da força de flexão no tornozelo do membro contra-lateral normal.....	Pág. 123
Figura 6.33 - Exemplo de moldes vasculares de corrosão prévios à metalização.....	Pág. 124
Figura 6.34 - Porção proximal do enxerto nervoso.....	Pág. 125
Figura 6.35 - Imagem de microscopia electrónica de varrimento dos plexos neovasculares endoneural, perineural e epineural do nervo isquiático, na zona de regeneração (ampliação 100 x - barra 100 µm).....	Pág. 125
Figura 6.36 - Fotografia de Diafanização da zona de regeneração no nervo isquiático, onde se pode observar um denso plexo neovascular epineural e a continuidade desse plexo epineural através da zona de reparação nervosa.....	Pág. 126
Figura 6.37 - Fotografias de Microscopia na 12. ^a semana de pós-operatório, apresentando diferentes aspectos histológicos do nervo isquiático distalmente ao defeito nervoso criado no Grupo A (ratos submetidos a enxerto de nervo autólogo).....	Pág. 127
Figura 6.38 - Fotografias de Microscopia na 12. ^a semana de pós-operatório, apresentando diferentes aspectos histológicos do nervo isquiático distalmente ao defeito nervoso criado no Grupo B (ratos submetidos a enxerto de veia jugular externa autóloga).....	Pág. 128
Figura 6.39 - Fotografias de Microscopia na 12. ^a semana de pós-operatório, apresentando diferentes aspectos histológicos do nervo isquiático distalmente ao defeito nervoso criado no Grupo C (ratos submetidos a enxerto de conduto de membrana amniótica humana imunoinerte MAH).....	Pág. 129
Figura 6.40 - Típica marcação retrógrada com o marcador <i>True Blue</i>	Pág. 130

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Comparação do índice funcional do nervo isquiático nos diferentes grupos às 4, 8 e 12 semanas.....	Pág. 122
Tabela 2 - Percentagem do peso dos músculos gêmeos e solhear às 12 semanas de recuperação nos diferentes grupos.....	Pág. 123
Tabela 3 - Quadro do número médio de fibras marcadas para neurofilamentos e respectiva densidade média.....	Pág. 131
Tabela 4 - Número médio de fibras marcadas para neurofilamentos.....	Pág. 131
Tabela 5 - Densidade média das fibras marcadas para neurofilamentos.....	Pág. 132
Tabela 6 - Quadro representativo do número médio de fibras marcadas com Acetilcolinesterase e respectiva densidade média.....	Pág. 133
Tabela 7 - Número médio de fibras marcadas com Acetilcolinesterase.....	Pág. 134
Tabela 8 - Densidade média de fibras marcadas com Acetilcolinesterase.....	Pág. 135
Tabela 9 - Número médio de fibras marcadas com Periferina.....	Pág. 136
Tabela 10 - Número médio de fibras marcadas com Periferina.....	Pág. 137
Tabela 11 - Densidade média de fibras marcadas com Periferina.....	Pág. 138

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

BP	<i>Brachial Plexus</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
E	Experimental
ECM	Extracelular Matriz
EIT	<i>Experimental Intermediate Toe Spread</i>
EPL	<i>Experimental Print Length</i>
ETS	<i>Experimental Toe Spread</i>
ITS	<i>Intermediate Toe Spread</i>
MAH	Membrana Amniótica Humana
MEV	Microscopia Electrónica de Varrimento
MNCV	<i>Motor Nerve Conduction Velocity</i>
N	<i>Normal</i>
NIT	<i>Normal Intermediate Toe Spread</i>
NPL	<i>Normal Print Length</i>
NTS	<i>Normal Toe Spread</i>
PB	Plexo Braquial
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PL	<i>Print Length</i>
SFI	<i>Sciatic Functionality Index</i>
SNA	Sistema Nervoso Autónomo
TB	<i>True Blue</i>
TS	<i>Toe Spread</i>

Preâmbulo

O meu interesse pela cirurgia iniciou-se muito cedo quando, depois da licenciatura em Medicina, antes do início do Internato Geral, realizei um estágio voluntário de cirurgia geral com o Dr. António Galhordas, recentemente falecido. O rigor e preciosismo com que realizava as técnicas cirúrgicas e o respeito e carinho que tinha para com os doentes foram grandes referências na minha vida profissional. Foi ele que me ajudou nos meus primeiros passos em cirurgia, de tal forma que me motivou a realizar o Internato da Especialidade de Cirurgia Geral que completei, embora já com interesse pela cirurgia plástica reconstrutiva, pela versatilidade que era possível e pela minúcia, podendo melhorar ou encontrar novas técnicas.

Durante a realização do Internato da Especialidade de Cirurgia Plástica com o Dr. Elias Damião Pires, cirurgião plástico nacional e internacional conceituado, como responsável pela minha formação, tive, desde logo, um grande interesse pelas técnicas microcirúrgicas, tendo até realizado um curso de microcirurgia ministrado pelo notável cirurgião plástico e cirurgião da mão, o italiano Ezio Morelli, o que também me entusiasmou a efectuar um estágio no seu serviço onde, de facto, tive a oportunidade de colaborar em microcirurgias dos nervos periféricos, particularmente em cirurgias do Plexo Braquial.

Na mesma altura, o Professor João Patrício de Coimbra, reconhecido internacionalmente pelo seu mérito na microcirurgia reconstrutiva, entusiasmou-me para o ensino prático das técnicas microcirúrgicas, convidando-me como monitora para os seus cursos de iniciação à microcirurgia realizados no animal de experimentação.

Todos estes factores contribuíram para o início deste meu percurso.

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO HISTÓRICA DA REPARAÇÃO DO NERVO PERIFÉRICO

Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.

Albert Einstein

1.1. Introdução

Os investigadores ao nível mundial têm procurado compreender o que ocorre na clínica em caso de lesão nervosa, seja esta traumática ou cirúrgica.

Durante muitos anos, só a fibra nervosa interessou os anatomistas e fisiologistas. O tecido conjuntivo e os vasos sanguíneos embaraçavam as análises experimentais e foram, por isso, afastados dos estudos.

Nos últimos anos, têm sido publicadas várias centenas de artigos sobre o fenómeno da regeneração nervosa, o que se deve ao facto de que, na maior parte das vezes, a recuperação funcional não é atingida de uma forma satisfatória, sobretudo nas lesões com extensa perda de tecido nervoso reparado com enxertos.

A recuperação funcional é aquilo que de mais importante se segue à lesão nervosa, ainda que a técnica cirúrgica tenha sido a mais adequada. Raramente, na clínica, essa recuperação funcional é atingida na sua totalidade, considerando que a reinervação, quer motora, quer sensitiva, ocorre com maior ou menor *deficit*.¹

Interessa, por isso, compreender o fenómeno da regeneração nervosa e quais os factores que podem interferir nesta regeneração, tendo em conta que os mesmos são responsáveis, na clínica, pelas sequelas motoras e/ou sensitivas nas lesões nervosas traumáticas ou cirúrgicas.

As repercussões das alterações vasculares no que diz respeito aos nervos periféricos e às alterações hemodinâmicas afectam a fisiopatologia de muitos quadros clínicos mórbidos. De entre eles, salientam-se as alterações provocadas por acidentes traumáticos, por ruptura, por estiramento, por compressão ou por acção cirúrgica. Contudo, continua ainda a ser pouco conhecida a influência da vascularização do nervo periférico em caso de lesão nervosa.

Portanto, o estudo da vascularização do nervo e a investigação sobre a forma como essa vascularização pode interferir na regeneração nervosa, em caso de lesão, são de grande interesse, pois o seu conhecimento poderá contribuir para melhorar as estratégias de abordagem das lesões nervosas e para inovar as técnicas cirúrgicas no tratamento das lesões do nervo periférico.

1.2. Breve Revisão Histórica

Médicos e filósofos da Idade Antiga já recomendavam a reparação dos nervos em caso de lesão. Contudo, a História da reparação dos nervos periféricos e o estudo da regeneração nervosa só teve início em 1850, visto que, até então, o conceito de reparação directa do nervo não era aceite. O período entre 1850 e 1900 caracterizou-se por ter sido muito rico em novas descobertas do conhecimento médico.² Nessas descobertas, surge também o conceito de reparação do nervo.

É, então, no Século XIX, que se dá início à reparação e à reconstrução de nervos periféricos e ao estudo da regeneração nervosa. É de destacar que, já em 1828, Marie Jean Pierre Flourens, fisiologista francês, fundador da ciência experimental sobre o cérebro e pioneiro em anestesia, transpôs nervos dos músculos extensores de asas de galo para os músculos flexores^{3,4}, tendo até publicado os resultados no seu artigo original *Recherches experimentales sur les propriétés et les fonctions du système nerveux dans les animaux vertébrés*.

Alguns autores como Paget, em 1847, defendiam a reparação imediata em caso de lesão extensa do nervo, e Paget até descreveu o caso de um doente com 11 anos, em que uma secção do nervo mediano foi reparada, alcançando a recuperação completa num prazo de um mês.

Em 1850, Augustus Waller apresentou o seu trabalho clássico demonstrando a degenerescência distal pós-secção do nervo, que ainda é hoje designada “degenerescência Walleriana”. No seu laboratório, com equipamento primitivo, estudou também a regeneração nervosa dos nervos glossofaríngeos e hipoglosso da rã, e demonstrou não só a degenerescência distal, mas também a progressão da regeneração a partir do cilindro-eixo. Waller, verificou também que a regeneração era mais rápida no jovem do que no adulto, e que a estimulação galvânica não aumentava a velocidade de recuperação.⁵

Em 1864, Weir Mitchell descreveu as lesões nervosas por arma de fogo e, pela primeira vez, a causalgia. É, por isso, interessante rever a história do enxerto nervoso que começou na Era Listeriana. Em Novembro de 1866, Lister escreveu uma carta ao seu amigo *Sir Hector Cameron* sobre uma paciente com um tumor do nervo isquiático, sugerindo que seria vantajoso, depois de removido o tumor, formar um “canal” com fio de *catgut* entre as duas extremidades do nervo para que um novo tecido nervoso pudesse crescer dentro desse canal, para reinervar a extremidade distal do nervo isquiático.

Philipeaux e Vulpian, por sua vez, em 1870, realizaram uma experiência na qual utilizaram o nervo sublingual como ponte para reparar um defeito do nervo hipoglosso. Em 1872, Weir publicou o seu trabalho clássico *Injuries of Nerve and Their Consequences*.

Cirurgiões britânicos, ao fazerem a revisão da cirurgia durante a Primeira Guerra Mundial, concluíram que o enxerto autólogo de nervo não tinha tido êxito até então⁶, verificando-se efectivamente um retrocesso no enxerto nervoso, o que levou a um retardamento no progresso desta matéria, aproximadamente em 20 anos. Já no Séclo XX, nomes como Tinel, Seddon, Woodhall, Moberg e Barners Woodhall dos Estados Unidos destacaram-se pelo contributo que deram nos grandes avanços da reparação dos nervos periféricos, em caso de lesão.

Durante a Primeira Guerra Mundial, Tinel, em França, e Hoffman, na Alemanha, estudaram a regeneração dos nervos submetidos a reconstrução. Tinel, em 1915, publicou um artigo sobre a regeneração nervosa em que descreveu a dor como um sinal de irritação nervosa e o *tingling* ou formigueiro como um sinal de regeneração axonal. Curiosamente, Tinel, durante a Segunda Guerra Mundial, esteve preso durante dois anos pelo seu trabalho em França, nos subterrâneos.

Bunell, em 1927, publicou um artigo original sobre o enxerto nervoso digital.⁷ Muito do que se sabe hoje sobre a regeneração nervosa deve-se a Ramón Y. Cajal (1928)²⁷, que desenvolveu conceitos importantes sobre o crescimento do axónio seccionado, a formação de cones crescentes, a reordenação em novos fascículos dos axónios em crescimento e a orientação dos novos axónios para os seus tecidos-alvo.

Em 1942, Sanders fez a revisão da história do enxerto nervoso que fora reportada na experimentação animal e preconizou o uso de auto-enxerto nervoso no tratamento dos doentes com perdas de nervo de grande extensão.⁸ Na Austrália, Sir Sidney Sunderland (1945) não pode deixar de ser referido pelo seu trabalho exaustivo na descrição detalhada da anatomia interna do nervo periférico. O seu trabalho suporta o conceito de agrupamento fascicular na reparação e reconstrução nervosa.^{9,10}

Nos Estados Unidos, Barnes Woodhall¹¹, um neurocirurgião de destaque, liderou os cirurgiões militares americanos na área dos nervos periféricos e na sua reconstrução.¹² Woodhall e Seddon são duas figuras que estudaram e interpretaram a reparação nervosa primária e secundária, a reconstrução nervosa com pontes de nervo e os enxertos nervosos em cabo. Estes estudos ainda são válidos, hoje em dia.

Herbert Seddon, em 1947, e de novo, em 1963, descreveu o sucesso em mais de 100 doentes com enxertos nervosos^{13,14}, sobretudo em crianças e em pequenos nervos como os nervos digitais. Seddon alcançou uma importante conclusão que indicava que os resultados do enxerto nervoso nos dedos eram melhores do que os da sutura secundária. Seddon, com a colaboração de outros cirurgiões ingleses de guerra, descreveu também as lesões dos nervos periféricos, do plexo braquial aos nervos digitais.^{14,15} As regras *standard* para os actuais procedimentos na reparação nervosa e no enxerto nervoso baseiam-se ainda nestes trabalhos. Seddon continuou o seu trabalho clínico e de investigação nesta matéria até à sua morte em 1977.^{16,17}

Erik Moberg (1966), na Suécia, demonstrou a importância da avaliação da recuperação da sensibilidade com o teste da discriminação de dois pontos, ainda hoje utilizado na prática clínica.^{18,19}

Millesi, Meissl e Berger (1972), com os seus trabalhos experimentais^{20,21} contribuíram com importantes noções sobre a regeneração nervosa, nomeadamente no que diz respeito ao resultado da reparação nervosa e à quantidade de proliferação de tecido conjuntivo no local da sutura. Concluíram, então, que a remoção do epinervo levaria a uma menor produção de tecido conjuntivo cicatricial na sutura. Estes autores verificaram também que uma sutura do nervo sob tensão comprometia a regeneração nervosa e levava a uma maior produção de tecido de cicatriz, o que impedia a regeneração axonal, resultando numa recuperação funcional comprometida.

Como tal, Millesi, Meissl e Berger²¹ compararam o enxerto de nervo e a sutura nervosa epineural sob tensão e concluíram que os resultados com enxerto nervoso eram melhores do que os

com da sutura sob tensão. Millesi²⁰, num segundo trabalho experimental, concluiu que, em condições favoráveis, não havia diferença entre os resultados obtidos com a sutura sem tensão e os resultados com enxerto de nervo.

Lundborg (1979)²², por sua vez, sugeriu que o segredo da regeneração nervosa não dependia apenas da técnica cirúrgica, nem do material de sutura, nem do uso do microscópio cirúrgico, mas de um meio óptimo em que os potenciais factores neurotróficos pudessem actuar livremente.

Apesar dos muitos autores que se dedicaram ao estudo da regeneração nervosa, e que serão referidos neste estudo, e dos consideráveis avanços nas técnicas de reparação nervosa que surgiram nos últimos 150 anos, os resultados são ainda imprevisíveis²³⁻²⁶, ou seja, ainda não são inteiramente aceitáveis, revestindo-se de um maior ou menor grau de *deficit* na recuperação funcional ou sensitiva.

1.3. Morfologia e Fisiologia do Nervo Periférico

O conhecimento da anatomia, da histologia e da fisiologia do nervo periférico é fundamental para o estudo e compreensão do fenómeno da regeneração nervosa em caso de lesão total ou parcial.

O sistema nervoso periférico tem como unidade anatómica o neurónio que, por sua vez, é constituído pelo corpo celular, pelo axónio, pelos dendritos (ramificações apicais) e pelos telodendros (ramificações finais do axónio que estabelecem contacto com outros neurónios). Quando o corpo celular ou soma tem a sua localização na substância cinzenta ventral da espinhal medula, o neurónio é do tipo motor; quando, por outro lado, está localizado no gânglio da raiz dorsal, é designado neurónio sensitivo.

O centro metabólico do neurónio é o corpo celular e é a partir dele que, normalmente, têm origem os dois processos celulares: os dendritos e os axónios. O comprimento do axónio pode variar entre alguns milímetros e um metro. De forma cilíndrica e com um diâmetro entre 0,2 e 20 μm , muitos dos axónios são envolvidos pela bainha de mielina que sofre interrupções em intervalos regulares, designados nódulos de *Ranvier* (Figura 1.1).

Os nódulos de *Ranvier* são os pontos de contacto entre as diferentes células de *Schwann* ao longo dos axónios mielinizados e interrompem a bainha de mielina. São pequenas constrições com um comprimento de 1 μm , desprovidos de mielina. Do ponto de vista funcional, os nódulos de *Ranvier* são os únicos pontos ao longo das fibras mielinizadas que suportam os rápidos processos de despolarização e de repolarização necessários para a génese dos potenciais de acção, permitindo uma condução rápida dos impulsos eléctricos ao longo dos axónios.²⁷ Sendo o axónio a continuidade do neurónio ao longo de uma distância considerável, qualquer lesão localizada no seu trajecto terá consequências graves para a sobrevivência de todo o neurónio.

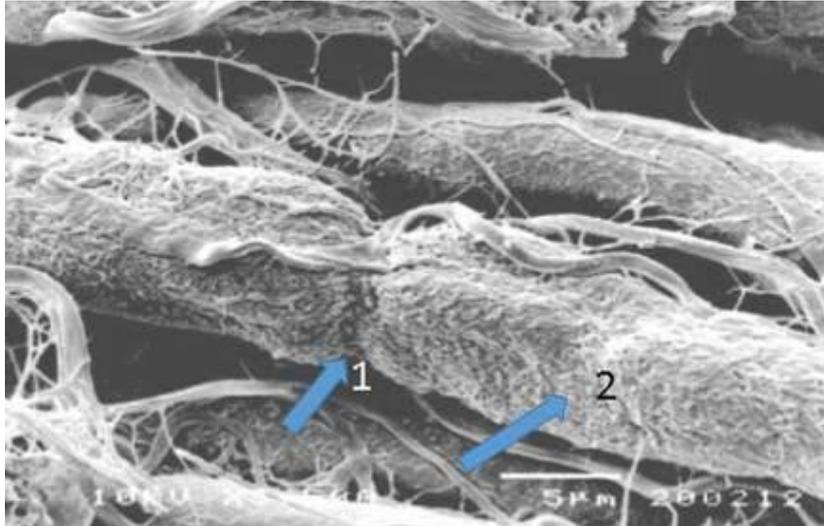


Figura 1.1 - Nódulo de Ranvier (1) e Internódulo (2) do nervo isquiático do Rato Wistar. Em Microscopia electrónica de varrimento (ponto crítico) - 3 500 x.

1.3.1. Fibra Nervosa

Por definición, a fibra nervosa comprende o conxunto do axónio con as células de *Schwann*. O nervo periférico é constituído por un feixe ou por varios feixes de fibras nervosas. As fibras motoras têm origem na substância cinzenta ventral da medula espinhal; por outro lado, as sensitivas no gânglio da raiz dorsal e as fibras simpáticas têm origem no gânglio simpático do sistema nervoso autónomo. As fibras agrúpan-se formando os feixes que são de número, padrão e dimensão variáveis conforme o tipo de nervo. As fibras nervosas são mielinizadas (mielínicas) e não mielinizadas (amielínicas) (Figura 1.2, Figura 1.3).

Os axónios são rodeados pelas células de *Schwann* tendo em conta que nas fibras mielinizadas uma célula de Schwann envolve apenas um único axónio, e o seu citoplasma dispõe-se em espiral em torno do mesmo, produzindo uma bainha de mielina rica em lípidos de 70 % e em proteínas de 60 %. Nas fibras não mielinizadas, uma célula de *Schwann* serve, em simultâneo, vários axónios.

As fibras nervosas não estão dispostas em unidades individuais, mas estão envolvidas por um tecido conjuntivo, o endonervo, e reúnem-se em fascículos que, por sua vez, estão envolvidos por um tecido conjuntivo designado perinervo. Os fascículos, por outro lado, estão agrupados pelo epinervo constituindo, assim, o nervo periférico²⁶ (Figura 1.4).

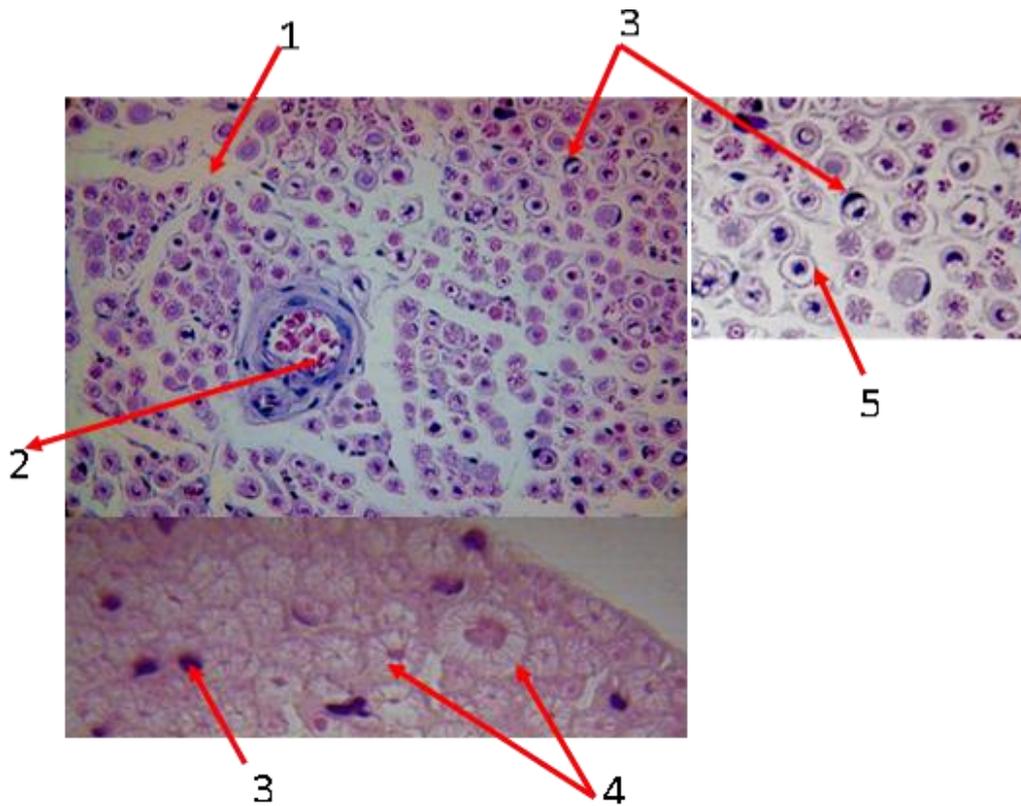


Figura 1.2 - Corte histológico transversal de nervo isquiático corado com hematoxilina-eosina onde se pode observar: endoneuro (1), arteríola (2), núcleo de célula de Schwann (3), axônio mielínico (4) e axônio amielínico (5).

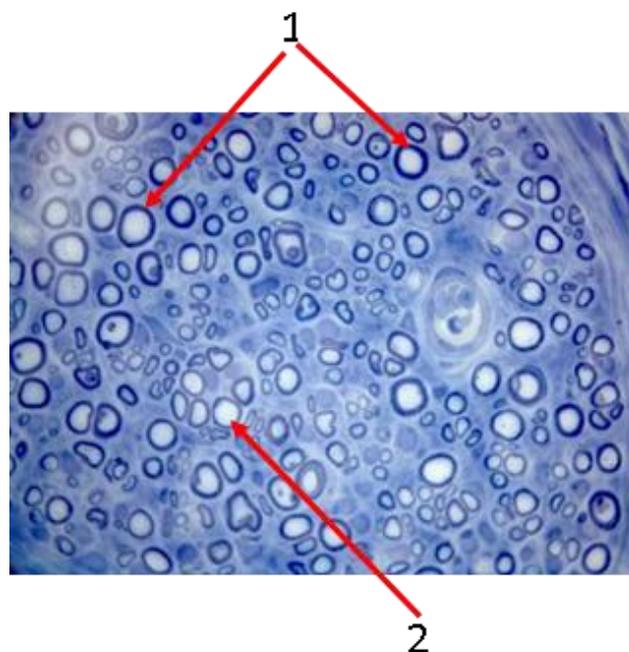


Figura 1.3 - Corte histológico transversal de nervo isquiático corado com azul de toluidina demonstrando fibras mielínicas (1) com uma espessa bainha de mielina e com fibras amielínicas (2) sem espessura de mielina nas suas bainhas.

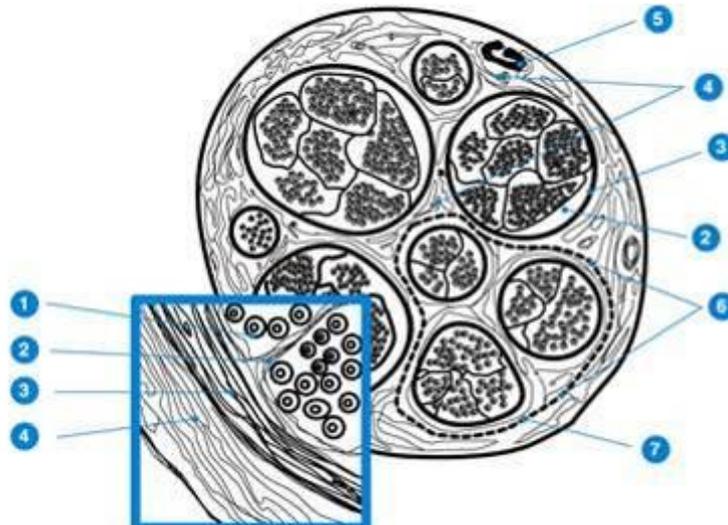


Figura 1.4 - Esquema da anatomia do Nervo: 1 - Fibra Nervosa; 2 - Endonervo; 3 - Perinervo; 4 - Epinervo; 5 - Vaso; 6 - Grupo de Fascículos; 7 - Fascículo Nervoso (Adaptado de David. P Green, 1988).

1.3.2. Vascularização do nervo periférico (breve referência)

A fisiopatologia de muitos quadros clínicos frequentes, como a ruptura, o estiramento ou a compressão do nervo periférico, está relacionada com alterações vasculares. Sabe-se que o axónio dos nervos periféricos é vulnerável à isquemia devido à grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axónio.²⁷⁻³⁰ Estudos experimentais e anatómicos comprovaram que o nervo periférico é uma estrutura bem vascularizada. O nervo periférico possui um sistema microvascular bem desenvolvido no epinervo, no perinervo e no endonervo.²⁹⁻³¹

Existem técnicas laboratoriais para o estudo da macro e da microvascularização dos tecidos e órgãos, enquanto parte destes, sendo as mais usadas a injeção e a dissecação, a injeção e a corrosão através de microscopia electrónica de varrimento para moldes microvasculares, a injeção e a diafanização e a histologia com os marcadores específicos para os vasos. Estas mesmas técnicas são particularmente válidas para o estudo da macro e da microvascularização do nervo periférico.

1.4. As Lesões dos Nervos Periféricos

O nervo periférico, ao longo do seu percurso anatómico da sua origem no forámen intervertebral à inervação dos seus órgãos-alvo, está sujeito a vários tipos de lesão. Os agentes das lesões podem ser múltiplos como uma compressão, uma laceração directa, um fenómeno de isquémia, entre outros. Na clínica, é fundamental ter conhecimento sobre os tipos de lesão que podem ocorrer, e sobre as estruturas do nervo que podem estar alteradas, conduzindo-se a uma classificação destas lesões. Os dois sistemas mais amplamente utilizados para a classificação das lesões do nervo periférico correspondem às propostas de Seddon e de Sunderland.

1.4.1. Classificação das Lesões do Nervo Periférico

A microestrutura dos troncos nervosos é a base para a classificação das lesões nervosas. O nervo periférico pode sofrer várias agressões ao longo de todo o seu percurso anatômico até à inervação dos seus órgãos-alvo.

Para a classificação das lesões do nervo periférico têm sido utilizadas as propostas de Seddon (Seddon, 1943; Seddon, 1972)^{16,17} e de Sunderland (Sunderland, 1951; Sunderland, 1978; Sunderland, 1990).^{1,10,34} Estes autores são considerados, por muitos investigadores, os “Pais da cirurgia do nervo periférico”.³²⁻³⁷ Como tal, as lesões do nervo periférico classificam-se, actualmente, da seguinte maneira:

1.4.1.1 Neurapraxia ou Lesão de Sunderland de tipo I: é apenas um bloqueio local na condução motivada por estiramento ou por compressão da fibra nervosa, mantendo-se a continuidade axonal e, por isso, não há degenerescência Walleriana, mas apenas a danificação da bainha de mielina.

Clinicamente, manifesta-se através de uma paralisia motora, enquanto as fibras sensitivas e as do sistema nervoso autónomo (SNA) estão preservadas. As fibras de maior diâmetro são as mais vulneráveis.

1.4.1.2 Axonotmese ou Lesão de Sunderland de tipo II: neste tipo de lesão, a compressão ou estiramento são mais intensos levando à descontinuidade do axónio e à consequente degenerescência Walleriana. Na axonotmese, os tubos do endonervo estão intactos permitindo uma regeneração dos axónios perfeitamente orientada até ao seu alvo periférico. O prognóstico destas lesões é também muito favorável.

A intervenção cirúrgica para a correcção deste tipo de lesão é através da neurólise e é apenas necessária para eliminar algum tecido fibroso que se tenha formado, mas os músculos podem sofrer alterações irreversíveis durante a reinervação.

1.4.1.3 Neurotmese ou Lesão de Sunderland de tipo III-VI-V: a neurotmese implica uma perda da continuidade dos axónios e de todos os elementos que constituem o nervo periférico (tubos do endoneurónio, do perinervo e do epinervo), o que leva a uma alteração total da anatomia do nervo. Nesta classificação, a neurotmese divide-se em três subgrupos segundo a continuidade ou descontinuidade das diferentes estruturas de suporte do nervo periférico.

1.4.1.4 Lesão de Sunderland de tipo III: existe uma perda de continuidade axonal e dos tubos do endonervo, mas com o perinervo preservado.

1.4.1.5 Lesão de Sunderland de tipo IV: existe uma perda de continuidade axonal e dos tubos do endonervo e do perinervo, embora o epinervo permaneça intacto.

1.4.1.6 Lesão de Sunderland de tipo V: o nervo periférico está completamente seccionado, resultando numa distância variável entre os segmentos neurais lesados.

Na neurotmeze, a regeneração espontânea não é possível e, por isso, é necessária a reparação cirúrgica do nervo com a finalidade de se restabelecer a continuidade para promover a regeneração nervosa e a reinervação dos órgãos-alvo.

1.5. Fisiopatologia do Nervo Periférico

Quando a fibra nervosa sofre uma agressão grave, seja por secção, isquémia ou esmagamento, seja por um processo inflamatório que origine uma interrupção da integridade do axónio, as fibras sofrem um processo degenerativo distal à lesão do axónio denominada degenerescência Walleriana.^{38.39.40}

Augustus Waller, em 1850, demonstrou que quando um nervo periférico sofre uma lesão grave, as fibras nervosas do segmento distal degeneram totalmente, enquanto as do segmento proximal à lesão sobrevivem. Contudo, também surgem alterações de tipo degenerativo no segmento proximal à lesão do nervo com a consequente reacção do corpo celular.

É indispensável a sobrevivência do neurónio para a regeneração axonal após a lesão, o que depende de vários factores como o tipo de neurónio, a idade e a proximidade do corpo celular. Quanto mais afastadas do corpo celular ocorrerem as lesões, maior será a probabilidade de sobrevivência do neurónio.^{1,32,33} De uma forma geral, os neurónios motores são menos susceptíveis à morte celular do que os nervos cranianos ou sensitivos.

As duas principais respostas do nervo periférico às lesões baseiam-se no alvo da agressão: a célula de *Schwann* ou o axónio. As doenças que afectam principalmente a célula de *Schwann* levam à perda de mielina, sendo este processo designado desmielinização segmentar.

O comprometimento primário do neurónio e do seu axónio leva à degenerescência axonal. Em algumas doenças, a degenerescência axonal pode ser seguida de regeneração axonal e de reinervação do órgão-alvo. Noutras, porém, existe uma atrofia musculoesquelética por desinervação e uma perda de axónios devido a uma anormalidade primária da própria fibra muscular chamada de miopatia.

1.5.1. Regeneração Axonal

Quando o neurónio sobrevive à lesão, o segmento proximal do nervo sofre uma degenerescência, geralmente, até ao primeiro nódulo de *Ranvier* proximal à lesão. Esta degenerescência cria uma pequena área de degenerescência *Walleriana*. No segmento proximal do nervo vão surgir os denominados cones de crescimento.

Os axónios emergem a partir dos nódulos de *Ranvier*, localizados a uma distância máxima de 6 mm proximal à lesão e designada zona germinativa.²⁷ O crescimento axonal é inicialmente lento, passando por um período de aceleração e, ao terceiro dia após a lesão, a sua velocidade passa a ser constante.

Quando a lesão do nervo periférico não é suficiente para interromper a continuidade da lâmina basal das células de *Schwann*, os axónios em regeneração penetram no segmento distal com um atraso de apenas 1 ou 2 dias. Pelo contrário, perante uma solução de continuidade entre os segmentos proximal e distal, este atraso poderá ser de várias semanas. A remielinização dos axónios em regeneração é iniciada através do contacto do axolema com as células de *Schwann* das bandas de *Bungner*. A extensão desta mielinização é determinada pelas dimensões do axónio.^{41,42}

Em 1986, foi apresentado o primeiro trabalho sobre a teoria da especificidade fascicular com a intenção de explicar o crescimento preferencial dos axónios em direcção aos órgãos-alvo, originalmente inervados por eles. Com a utilização de tubos-guia de polilactato e de silicone³⁹ demonstrou-se, do ponto de vista histológico, que as fibras do nervo peroneal crescem preferencialmente em direcção aos fascículos do nervo peroneal. As fibras motoras em regeneração vão inervar, de uma forma selectiva, os axónios motores do segmento distal.⁴³

Os investigadores que propõem a existência da especificidade fascicular recomendam a aplicação dos tubos-guia em detrimento da sutura topo-a-topo, quando a topografia fascicular não é reconhecida.^{43,44}

1.6. Referências Bibliográficas

1. Sunderland, S. (1990) *The anatomy and physiology of nerve injury*. *Muscle & Nerve*. 13.^a ed., pp. 771-784.
2. Garrison, F.H. (1929) *An Introduction to the History of Medicine*. 4.^a ed. Philadelphia, WB Saunders.
3. Spinner, M. (1978) *Injuries to the Major Branches of Peripheral Nerves of the Forearm*. 2.^a ed., Philadelphia, WB Saunders.
4. Bhattacharyya, Kalyan B. (2011) *Eminent Neuroscientists - Their Lives and Works*. 1.^a ed., Association of Neuroscientists of Eastern India Academic Publishers.
5. Boyes, J.A. (1976) *On the Shoulders of Giants*. JB Lippincott, Philadelphia.
6. Brooks, D. (1955) *The place of nerve grafting in orthopaedic surgery*. *J. Bone, Joint Surg*, 37A:299-305.
7. Bunnell, S. (1927) *Surgery of nerves of the hand*. *Surg. Gynecol Obstet*, 44:145.
8. Sanders, FK. (1942) *The repair of large gaps in the peripheral nerves*. *In Brain*, 65:281.
9. Sunderland, S. (1968) *Nerves and Nerve Injuries*. Williams & Wilkins, Baltimore.
10. Sunderland, S. (1978) *Nerves and Nerve Injuries*. 2.^a ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
11. Woodhall, B. (1956) Nulsen FE, White J.C., Davis L. Neuro-surgical implications. *In Woodhall B. Beebe C.W. ed. Peripheral Nerve Regeneration*, Washington DC, US Government Printing Office.
12. Walker, E.A. (1951) *History of Neurological Surgery*. Williams & Wilkins, Baltimore.
13. Seddon, H.J. (1947) *The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves*. *Br. J. Surg.*, 35:151.
14. Seddon, H.J. (1963) *Nerve grafting*. *J. Bone Surg.*, 45B:447.
15. Strange, FGStC. (1950) *Case report on pedicled nerve graft*. *Br. J. Surg.*, 37:331.
16. Seddon, H. (1943) *Three types of nerve injury*. *Brain*, 66, pp. 237-28.
17. Seddon, H.J. (1972) *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*. Williams & Wilkins, Baltimore,

18. Moberg, E. (1966) *Methods of examining sensibility of the hand*. In Flynn J.E. ed. *Hand Surgery*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 236.
19. Moberg, E. (1968) *Nerve repair in hand surgery - An analysis*. *Surg. Clin. North Am.*, Oct. 48:985.
20. Millesi, H.; Meiss, C. e Berger, A. (1972) *The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves*. *J. Bone Joint Surg.*, 54A:727-749.
21. Millesi, H.; Meiss, C. e Berger, A. (1976) *Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar and radial nerves*. *J. Bone Joint Surg.*, 58A:209-218.
22. Lundborg, C. (1979) *The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: Structural and functional aspects*. *J. Hand Surg.*, 4:34-41.
23. Larsen, R.D. e Posch, J.L. (1958) *Nerve injuries in the upper extremity*. *Arch Surg*, 77:469.
24. McEwan, L.E. (1962) *Median and ulnar nerve injuries*. *Aust NZ J. Surg.*, 32:89.
25. Sakellarides, H. (1962) *A follow up study of 172 peripheral nerve injuries in the upper extremity in civilians*. *J. Bone Joint Surg.*, 44A:140.
26. Wynn-Parry, C.B. e Salter, M. (1976) *Sensory re-education after median nerve lesions*. *Hand*, 8:250.
27. Cajal, R. (1928) *Degeneration and regeneration of the nervous system*. In DeFelipe J., Jones E.G., New-York, Oxford University Press, pp. 66-304 (reprinted in 1991).
28. Roberto, Maria Angélica (2011) *Reparação Nervosa; Reparação do Nervo Ciático - Suturas e Enxertos*. In Patrício, João A.B. ed. *Microcirurgia-Técnica Cirúrgica e Patologia Experimental*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 107-117.
29. Bell, M.A. e Weddell A.G. (1984) *A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve*. *Muscle Nerve*, 7:524-34.
30. Reina, M.A.; Lopez, A.; Villanueva, M.C.; De Andres, J.A. e Leon, G.L. (2000) *Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization*. In *Ver. Esp. Anestesiol Reanim.*, 47:464-75.
31. Bell, M.A. e Weddell, A.G. (1984) *A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals*. *Brain*, 107:871-898.
32. Lundborg, G. e Dahlin, L.B. (1996) *Anatomy, function and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression*. *Hand Clin*, 12:185-93.
33. Rempel, D.; Dahlin, L. e Lundborg, G. (1999) *Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading*. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 81:1600-10.
34. Sunderland, S. (1951) *A Classification Of Peripheral Nerve Injuries Producing Loss of function*. *Brain*. 78.^a ed., pp. 491-516.
35. Sunderland, S. e Bradley, K. (1949) *The cross-sectional area of peripheral nerve trunks devoted to nerve fibres*. *Brain*. 72.^a ed., pp. 428-439.
36. Sunderland, S. e Bradley, K. (1961) *Stress-strain phenomena in human peripheral nerve trunks*. *Brain*. 84.^a ed., pp.102-119.
37. Lundborg, G.; Myers, R. e Powell, H. (1983) *Nerve compression injury and increased endoneurial fluid pressure: a "miniature compartment syndrome"*. In *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 46:1119-24.
38. Tsukita, S. e Ishikawa, H. (1980) *The movement of membranous organelles in axons: electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles*. In *Journal of Cell Biology*, Vol. 84, pp. 513-530.
39. Smith, K.j. e Hall, S.m. (1988) *Peripheral demyelination and remyelination by the calcium-selective ionophore ionomycin: in vivo observations*. In *Journal of the Neurological Sciences*, Vol. 83, pp. 37-53.
40. Mackinnon, Susan E.; Hudson, Alan R. e Hunter, Daniel. (1985) *Histologic Assessment of Nerve Regeneration in the Rat*. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol. 75, No.3, pp. 384-8.
41. Bunge, R.P.; Bunge, M.B. e Eldridge, C.F. (1986) *Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells*. *Annals Review of Neuroscience*, 9.^a ed., pp. 305-328.
42. Hildebrand, C.; Bow, C.M. e Remahl, I.N. (1994) *Myelination and myelin sheath remodeling in normal and pathological PNS fibers*. In *Progress in Neurobiology*, Vol. 43.
43. Politis, M.J. e Steiss, J.E. (1985) *Electromyographic evaluation of a novel surgical preparation to enhance nerve-muscle specificity that follows mammalian peripheral nerve trunk transection*. In *Experimental Neurolog.*, Vol. 87, pp. 326-333.
44. Seckel, B.R.; Ryan, S.E.; Gagne, R.G.; Chiu, T.H.; Watkins, E. (1986) *Target specific nerve regeneration*. In *Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol. 78, pp. 793-800.

Capítulo 2

2. MATERIAIS E TÉCNICAS DE ESTUDO

2.1. Materiais de Estudo

O material de estudo sobre o qual nos dedicámos foi:

- A vascularização e a estrutura do nervo mediano, em 26 cadáveres humanos;
- A vascularização do plexo braquial, em 30 ratos Wistar;
- A vascularização do nervo isquiático, em 30 ratos Wistar;
- A regeneração nervosa na reconstrução de defeito do nervo isquiático através de diferentes métodos no animal de experimentação, em 90 ratos Wistar.

Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. O Biotério está creditado pelo alvará emitido pela DGV, onde consta a autorização de utilização de animais, pequenos roedores, ao abrigo do disposto na Portaria 1005/92 de 23 de Outubro.

2.1.1. A Vascularização do Nervo Mediano do Cadáver Humano

O estudo da macrovascularização, da microvascularização e da estrutura do nervo mediano humano foi realizado em 26 cadáveres. Para este estudo, a eleição do nervo mediano deveu-se ao facto de este ser o nervo periférico que na clínica é mais frequentemente atingido.

As lesões dos nervos do membro superior são frequentes, sendo as mais comuns aquelas que são causadas pela compressão exercida por estruturas circundantes ou pela secção do nervo.¹⁻³ As lesões por compressão no nervo mais frequentes são aquelas que afectam o nervo mediano, particularmente no túnel cárpico. Estima-se que esta patologia tenha uma taxa de incidência de, pelo menos, 3 % na população em geral.^{1,4,5}

O estudo dos 26 cadáveres do Gabinete de Doação do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa decorreu nesse mesmo Departamento.

Em 15 destes cadáveres, foi estudada a macrovascularização do nervo mediano por injeção-dissecção e por diafanização. Em 8 destes cadáveres para o estudo da microvascularização, foi injectada, através da artéria subclávia, uma solução de *Mercox* para obterem-se moldes vasculares que, posteriormente, foram observados em microscopia electrónica de varrimento (MEV).

O estudo da estrutura do nervo mediano, pela técnica histológica, foi realizado em 3 nervos medianos previamente injectados na intravascular com uma solução corada. Os nervos medianos

para o estudo através da técnica histológica foram excisados e imediatamente fixados em formaldeído a 10 %, e preparados para o exame histológico utilizando-se os corantes hematoxilina-eosina, Tricrómico de Masson e imunocorante CD-31 para a observação do endotélio dos vasos.

2.1.1.1. Considerações Éticas sobre a Utilização de Cadáver Humano para Investigação

A utilização do cadáver para a investigação que realizámos foi regida pelo Decreto-Lei n.º 274/99 de 22 de Julho⁶ que regulamenta a utilização de cadáveres para fins de ensino e de investigação científica, e que substitui a Portaria n.º 40, de 22 de Agosto de 1913, clarificando, por sua vez, os aspectos lícitos da dissecação de cadáveres, bem como da extracção de peças, tecidos ou órgãos para fins de ensino e de investigação científica.^{6,7}

Foram também respeitadas as regras e princípios presentes nos artigos 1.º e 3.º, da Lei n.º 12/93, de 22 de Abril. Faço referência ainda aos pareceres n.º 2/CNECV/92, n.º8/CNE/94, n.º 24/CNECV//98 e n.º27/CNECV/98.

No parecer (2/CNE/92) sobre a utilização de cadáveres humanos para fins de ensino médico e que fala sobre a sua necessidade, pertinência e legitimidade é feita referência aos princípios pelos quais se rege a recepção de cadáveres nos estabelecimentos de ensino. Além dos aspectos administrativos, saliento a importância da conservação do corpo, mediante um processo científico de eficiência comprovada, e da reconstituição do corpo dos cadáveres humanos após a dissecação e a definição das peças anatómicas retiradas para conservação ou para investigação científica, sendo as mesmas registadas em livro especial.

No Parecer 8/CNE/94 sobre o projecto de proposta de lei que visa regular as situações em que é lícita a dissecação de cadáveres humanos, ou de parte deles, após a morte cárdio-respiratória, bem como a extracção de peças, tecidos e órgãos para fins de ensino e de investigação científica, esclarece-se o caso de **“Cadáveres não reclamados”** e faz-se referência ao **“Respeito pelos cadáveres”**, o que inclui a existência de **instalações condignas**.

O parecer 24/CNECV/98 sobre o Projecto de D.L., que visa estabelecer o regime jurídico que lícita a dissecação de cadáveres para fins de ensino e de investigação científica, considera que é lícita a dissecação de cadáveres **quando a pessoa tenha declarado, em vida, a vontade de que o seu cadáver seja utilizado para fins de ensino médico e de investigação científica** «e não haja manifestado em vida, junto do Ministério da Saúde, a sua oposição a qual constará do Registo Nacional de não Dadores». É também referido que deverão ser estabelecidas as Instituições creditadas para receberem os cadáveres.

A nota 27/CNECV/99 sobre a lei n.º 12/99 de 15 de Março «clarifica a utilização de cadáveres para ensino e investigação exigindo» que a pessoa tenha manifestado **«conscientemente essa vontade, não sendo reconhecido a quem quer que seja o direito de, após a morte do dador, anular a sua decisão»**.

O respeito pela dignidade da pessoa humana foi o princípio fundamental na utilização dos cadáveres neste estudo. Previamente à utilização do cadáver, foram consultados os registos do RENNDA para eliminar a hipótese de «Manifestação de indisponibilidade para a dádiva *post mortem*».

Foram registados no processo individual de cada cadáver todos os actos realizados. Todos os procedimentos realizados no cadáver humano foram propostos e aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

2.1.1.2. Técnica de Embalsamamento de Cadáveres

Os cadáveres usados neste estudo, provenientes do Gabinete de Doação do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, foram sujeitos à técnica de embalsamamento desenvolvida neste Departamento.⁷

O embalsamamento é um processo químico que permite a preservação, sanitização e desinfecção do corpo humano por tempo indeterminado, em condições que conferem ao material cadavérico uma qualidade e uma aparência muito próximas do natural, permitindo uma perfeita identificação de todas as estruturas, artérias, nervos, veias, tendões, aponevroses, entre outros. A conservação do músculo pode mesmo considerar-se óptima. Estas características são de grande importância para o ensino da anatomia e para o treino cirúrgico, culminando na investigação.

Os cadáveres foram submetidos a embalsamamento pela técnica desenvolvida neste Departamento e que se realiza com procedimentos particulares, conferindo um resultado final de embalsamamento das estruturas com características que permitem o estudo, a dissecção anatómica e o treino cirúrgico próximos da prática *in vivo*.⁷

A técnica de embalsamamento consiste numa infusão de uma solução para embalsamar, concebida e utilizada há vários anos por este Departamento de Anatomia, usando-se uma máquina automática de perfusão. A solução de embalsamamento adoptada é uma combinação de álcool alifático Dietileno glicol com Monoetileno glicol, optimizada para preservar a textura, o volume, a cor e a forma do corpo e dos seus tecidos, tão perfeitos quanto possível, permitindo também a desinfecção e a sanitização do processo.

A solução resultante da mistura é um líquido claro, prático, indolor, incolor e com a densidade da água. A estas propriedades acrescem-se níveis higroscópicos adequados, uma boa solubilidade em ácidos orgânicos, sendo ainda fisiologicamente inofensiva. Esta substância não produz vapores tóxicos no ambiente e não é prejudicial ao toque.

O procedimento de embalsamamento do cadáver envolve um circuito fechado para a perfusão de fluido de embalsamamento, directamente da máquina para o sistema vascular preservado do cadáver, sem risco directo para a prática de dissecção. As características desta solução revelaram-se uma boa escolha, toxicologicamente comparável ao glicerol, para obter os objectivos pretendidos.⁷

Para a exposição dos vasos femorais, foi realizada uma incisão nas regiões inguinais direita e esquerda, preparando-se as artérias femorais para a injeção bidireccional da solução de embalsamamento, através de uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm. O cadáver é apenas previamente lavado com uma solução de Chlorhexidine, e conservado a uma temperatura de 4 a 6 °C, envolvido num saco de plástico simples. A injeção é realizada através da introdução de cateter apropriado na artéria femoral proximal e de outra cânula, também de calibre apropriado, introduzida na artéria femoral, à temperatura ambiente.

A injeção da solução de embalsamamento é realizada com uma infusão pulsada a um ritmo entre 60 e 70 pulsos por minuto com o objectivo de imitar os vasos normais no débito cardíaco, com a variação da pressão sistólica e diastólica, reduzindo-se a resistência ao fluxo e expandindo-se, em extensão e em espessura, a solução nos tecidos perfundidos.⁷

A duração média de infusão vascular foi de aproximadamente 30 a 45 minutos por cadáver, realizando-se com uma taxa de perfusão de 70 pulsos/minuto. O volume médio da solução de embalsamamento injectado foi de 7 litros por corpo, variando com a massa e a estatura do mesmo.

2.1.1.3. Parecer da Comissão de Ética

«A Comissão de Ética da FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar o Projecto de investigação intitulado “**Estudo da Vascularização dos Nervos Periféricos e Influência na Regeneração Nervosa - Estudo Experimental e no Cadáver Humano**” (n.º 13/2012/CEFCM), submetido pela Dra. Maria Angélica Roberto.»

2.1.2. A Vascularização do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial do Rato Wistar

O estudo da vascularização dos nervos periféricos no animal de experimentação foi realizado em 60 ratos Wistar, com as mesmas técnicas utilizadas no nervo mediano humano, tendo em conta que em 30 animais foi estudada a vascularização do nervo isquiático; e, nos outros 30, foi estudada a vascularização do plexo braquial por ser também uma estrutura anatómica que, na clínica, é lesionada com uma relativa frequência, traduzindo-se em sequelas sensitivas e motoras graves.⁸

O rato é provavelmente a espécie animal mais utilizada em estudos como modelo animal experimental.⁹⁻¹² Nesta espécie, o nervo isquiático tem sido tradicionalmente utilizado como um substituto do típico nervo humano, particularmente do nervo mediano humano.^{9,10,13}

Tem sido largamente assumido que estes dois nervos (o nervo mediano humano e o nervo isquiático do rato) são muito semelhantes nos aspectos mais importantes, nomeadamente no que diz respeito à fisiologia na reparação nervosa.^{2,13,14} Contudo, faltava o conhecimento do grau de semelhança da vascularização entre estes dois nervos.^{9,14} Isto, por sua vez, tem implicações

potenciais e significantes quando se estudam novas estratégias para a reparação do nervo mediano, usando-se como modelo o nervo isquiático do rato.¹⁵⁻¹⁹

Além disso, um conhecimento pormenorizado da vascularização do nervo é de uma grande importância, quer na experimentação, quer na clínica, nomeadamente no planeamento e na execução de retalhos nervosos livres, pediculados ou de retalhos compostos que incluem nervos.^{15,19,20} Assim, considerou-se indispensável comparar, sistematicamente, a macro e a microvascularização do nervo isquiático do rato com as do nervo mediano humano, dando-se uma importância particular aos aspectos que podem ser de interesse experimental.²¹

2.1.2.1. Considerações Éticas e do Bem-Estar Animal

Todos os procedimentos praticados nos animais, inclusive a eutanásia, foram realizados de acordo com o Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto²², que voga a Portaria 1005/92 de 23 de Outubro, o Dec. Lei 129/92 de 6 de Julho (transpõe a directiva 86/609/CEE) e a Portaria 466/95 de 17 de Maio.

Foi também seguida a *Directive of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, adopted by the Council on 3 of June of 2010, as Guidelines on the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*, a GIRCOR ou Guia para a Avaliação Ética de Experiências com Animais de Laboratório e o *Canadian Council on Animal Care – Ethics of Animal Investigation (revised on October of 1989)*.

Qualquer investigação que implique experimentação animal não poderá ser validada se não forem rigorosamente respeitadas as recomendações dos 3 Rs de Russell and Burch, **Replacement, Reduction and Refinement** e o *The Design of Animal Experiments* de Michael F. W. Festing e Philip Overend.^{23,24}

A primeira recomendação dos 3 Rs (*Replacement*), a Substituição, é logicamente a mais importante a ser implementada quando se projecta uma investigação com experimentação animal. Contudo, nem sempre pode ser respeitada e, se assim for, tem que ser justificado o seu não-cumprimento. Neste projecto, não foi possível aplicar a regra da Substituição sem que fosse colocada em risco a investigação, especialmente por ser uma investigação académica básica (Rainer Gregor, na Universidade de Fribourg, realizou uma investigação básica em neurofisiologia).²⁵

Não foi possível substituir o modelo animal por um modelo *in vitro* por se tratar de um estudo anatomofisiológico que testa uma técnica cirúrgica e a sua fisiopatologia. Justifica-se, assim, a impossibilidade de substituir total ou parcialmente o modelo *in vivo* por um modelo *in vitro*.

Quanto à 2.ª recomendação (*Reduction*), a Redução, ao ser realizado o Desenho Animal para este estudo, foi respeitada esta regra no cálculo do número mínimo de animais a serem usados para se alcançar os objectivos pretendidos e para se obter toda a informação desejada, através de uma análise estatística apropriada e de uma interpretação cuidadosa dos resultados atingidos.²⁶⁻²⁹

Relativamente ao 3.º R (*Refinement*), o Requite, no que se refere ao “Bem-estar Animal”, foram seguidas todas as directrizes que regulamentam essa prática.²⁹⁻³² Todo e qualquer

procedimento cirúrgico ou de outro tipo que pudesse causar sofrimento, desconforto ou *stress* ao animal foi realizado sob anestesia geral. O bem-estar animal, sobre todos os aspectos, foi constantemente monitorizado, tanto no pré-operatório, como no intra-operatório e no pós-operatório. Esta monitorização justifica-se não só por razões **éticas, mas também por razões relacionadas com a segurança na experimentação a realizar e com a validade dos resultados obtidos.**

A eutanásia dos animais foi também feita sob anestesia geral, durante a qual são realizadas as colheitas dos nervos para a análise histológica. É muito importante que a colheita dos nervos seja feita durante a vida do animal, em condições anátomo-fisiológicas normais, para a exclusão de factores que possam alterar os resultados, nomeadamente a isquemia e a decomposição do tecido nervoso, esta última que se inicia muito precocemente, estando relacionada com a primeira.

Relativamente a outros aspectos do Bem-Estar Animal, faço referência ao facto de que todos os animais habitavam em gaiolas individuais com cama de serradura específica e, no pós-operatório, permaneceram no recobro do biotério até ao dia da eutanásia. No recobro existia ventilação, humidade e temperatura controladas, ciclo de luz/escuro de 12 em 12 horas, e água e alimentos *ad libitum*, de acordo com as normas referidas atrás.

2.1.2.2. Princípios Cirúrgicos Básicos no Animal de Experimentação

Anestesia

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com uma injeção intra-peritoneal de ketamina/xilazina nas doses de 90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente.^{33,34,35} A administração da anestesia foi feita na sala da cirurgia, num ambiente tranquilo e de silêncio para prevenir qualquer *stress* que, por si só, pode condicionar a anestesia e ser até letal. A anestesia nunca foi realizada junto de outros animais, pois as feromonas causariam ansiedade e *stress* nos mesmos.

Antes de se iniciar a cirurgia, confirmou-se a profundidade anestésica verificando-se a ausência do reflexo de pedal através de uma pressão moderada sobre a pata posterior. Os sinais vitais do animal e a profundidade da anestesia foram monitorizados durante toda a cirurgia. Os animais sob anestesia geral foram posicionados em decúbito ventral com os membros dianteiros e traseiros em completa abdução, tendo-se o cuidado de os membros dianteiros não ficarem em abdução extrema para que não se provocasse a depressão respiratória.

A anti-sepsia cutânea foi realizada com uma solução de álcool iodado a 20 %, tendo em atenção o volume utilizado para prevenir os casos de hipotermia. Foram respeitadas as normas de assepsia cirúrgica e de prevenção da infecção.



Figura 2.1 - Rato em posição cirúrgica.

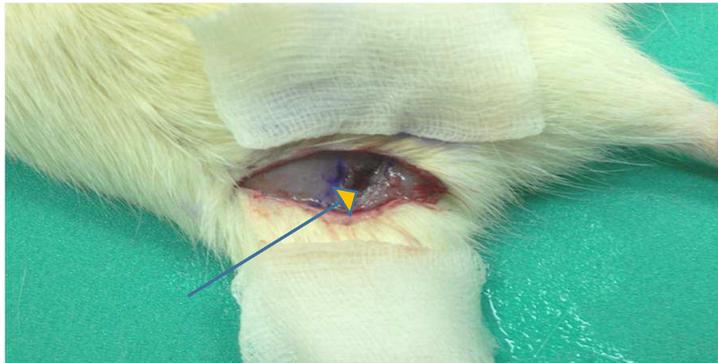


Figura 2.2 - Músculo Bicipite Femoral seccionado (seta).

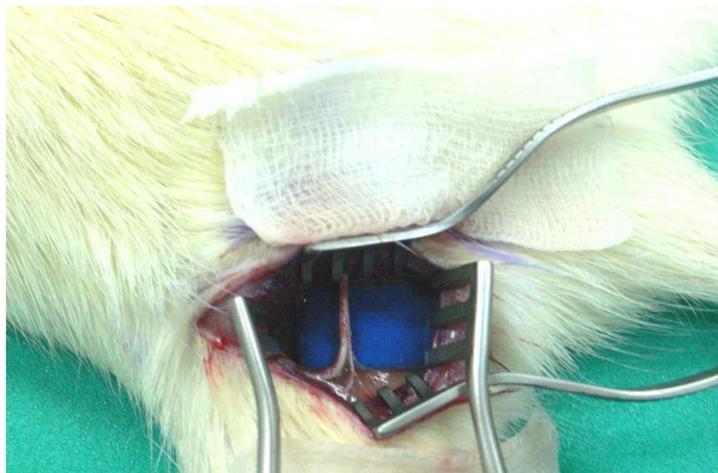


Figura 2.3 - Nervo isquiático exposto.

Cuidados Peri-Operatórios

É vital para o animal ter-se em conta os cuidados peri-operatórios.^{34,35,36} Se não forem cumpridos estes cuidados, existe o risco de se pôr em causa toda a experimentação, ou seja, a cirurgia que se está a realizar e até mesmo a sobrevivência do animal. Fazem parte destes cuidados a manutenção da temperatura do animal, a prevenção da desidratação, a prevenção da secura dos globos oculares e a hidratação da boca. Assim, sempre que a cirurgia se poderia prolongar além dos

30 minutos, para prevenir a hipotermia, foi utilizada uma placa de temperatura controlada ou, então, o animal foi coberto com compressas aquecidas. Terminada a cirurgia o animal foi mantido numa área de recobro a 25-30 até acordar da anestesia, ou seja, até já deambular.

Outro dos cuidados peri-operatórios a respeitar é a prevenção da desidratação, que se faz através da administração de 0,3 ml/kg de Soro Fisiológico intra-peritoneal ou subcutâneo, tanto no intra-operatório como no pós-operatório. Por outro lado, para prevenir a secura dos olhos, aplicaram-se gotas de soro fisiológico ou de lágrimas oftálmicas^{34,35,36}, no intra-operatório e no final da cirurgia. Terminada a cirurgia, foi sempre administrada água por via oral, na quantidade que o animal deglutou.

Analgesia

O reconhecimento e a gestão da dor fazem parte dos bons cuidados do pós-operatório, tendo sido reconhecidos e controlados os sinais de sofrimento de uma forma sistemática.^{33,34,35}

Esses sinais de sofrimento podem traduzir-se na recusa por parte do animal de se alimentar ou de beber água, ou até pelo facto de demonstrar um certo grau de imobilidade. Nem sempre foram observados sinais de sofrimento e também nem sempre nos foi possível monitorizá-los nas primeiras 6 ou 12 horas do pós-operatório, razão pela qual, imediatamente terminada a cirurgia, iniciámos o controlo da dor com a administração, por via oral, de Caprofen, nas doses diárias de 5 mg/kg, na água que tomavam, e que se assumia ser, diariamente, cerca de 10 % do seu peso.

Nunca usámos barbitúricos durante a cirurgia ou no pós-operatório, nem durante a cirurgia para a colheita das biópsias, pois os mesmos poderiam levar ao desenvolvimento de vasodilatação, afectando as cirurgias e os exames histológicos.

Eutanásia

A eutanásia foi realizada sob anestesia geral a todos os animais, após a colheita dos nervos isquiáticos intervencionados e do respectivo nervo isquiático contra-lateral para a biopsia de controlo para os estudos histológicos.^{33,34,35} A colheita dos nervos para a histologia é sempre feita sob anestesia geral visto que o nervo é muito sensível à isquémia, iniciando-se imediatamente a sua decomposição, o que pode alterar os resultados.

Da mesma forma da anestesia, a eutanásia foi cumprida num ambiente calmo, na sala da cirurgia, sem a presença de outros animais, ora pela administração de uma *overdose* de anestesia geral, ora pelo método inalatório com isoflurano. A câmara de eutanásia do Biotério da FCML foi também utilizada no horário de funcionamento para os animais que, sob a anestesia geral, sofreram as biopsias.

Antes de o animal ser colocado em saco próprio para a congelação e para a sua posterior cremação, foram verificados, sempre, os sinais pós-morte.

2.1.3. Regeneração Nervosa na Reconstrução de Defeito Nervoso por Diferentes Condutos, na presença de um fornecimento vascular axilal; Estudo Experimental no Rato Wistar

O estudo da regeneração nervosa na reconstrução de defeito de 10 mm de nervo foi realizado em 90 ratos Wistar, divididos em dois grupos principais relativamente à presença ou não de suprimento vascular axial.

Em 45 ratos Wistar foi criado um defeito de 10 mm no nervo isquiático direito, preservando-se o plexo vascular epineural. Os ratos foram, então, aleatoriamente submetidos a reconstrução do defeito nervoso com um dos seguintes procedimentos: auto-enxerto do segmento de nervo excisado (Grupo A, n = 15); enxerto autólogo de veia jugular externa (Grupo B, n = 15); conduto produzido com membrana amniótica humana imunoinerte (Grupo C, n = 15). Os ratos foram avaliados funcionalmente (avaliação das pegadas; electroneurografia e força de flexão ao nível do tornozelo) e estruturalmente (avaliações histológicas e morfométricas; taxa de recuperação do peso dos músculos gastrocnémios e solhar; e marcação axonal retrógrada com *TrueBlue*) às 4, 8 e 12 semanas.

Os outros 45 ratos Wistar foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos que o grupo anterior, mas sem a preservação do plexo vascular epineural. Os ratos foram submetidos à reconstrução do defeito nervoso com procedimentos idênticos aos do grupo anterior: auto-enxerto do segmento de nervo excisado (Grupo D, n = 15); enxerto autólogo de veia jugular externa (Grupo E, n = 15); conduto produzido com membrana amniótica humana imunoinerte (Grupo F, n = 15). Os ratos foram avaliados funcionalmente por electrofisiologia, avaliação histológica e morfométrica e através de estudo por imunohistoquímica indirecta (às 4, 8 e 12 semanas).

Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa em concordância com o *European Communities Council Directive of 24 of November of 1986 (86/609/EEC)*.

A Direcção-Geral de Veterinária, em 16 de Novembro de 2010, concedeu-me a competência de (investigadora-coordenadora): «Ao abrigo do ponto iii), da alínea e), do n.º 3 da Portaria n.º 1005/92, de 23 de Outubro, é atribuído a Maria Angélica Rato Da Silva Roberto creditação como pessoa competente (investigadora-coordenadora) para a prática de experimentação animal.»

2.1.4. Membrana Amniótica Humana Imunoinerte

2.1.4.1. Considerações Gerais

A Membrana Amniótica Humana, uma estrutura bioquímica complexa, é a camada mais interna da placenta.³⁶ É uma matriz não-vascularizada, composta por uma camada de epitélio cúbico e POR uma membrana basal espessa, formada principalmente por colagénio tipo I, tipo III e tipo IV, laminina, fibronectina e outras glicoproteínas.³⁷

Classicamente, a membrana amniótica humana tem sido utilizada como penso biológico, sendo rejeitada ao fim de algum tempo.

Neste estudo, foi usada a membrana amniótica humana (MAH) biocompatível e não biodegradável, que foi tornada imunoinerte, conforme o método descrito por Maria Teresa Furtado Ramos, Laura Maria Bugalhão Costa e Maria Angélica Rato da Silva Roberto no Depósito/Patente n.º 102589 do Instituto Nacional da Propriedade Industrial em 30 de Março de 2001.³⁸ Esse método consiste, basicamente, na mumificação da membrana amniótica, o que a torna imunologicamente inerte. É eliminado o epitélio sem alteração da integridade da matriz extracelular (ECM), permitindo o crescimento de células autólogas.

Esta membrana amniótica tornada imunologicamente inerte foi objecto de estudos de investigação no rato Wistar, cujo grupo de trabalho integrámos previamente, para demonstrar as suas propriedades imunológicas e a sua possibilidade de utilização na regeneração nervosa e cutânea *in vivo*. Os trabalhos decorreram também no Biotério da FCM-UNL, tendo sido reconhecido com um Prémio (referido no CV).

Com a membrana amniótica imunologicamente inerte, não se verifica a rejeição na sua aplicação, nem a necessidade da administração de imunossuppressores. Provou-se também que tem propriedades antifibróticas.^{39,40} A membrana amniótica humana imunoinerte que utilizámos neste estudo foi-nos gentilmente oferecida pela Delegação do Sul do Centro Português de Histocompatibilidade através do Prof. Doutor Hélder Trindade e Dra. Josefina Oliveira.

2.1.5. Protocolo da Colheita de Membrana Amniótica Humana para Transplantação

O Gabinete Coordenador de Colheita e Transplante (GCCT) do Hospital de S. José como Unidade de Colheita, em articulação com o Banco de Tecidos do Centro de Histocompatibilidade do Sul (BTCHSUL, Unidade de Processamento de Tecido), coordena, no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Maternidade Magalhães Coutinho (Hospital D. Estefânia, CHLC, EPE), a colheita de resíduo cirúrgico e de membrana amniótica, cuja utilidade terapêutica tem-se vindo a impor em diversas áreas da medicina.

Os Serviços de Oftalmologia e de Cirurgia Plástica do Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE, têm uma longa experiência na utilização da membrana amniótica com resultados terapêuticos bons e comprovados.

A membrana amniótica como resíduo cirúrgico é obtida com o consentimento informado das parturientes de cesarianas programadas, caso não haja ruptura do saco amniótico.

Os critérios para a exclusão de dadoras são os critérios gerais válidos para a exclusão de dadores de órgãos e tecidos, nomeadamente no que se refere à exclusão daqueles que ofereçam risco de transmissão de doenças infecciosas ou neoplásicas, além de critérios específicos para a membrana amniótica como gravidez não-vigiada; história obstétrica com alterações; miomectomia prévia; presença de sinais/sintomas de infecção neonatal; febre materna superior a 38 °C no dia do

parto; gestação inferior a 36 semanas; presença de mecónio no líquido amniótico; colo com dilatação total; rotura das membranas; e patologia vascular materna.

As grávidas propostas para cesarianas electivas que cumpram os critérios de inclusão no programa são abordadas pelo seu médico obstetra no sentido de lhes ser proposta a doação da placenta para fins terapêuticos e para a sua autorização para a realização de testes serológicos indispensáveis para que a doação possa ser concretizada.

No dia do parto, é feita a colheita de sangue para os testes serológicos para o despiste de infecção por Hepatite B, Hepatite C, VIH 1 e 2, HTLV 1 e 2 e Sífilis (1 tubo de bioquímica/seco e 2 EDTA), a realizar pelo Banco de Tecidos do Centro de Histocompatibilidade do Sul (BTCH Sul). As membranas são colhidas nas cesarianas programadas, no Bloco de Partos do Hospital D. Estefânia (CHLC, EPE), em dadoras seleccionadas pelo Coordenador do GCCT, e com a obtenção do consentimento informado pela parturiente.

Após a colheita, a membrana e os tubos de sangue (1 tubo de bioquímica, 2 tubos de EDTA) são transportados para o Banco de Tecidos do Centro de Histocompatibilidade do Sul (BTCH Sul), para serem processados, por forma a permitir a sua utilização terapêutica. As membranas cujas dadoras têm análises negativas são preparadas em “salas brancas” ISO Classe 5, certificadas.

A MAH imunologicamente inerte é preservada a -80 °C, o que lhe confere um prazo de validade prolongado.

2.1.5.1 Acto de Colheita da MAH

A colheita da membrana amniótica humana é feita durante a realização da cesariana. Após a verificação da aparente normalidade da placenta, esta é colocada, sucessivamente, em 3 sacos estéreis com soro fisiológico. A placenta e respectivas membranas, já colocadas em 3 sacos estéreis fechados, são identificadas e colocadas num saco de plástico comum que fica em contacto directo com o gelo da mala térmica para o transporte imediato para o BTCH Sul.

O BTCH Sul é o responsável por todos os procedimentos de preparação e controlo da qualidade da membrana amniótica colhida, bem como pelo seu correcto armazenamento.

2.1.5.2. Uso e Transplante de MAH

Em 1910, Davis foi o primeiro a descrever o uso de membranas fetais (âmnio e córion) como material cirúrgico no transplante de pele⁴¹, mas sem um grande sucesso pela rejeição que ocorreria.

No entanto, o uso de membrana amniótica na cirurgia foi expandido na década de 1940, tendo diversos autores descrito o seu uso no tratamento de uma variedade de doenças oculares.⁴¹ Em 1975, houve várias descrições sobre o uso da membrana amniótica como auto-enxerto^{41,42} e aloenxerto.⁴³ Estes autores concluíram que os auto-enxertos de membrana amniótica tornavam-se estruturas permanentes, mas o seu uso como aloenxertos era rejeitado após um dado período.⁴³

Actualmente, a membrana amniótica foi reconhecida como um excelente material para o tratamento de certas doenças oculares, tais como os defeitos epiteliais persistentes da córnea com ulceração⁴⁴, o pterígio recorrente^{45,46} e a reconstrução da superfície conjuntival.^{47,48} Também tem sido utilizada como um penso biológico.⁴⁹

O traumatismo do nervo periférico, muitas vezes, resulta numa perda funcional permanente por não ter ocorrido a regeneração. O nervo seccionado pode ser reparado através da sutura das extremidades seccionadas, ou, se houver perda de substância, a reparação pode ser feita com auto-enxerto ou através de um conduto biológico ou sintético.⁵⁰ A reparação por simples sutura das extremidades do nervo seccionado só pode ser realizada se não houver perda de tecido nervoso ou se esta perda for de pequenas dimensões. A reconstrução com auto-enxerto requer o uso de um nervo do paciente^{50,51} resultando numa morbilidade da zona dadora.⁵²

Vários materiais sintéticos⁵¹ têm sido usados em condutos para permitir a regeneração do nervo. A membrana amniótica tem sido também utilizada como um conduto de nervo para promover a regeneração do mesmo.^{53,54} Neste estudo, para criar um conduto de nervo biocompatível e não biodegradável, foi usada a membrana amniótica humana imunologicamente inerte.^{38,86}

2.2. Técnicas de Estudo

2.2.1. Técnica da Injecção-dissecção dos Vasos do Nervo Mediano do Cadáver Humano

Como técnica anatómica para o estudo angiomorfológico, a técnica de injecção vascular permite uma melhor individualização dos vasos superficiais levando a uma descrição anatómica pormenorizada da vascularização do nervo, assim como a uma melhor compreensão da relação entre os respectivos vasos.

Para a injecção dos vasos do nervo mediano do cadáver humano procedeu-se à exposição da artéria subclávia através de uma abordagem supraclavicular⁵⁵⁻⁵⁹ e, depois, seguiu-se a injecção através da artéria subclávia de uma suspensão coloidal de sulfato de bário a 20 % (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com gelatina comercial a 10 %, (em partes iguais) previamente aquecida a 37 °C e corada com pigmento vermelho (*Pigment Tintolac Super, Robialac*).

Os nervos medianos foram dissecados debaixo de uma lupa cirúrgica de aumento, da sua origem na axila aos ramos terminais na mão, procedendo-se ao estudo da sua vascularização. Os vasos do nervo mediano foram registados e, de seguida, removidos para serem sujeitos à técnica de diafanização descrita no seguimento.

Para a obtenção de moldes vasculares, injectou-se, através da artéria subclávia, uma solução de uma resina acrílica denominada *Mercocox*. Após a completa polimerização do produto, procedeu-se à corrosão dos nervos medianos para serem observados em microscopia electrónica de varrimento

de acordo com os protocolos correntemente empregados nesta instituição⁵⁵⁻⁵⁹, cuja técnica será descrita em seguida.

Para os exames histológicos, os nervos medianos previamente injectados na intravascular com a solução corada foram fixados em formaldeído e sujeitos aos corantes hematoxilina-eosina e Tricrómico de Masson e, para a observação do endotélio dos vasos, foi usado o imunocorante CD-31.

2.2.2. Técnica Cirúrgica para a Injecção dos Vasos do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial no Rato Wistar para o estudo por diafanização

Os procedimentos cirúrgicos a que foram sujeitos os animais de experimentação para a injecção dos vasos, para o posterior estudo anatómico por dissecação e para o estudo da vascularização pela técnica de diafanização, foram os seguintes:

- Anestesia geral intra-peritoneal com Ketamina e Xilazina, numa dose de 90 mg/kg e de 10 mg/kg, respectivamente;^{21,33,34,35}
- Laparotomia mediana e colocação de um cateter Abbocath de calibre 22G na aorta abdominal e outro na veia cava (Figura 2.4);
- Exsanguinação dos animais e lavagem com cerca de 500 cc. de soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9 %) em perfusão contínua. Geralmente, é atingida a eutanásia nesta fase;
- Reposição do volume sanguíneo com solução de soro fisiológico heparinizado (50 unid/ml);
- Fixação com injecção de gluteraldeído a 2 %;
- Injecção na aorta abdominal de uma suspensão coloidal de sulfato de bário a 20 % (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com 10 % de gelatina comercial (em partes iguais) aquecida a 37 °C e corada com pigmento vermelho, de acordo com as técnicas correntemente usadas na nossa instituição;⁵⁵⁻⁵⁹
- Injecção na veia cava caudal de uma suspensão coloidal de sulfato de bário a 20 % (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com 10 % de gelatina comercial (em partes iguais) aquecida a 37 °C e corada com pigmento azul, de acordo com as técnicas correntemente adoptadas nesta instituição.⁵⁵⁻⁵⁹

Após a verificação de que a solução estava solidificada (aproximadamente 6 horas após a injecção em ambiente de 4 °C), os animais foram dissecados com o uso de um microscópio cirúrgico binocular (*Leica M 651*) para o estudo anatómico do Plexo Braquial e dos nervos isquiáticos e, em seguida, estes foram removidos e diafanizados pela técnica descrita de seguida.

Foi registada a constituição e a distribuição do Plexo Braquial e dos seus ramos, bem como a origem e o termo das artérias e veias que suprimem estes nervos. Foi também registada a constituição e a distribuição do nervo isquiático e dos seus ramos, bem como a origem e término das artérias e veias que irrigam o nervo.

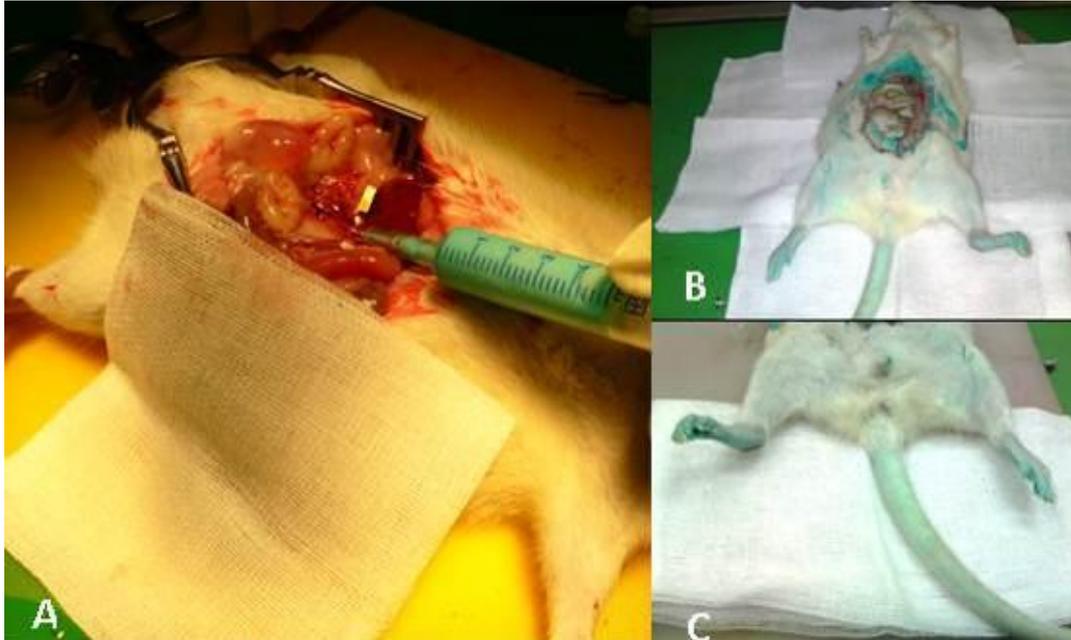


Figura 2.4 - A - Injeção de *Micropaque* na aorta abdominal; B e C - Aspecto do rato após a injeção.

2.2.3. Técnica Cirúrgica para a Injeção dos Vasos do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial no Rato Wistar para o estudo em Microscopia Electrónica de Varrimento

Os procedimentos cirúrgicos a que os animais de experimentação foram sujeitos para a obtenção de moldes vasculares e para a posterior observação em microscopia electrónica de varrimento, de acordo com os protocolos adoptados nesta instituição, foram os seguintes^{: 55- 59}

- Anestesia geral intra-peritoneal com Ketamina e Xilazina numa dose de 90 mg/kg e de 10 mg/kg, respectivamente;
- Cateterização da aorta abdominal, das supra-artérias renais e da veia cava caudal;
- Exsanguinação dos animais e lavagem com cerca de 500 cc. de soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9 %) em perfusão contínua;
- Reposição do volume sanguíneo com solução de soro fisiológico heparinizado (50 unid/ml);
- Fixação com injeção de glutaraldeído a 2 %;
- Injeção na aorta abdominal de solução de *Mercocox* para a obtenção de moldes vasculares e para uma posterior observação em microscopia electrónica de varrimento.

Após a completa polimerização dos produtos, os animais foram dissecados com o uso de um microscópio cirúrgico binocular (*Leica M 651*) para a remoção do Plexo Braquial e dos nervos isquiáticos, para que estes fossem sujeitos à técnica de obtenção de moldes vasculares e observados em microscopia electrónica de varrimento, de acordo com os protocolos correntemente utilizados nesta instituição e descritos no seguimento.⁵⁵⁻⁵⁹

2.2.4. Técnicas de Avaliação Morfológica/Morfométrica e Estrutural do Nervo Humano, do Nervo do Animal de Experimentação e da Regeneração Nervosa na Reconstrução de Defeito de Nervo Isquiático do Rato Wistar

Na análise histológica obtém-se uma grande quantidade de informação morfológica, mas o seu valor será significativamente reduzido se esta análise estiver limitada a uma descrição apenas qualitativa.

Os dados histomorfométricos relativos ao número, densidade e dimensão das fibras nervosas e vasos⁶⁰⁻⁶⁶ podem dar-nos respostas a questões importantes que surgem como, por exemplo, na comparação entre uma nova técnica microcirúrgica ou supra-microcirúrgica e uma técnica tradicional na reconstrução do nervo em caso de lesão/secção. Assim, na maioria das situações, uma análise morfo-quantitativa é fundamental para completar a avaliação morfológica, quer no nervo normal, quer no processo de regeneração.

Para o estudo quantitativo foi usado o programa *ImageJ* (Aplicativo *Java* para o processamento de imagens científicas).

A imunocitoquímica ou imunohistoquímica é aplicada a todas as biopsias usando-se os marcadores específicos para o tecido conjuntivo, os neurofilamentos, as células endoteliais, os axónios mielínicos motores e os axónios sensitivos amielínicos.⁶⁷⁻⁷¹

Este método do estudo da morfologia, quer qualitativa, quer quantitativa, aplica-se aos nervos do animal e do humano. Para o estudo morfológico/morfométrico e estrutural do Nervo Isquiático e do Plexo Braquial do rato Wistar, do Nervo Mediano Humano e da regeneração nervosa na reconstrução de defeito de nervo isquiático do rato Wistar, sob os aspectos morfológico/morfométrico e estrutural da regeneração nervosa, foram empregadas as seguintes técnicas:

- Técnicas de injeção-dissecção;
- Técnica de diafanização;
- Técnica de Injeção-corrosão para a microscopia electrónica de varrimento;
- Técnica Histológica com marcadores específicos para:
 - Neurofilamentos: Anticorpos anti-Neurofilamento;
 - Endotélio: Anticorpos anti-CD-31;
 - Axónios mielínicos: Anticorpos anti-Acetilcolinesterase;
 - Axónios amielínicos: Anti-Periferina;
 - Tricómico de Masson como marcador de tecido conjuntivo;
 - Técnica de Marcação Axonal Retrógrada com marcador fluorescente;
 - *True Blue* para a avaliação da regeneração nervosa sensitiva.

2.2.4.1. Técnica de Diafanização

A técnica de diafanização utilizada neste estudo foi a desenvolvida por Spalteholz e posteriormente modificada por Esperança-Pina e Goyri O'Neill.⁷²⁻⁷⁵ A técnica de diafanização para cortes após a injeção vascular consiste na transformação do parênquima num meio transparente, para permitir a observação do trajecto e as relações dos vasos previamente injectados com uma suspensão coloidal de sulfato de bário a 20 % (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com 10 % de gelatina comercial (em partes iguais) aquecida a 37 °C e corada com pigmento vermelho ou azul (*Pigment Tintolac Super, Robialac*).

Depois da solidificação da mistura injectada, ocorrem as seguintes fases:

- fase de fixação: o órgão é fixado em formol a 10 °C;
- fase de descoloração: o órgão introduzido em água oxigenada 130 v (peróxido de hidrogénio a 35 %) e diluída a 30 %, entre 6 e 24 horas, de acordo com a espessura do espécime;
- fase de desidratação: procede-se à desidratação em acetona de concentração progressiva a 75 %, a 80 %, a 85%, a 90 % e a 93 %, à temperatura de -20 °C, durante 6 a 24 horas, de acordo com a espessura do espécime;
- fase de transparência ou de diafanização: finalmente, procede-se à transparência ou diafanização da peça segundo a técnica desenvolvida por Spalteholz (1914). A peça é imersa no líquido de Spalteholz, constituído por salicilato de metilo e benzoato de benzilo na proporção de 3:1, com aplicação de vácuo 0.2 bares durante 15 minutos. As peças foram estudadas e observadas através da lupa estereoscópica marca *MEIJI*, modelo *EMZ-13 TR-Olympus* com *zoom*, e do microscópio cirúrgico binocular (*Leica M 651*).

2.2.4.2. Técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento em Moldes Vasculares

Os procedimentos cirúrgicos para a cateterização dos vasos para a injeção de *Mercox*, quer no modelo animal, quer no modelo humano, são os mesmos realizados para a diafanização.

A técnica de injeção-corrosão para a obtenção de moldes vasculares para a sua observação em Microscopia Electrónica de Varrimento consiste na fixação do órgão, por via intravascular, com glutaraldeído a 2,2 %, tamponado com cacodilato de sódio à temperatura de 38 °C, seguindo-se a injeção de *Mercox* previamente preparada com um catalisador, e deixando-se a peça durante 15 minutos à temperatura ambiente. A corrosão é feita em vários blocos previamente preparados, numa solução de hidróxido de potássio a 7 %, seguindo-se a lavagem em água corrente e a secagem em estufa a 37 °C.

O molde vascular é estudado numa lupa estereoscópica, realizando-se, depois, a sua metalização em ouro, numa atmosfera rarefeita contendo Árgon EU, num *Polarom*, modelo *SC507*. Concluída a metalização em ouro, os moldes microvasculares são observados no microscópio de

varrimento *JEOL*, modelo *JSM-5410*, para o estudo morfológico e para a medição do calibre com a aplicação do sistema *SEMAfore*⁷⁶, registando-se fotograficamente as imagens com interesse.

2.2.4.3. Técnica Histológica para Marcadores Específicos

A técnica histológica, realizada no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S. José, Centro Hospitalar De Lisboa Central, basicamente, processa-se da seguinte forma:

1.º Fixação

Depois de ser preparado um espécime do órgão, este é fixado por um período nunca inferior a 24 horas, variando com a espessura do espécime.

2.º Lavagem

Tira-se o excesso do fixador em água corrente durante 20 a 30 minutos. Faz-se a inclusão em parafina, precedida da sua penetração do seguinte modo:

- Desidratação pelo álcool a 70 °, 90 °, 95 ° e 100 °;
- Desidratação pela acetona;
- Impregnação pelo xilol, dissolvente da parafina;
- Impregnação durante 24 horas, em banho de parafina mole;
- Impregnação durante 2 horas, em banho de parafina mole;
- Para a inclusão definitiva, deita-se a parafina numa cassette.

3.º Corte

Para se obter os cortes das peças com uma espessura de 5 µm, é utilizado o micrótomo de tipo "Minot".

4.º Colagem

Segue-se a colagem dos cortes em lâminas desengorduradas pelo álcool-éter, com água albuminosa. A colagem do corte realiza-se, então, usando-se uma placa de metal aquecida a temperaturas sucessivamente maiores. De seguida, são colocadas na estufa durante 24 horas e, depois, desparafinadas em xilol, variando o tempo de permanência na estufa de acordo com a espessura do corte.

5.º Coloração

Os cortes são corados pela hematoxilina-eosina (*hemalumen-eosina*) e com os marcadores específicos para este estudo:

- Neurofilamentos: **Anticorpos anti-Neurofilamentos**;
- Endotélio: **Anticorpos anti-CD-31**;
- Axónios mielínicos: **anticorpos anti-Acetilcolinesterase**;

- Axónios amielínicos: **anticorpos anti-Periferina**;
- Tricrómico de Masson: **marcador de tecido conjuntivo**.

6.º Montagem

Após a coloração das lâminas, estas são novamente desidratadas. A montagem faz-se deitando-se na lâmina e sobre o corte uma gota de bálsamo de Canadá, colocando-se, então, sobre ela uma lamela, com o cuidado de não deixar bolhas de ar. Finaliza-se limpando-se com xilol.

7.º Estudo morfológico

As preparações histológicas que se obtiveram foram observadas num microscópio óptico digital (*Leica DMLB2*).

Para o registo deste estudo morfológico, foram tiradas fotografias de todas as peças histológicas dos diferentes imuno-marcadores, em várias ampliações, totalizando um valor próximo das 10 000 fotografias. Estas fotografias foram utilizadas para determinar, nas áreas de secção, a densidade de axónios, o número total de fibras e o número total de fibras axonais. Para evitar “o efeito de margem”, foi aplicado o método de dissector bidimensional.^{9,71} As imagens foram morfometricamente analisadas com o recurso ao programa *Image J*.^{9,77}

2.2.4.3.1. Técnica de Marcação Axonal Retrógrada com Marcador Fluorescente *True Blue*

A Técnica de Marcação Axonal Retrógrada com Marcador Fluorescente *True Blue* tinha como finalidade a avaliação da regeneração nervosa sensitiva. No final das 12 semanas após a cirurgia, o animal é submetido a marcadores retrógrados com *True Blue* (TB) para avaliar a recuperação da correcta conexão anatómica do tracto sensitivo.

Ao 84.º dia, é feita uma injeção intra-cutânea de 12 µl de *True Blue* 2,5 % (*Sigma-Aldrich*), na parte mediana da face plantar da pata direita. Ao 10.º dia post injeção de TB, os animais são eutanasiados para a realização da excisão dos mielómeros de L1 a L4 e dos respectivos gânglios espinhais dorsais ou DRG (*dorsal root ganglia*), bem como das secções coronais do córtex cerebral nas áreas motora primária e somestésica primária. Estas partes do neuro-eixo são imersas numa mistura de 4 % de paraformaldeído e 10 % de sucrose num 1 M de PBS (*phosphate buffered saline*) a um pH de 7.4, durante 4 horas.

Depois da fixação, os DRG são transferidos para 15 % de sucrose em PBS durante, pelo menos, 15 horas. Finalmente, os DRG são transferidos para 30 % de sucrose em PBS, pelo menos durante 15 horas e, no final deste tempo, são congelados em azoto líquido. De seguida, são feitos cortes de 20 µm de espessura no criostato.

Os cortes, depois de descongelados, são montados numa lâmina de vidro revestida de polilissina.^{77,78} Os DRG são, então, examinados através da fluorescência no microscópio de fluorescência (*Leica DMIRE 2*). A presença de fluorescência é avaliada na secção transversa maior.⁶⁸ As imagens são morfometricamente analisadas com o recurso ao programa *Image J*.^{9,77} A análise estatística é realizada com o programa estatístico *PASW 20.0*. A ANOVA é utilizada para comparar as médias entre os diferentes grupos. O teste do Qui-quadrado é utilizado para comparar as proporções. Um valor de p inferior a 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

2.2.5. Técnicas de Avaliação Funcional na Regeneração Nervosa

Os métodos tradicionais para a avaliação da regeneração nervosa pós-lesão e da sua reparação, tais como a electrofisiologia^{79,80,81} e a histomorfometria^{71,82}, universalmente adoptados na neuro-regeneração experimental, podem não se correlacionar necessariamente com a recuperação motora e sensitiva.

Para a avaliação da recuperação funcional é importante descrever a sua sequência temporal através de diversos métodos de natureza motora e sensorial e relacioná-la com a avaliação morfológica.⁸²⁻⁸⁵ Para atingir este fim, foram aplicados vários métodos de avaliação neste estudo. A escolha dos testes funcionais a utilizar é de uma importância crucial nos estudos de lesão e de reparação do nervo periférico e é um dos pontos mais essenciais que poderemos encontrar na investigação do nervo periférico.

As técnicas utilizadas para a avaliação funcional normal e pós-regeneração nervosa no animal de experimentação (avaliação das pegadas; eletroneurografia e força de flexão ao nível do tornozelo) foram as seguintes:

- Índice de Funcionalidade do Isquiático: *sciatic functionality index* (SFI);
- Velocidade de Condução Nervosa Motora (MNCV) e da força de flexão ao nível do tornozelo;
- Taxa de Recuperação Muscular (peso dos músculos gastrocnémios e solhear);
- Registo da função em vídeo.

2.2.5.1. Índice de Funcionalidade do Isquiático: *sciatic functionality index* (SFI)

A validação do índice de funcionalidade do isquiático, *sciatic functionality index* (SFI) é realizada antes da cirurgia, na 4.^a semana, pós-cirurgia, e no final da experiência.^{9,77,84} Para a realização deste teste, os animais foram colocados numa extremidade de um corredor de madeira com 42 cm de comprimento e 8,2 cm de largura, conectado no final com uma caixa fechada e pintada de preto para atrair o animal.⁹ No chão do corredor é colocado um papel milimétrico para obter a marca das patas posteriores que são pintadas com o azul-de-metileno. Os animais têm que ser previamente treinados a caminhar no corredor.

As seguintes medidas foram obtidas através da impressão de ambas as patas experimentais (E) e não-operadas (N): a distância entre o 1.º e o 5.º dedos: *toe spread* (TS); a distância entre o 2.º e o 4.º dedos: *intermediate toe spread* (ITS); e o comprimento da impressão *the print length* (PL).^{9,84,85}

A fórmula de Bain *et al.* foi usada para determinar o SFI^{77,78}. Um valor de SFI próximo de 100 representa uma total deficiência dos membros posteriores, enquanto um score de 0 indica a total recuperação do nervo isquiático.^{8,84}

2.2.5.2. Avaliação da Velocidade de Condução Nervosa Motora (MNCV) e da força de flexão ao nível do tornozelo

Sob anestesia geral e directa, na visualização do nervo isquiático, foi medida a velocidade de condução nervosa motora (MNCV) dos dois membros com o equipamento *Neuromatic 2000 M/C Neuromyograph*, como descrito por Varejão⁹. Depois de determinada a MNCV, foi avaliada a força da flexão em ambos os lados pela estimulação directa do nervo com o neuro-estimulador *Plexival Medival*, um aparelho produtor de uma corrente eléctrica com as seguintes características: intensidade de 4.0 miliampères; frequência de 4 Hertz; e 50 microsegundos de duração.

A pata ficou em posição de descanso e foi fixada ao dinamómetro transdutor (*Sauter FH-5*) com uma linha de sutura paralela à mesa. As leituras foram avaliadas para 30 segundos. Obteve-se um valor médio destas leituras.

2.3. Referências Bibliográficas

1. Neal, S. e Fields, KB. (2010) *Peripheral nerve entrapment and injury in the upper extremity*. In *American family physician*, 81:147-55.
2. Sunderland, S. Nerve. (1991) *Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal*. In 1.ª ed., New-York, Churchill Livingstone.
3. Dahlin, LB. (2006) *Nerve injury and repair: from molecule to man*. In D.J. S., Hentz V.R., ed. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. In 1.ª ed., Philadelphia, Churchill Livingstone, pp. 1-22.
4. Szabo, R.M. e Koo, J.T. (2006) *Compression neuropathies of the median nerve*. In D.J. S., Hentz V.R., ed. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. In 1.ª ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, pp. 41-219.
5. Mackinnon, S.E. e Novak, C.B. (2011) *Compression neuropathies*. In Wolfe, S.W.; Hotchkiss, R.N.; Pederson, W.C.; Kozin, S.H., ed. *Green's operative hand surgery*. 6.ª ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, pp. 977-1014.
6. *Decreto-Lei n.º 274/99 de 22 de Julho*. Documentação, CNECV. 1991-1993; 1:67-72.
7. Goyri-O'Neill, João; Pais, Diogo; Freire De Andrade, Francisco; Ribeiro, Paulo; Belo, Ana; O'Neill, Assunção; Ramos, Samuel e Neves Marques (2013) *Improvement of the Embalming Perfusion Method: The Innovation and the Results by Light and Scanning Electron Microscopy*. *Acta Med. Port.*, 26 [3], Maio-Junho, pp.188-194.
8. Almeida, Maria Angélica; Casal, Diogo; Mafra, Manuela; Mascarenhas-Lemos, Luís; Martins-Ferreira, José; Ferraz-Oliveira, Mário; Amarante, José Amarante e Goyri-O'Neill, João (2013) *Brachial Plexus Morphology and Vascular Supply in the Wistar Rat Morphologia e Vascularização do Plexo Braquial no Rato Wistar*. *Acta Med. Port.*, 26 [3], Maio-Junho, pp.

- 243-250.
9. Varejão, A.S. (2003) *Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experimental*. Tese de Doutoramento Vila Real, Trás-os-Montes e Alto Douro.
 10. Bontioti, E. (2005) *End-to-side nerve repair. A study in the forelimb of the rat*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de Lund, Suécia, pp. 36-41.
 11. Cenci, M.A.; Whishaw, I.Q. e Schallert, T. (2002) *Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat?* Nature reviews Neuroscience, 3:574-9.
 12. Rupp, A; Schmahl, W; Lederer, W e Matiasek, K. (2007) *Strain differences in the branching of the sciatic nerve in rats*. Anatomia, histologia, embryologia, 36:202-8.
 13. Varejão, A.S. (2011) *Cirurgia dos Nervos Periféricos*. In Patrício, J.A.B., ed. *Microcirurgia: Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental*, 1.^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp.101-105.
 14. Dahlin, L.B. (2006) *Nerve injury and repair: from molecule to Man*. In Slutsky, D.J. e Hentz, V.R., ed. *Peripheral Nerve Surgery: Practical Applications in the Upper Extremity*. Philadelphia, Elsevier, pp. 1-22.
 15. Suami, H.; Taylor G.I. e Pan W.R. (2003) *Angiosome territories of the nerves of the lower limbs*. Plast. Reconstr. Surg., 112:1790-8.
 16. Terzis, J.K.; Skoulis, T.G. e Soucacos, P.N. (1995) *Vascularized nerve grafts. A review*. Int. Angiol, 14:264-77.
 17. Breidenbach, W.C. e Terzis, J.K. (1986) *The blood supply of vascularized nerve grafts*. J. Reconstr. Microsurg., 3:43-58.
 18. Breidenbach, W. e Terzis, J.K. (1984) *The anatomy of free vascularized nerve grafts*. Clin. Plast. Surg., 11:65-71.
 19. Adams, W.E. (1943) *The blood supply of nerves*. Journal of anatomy, 77:243.
 20. Hong, M.K e Taylor, G.I. (2006) *Angiosome territories of the nerves of the upper limbs*. Plast. Reconstr. Surg., 118:148-60.
 21. Angélica Almeida, Maria; Casal, D.; Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L.; Martins-Ferreira, J.; Ferraz-Oliveira, M.; Pais, D.; Amarante, J. e Goyri-O'Neill, J. (2014) *Angiomorphological comparison of the sciatic nerve of the rat and the human median nerve: implication sexperimental procedures...* Archives of Anatomy, Vol. 2, nº 1, pp. 31-51.
 22. *Decreto-Lei nº 113/2013 - 7 de Agosto*.
 23. Festing Michael, F.W.; Overend, Das Rose Gaines; Borja, Mario Cortina; Berdoy, Manuel (2004) *The Design of Animal Experiments: Reducing the use of animals in reserarch through better experimental design*. Laboratory Animal Hanbooks NO. 14 2002, Laboratory Animal Ltd Reprinted.
 24. Rainer, G. and Miller, E.K. (2000) *Effects of Visual Experience on the Representation of Objects in the Prefrontal Cortex*. Neuron 27, pp. 179-189.
 25. Festing, M.F.W. (1994) *Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments*. Laboratory Animals 28, pp. 212-21.
 26. Altman, D.G. (1991) *Practical Statistics for Medical Research*. London, Glasgow, New-York, Chapman and Hall.
 27. McCance. (1995) *Assessment of statistical procedures used in papers in the Australian Veterinary Journal*. *Australian Veterinary Journal* 72, pp. 322-8.
 28. Porter, A.M.W. (1999) *Misuse of correlation and regression in three medical journals*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 92, pp.123-8.
 29. Home Office (1995) *Code of Practice for the housing and care of animals in designated breeding and supplying establishments*. London, HMSO.
 30. Home Office (2000) *Guidance on the operation of the Animals (Scientific Procedures). Act. 1986*. London *The Stationery Office*. [Internet] Disponível em (www.homeoffice.gov.uk/ccpd/aps.htm).
 31. NRC (National Research Council) (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington DC, National Academy Press.
 32. Stokes, W.S. 12000 *Reducing unrelieved pain and distress in laboratory animals using humane end points*. *ILAR Journal* 41, pp. 59-61.
 33. Hellebrekers L.J.B., L.H. e Flecknell, P.A. (2001) *Anaesthesia, analgesia and euthanasia*. In *Principles of Laboratory Animal Science*. Editores Van Zutphen, L.F.; Baumans, V.; Beynen, A.C., Elsevier, pp. 277-311.
 34. Van Zutphen L. e V.B., Beyen A. (2001) *Principles of Laboratory Animal Science*. Amsterdam, Elsevier Science Publ., pp. 5-6.

35. Graeme D. Ruxton e Nick Colegrave. *Experimental Design for the life sciences*. 2.^a ed. Oxford.
36. Shimazaki, Jun; Shinozaki, Naoshi e Tsubota, Kazuo (1998) "Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon". Br. J. Ophthalmol 82 (March), pp. 235-240.
37. Mohammad, Jamal; Shenaq, Jay; Rabinovsky, Eric e Shenaq, Saleh (2000) "Modulation of Peripheral Nerve Regeneration: A Tissue-Engineering Approach. The Role of Amnion Tube Nerve Conduit Across a 1 - Centimeter Nerve Gap". Plast. Reconstr. Surg. Feb.105, pp. 660-666.
38. Ramos, Maria Teresa Furtado; Costa, Laura Maria Bugalhão; Roberto, Maria Angélica Rato da Silva (2001) *A method of preparation of amniotic membrane renders the tissue immunologically inert*. Depósito n.º 102589, Instituto Nacional da Propriedade Industrial de 30 de Março, Patente 102 589.
39. Tseng, S.C.G. e Li D-Q, Ma X. (1998) *Down-regulation of TGF-β1, TGF-β2, TGF-3, and tgG - receptor II expression in human corneal fibroblasts by amniotic membrane*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 39:S428.
40. Li, D.W. e Tseng, S.C.G. (1995) Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. J. Cell Physiol, 163:61-79.
41. Dua, Harminder S. (1999) "Amniotic membrane transplantation". Br. J. Ophthalmol 83, pp. 748-752.
42. Trelford, John D.; Hanson, Frederick W.; Anderson, David G. e Mendel, Verne E. (1975) "Amnion autografts, permanent structure". *Journal of Medicine* 6, pp. 243-247.
43. Trelford, John D.; Hanson, Frederick W.; Anderson, David G. e Mendel, Verne (1975) "Implanted Amniotic Membrane as an Autograft and as an Allograft." *Journal of Medicine* 6, pp. 169-180.
44. Lee, S. H. e Tseng S. C. (1997) "Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration." Am. J. Ophthalmol 123, pp. 303-12.
45. Solomon, Abraham; Pires, Renato T. F. e Tseng, Scheffer C. G. (2001) "Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia." *Ophthalmology* 108, pp. 449-60.
46. Shimazaki, Jun; Shinozaki, Naoshi e Tsubota, Kazuo (1998) "Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon." Br. J. Ophthalmol 82, March, pp. 235-240.
47. Tseng, Scheffer C.C; Prabhasawat, Pinnita e Lee, Shwu-Huey (1997) "Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction." Am. J. Ophtalmol 124 (6), pp. 765-74.
48. Meller, Daniel; Maskin, Steven L.; Pires, Renato T. F. e Tseng, Scheffer C. G. (2000) "Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments." *Cornea* 19, pp. 796-803.
49. Rao, T. Viswanatha e Chandrasckharam, V. (1981) "Use of Dry Human and Bovine Amnion as a Biological Dressing." *Arch. Surg.* 116, pp. 891-896.
50. Rutkowski, Gregory E. e Heath, Carole A. (2002) "Development of a Bioartificial Nerve Graft. II. Nerve Regeneration in Vitro." *Biotechnol. Prog.* 18 (2), pp. 373-379.
51. Rutkowski, Gregory E. e Heath, Carole A. (2002) "Development of a Bioartificial Nerve Graft. I. Design based on a Reaction-diffusion Model." *Biotechnol. Prog.* 18, pp. 362-372.
52. Hudson, Terry W.; Evans, Gregory R. D. e Schmidt, Christine E. (2000) "Engineering strategies for Peripheral Nerve Repair." *Clinica in Plastic Surgery* 26, pp. 485-497.
53. Mligiliche, Nurru; Endo, Katsuaki; Okamoto, Keiko; Fujimoto, Etsuko e Ide, Chizuka (2002) "Extracellular matrix of Human Amnion Manufactured into Tubes as Conduits for Peripheral Nerve Regeneration." *J. Biomed Mater Res.* 63, pp. 591-600.
54. Mohammad, J.A.; Warnke, P. H.; Pan, Y. C. e Shenaq, S. (2000) "Increased axonal regeneration through a biodegradable amniotic tube nerve conduit: effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media." *Ann. Plast. Surg.* 44, pp. 59-64.
55. Esperança-Pina J.A. (1979) *Territórios arteriais esplénicos. Bases anatomo-experimentais das esplenectomias parciais*. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
56. Goyri O'Neill J. (1983) *Vascularização da Placenta Humana*. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Ciências Médicas, pp. 33-41.
57. Esperança-Pina J.A. (1973) *Circulação venosa cardíaca*. Estudo anatomo-experimental. 2^a ed. Edição do autor, Lisboa.

58. Correia M. (1983) *Vascularização arterial do rim*. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, FCM.
59. Pais D. (1995) *Vascularização arterial e microvascularização testículo-epididimária*. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, FCM. Lisboa.
60. Pu L.L.; Syed S.A.; Reid M.; Patwa H., e Goldstein J.M. (1999) *Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap*. *Plastic and reconstructive surgery*, 104:1379-85.
61. Chiu D.T. e Strauch B. (1990) *A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less*. *Plastic and reconstructive surgery*, 86:928-34.
62. Stahl S. e Rosenberg N. (1999) *Digital nerve repair by autogenous vein graft in high-velocity gunshot wounds*. *Military medicine*, 164:603-4.
63. Duan X.L.; Xu Y.Z. e Zeng Z.C. (2004) *Bridging rat sciatic nerve defects with the composite nerve-muscle autografts wrapped with human amnion matrix membrane*. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences*, 29:279-83.
64. Geuna, S.; Tos, P.; Battiston, B.; Guglielmone, R. e Giacobini-Robecchi M.G. (2000b) *A stereological study of long-term regeneration of rat severed sciatic nerve repaired by means of muscle-vein-combined grafts*. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* 105, pp. 65-73.
65. Evans, Grd.; Brandt, K.; Widmer, M.S.; Lu, L.; Meszlenyi, R.K.; Gupta, P.K.; Mikos, A.G.; Hodges, J.; Williams, J.; Gürlek, A.; Nabawi, A.; Lohman, R. e Patrick, J.R. C.W. (1999) *In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration*. *Biomaterials* 20, pp. 1109-1115.
66. Geuna, S.; Tos, P.; Battiston, B.; Guglielmone, R.; Giacobini-Robecchi, M. G. (2000c) *Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle*. *Anatomy and Embryology* 201, pp. 475-482.
67. Cuadras, J.; Verdú, E. e Navarro, X. (1999) *Improvement of regeneration with predegenerated nerve transplants in silicone chambers*. *Restorative Neurology and Neuroscience* 14, pp. 65-79.
68. Mackinnon, S.E.; Hudsonm, A.R. e Hunter, D.A. (1985) *Histologic assessment of nerve regeneration in the rat*. *Plastic and Reconstructive Surgery* 75, pp. 384-388.
69. Geuna, S. (2000) *Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system*. *Journal of Comparative Neurology* 427, pp. 333-339.
70. Geuna, S.; Tos, P.; Battiston, B. e Guglielmone, R. (2000a) *Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves*. *Annals of Anatomy* 182, pp. 23-
71. Geuna, S.; Tos, P., Battiston, B., Guglielmone, R. e Giacobini-Robecchi, M.G. (2001) *Methodological Issues In Size Estimation Of Myelinated Nerve Fibers in peripheral nerves*. *Anatomy and Embryology* 204, pp. 1-10.
72. Spalteholz, W. (1927) *Das durchsichtigmachen als biologische arbeitsmethode*. *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden* 8, pp. 409-32.
73. Esperança-Pina, J.A. (1972) *A investigação anatomo-funcional em angiologia e as substâncias fluorescentes*. Prova Complementar de Doutoramento, FML.
74. Goyri O'Neill, J. e Esperança-Pina, J.A. (1982) *Modificação à técnica de difanização-I*. In *Actas do V International Symposium On Morphological Sciences*, Rio de Janeiro.
75. Goyri O'Neill J. (1984) *Técnica de Plastinização: Sua contribuição para o ensino e investigação em Anatomia*, pp. 92-101.
76. Esperança-Pina, J. (1983) *Aspectos morfológicos gerais e actuais da microvascularização*. *Acta Médica Portuguesa*, 4:433-6.
77. Rupp A. Functional (2007) *Funcional, electrophysiologic and morphometric evaluation of peripheral nerve regeneration after bridging a 14 mm gap in the rat sciatic nerve*. Tese de Doutoramento Munich, Ludwig-Maximilians.
78. Jivan, S.; Novikova, L.N.; Wiberg, M. e Novikov, L.N. (2006) *The effects of delayed nerve repair on neuronal survival and axonal regeneration after seventh cervical spinal nerve axotomy in adult rats*. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale*, 170:245-54.
79. Politis, M.J. e Steiss, J.E. (1985) *Electromyographic evaluation of a novel surgical preparation to enhance nerve-muscle specificity that follows mammalian peripheral nerve trunk transection*. *Experimental Neurology* 87, pp. 326-333.
80. Erlanger, J. e Gasser, H. (1937) *Electrical signs of nervous activity*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia.

81. Evans, G.R.D.; Brandt, K.; Niederbichler, A.D.; Chauvin, P.; Hermann, S.; Bogle, M.; Otta, L.; Wang, B. e Patrick, J.R. CW. (2000) Clinical long-term in vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 11, pp. 869-878.
82. Meek, M.F.; Van Der, WERFF JFA; Nicolai J.P.A e Gramsbergen, A. (2001) Biodegradable nerve guides versus autologous nerve grafts: electromyographic and video analysis. *Muscle & Nerve* 24, pp. 753-759.
83. Rosen, J.M. e Jewett, D.I. (1980) Physiological methods of evaluating experimental nerve repairs. In Jewett DL, McCarrol HR Jr, editors. *Nerve repair*. The C.V. Mosby Company, St. Louis, pp. 150-16.
84. Brown, C.J.; Mackinnon, S.E.; Evans, P.J.; Bain, J.R. e Makino, A.P., *et al.* (1989) *Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index*. *Microsurgery*, 10:226-35.
85. Angélica Almeida, Maria; Casal, D.; Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L.; Silva, E.; Farinho, A.; Iria, I.; Martins-Ferreira, J.; Ferraz-Oliveira, M.; Videira, P.; Vassilenko, V.; Amarante. J. e Goyri-O'Neill, J. (2014) *Evaluation of the efficacy of different conduits to bridge a 10 millimeter defect in the rat sciatic nerve in the presence of an axial blood supply*. *Archives of Anatomy* Vol. 2, nº 1, 4-30.
86. Maria Angelica Almeida; M. Manuel Mouzinho; João Anacleto; Teresa Ramos; Laura Silva (2002). Repair of Rat Sciatic Nerve Gaps with Human Amniotic Membrane Tube, and Using Interposition of Autologous Vein Conduits. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 18 (3), Abstracts-Part I, pp. 203-258.

Capítulo 3

3. A VASCULARIZAÇÃO DO NERVO MEDIANO DO CADÁVER HUMANO

3.1. Considerações gerais

As capacidades do nervo periférico de regenerar e de reinervar os seus órgãos-alvo são reconhecidas há mais de um século. Contudo, em caso de lesão do nervo, são poucas as vezes em que se atinge uma recuperação funcional completa, apesar dos avanços importantes nas técnicas de microcirurgia e do conhecimento actual do processo regenerativo. Os avanços nas técnicas cirúrgicas dependem muito do conhecimento da área anatómica para se poder intervir e, quando se trata da vitalidade de um tecido, é muito importante respeitar a sua vascularização.

Sendo o neurónio muito vulnerável à isquemia, é fundamental ter um conhecimento pormenorizado da macro e da microvascularização do nervo periférico para a compreensão da sua influência na regeneração nervosa. Com esse conhecimento pormenorizado será, com certeza, possível descreverem-se novas técnicas cirúrgicas que permitam a reconstrução do nervo periférico lesado com melhores resultados na prática clínica, particularmente no grau de recuperação motora e sensitiva.

Os nervos do membro superior estão sujeitos, muito frequentemente, a lesões traumáticas, quer pela compressão exercida por estruturas circundantes, quer pela secção do nervo.¹⁻³ No túnel cárpico é muito frequente o nervo mediano ser afectado por uma compressão exercida pelo ligamento anterior do cárpico, desenvolvendo-se um quadro clínico típico que é designado síndrome do túnel cárpico. Estima-se que esta patologia tenha uma taxa de incidência de pelo menos 3 % na população em geral.^{1,4,5} Nos Estados Unidos da América, a síndrome do túnel cárpico está associada a 90 % das consultas dos doentes com disfunção do nervo periférico, o que corresponde a mais de 13 % do total das consultas com o médico de família.^{1,4}

Além disso, não só a compressão no nervo mediano tem uma grande incidência, como também está associada a uma importante incapacidade funcional individual com graves repercussões económico-sociais.^{1,4,5} Por exemplo, após o tratamento cirúrgico da síndrome do túnel cárpico, mais de 10 % dos doentes continuaram sem trabalhar e um grande número deles reportou a sua incapacidade para o trabalho e/ou para outras actividades.³

As lesões originadas por secção do nervo, particularmente no caso do nervo mediano, são menos frequentes do que as lesões por compressão, mas ainda assim representam quase 3 % das lesões do membro superior que são referenciadas pelas Unidades ou Centros de Patologia da Mão.³ Estas lesões têm um prognóstico pior do que as lesões originadas por compressão e estão associadas não só a um grande encargo individual, mas também social (em relação à sociedade).^{2,3,5}

Na Suécia, por exemplo, foi contabilizado que uma pessoa com uma secção do nervo mediano no antebraço representa um custo para a sociedade de 51 238 € nos primeiros anos após a lesão.^{6,7}

Por conseguinte, não é surpresa que numerosos estudos tenham sido feitos para permitir um melhor conhecimento e um melhor tratamento das lesões dos nervos periféricos, em particular do nervo mediano.^{2,4,8,9,10} Assim, um conhecimento pormenorizado da vascularização do nervo é de grande importância, quer na experimentação, quer na clínica, nomeadamente no planeamento e na execução de retalhos nervosos livres, pediculados ou de retalhos compostos que incluem nervos.¹⁰⁻¹³

3.2. Anatomia Vascolar do Nervo Periférico

3.2.1. Conceito de Angiosoma

A bibliografia existente sobre a vascularização do nervo periférico, sobretudo aquela que se refere à microvascularização, quer humana, quer animal, e a sua influência na regeneração nervosa, é escassa.

Taylor e Palmer, em 1987^{14,15}, introduziram na medicina o conceito de "angiosoma" com os seus estudos anatómicos aplicados no campo da Cirurgia Plástica Reconstructiva. Este conceito delimita o corpo humano em áreas vasculares tridimensionais com territórios cutâneos, subcutâneos e musculares, irrigados por artérias específicas e drenados por veias acessórias e específicas também. Cada angiosoma subdivide-se, por sua vez, em dois territórios: o território arterial, o artériosoma, e o território venoso, o venosoma.¹³⁻¹⁶

O conceito de angiosoma explica as variações anatómicas dos vasos de diferentes regiões do corpo e divide o corpo humano em blocos vasculares tridimensionais que se relacionam entre si como um *puzzle*. As zonas de inter-relação entre angiosomas adjacentes ocorrem, normalmente, ao nível da musculatura profunda. A maioria dos tecidos (músculos, nervos, ossos e tendões) é atravessada por dois ou mais angiosomas.¹³

3.2.2. A Vascularização Arterial do Nervo Periférico

De acordo com a classificação de Taylor, podemos descrever 4 tipos de vascularização arterial dos nervos periféricos (Figura 3.1):

- **O tipo A** refere-se a um nervo *não-ramificado*, suprimido de uma forma segmentar por um vaso paralelo;
- **O tipo B** refere-se a um nervo *ramificado*, suprimido da mesma maneira que o de tipo **A**;
- **O tipo C** refere-se a um nervo *não-ramificado* com um longo pedículo vascular que cursa no epinervo;

- O **tipo D** refere-se a um nervo *não-ramificado* com múltiplos pedículos vasculares com origem em diferentes vasos;
- O **tipo E** refere-se a um nervo *ramificado* com uma vascularização análoga à do tipo **D**.

A classificação de Taylor foi inicialmente idealizada para contribuir para a possibilidade de uma transferência nervosa como retalho livre.¹⁶⁻¹⁸ O uso desta classificação como um método prático para fornecer informação relativa ao transporte da vascularização dos nervos é importante.

Assim, relativamente à adequação para a transferência microvascular livre de nervo, considera-se que o melhor nervo para esta transferência é aquele que possui uma vascularização arterial do **tipo A**, enquanto o pior nervo para essa transferência microvascular é aquele que possui uma vascularização arterial do **tipo E**.¹⁶ Na Figura 3.2, ilustra-se o suprimento vascular arterial dos nervos periféricos do membro superior. Os diferentes segmentos dos nervos estão classificados de acordo com os tipos descritos anteriormente, de A a E.

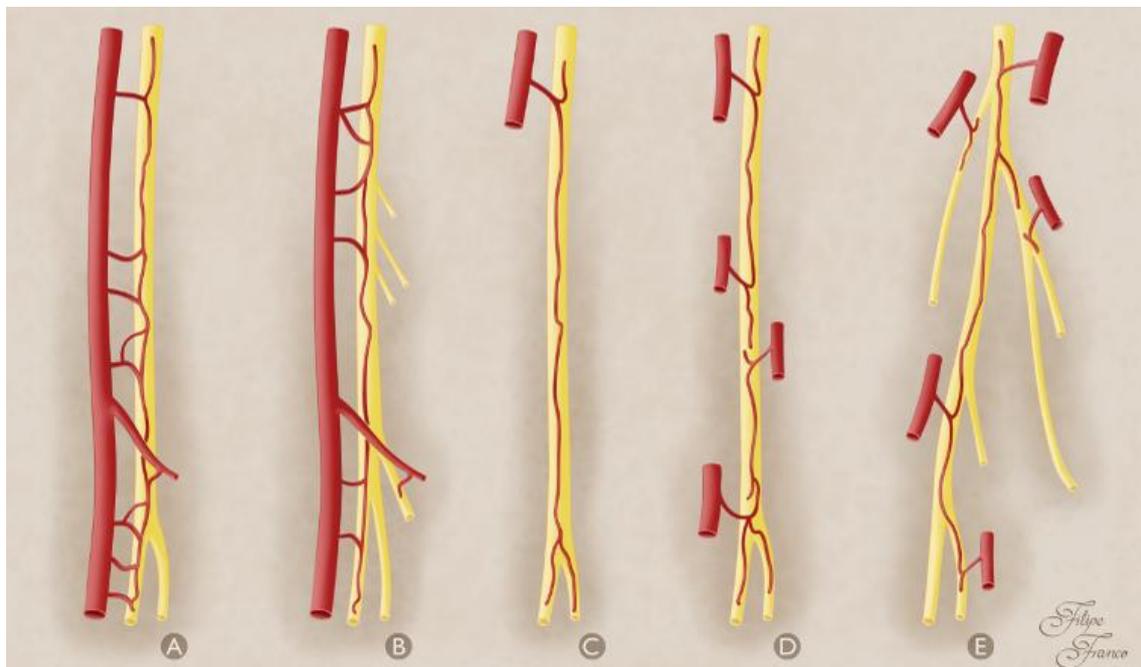


Figura 3.1 - Representação esquemática do suprimento vascular dos nervos periféricos (segundo a classificação de Taylor).

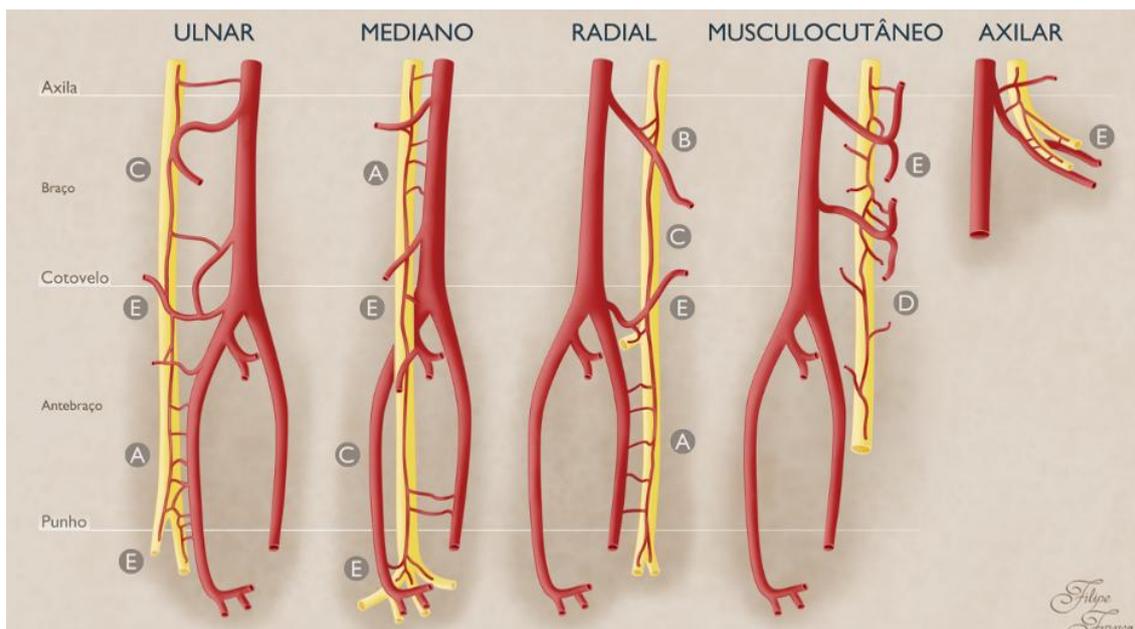


Figura 3.2 - Diagrama simplificado que ilustra o suprimento vascular arterial dos nervos periféricos do membro superior. Os segmentos dos nervos são classificados através de uma escala de tipos, de A a E, de acordo com a sua capacidade para a transferência vascularizada.

3.2.3. A Vascularização Venosa do Nervo Periférico

Taylor identificou 4 padrões de drenagem venosa¹⁶⁻¹⁹ relativamente aos nervos do membro superior (Figura 3.3; Figura 3.4).

Embora muitas das vénulas *nervorum* sejam acompanhadas pelas artérias nutrientes do nervo, elas estão presentes num número superior em relação às artérias. Em geral, as vénulas *nervorum* drenam para a veia mais próxima ou para o plexo de veias.

Como tal, os 4 padrões identificados por Taylor são os seguintes (Figura 3.4 A; Figura 3.4 B; Figura 3.4 C; Figura 3.4 D):

- **A - Drenagem Directa:** Esta é a variedade menos comum na qual as vénulas *nervorum*, geralmente de calibre grande, drenam directamente do nervo em direcção às veias comitantes acompanhantes. Estas veias têm uma configuração característica em forma de T (Figura 3.3 A - nervo ulnar; Figura 3.4 A);
- **B - Drenagem indirecta:** Neste tipo de drenagem venosa, as vénulas *nervorum* tem origem no nervo e juntam-se às veias que o cruzam, as quais dirigem-se para as veias comitantes. Na maioria dos casos, estas veias intermédias derivam de músculos (Figura 3.3 B - nervo mediano; Figura 3.4 B);
- **C - Drenagem para o plexo venoso periarterial:** Este é um padrão muito comum de drenagem venosa do nervo. Nos tecidos profundos, as arteríolas têm um percurso junto às suas veias comitantes e estão rodeadas por um plexo venoso riquíssimo em veias finas que drenam, por sua vez, em direcção às veias comitantes da artéria.

As vénulas *nervorum*, neste padrão, são geralmente de menor calibre em relação aos padrões anteriores, e drenam directamente em direcção ao plexo venoso periarterial (Figura 3.3 C - nervo radial; Figura 3.3 D - nervo isquiático; Figura 3.4 C);

- **D - Drenagem para o plexo venoso perivenos:** Este padrão é típico da drenagem venosa dos nervos cutâneos. Um plexo de veias pequenas drena em direcção às veias grandes subcutâneas. As vénulas *nervorum* drenam em direcção a esse plexo perivenoso, geralmente, depois de um percurso de vários centímetros antes de o alcançarem (Figura 3.3 E - nervo cutâneo; Figura 3.4 D).

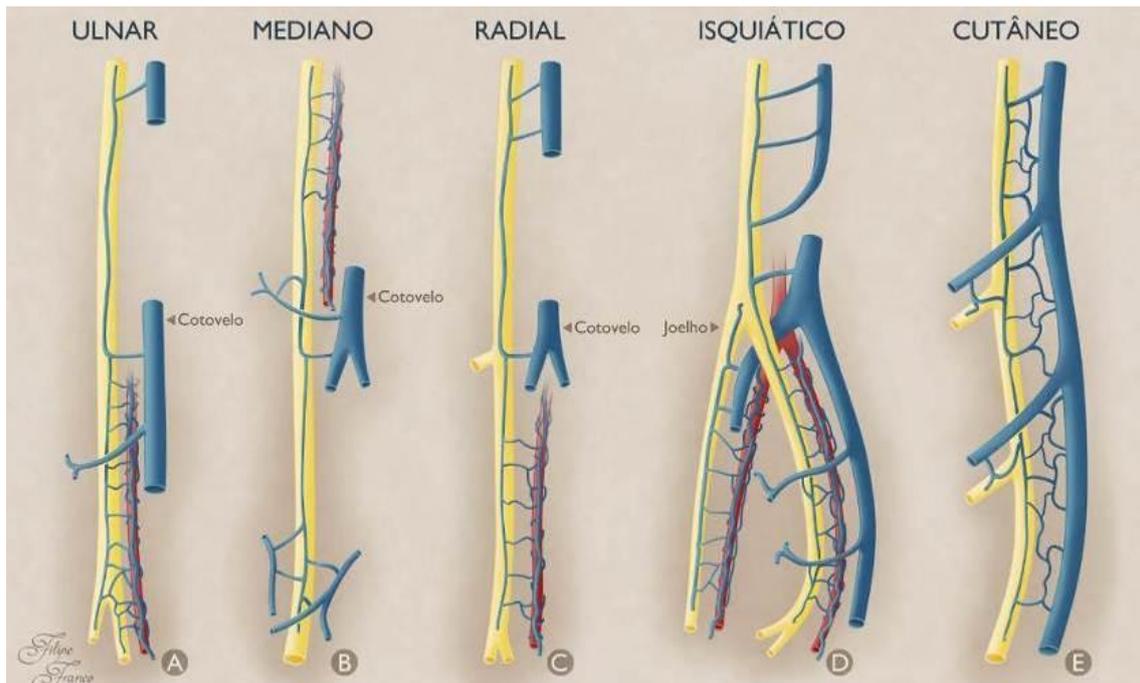


Figura 3.3 - Diagrama esquemático dos quatro tipos de drenagem venosa (segundo a classificação de Taylor). A: drenagem directa - nervo ulnar; B: drenagem indirecta - nervo mediano; C: drenagem para o plexo venoso periarterial - nervo radial; D: drenagem para o plexo venoso periarterial - nervo isquiático; E: drenagem para o plexo venoso perivenoso - nervo cutâneo.

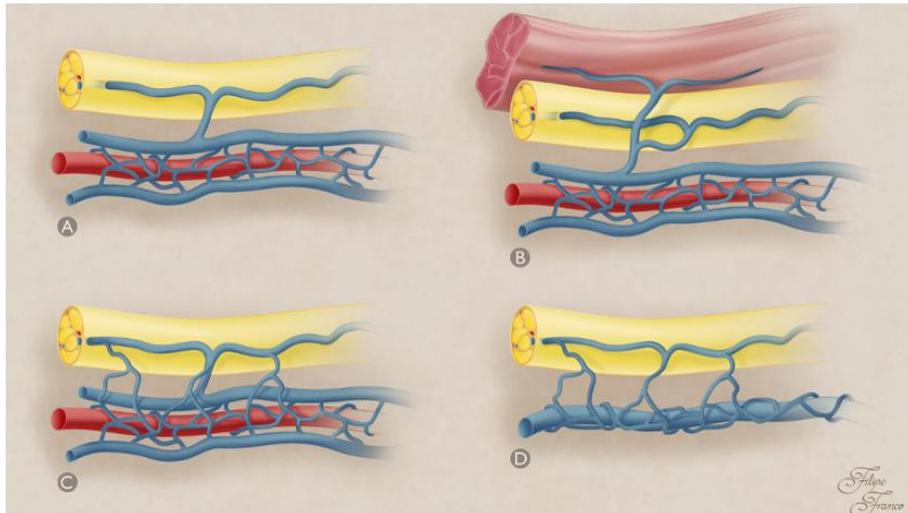


Figura 3.4 - Representação esquemática dos tipos de drenagem venosa do nervo periférico. A: drenagem directa para as veias comitantes do feixe neurovascular; B: drenagem indirecta para as veias próximas derivadas do músculo; C: drenagem para o plexo venoso periarterial; D: drenagem para o plexo perivenoso.

3.3. Estrutura do Nervo Periférico

3.3.1. As Bainhas de Tecido Conjuntivo do Nervo Periférico

Os axónios, também designados fibras nervosas, estão agrupados por um tecido conjuntivo que é uma parte importante do nervo periférico, pois dá suporte às fibras nervosas e a toda a microvascularização do nervo. De acordo com a sua localização no nervo, o tecido conjuntivo é designado epinervo, perinervo ou endonervo.

O epinervo é constituído pelo **epinervo externo ou epifascicular** e pelo **epinervo interno ou interfascicular**.^{20,21} O epinervo externo ou epifascicular é constituído por um tecido conjuntivo laxo que envolve todo o nervo. Por sua vez, o epinervo interno ou interfascicular é constituído pelo tecido conjuntivo laxo onde se encontram os fascículos dispersos.

O epinervo é constituído por colagénio de tipos I e III, por fibroblastos, por tecido adiposo e por numerosos vasos sanguíneos longitudinais que formam o plexo vascular epineural (Figura 3.5).²² O plexo vascular epineural estabelece anastomoses com os plexos vasculares perineural e endoneural (Figura 3.5).

O perinervo é a bainha densa de tecido conjuntivo que envolve, de maneira individual, cada fascículo, e é formado por um conjunto de lâminas celulares e de fibras de colagénio (Figura 3.6). Esta estrutura serve, assim, para proteger o conteúdo do endonervo de agressões externas e possui ainda uma rede vascular importante que é designada plexo vascular perineural.

O endonervo é o tecido conjuntivo intrafascicular constituindo, assim, o meio conjuntival onde se dispõem os axónios. O endonervo é composto predominantemente por fibroblastos e por fibras de colagénio de tipo I, as quais dispõem-se de uma forma paralela aos axónios. Os vasos capilares existentes no endonervo formam o plexo vascular endoneural.

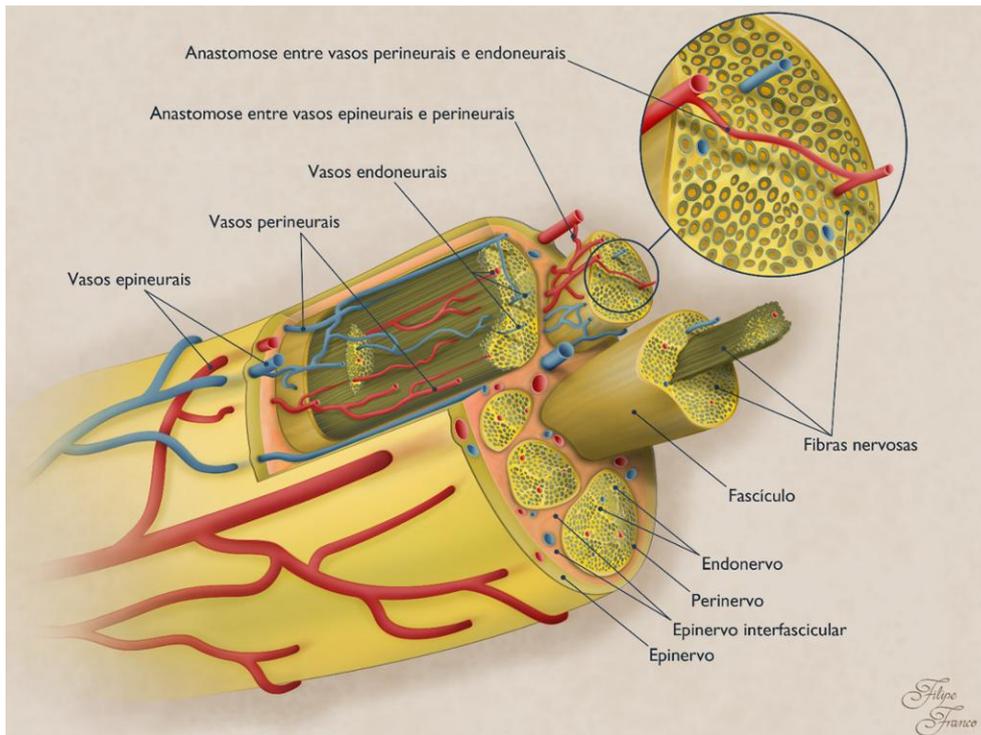


Figura 3.5 - Representação esquemática das estruturas do nervo periférico onde se pode ver a relação das bainhas do tecido conjuntivo (epinervo, epinervo interfascicular, perinervo e endonervo) com as fibras nervosas e a vascularização do nervo constituída pelo plexo vascular epineural, pelo plexo vascular perineural e pelo plexo vascular endoneural, e as anastomoses entre eles.

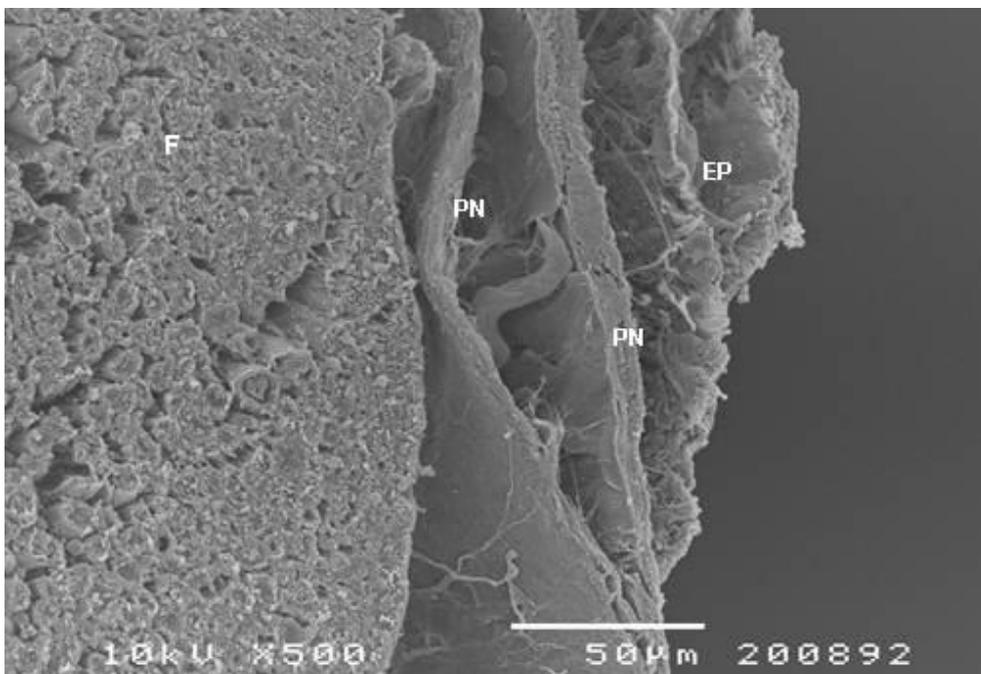


Figura 3.6 - Imagens das ultra-estruturas do nervo periférico em MEV (ponto crítico 500 x).
F - Fascículo; PN - Perinervo; EP - Epinervo.

3.3.2. A Microcirculação do Nervo Periférico

O nervo periférico possui dois sistemas microvasculares integrados, mas funcionalmente independentes e bem desenvolvidos, no epinervo, no perinervo ou no endonervo. São designados **sistema microvascular extrínseco** e **sistema microvascular intrínseco**.²²⁻²⁸

O sistema microvascular extrínseco tem origem nos vasos arteriais e venosos vizinhos, bem como noutros vasos de menor calibre, nos músculos adjacentes e no periósteo. Os vasos do sistema extrínseco circulam num mesonervo e, quando atingem o **epinervo epifascicular**, dividem-se em ramos ascendentes e descendentes que se anastomosam com o sistema intrínseco, o qual, por sua vez, é composto pelos vasos do epinervo interfascicular, pelo plexo vascular perineural e pelo plexo vascular endoneural (Figura 3.5, Figura 3.7).

Os vasos sanguíneos do epinervo epifascicular, e que integram o **sistema microvascular extrínseco**, e os vasos sanguíneos do epinervo interno ou interfascicular caracterizam-se por serem de maior calibre e por seguirem o eixo longitudinal do nervo. Estes vasos do plexo epineural formam numerosas anastomoses com os vasos do plexo perineural, que também estão orientados no sentido do eixo longitudinal do nervo.

A partir do perinervo, os vasos cursam de forma oblíqua em direcção ao espaço do endonervo onde se anastomosam com o plexo vascular endoneural²³⁻²⁹ (Figura 3.5).

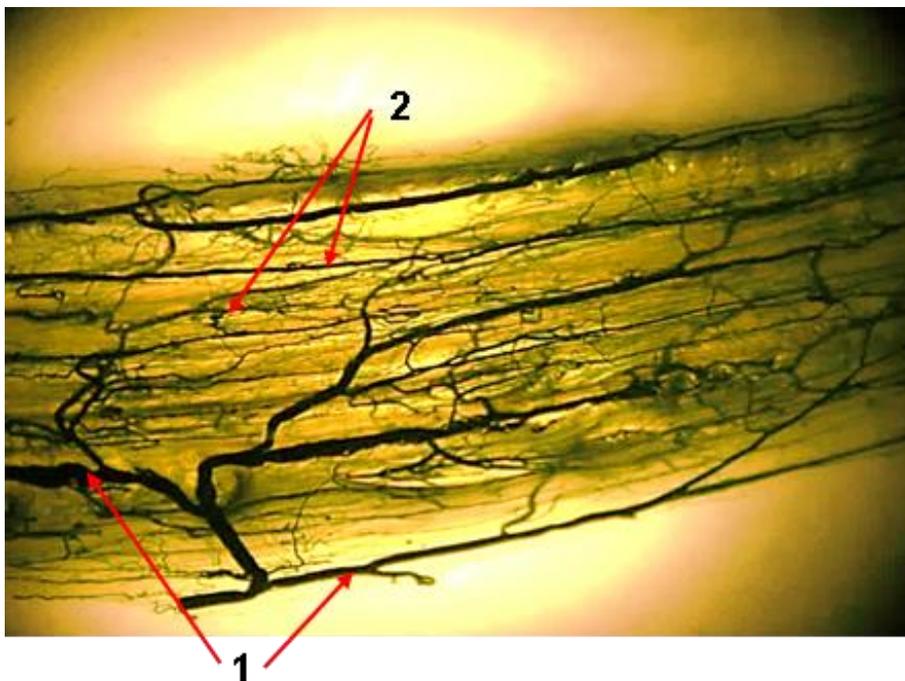


Figura 3.7 - Nervo Mediano Humano, após injeção arterial de *Micropaque* e diafanização, observado em lupa estereoscópica e transiluminação (ampliação 20 x). 1 - Sistema microvascular extrínseco; 2 - Sistema microvascular intrínseco.

3.4. A Macrovascularização do Nervo Mediano Humano

O estudo da macrovascularização do nervo mediano humano foi realizado em 15 cadáveres humanos. Para esse estudo, procedeu-se à injeção na artéria subclávia, de uma suspensão coloidal de sulfato de bário (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com 10 % de gelatina comercial (em partes iguais) e corada com pigmento vermelho (*Pigment Tintolac Super, Robialac*). A abordagem da artéria subclávia para a realização da injeção do produto indicado foi uma abordagem anatómica supraclavicular.³⁰⁻³⁴

Os nervos medianos foram dissecados sob uma lupa cirúrgica de aumento, da sua origem na axila aos ramos terminais na mão, procedendo-se, depois, ao estudo da sua vascularização que nos permitiu perceber que o nervo mediano tem origem na frente da artéria axilar por confluência das raízes medial e lateral do plexo braquial. Da sua origem aos ramos terminais na mão, o nervo recebe múltiplos ramos vasculares das artérias axilar, braquial, radial, cubital, colateral, cubital inferior, cubital recorrente, dos vasos interósseos anteriores e das arcadas palmares na mão (Figura 3.8). Da sua origem e a partir das raízes medial e lateral, múltiplos vasos suprimem o nervo, seguindo-o ao longo de todo o seu comprimento (Figura 3.9).

De acordo com a classificação de Taylor sobre a vascularização nervosa¹⁶, o nervo mediano segue o padrão de **tipo A** no braço, o de **tipo E** no antebraço distal e proximal e o de **tipo C** em 1/3 médio do antebraço. O nervo interósseo anterior e os nervos colaterais digitais palmares que são originários do nervo mediano são seguidos, paralelamente, pelos ramos homónimos que apresentam um padrão de **tipo A**. O nervo mediano humano recebe também múltiplos ramos vasculares a partir dos vasos vizinhos, particularmente daqueles que paralelamente ao nervo, mesmo sendo algo breve (Figura 3.8; Figura 3.9).

Estes vasos fornecem ao plexo vascular epineural vários ramos ao longo do nervo de uma maneira relativamente variável. Acrescente-se que o nervo mediano humano recebe também ramos dos vasos que suprimem os músculos vizinhos, particularmente onde os nervos originam ramos para estes. Por último, foi muito frequente observar os vasos sanguíneos a acompanhar os ramos nervosos destinados aos músculos, numa direcção oposta à dos nervos, terminando com o estabelecimento de anastomoses com o plexo vascular epineural²³⁻²⁸ (Figura 3.9; Figura 3.11 A).

Concluído o estudo por dissecação, os nervos medianos foram removidos e foi realizada a diafanização pela técnica descrita no Capítulo 2³⁵⁻³⁸. Pela observação através de uma lupa estereoscópica (marca *MEILJI*, modelo *EMZ-13TR Olympus*) e através de transiluminação (ampliação 20 x), foi possível também identificar os vasos da microcirculação com um calibre menor, até 0,2 mm (Figura 3.11 A; Figura 3.11 B).

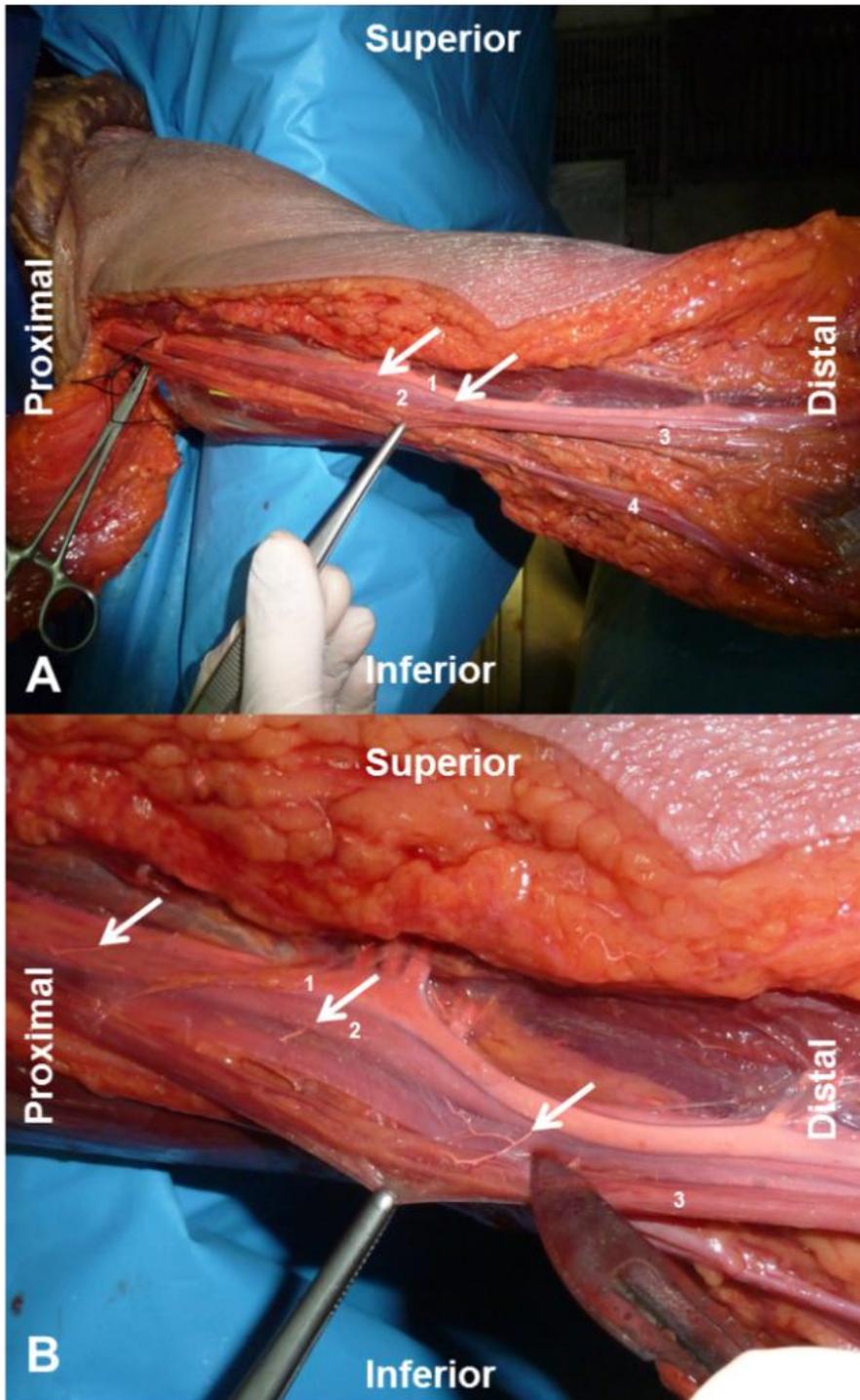


Figura 3.8 - Fotografia de aspecto medial da dissecção do braço direito. A - Demonstra os múltiplos ramos da artéria braquial em direcção ao nervo mediano; B - Demonstra, em pormenor, alguns desses ramos: 1 - artéria braquial; 2 - veia braquial; 3 - nervo mediano; 4 - veia basílica; setas - ramos da artéria braquial em direcção ao nervo mediano.

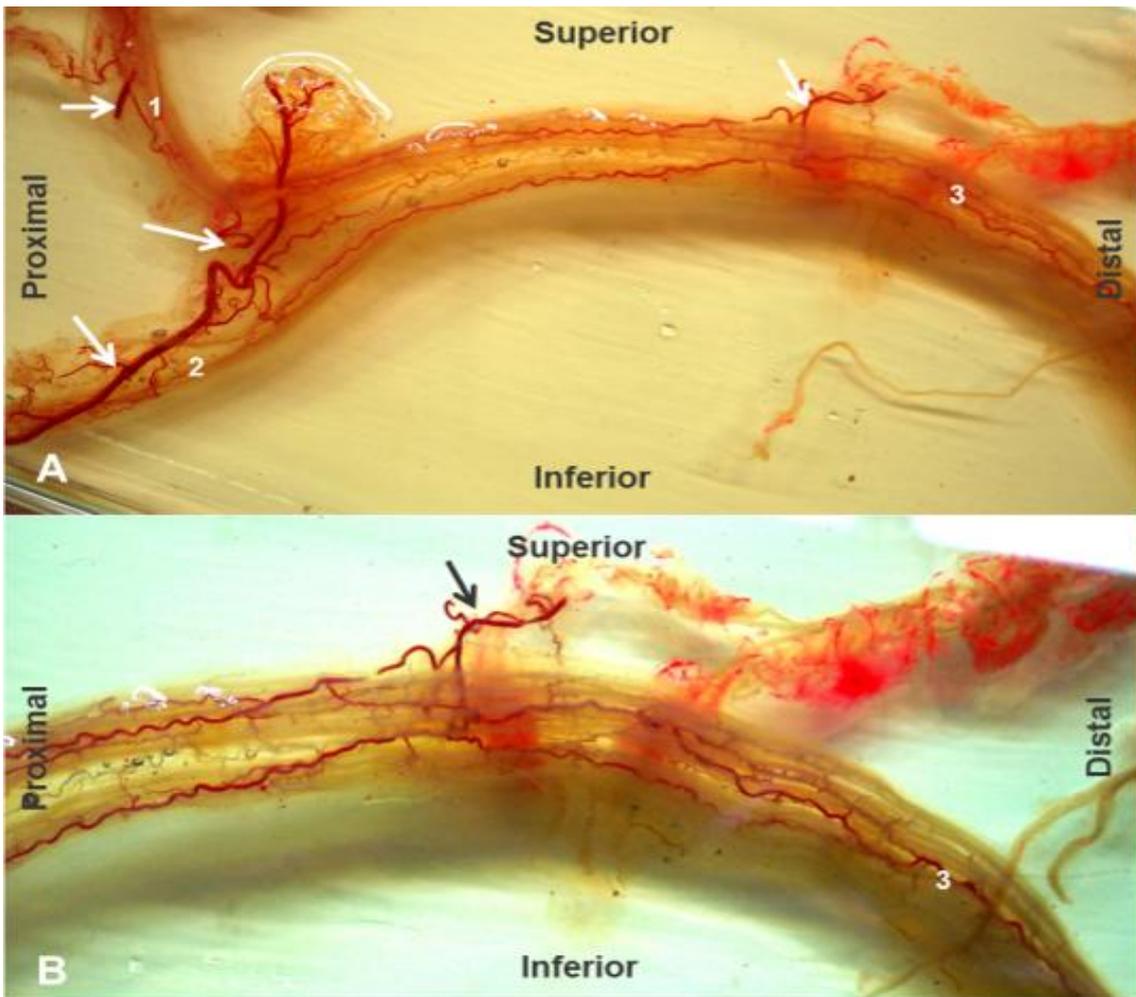


Figura 3.9 - Fotografias do nervo mediano humano (A e B), injectado previamente com um contraste colorido intravascular. Pode observar-se múltiplos vasos nutritivos (setas) que suprimem os vasos epineurais do nervo mediano humano. 1 - raiz lateral do nervo mediano; 2 - raiz medial do nervo mediano; 3 - nervo mediano.

Quanto à drenagem venosa do nervo mediano humano, de acordo com a classificação de Taylor, pode considerar-se como sendo do **tipo B**, correspondendo a uma drenagem extraneural em que as veias *nervorum* drenam, indirectamente, para as veias próximas, normalmente derivadas de músculos (Figura 3.10).¹⁷⁻¹⁹

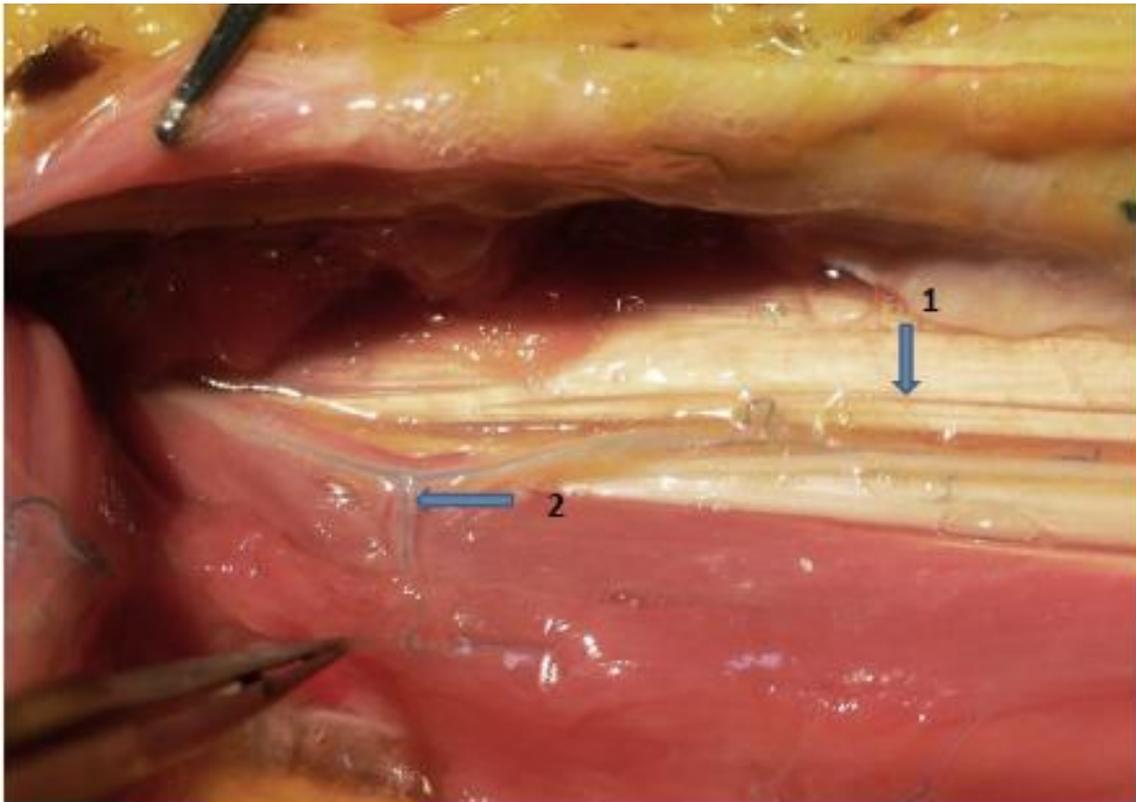


Figura 3.10 - Nervo Mediano (seta 1) e a sua drenagem venosa indirecta (seta 2) para a veia próxima, derivada de um músculo; drenagem venosa do tipo B.

3.5. A Microvascularização do Nervo Mediano Humano

Para o estudo da microvascularização do nervo mediano humano foram utilizadas as técnicas da Diafanização, a MEV e, ainda, a técnica da Histologia. Como já foi referido, os 15 nervos medianos injectados com *Micropaque* foram removidos e foi realizada a diafanização utilizando-se a técnica descrita no Capítulo 2.³⁴⁻³⁸

Em 8 cadáveres humanos, foi injectada uma solução de *Mercox* na artéria subclávia recorrendo-se à mesma técnica aplicada na injeção de *Micropaque*, para se obter moldes vasculares que, posteriormente, foram observados utilizando-se a microscopia electrónica de varrimento, MEV, de acordo com a técnica descrita no Capítulo 2.³⁰⁻³⁴

Além disso, em 3 cadáveres, também previamente injectados na intravascular com uma solução corada, os nervos medianos foram fixados em formaldeído a 10 % e preparados para o exame histológico, usando-se os corantes hematoxilina-eosina e Tricrómico de Masson. Adicionalmente, as secções dos nervos foram marcadas com o imunocorante CD-31 para a observação do endotélio dos vasos.

3.5.1. A Microvascularização do Nervo Mediano Humano pela Técnica de Diafanização

Pela diafanização do nervo mediano humano e pela observação das peças através de uma lupa estereoscópica (marca *MEILJI*, modelo *EMZ-13TR Olympus*) e da transiluminação (ampliação 20 x) (Figura 3.7), foram identificados os vasos nutritivos que circulam num mesonervo, que têm origem em vasos vizinhos do nervo e que suprimem os vasos epineurais do nervo mediano humano integrando o sistema extrínseco (Figura 3.7, Figura 3.11 A).

Estes vasos, quando atingem o epinervo epifascicular, dividem-se em ramos longitudinais ascendentes e descendentes que se anastomosam com o sistema intrínseco, composto pelos vasos do epinervo interfascicular, pelo plexo vascular perineural e pelo plexo vascular endoneural (Figura 3.5, Figura 3.7). Verificou-se também que o plexo vascular longitudinal epineural anastomosa-se com os vasos transversos e oblíquos existentes na superfície do epinervo, emitindo múltiplos ramos oblíquos que suprimem os plexos vasculares perineurais e endoneurais (Figura 3.11 A; Figura 3.11 B; Figura 3.11 C).

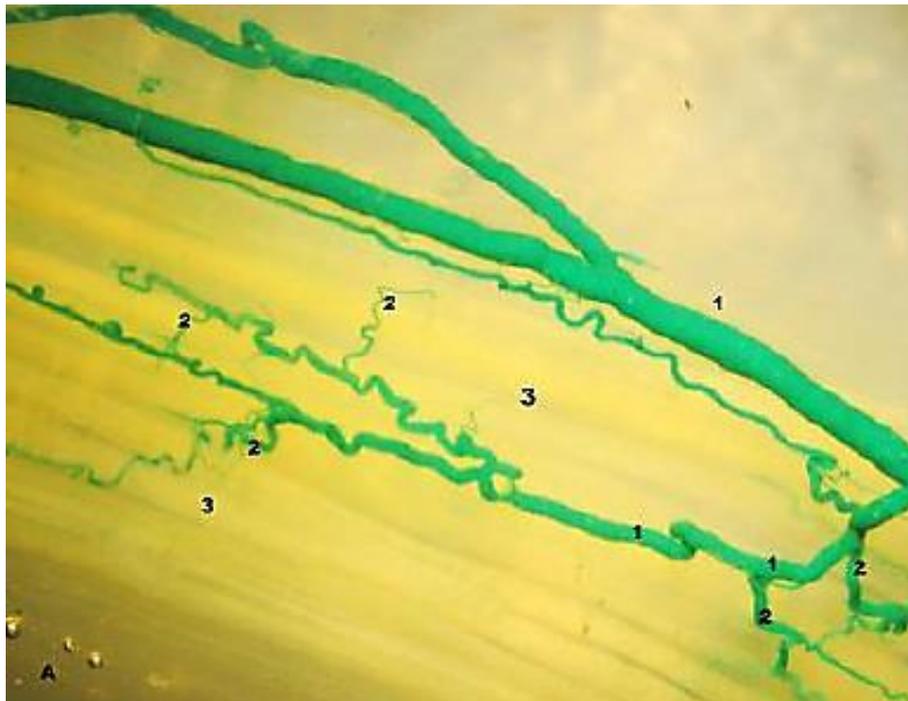


Figura 3.11 - A - Fotografia da Diafanização do Nervo Mediano Humano. Demonstra o plexo vascular longitudinal epineural e os vasos anastomóticos transversos e oblíquos na superfície do epinervo. Os vasos epineurais (1) emitem múltiplos ramos oblíquos que suprimem os plexos perineurais (2) e endoneurais (3). Os vasos nutritivos (4) têm origem em vasos vizinhos, e suprimem os vasos epineurais do nervo mediano humano.

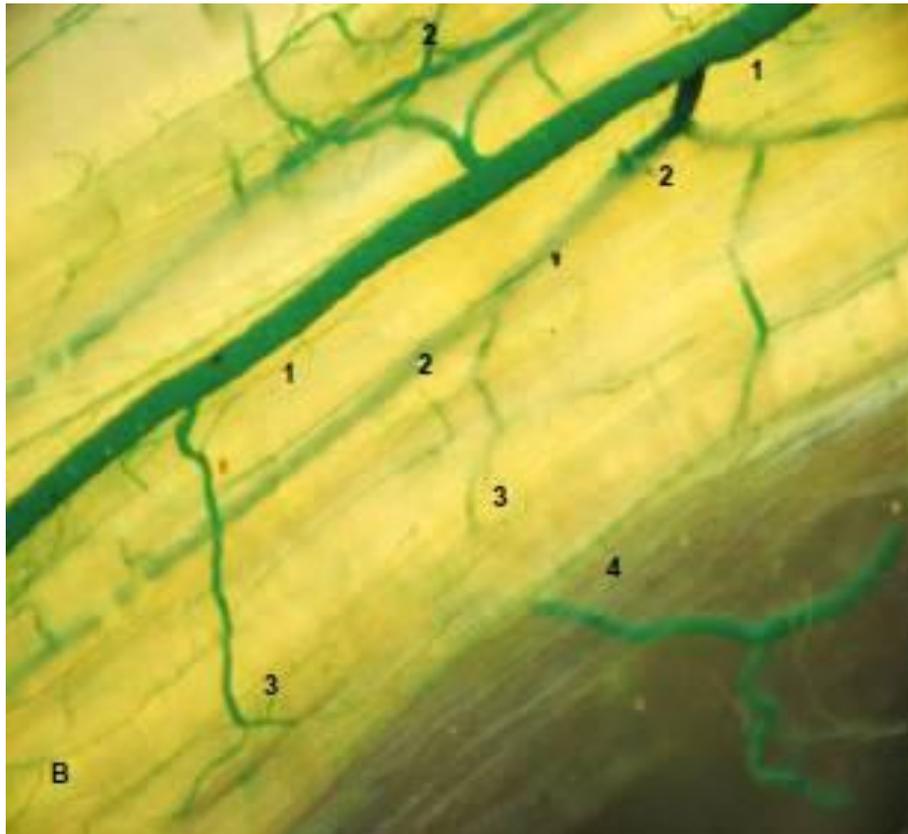


Figura 3.11 - B - Fotografia da Diafanização do Nervo Mediano Humano onde se identificam os vasos epineurais (1) emitindo múltiplos ramos oblíquos que suprimem os plexos perineurais (2) e endoneurais (3).

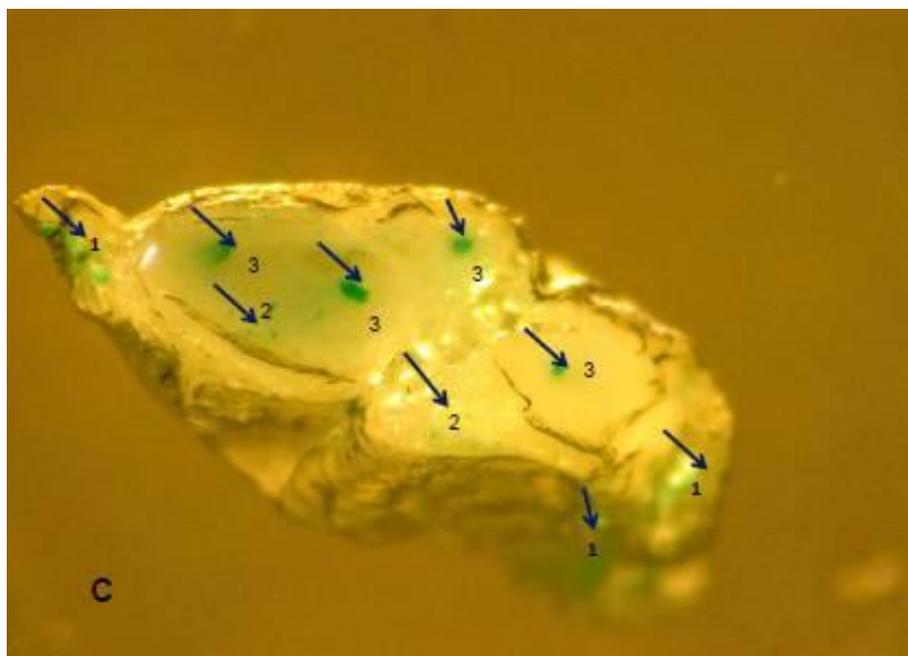


Figura 3.11 - C - Fotografia de corte transversal da Diafanização do Nervo Mediano Humano (ampliação 20 x). Vasos epineurais (1); Vasos perineurais (2); Vasos endoneurais (3).

3.5.2. Microvascularização do Nervo Mediano Humano pela Técnica da Microscopia Electrónica de Varrimento

3.5.2.1. Breves Considerações sobre a Identificação e a Interpretação de Moldes Vasculares Observados em Microscopia Electrónica de Varrimento

Esperança Pina (1986) adoptou uma nomenclatura baseada no calibre dos vasos inferiores a 200 μm , em cortes diafanizados, e através da microscopia electrónica de varrimento. O autor refere que o estudo da microvascularização apenas considera os vasos com calibres inferiores a 200 μm .³⁰

Segundo a sua classificação da microvascularização fazem parte: as arteríolas de 1.^a ordem, com calibres compreendidos entre 200 e 100 μm ; as arteríolas de 2.^a ordem, com calibres compreendidos entre 100 e 30 μm ; as arteríolas pré-capilares, as arteríolas terminais ou as metarteríolas, com calibres compreendidos entre 30 μm e o calibre dos canais preferenciais e capilares; os canais preferenciais, com calibres compreendidos entre 10 e 15 μm ; os capilares, com calibres compreendidos entre 5 e 12 μm ; as vénulas pós-capilares, com calibres compreendidos entre o calibre dos capilares canais preferenciais e 30 μm ; as vénulas de 2.^a ordem, com calibres compreendidos entre 30 e 100 μm ; as vénulas de 1.^a ordem, com calibres compreendidos entre 100 e 200 μm ; e as anastomoses artério-venosas, com calibres entre 20 e 30 μm .

Pela técnica da injeção-corrosão para a obtenção de moldes vasculares e para a posterior observação dos mesmos em MEV, foi possível distinguir as arteríolas e as vénulas, com base na impressão nos moldes vasculares dos núcleos respectivos, das células endoteliais desses vasos.^{30,39}

Os capilares podem identificar-se pelo seu diâmetro. Podem também ser identificadas as estruturas individuais de cada tipo de vaso através das suas estruturas específicas, tais como as válvulas venosas, as almofadas intra-arteriais e os esfíncteres.

1. Vasos Arteriais

A impressão do núcleo das células endoteliais dos vasos arteriais, em molde vascular, tem uma forma oval e está orientada de forma paralela ao eixo longitudinal do vaso³⁹ (Figura 3.12 A; Figura 3.12 B):

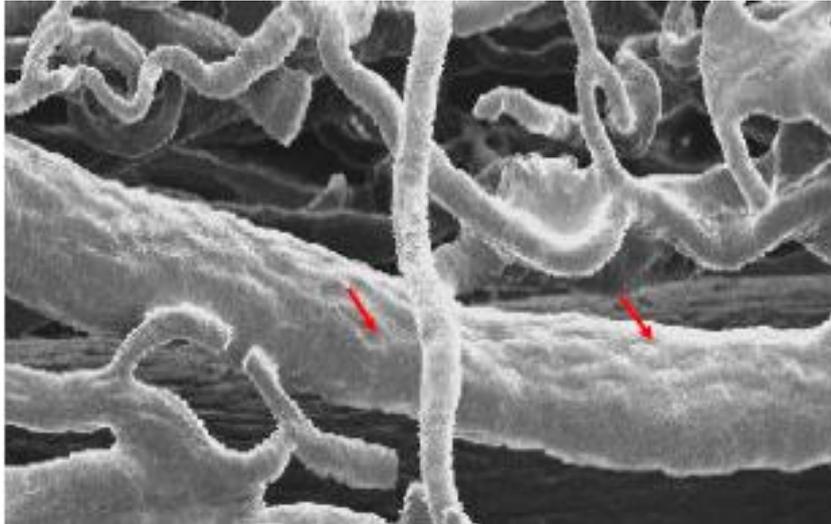


Figura 3.12 A - Impressão dos núcleos das células endoteliais da arteríola (setas).

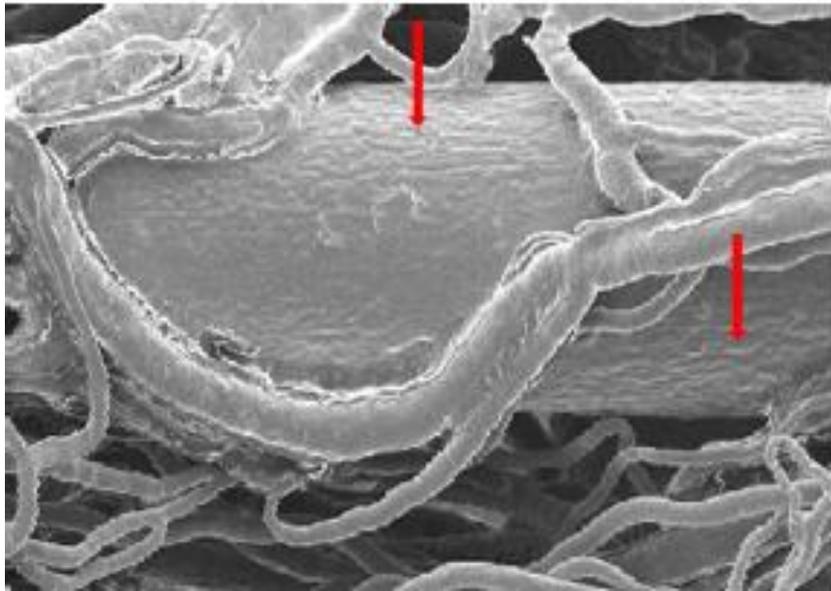


Figura 3.12 B - Impressão dos núcleos das células endoteliais da arteríola (setas), numa ampliação 50 x.

2. Vasos Venosos

A impressão do núcleo das células endoteliais da veia, em molde vascular, tem uma forma circular e não tem uma orientação específica em relação ao eixo do vaso³⁹ (Figura 3.13):

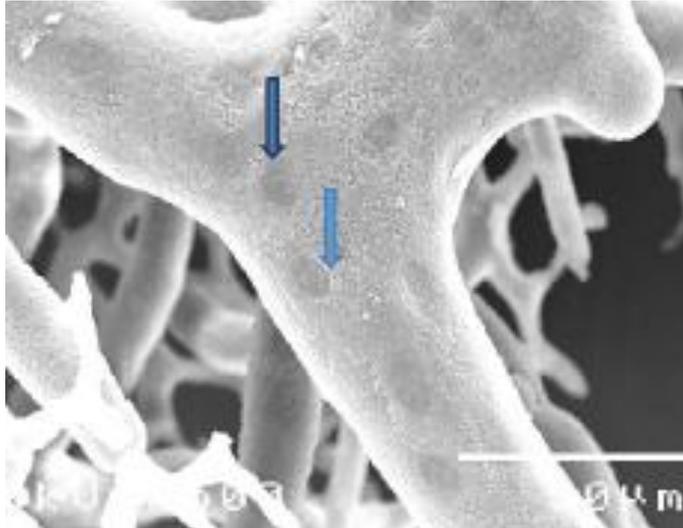


Figura 3.13 - Impressão do núcleo das células endoteliais da veia (setas), numa ampliação 500 x.

3. Origem do Capilar

O capilar tem origem nas arteríolas pré-capilares, nas arteríolas terminais ou nas metarteríolas, com calibres de 30 μm (Figura 3.14; Figura 3.15; Figura 3.16 A; Figura 3.16 B). O calibre dos canais preferenciais varia entre 10 e 15 μm . Os capilares têm calibres compreendidos entre 5 e 12 μm .

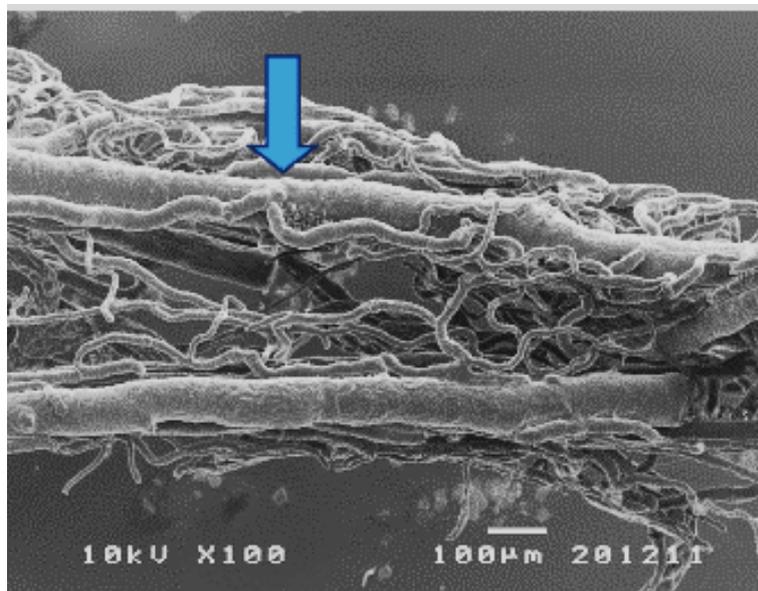


Figura 3.14 - Origem dos capilares (seta). Ampliação 100 x.

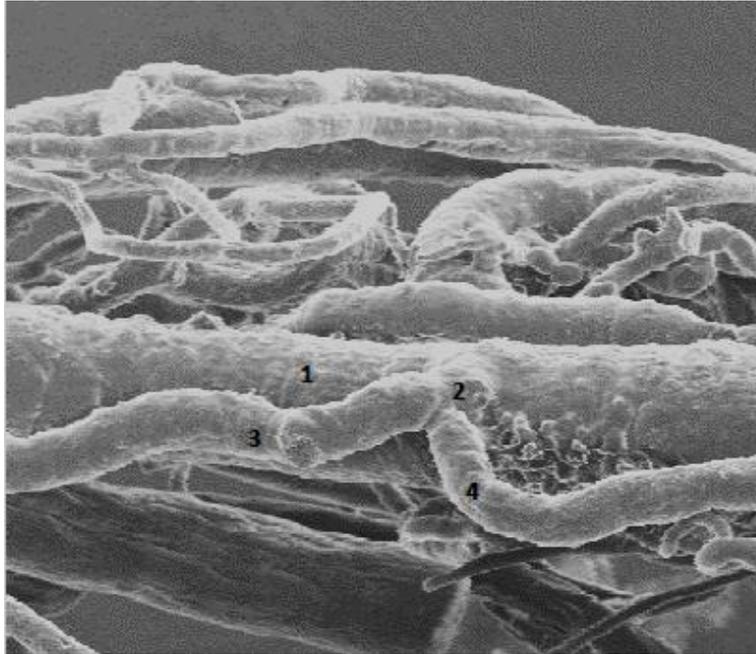


Figura 3.15 - Fotografia da origem dos capilares. 1 - arteríola; 2 - funil-chaminé; 3 e 4 - capilares. Pormenor da Figura 3.14.

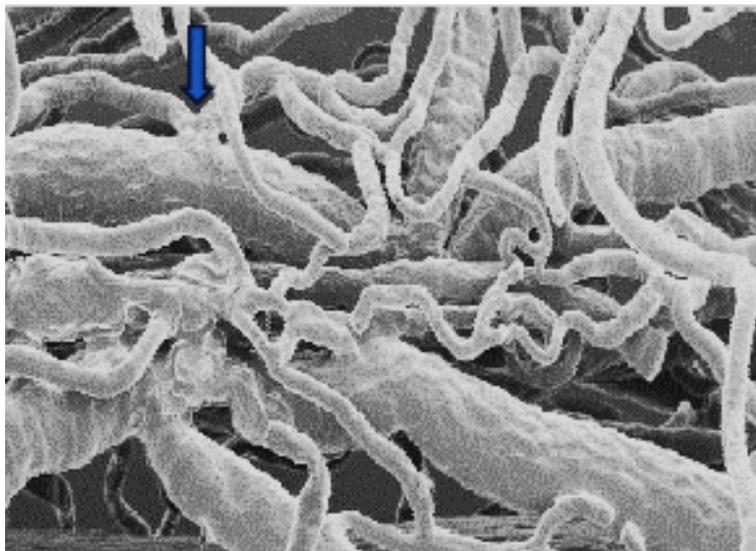


Figura 3.16 A - Origem dos capilares (seta), numa ampliação 100 x.

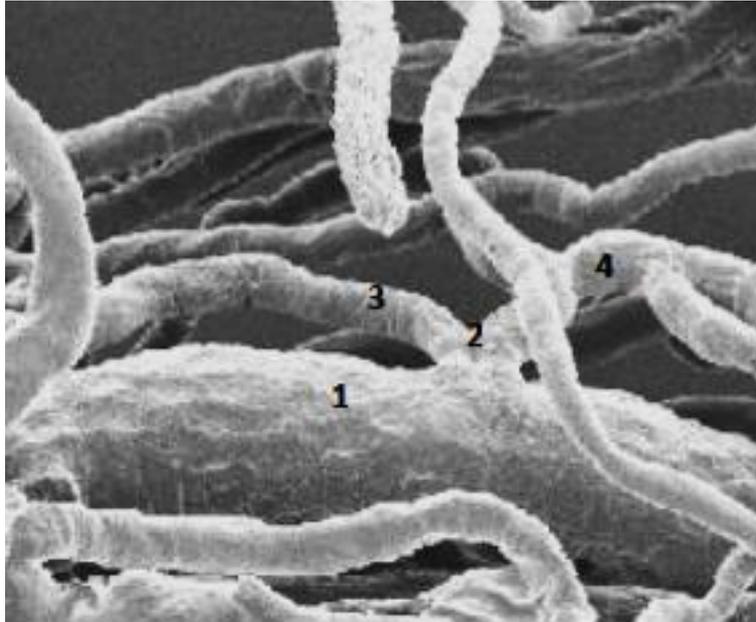


Figura 3.16 B - Fotografia de pormenor da origem dos capilares. 1 - arteríola; 2 – funil/chaminé; 3 e 4 - capilares. Pormenor da Figura 3.16 A.

4. Válvulas Venosa

As válvulas venosas apresentam-se como fendas profundas que representam o local dos folhetos da válvula³⁹ (Figura 3.17).

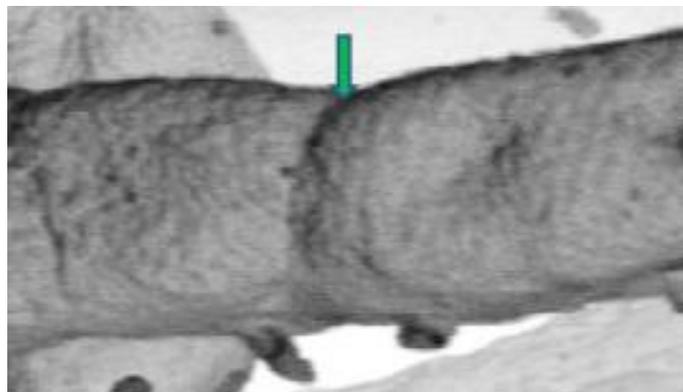


Figura 3.17 - Válvula venosa (seta).

5. Válvulas da Íntima Intra-arterial

As válvulas da íntima ou “almofadas”³⁹ são espessamentos longitudinais localizados na íntima arterial, na origem dos ramos colaterais. A sua função não é ainda claramente definida e é base de discussão sobre: se há, de facto, clonagem celular a partir do fluxo axial do vaso original para o interior do vaso-filho (ramo colateral); ou se tem a simples função de esfíncter; ou se tem as funções de quimio-receptor ou de mecano-receptor.³⁹ Estas válvulas da íntima arterial foram encontradas em muitas espécies, incluindo no Homem, e têm sido estudadas detalhadamente, por meio da MEV, em órgãos de rato (Figura 3.17 A; Figura 3.17 B).

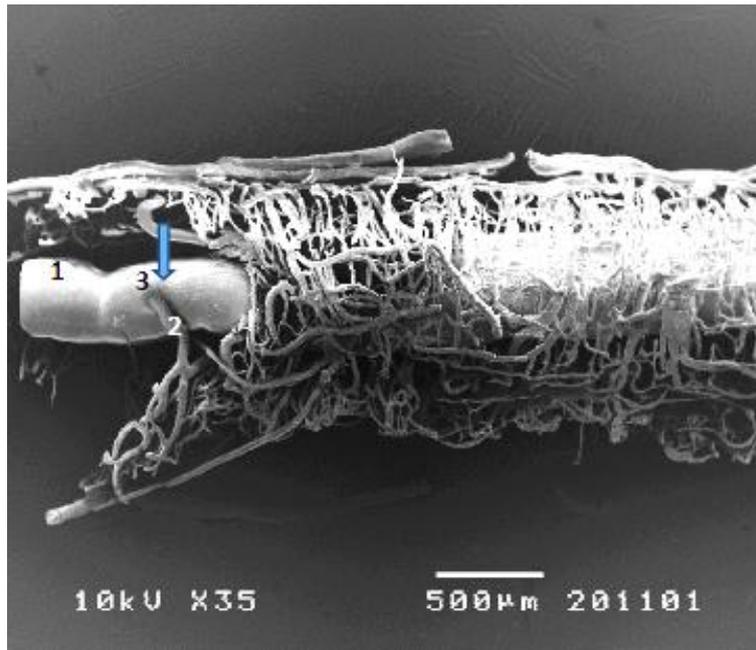


Figura 3.17 A - Válvulas da íntima. 1 - Vaso de origem “mãe” arterial; 2 - Vaso ramo “filho”; 3 - Impressão intra-arterial da “almofada”: válvula da íntima na origem do ramo arterial (seta 3), numa ampliação 35 x.

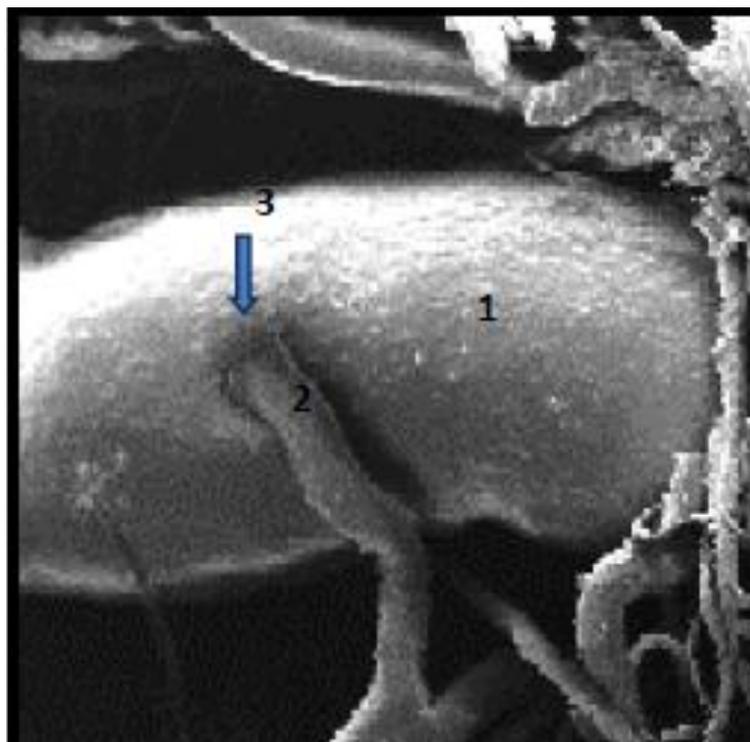


Figura 3.17 B - Pormenor da Figura 3.17 A. 1 - Vaso de origem “mãe” arterial; 2 - Vaso ramo “filho”; 3 - Impressão intra-arterial da “almofada”: válvula da íntima na origem do ramo arterial (seta 3).

6. Capilares

O capilar pode identificar-se através do seu diâmetro entre 5 e 12 µm (Figura 3.18):



Figura 3.18 - Imagens de Capilares. Ampliação 500 x.

3.5.2.2. A Microvascularização do Nervo Mediano Humano

Pela combinação dos estudos efectuados no nervo mediano humano através das técnicas da Diafanização, da MEV e da Histologia, foi possível identificar os dois sistemas vasculares distintos, designados sistema “extrínseco” e sistema “intrínseco.”²⁴⁻²⁹ O sistema extrínseco é composto por vasos nutritivos que suprimem o sistema microvascular e por os vasos epineurais, enquanto o sistema intrínseco é composto pelos plexos vasculares perineural e endoneural ou pelo intrafascicular.

Os fascículos são vascularizados de forma segmentada por vasos epineurais, e cada fascículo apresenta uma microvascularização bem definida que é composta, por sua vez, pelo plexo perineural e pelo plexo endoneural²⁶⁻²⁹ (Figura 3.19; Figura 3.20).

A microvascularização é constituída por vasos epineurais escassos que percorrem o eixo principal do nervo (Figura 3.11 A; Figura 3.11 B; Figura 3.21; Figura 3.22). Estes vasos apresentam numerosas anastomoses entre eles e ao longo de todo o percurso do nervo (Figura 3.23).

Os vasos epineurais enviam muitos ramos oblíquos que suprimem os plexos perineurais e endoneurais. Estes dois plexos são muito densos, particularmente o último, formando uma rede robusta ao longo de todo o percurso do nervo (Figura 3.23; Figura 3.24, Figura 3.25). Os vasos perineurais demonstram, também, uma direcção longitudinal predominante.

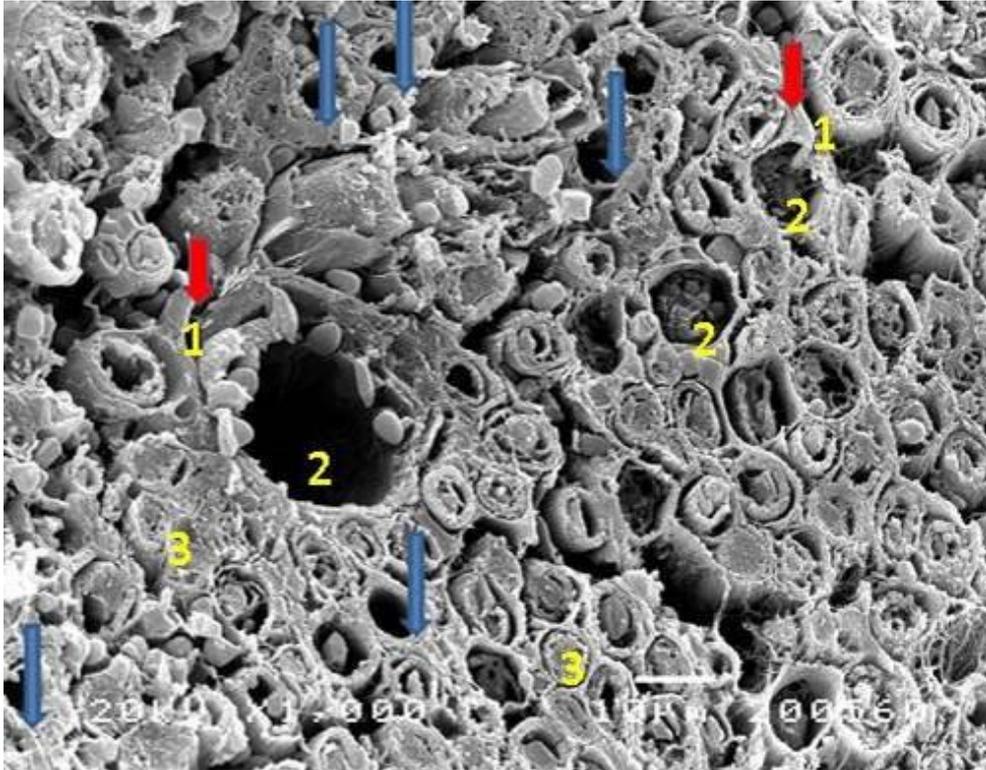


Figura 3.19 - Grande ampliação de um corte transversal de nervo observado em MEV (ponto crítico) demonstrando o plexo vascular endoneural (ampliação 1 000 x).
1 - endoneurio (seta vermelha); 2 - arteríolas; 3 - fibras nervosas ou axônios; setas azuis – capilares.

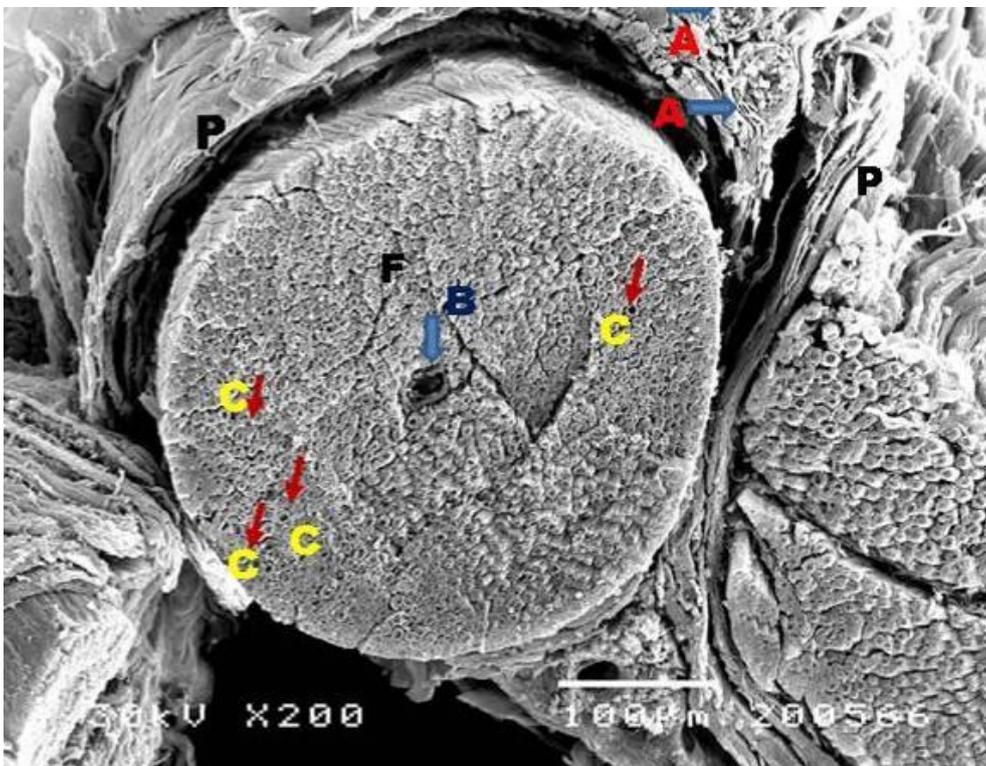


Figura 3.20 - Grande ampliação de um corte transversal de um nervo observado em MEV (ponto crítico) demonstrando um fascículo (F) com o perinervo (P) e a sua vascularização (A), e o plexo vascular endoneural (B e C), numa ampliação 200 x.

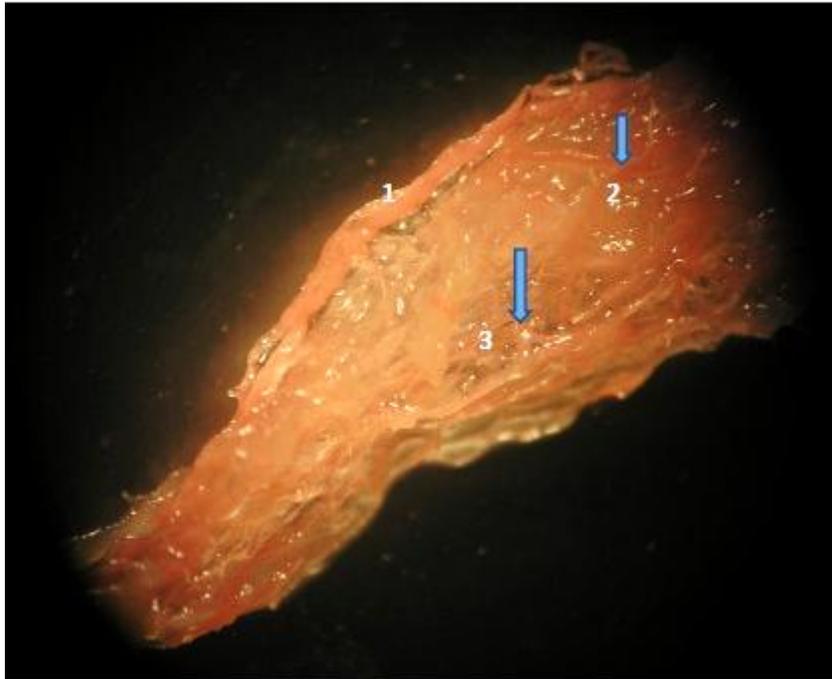


Figura 3.21 - Molde vascular após a injeção arterial de *Mercor*. Observação prévia à metalização do nervo mediano humano no braço, em lupa estereoscópica, demonstrando (ampliação 10 x) o grande vaso epineural (1) a enviar ramos oblíquos que suprimem os vasos perineurais (2) e endoneurais (3).

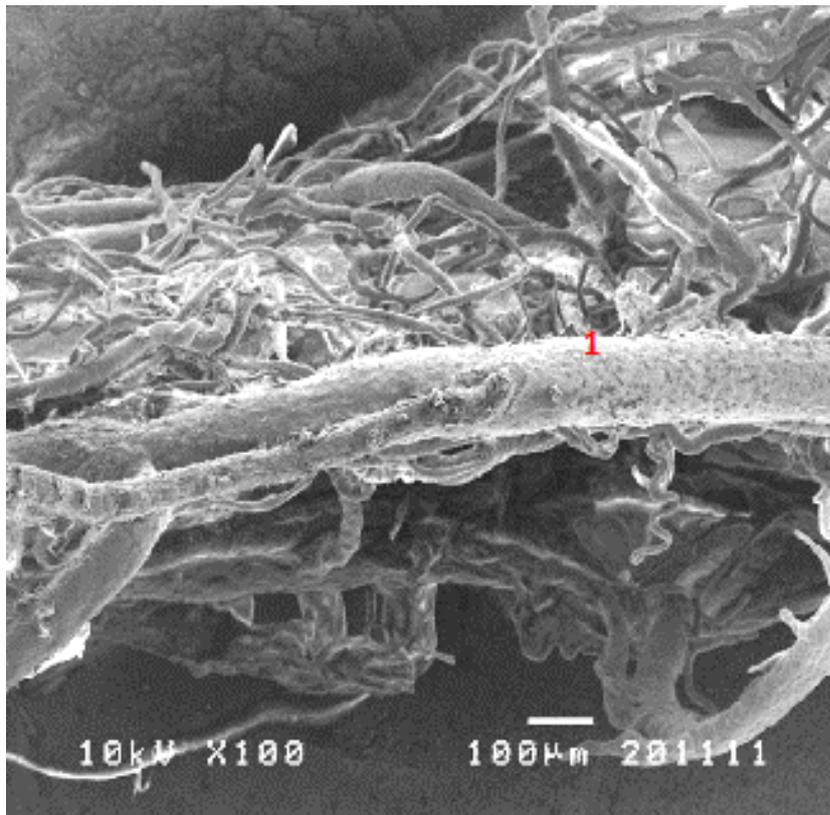


Figura 3.22 - Nervo mediano humano no braço observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 100 x; barra 100 µm). Pode ver-se o grande vaso epineural (1) e uma rede rica de capilares endoneurais.

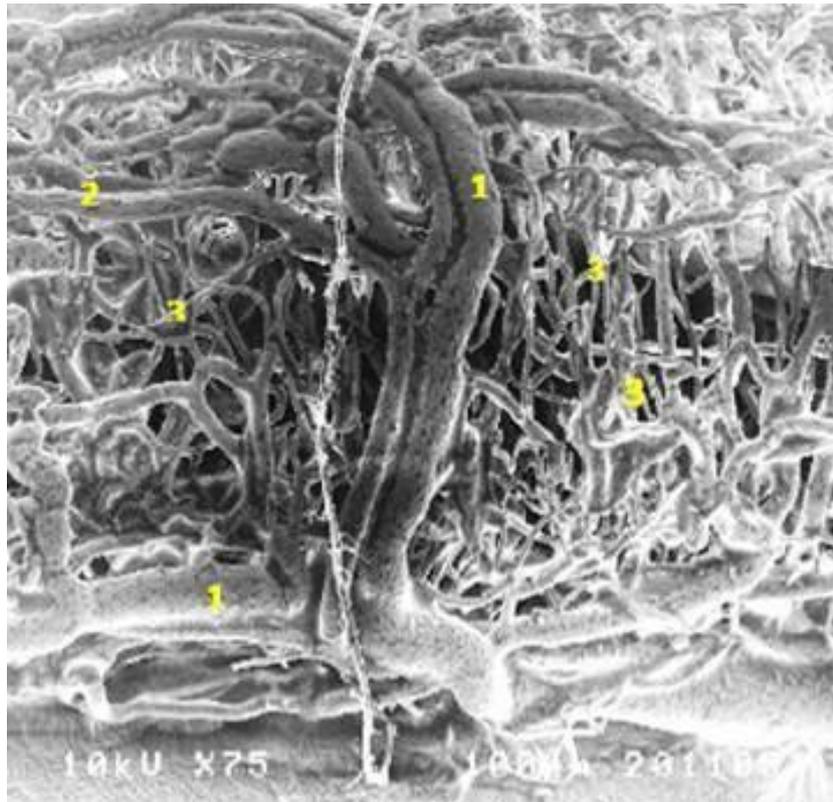


Figura 3.23 - Nervo mediano humano no braço observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 75 x; barra 100 µm). Pode ver-se os grandes vasos epineurais (1) enviando ramos oblíquos que suprimem os vasos perineurais (2) e endoneurais (3).

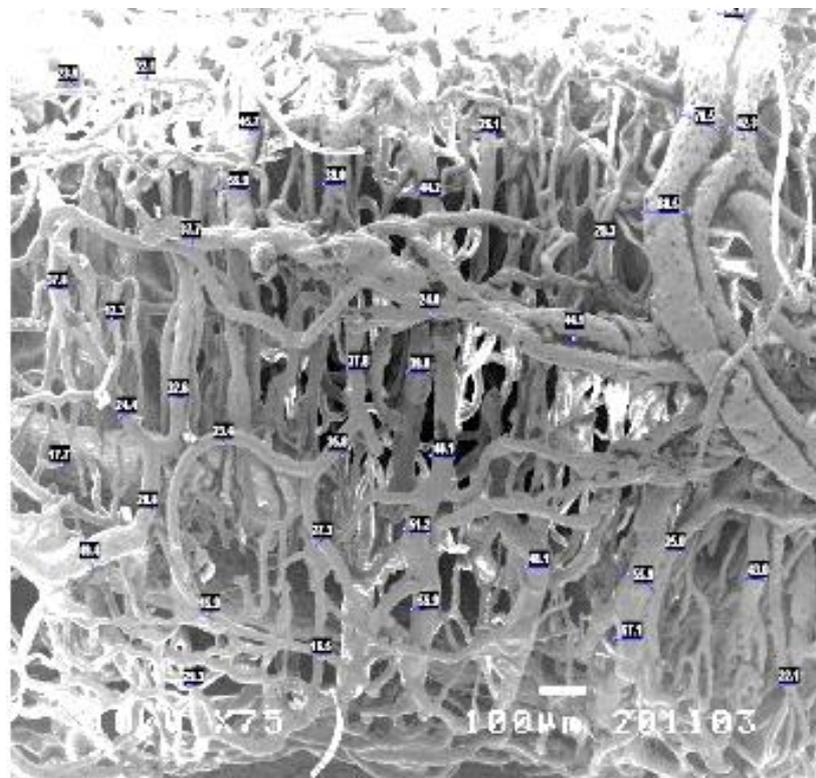


Figura 3.24 – Outra imagem do nervo mediano humano no braço, observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 75 x; barra 100µm). Densa vascularização epineural, perineural e endoneural e medição do calibre dos vasos com aplicação do sistema *SEMAfor*.

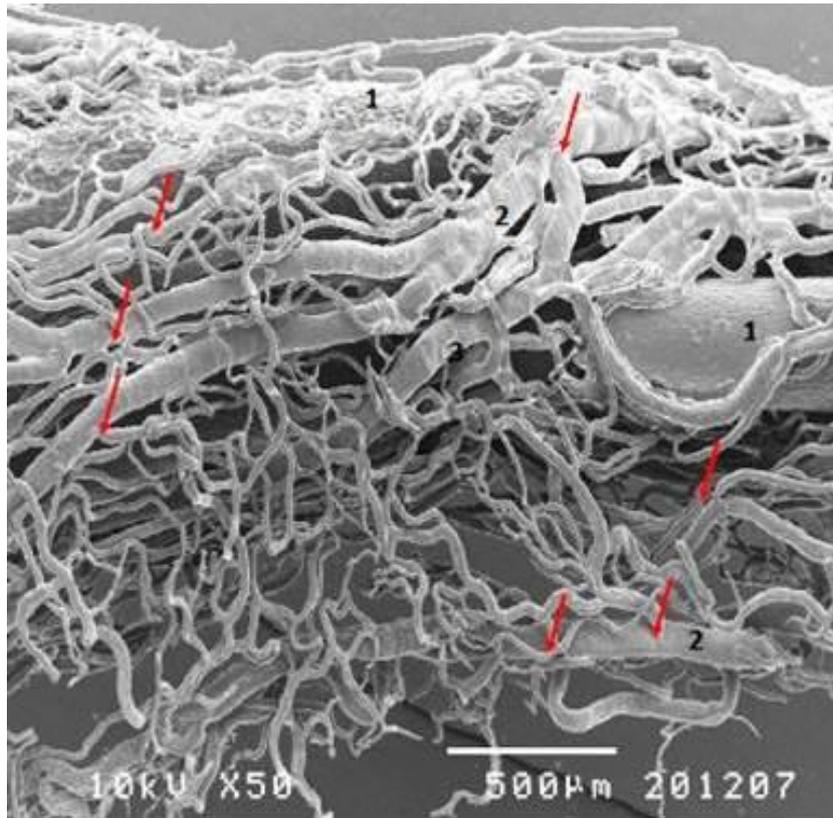


Figura 3.25 - Nervo mediano no braço, observado em microscopia electrónica de varrimento (ampliação 50 x; barra 500 µm). Pode ver-se inúmeras anastomoses vasculares (setas) entre o plexo epineural (1), perineural (2) e endoneural (3).

3.5.3. A Microvascularização do Nervo Mediano Humano pela Técnica Histológica

Histologicamente, o nervo mediano humano apresenta-se como um nervo polifascicular (Figura 3.26). Pela coloração com hematoxilina-eosina pôde identificar-se a microvascularização constituída pelos vasos epineurais, perineurais e endoneurais (Figura 3.26). Através dos marcadores específicos de células endoteliais (imunocorante DC31), também foi identificada a vascularização epineural, perineural e endoneural⁴⁰ (Figura 3.27).



Figura 3.26 - Nervo mediano humano em microscopia óptica; coloração com hematoxilina-eosina (A) demonstrando os vasos: epineural (1), perineural (2) e endoneural (3), numa ampliação 400 x.

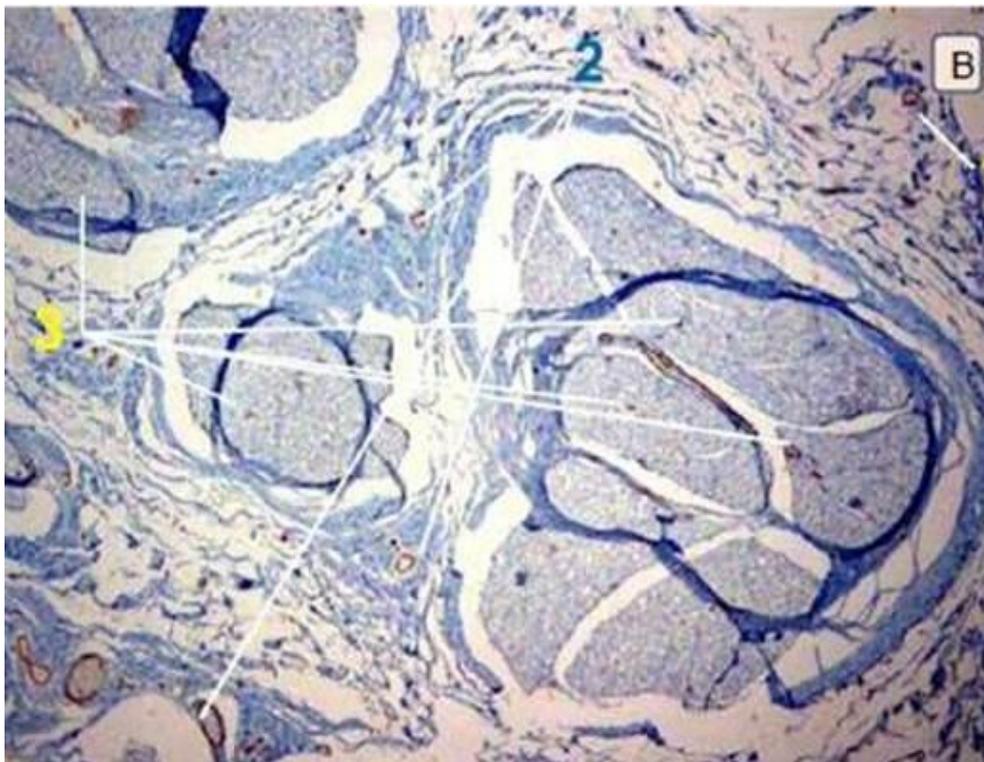


Figura 3.27 – Uma secção de nervo mediano humano (B) em microscopia óptica (ampliação 100 x). Coloração com imunocorante CD-31 a identificar os vasos epineurais (1), perineurais (2) e endoneurais (3).

Neste estudo, verificámos que o nervo mediano humano apresenta grandes vasos epineurais relativamente escassos que percorrem o eixo principal do nervo. Estes vasos apresentam numerosas anastomoses entre eles próprios ao longo de todo o curso do nervo. Os vasos epineurais emitem muitos ramos oblíquos que suprimem os plexos perineurais e endoneurais. Estes dois plexos são muito densos, particularmente o último, formando uma rede robusta através de todo o percurso do nervo, visualizado através das imagens de MEV. Os vasos perineurais têm uma direcção que é predominantemente longitudinal.

3.6. Referências Bibliográficas

1. Neal, S. e Fields, K.B. (2010) *Peripheral nerve entrapment and injury in the upper extremity*. American family physician, 81:147-55.
2. Sunderland, S. (1991) *Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal*. 1.^a ed. New-York, Churchill Livingstone, 53.
3. Dahlin, L.B. (2006) Nerve injury and repair: from molecule to man. In D.J. S., Hentz V.R., ed. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. 1.^a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, pp. 1-22.
4. Szabo, R.M. e Koo, J.T. (2006) Compression neuropathies of the median nerve. In: D.J. S., Hentz VR, ed. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. 1.^a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, pp. 219-41.
5. Mackinnon, S.E. e Novak, C.B. (2011) Compression neuropathies. In Wolfe SW, Hotchkiss RN, Pederson WC, Kozin SH, ed. *Green's operative hand surgery*. 6.^a ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, pp. 977-1014.
6. Rosberg, H.E.; Carlsson, K.S. e Dahlin, L.B. (2005) Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi*, 39:360-9.
7. Rosberg, H.E.; Carlsson, K.S.; Hojgard, S.; Lindgren, B. e Lundborg, G. et al. (2005) *Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm-analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden*. J. Hand. Surg. Br., 30:35-9.
8. Yanase, Y. (2004) Micronerve suture and graft in the rat. In Tamai, S.; Usui, M. e Yoshizu, T. ed. *Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery*. 1.^a ed. Japan, Springer-Verlag, pp. 44-51.
9. Varejão, A.S. (2003) *Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experimental*. Tese de Doutoramento. Vila Real, Trás-os-Montes e Alto Douro.
10. Suami, H.; Taylor, G.I. e Pan, W.R. (2003) *Angiosome territories of the nerves of the lower limbs*. Plast. Reconstr. Surg., 112:1790-8.
11. Adams, W.E. (1943) The blood supply of nerves. *Journal of anatomy*, 77:243.
12. Hong, M.K. e Taylor, G.I. (2006) *Angiosome territories of the nerves of the upper limbs*. Plast. Reconstr. Surg., 118:148-60.
13. Taylor, G.I. e Palmer J.H. (1987) *The vascular territories (angiosomes) of the body: Experimental study and clinical applications*. Br. J. Plast. Surg., 40 (2):113.
14. Taylor, G.I. e Palmer J.H. (1992) *Angiosome theory*. Br. J. Plast. Surg., 45:327.
15. Algieri, R.; Sarti, O.; Ferrante, M.; Roldan, I. e D'Amore V. (2011) *Consideraciones Anato-Quirurgicas de los Angiosomas en tobillo y pie*. Hospital Aeronáutico Central; 6 (2):11-12.
16. Taylor, G.I. (1999) *Free vascularized nerve transfer in the upper extremity*. Hand clinics, 15:673-95.
17. Taylor, G.I. (2003) *The angiosomes of the body and their supply to perforator for flaps*. Clin. Plast. Surg., 30 (3):331-42.
18. Taylor, G.I. (1990) The Angiosome Concept and Tissue Transfer. *Quality Medical Publishing-2014*.
19. Del Pinal, F. e Taylor, G. I. (1990) *The venous drainage of nerves: Anatomical study and clinical implications*. Br. J. Plast. Surg., 43: 511.

20. Admir Hadzic e Carlo Franco (2013) *Essentials of Regional Anesthesia Anatomy NYSORA*.
21. M.A. Reina; A. López; M.C. Villanueva; J.A. de Andrés, e G.I. León (2000) Morfología de los nervios periféricos, de sus cubiertas y de su vascularización. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.*, 47:464-476.
22. M.A. Reina; R. Arriazu; C.B. Collier; X. Sala-Blanch e L.Izquierdo J.A. de Andrés (2013) Electron microscopy of human peripheral nerves of clinical relevance to the practice of nerve blocks. A structural and ultrastructural review based on original experiential and laboratory data. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.*, 60 (10):552-562.
23. Sunderland, S. (1945) *Blood supply of the nerves of the upper limb in man*. *Arch. Neurol. Psychiatry* 53:91.
24. Lundborg, G. (1975) Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *The Journal of bone and joint surgery*, American volume, 57:938-48.
25. Lundborg, G. (1988) *Intraneural microcirculation*. *The Orthopedic clinics of North America* 1988,19:1-12.
26. Lundborg G. (1982) Ischemic tissue injury-peripheral nerves. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery Supplementum*, 19:10-5.
27. Lundborg, G. (1975) *Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function*. *J. Bone Joint Surg.*, 57 (A):938-9.
28. Lundborg, G. (1979) *The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects*. *J. Hand Surg.*, 4:34.41.
29. Lundborg, G. e Rydevik, B. (1973) *Effects of stretching the tibial nerve of the rabbit: a preliminary study of the intraneural circulation and the barrier function of the perineurium*. *J. Bone Joint Surg.*, 55 (B):390.401.
30. Esperança-Pina, J.A. (1979) *Territórios arteriais esplénicos*. Bases anatomo-experimentais das esplenectomias parciais. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
31. Goyri O'Neill J. (1983) *Vascularização da Placenta Humana*. Tese de Doutoramento apresentada na Faculdade de Ciências Médicas, pp. 33-41.
32. Esperança-Pina, J.A. (1973) *Circulação venosa cardíaca*. Estudo anatomo-experimental. 2.ª Ed. Edição do autor, Lisboa.
33. Correia, M. (1983) *Vascularização arterial do rim*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
34. Pais, D. (1995) *Vascularização arterial e microvascularização testículo-epididimária*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
35. Spalteholz W. (1927) *Das durchsichtigmachen als biologische arbeitsmethode*. *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden* 8, pp. 409-32.
36. Esperança-Pina, JA. (1972) *A investigação anatomo-funcional em angiologia e as substâncias fluorescentes*. Prova Complementar de Doutoramento, FML.
37. Goyri O'Neill JV-H, G.; Esperança-Pina, J.A. (1982) *Modificação à técnica de difanização-I*. In *Actas do V International Symposium On Morphological Sciences*, Rio de Janeiro.
38. Goyri O'Neill, J. (1984) *Técnica de Plastinização: Sua contribuição para o ensino e investigação em Anatomia*, pp. 92-101.
39. S. H. Aharinejad e A. Lametschwandtner (1992) *Microvascular Corrosion Casting in Scanning Electron Microscopy – Techniques and Application*, by Springer-Verlag/ Wien-
40. Angélica-Almeida M.; Casal, D., Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L.; Martins-Ferreira, J.; Ferraz-Oliveira, M.; Pais, D.; Amarante, J. e Goyri-O'Neill, J. (2014) *Angiomorphological comparison of the sciatic nerve of the rat and the human median nerve: implication experimental procedures*. *Archives of Anatomy* Vol. 2, nº 1, pp. 31-51.

Capítulo 4

4. A VASCULARIZAÇÃO DO PLEXO BRAQUIAL DO RATO WISTAR

4.1. Introdução

As lesões dos nervos periféricos afectam, principalmente, a população jovem, originando um encargo socioeconómico significativo.¹⁻⁶ Os resultados podem ser devastadores, particularmente se a função da mão for comprometida. A mão é um instrumento indispensável para o trabalho e participa na maior parte das actividades diárias, contribuindo fortemente para o bem-estar individual.¹⁻³ Além disso, o membro superior é essencial para a interacção com o ambiente, permitindo o estudo dos objectos pelo tacto, bem como a expressão pelos gestos, pela pintura ou pela música.¹⁻³

Embora tenham existido, nas décadas recentes, grandes avanços nas técnicas cirúrgicas usadas na reparação das lesões dos nervos periféricos, a recuperação funcional total permanece ainda inatingível em muitos doentes.¹⁻³

O rato (*Rattus norvegicus*) é, provavelmente, a espécie animal mais frequentemente utilizada nos estudos experimentais sobre a reparação nervosa.^{7,8} Nesta espécie, o nervo isquiático tem sido o centro de novos procedimentos experimentais na reparação do sistema nervoso periférico.⁹

Estudos recentes sugerem que os modelos que usam o plexo braquial (PB) do rato podem ter várias vantagens em relação ao nervo isquiático, nomeadamente a baixa incidência de contracturas articulares e a automutilação do membro operado.⁹⁻¹⁴ Além disso, o modelo do PB permite uma rápida identificação da regeneração, pois o caminho a ser percorrido pelos axónios em crescimento é menor nos membros anteriores do que nos membros posteriores do rato devido ao maior comprimento do último.⁹⁻¹⁴

Acrescente-se que numerosos modelos têm sido desenvolvidos e validados para determinar as funções motora e sensitiva do PB no rato, aumentando também, assim, a sua consistência para o uso de modelos experimentais envolvendo o PB do rato.^{6,15-19} Estranhamente, contudo, a literatura é muito limitada quanto à morfologia do PB do rato, e ainda mais escassa em relação à vascularização destes nervos.¹⁴⁻¹⁷ Por esta razão, entende-se que é importante contribuir para um melhor conhecimento da morfologia e vascularização do PB do rato para estudos posteriores da fisiopatologia, da regeneração e da aplicação na clínica.

4.2. Materiais e Métodos

Trinta ratos adultos com um peso entre os 300 e os 350 g foram sujeitos a anestesia geral através de uma injeção intra-peritoneal com uma mistura de ketamina e de xylazina numa dose de 90 mg/kg e de 10 mg/kg, respectivamente.¹⁸ Os animais foram submetidos a uma laparotomia mediana e eutanasiados através da colocação de um cateter na aorta abdominal e de outro na veia cava para os exsanguinar. Foi repostado o volume sanguíneo com uma solução de soro heparinizado (50 unid/ml).

Em 25 animais procedeu-se à injeção de uma suspensão coloidal de sulfato de bário (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com 10 % de gelatina comercial (em partes iguais) e corada com pigmento vermelho ou azul (*Pigment Tintolac Super, Robialac*). A solução vermelha foi injectada na aorta abdominal e a solução azul na veia cava caudal.¹⁹⁻²³ Os ratos foram dissecados com o uso de um microscópio cirúrgico binocular (*Leica M 651*).

Foi registada a constituição e a distribuição do PB e dos seus ramos, bem como a origem e o término das artérias e das veias que suprimem estes nervos. Posteriormente, em 20 dos 25 ratos injectados, os nervos foram removidos e diafanizados segundo a técnica desenvolvida por Spalteholz e, mais tarde, modificada por Esperança-Pina e Goyri O'Neill.²⁴⁻²⁷

Estes nervos foram observados com uma lupa binocular para estudar a sua vascularização. Em 5 dos ratos injectados, os nervos foram fixados em formaldeído a 10 % e preparados para uma observação histológica, tendo sido corados com hematoxilina-eosina e com Tricrómico de Masson. Adicionalmente, as secções dos nervos foram marcadas com imunocorante CD-31 para a observação do endotélio dos vasos.

Finalmente, em 5 ratos, uma solução de *Mercox* foi injectada na artéria aorta abdominal para a obtenção de moldes vasculares e, posteriormente, estes foram observados em microscopia electrónica de varrimento, de acordo com os protocolos descritos no Capítulo 2.^{19-22,28}

4.3. Morfologia do Plexo Braquial no Rato Wistar

Em todos os animais estudados verificou-se que o PB é composto por ramos com origem nas raízes ventrais de C4 a C8 e na T1. Em 57 % dos casos (n = 17) a raiz ventral de T2 estabelece uma anastomose com a raiz ventral de T1, contribuindo, desta maneira, para a formação do PB.²⁹ Este ramo de T2, tal como o de C4 para o PB, é menor do que os restantes ramos que formam as raízes do plexo. A disposição mais comum dos constituintes do PB está descrita na Figura 4.1 A.

Em 87 % (n=26) dos espécimes, verificou-se a existência de um ramo do segundo e/ou terceiro nervos intercostais para os nervos cutâneos medial braquial e antebraquial (Figura 4.1 C). As raízes emergem entre os músculos escalenos anterior e o mediano, formando o plano PB por baixo da clavícula (Figura 4.1 A; Figura 4.1 B; Figura 4.1 C; Figura 4.2 A; Figura 4.2 B; Figura 4.2 C).

Admitindo que existe uma clara homologia entre os elementos do PB do rato e os do Homem, verificou-se que a origem dos diferentes ramos terminais e colaterais são diferentes nestas duas espécies.²³ Por exemplo, não existem claramente cordas medial, posterior e laterais no plexo braquial do rato.²⁹ Além disso, o nervo mediano, por exemplo, normalmente com origem a partir de três raízes diferentes, representa o ramo terminal mais espesso do plexo braquial do rato²⁹ (Figura 4.1 A; Figura 4.1 C).

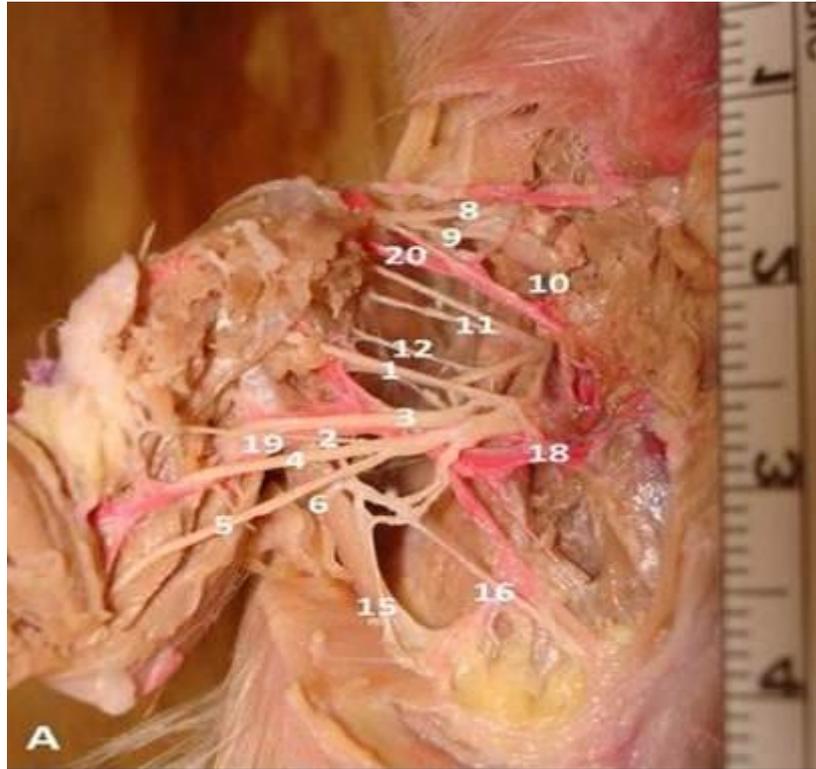


Figura 4.1 A - Habitual disposição dos elementos constituintes do plexo braquial (PB) no rato Wistar. Aspecto vertebral da dissecção da pata direita demonstrando os vários ramos terminais e colaterais do PB, e a sua associação íntima com vários troncos arteriais maiores (amplificação 6 x).

- 1 - Nervo axilar; 2 - Nervo musculocutâneo; 3 - Nervo radial; 4 - Nervo mediano; 5 - Nervo ulnar;
- 6 - Nervo cutâneo braquial medial; 7 - Nervo cutâneo antebraquial medial; 8 - Nervo escapular dorsal;
- 9 - Nervo supraescapular; 10 - Nervo para o músculo subclávio; 11 - Nervo subescapular superior;
- 12 - Nervo subescapular inferior; 13 - Nervo toracodorsal; 14 - Nervo longo torácico; 15 - Nervo peitoral lateral;
- 16 - Nervo peitoral medial; 17 - Nervo intercostobraquial; 18 - Artéria axilar; 19 - Artéria braquial;
- 20 - Tronco arterial acromial.

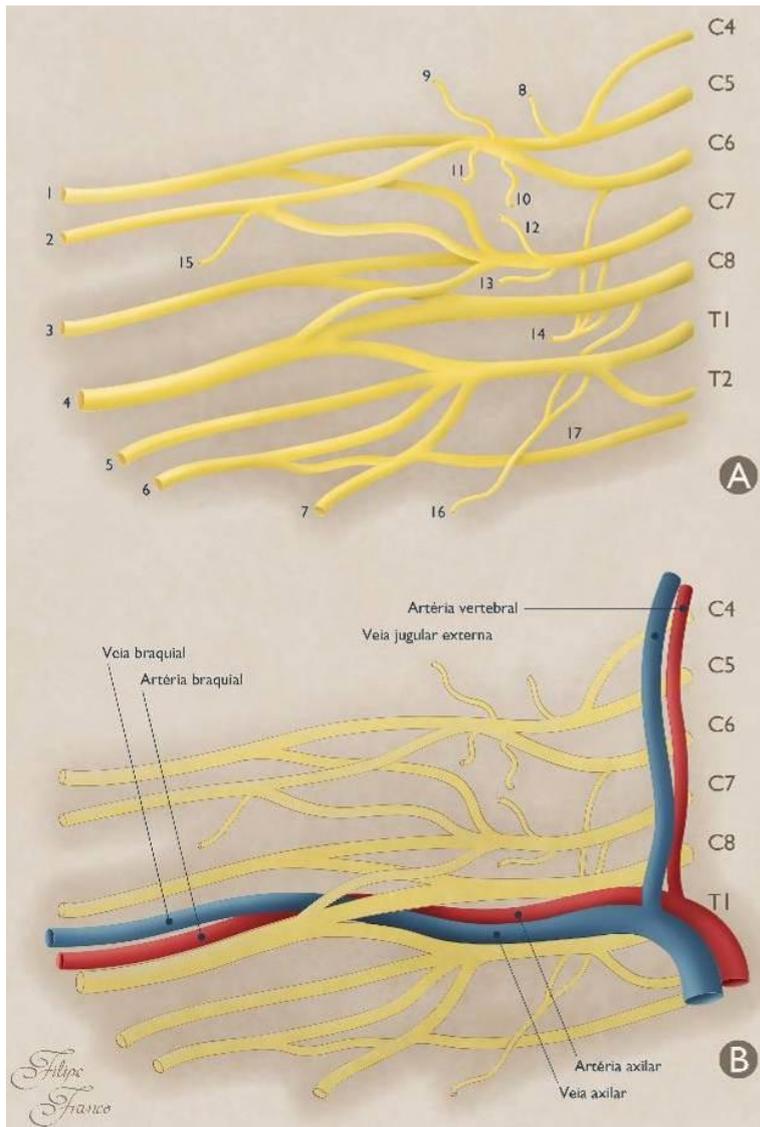


Figura 4.1 B - Desenho esquemático da disposição mais habitual dos constituintes do PB do rato Wistar, de acordo com o nosso estudo.

- 1 - Nervo axilar;
- 2 - Nervo musculocutâneo;
- 3 - Nervo radial;
- 4 - Nervo mediano;
- 5 - Nervo ulnar;
- 6 - Nervo cutâneo braquial medial;
- 7 - Nervo cutâneo ante braquial medial;
- 8 - Nervo escapular dorsal;
- 9 - Nervo supraescapular;
- 10 - Nervo para o músculo subclávio;
- 11 - Nervo subescapular superior;
- 12 - Nervo subescapular inferior;
- 13 - Nervo toracodorsal;
- 14 - Nervo longo torácico;
- 15 - Nervo peitoral lateral;
- 16 - Nervo peitoral medial;
- 17 - Nervo intercostobraquial.

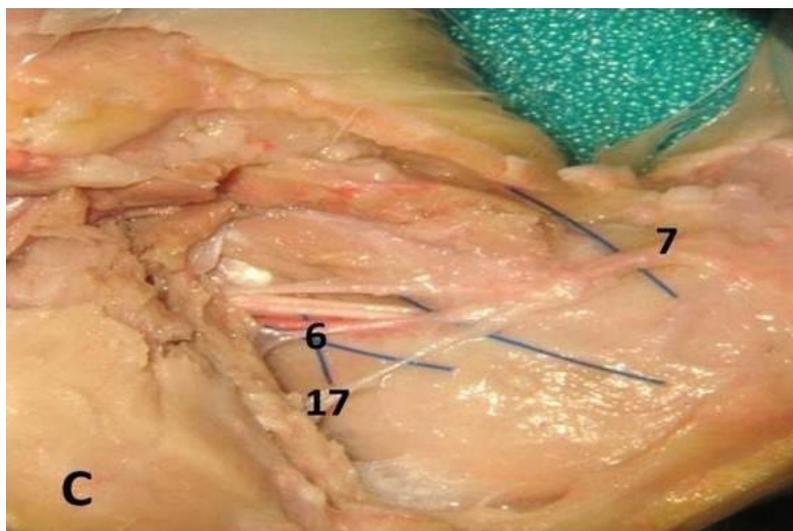


Figura 4.1 C - Aspecto ventral da dissecção da pata esquerda expondo a anastomose usual entre o segundo nervo intercostal e os nervos cutâneo braquial medial e cutâneo ante braquial (amplificação 10 x).

- 6 - Nervo cutâneo braquial medial;
- 7 - Nervo cutâneo ante braquial medial;
- 17 - Nervo intercostobraquial.

4.4. A Vascularização do Plexo Braquial no Rato Wistar

4.4.1. A Macrovascularização

A vascularização arterial do PB deriva directa ou indirectamente das artérias vertebral, axilar, braquial e mediana, bem como das artérias derivadas directamente do arco aórtico e dos troncos arteriais acromial e cervical.²⁹ Estas duas últimas artérias são análogas ao tronco tireocervical humano. Todas essas artérias emitem ramos diversos e variáveis para os nervos vizinhos, formando um plexo arterial epineural notório à volta das raízes, troncos e ramos colaterais do PB²⁹ (Figura 4.2 A; Figura 4.2 B; Figura 4.2 C).

Os ramos arteriais para cada nervo são muito variáveis, tanto em número como em calibre, mesmo nos dois lados de cada animal.



Figura 4.2 A - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito do rato expondo a vascularização arterial do plexo a partir das artérias vizinhas ao nível das raízes (ampliação 16 x).
1 - Artéria axilar; 2 - Artéria braquial; 3 - Artéria vertebral.

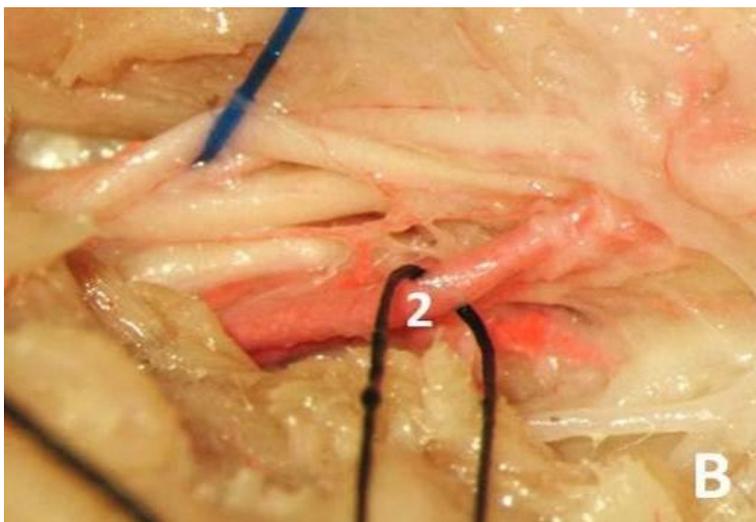


Figura 4.2 B - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito do rato demonstrando a vascularização arterial do plexo a partir das artérias vizinhas ao nível dos troncos (ampliação 16 x).
2 - Artéria braquial.

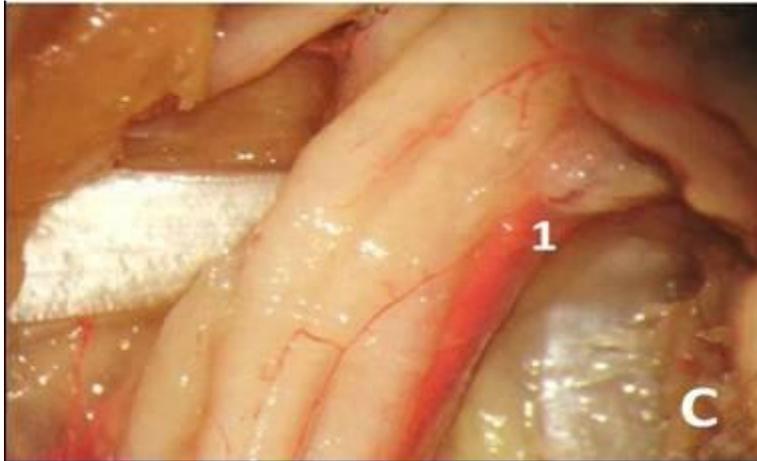


Figura 4.2 C - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito do rato expondo a vascularização arterial do plexo a partir das artérias vizinhas dos ramos terminais. Estas pequenas artérias formam uma rede vascular por cima da superfície dos nervos – plexo arterial epineural (ampliação 25 x).
1 - Artéria axilar.

A drenagem venosa segue um trajecto similar às estruturas arteriais homónimas, drenando, por fim, em direção às veias mediana, braquial, axilar e cefálica (Figura 4.3 A; Figura 4.3 B). As veias que drenam os nervos são mais numerosas do que as artérias, mas de menor calibre, tornando a sua identificação difícil ao nível epineural, mesmo com ampliações de 40 x.

Os nervos que não são acompanhados por vasos proeminentes recebem ramos vasculares (artérias e veias) de pequenos vasos dos músculos vizinhos. Isto, por vezes, verificou-se mesmo nos casos onde existiam grandes vasos nutrientes vizinhos, com vasos diminutos a interligar o sistema vascular longitudinal epineural ao sistema vascular muscular vizinho. Frequentemente, viram-se os vasos sanguíneos que saíam da superfície dos músculos a acompanhar os ramos nervosos dos mesmos (Figura 4.3 A; Figura 4.3 B).

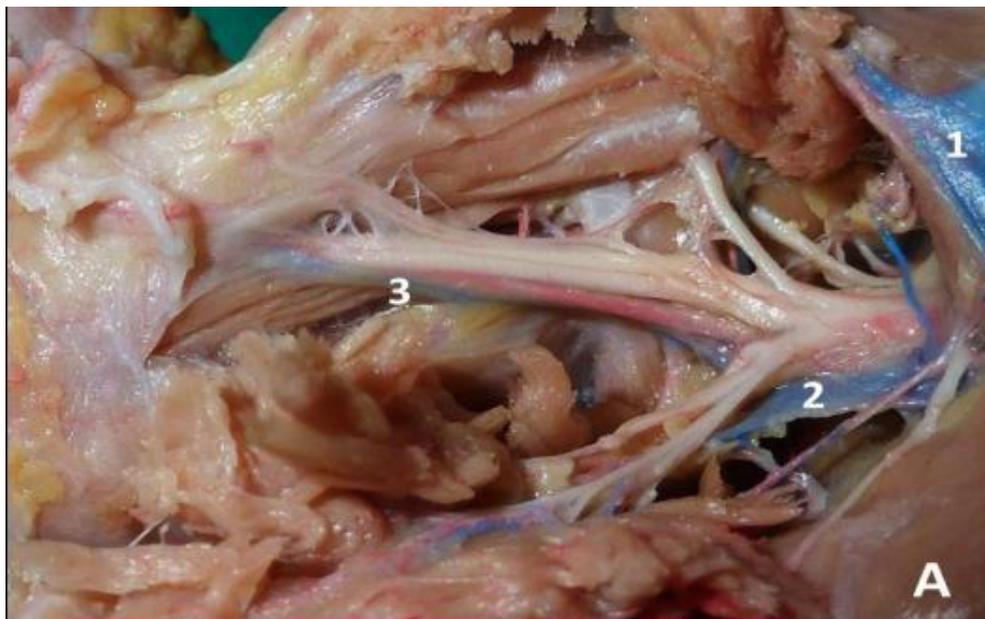


Figura 4.3 A - Fotografia da dissecção do plexo braquial direito demonstrando a vascularização arterial (vermelho) e venosa (azul) para os elementos nervosos. A drenagem venosa segue um curso paralelo à vascularização arterial (ampliação 16 x).

1 - Veia jugular externa; 2 - Veia axilar; 3 - Veia braquial; 4 - Nervos escapular dorsal.

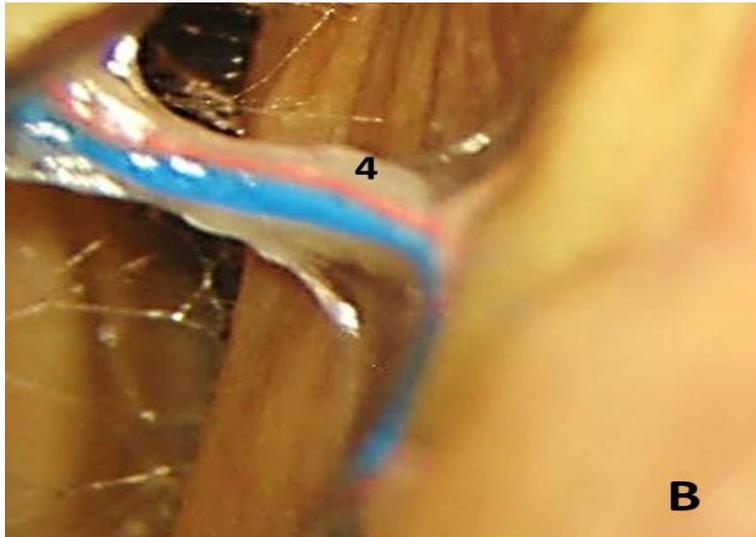


Figura 4.3 B - Pormenor do nervo escapular dorsal, ilustrando o facto de que, frequentemente, os nervos que entram nos músculos recebem ramos arteriais e venosos dos vasos que irrigam os músculos vizinhos (ampliação 25 x).
1 - Veia jugular externa; 2 - Veia axilar;
3 - Veia braquial; 4 - Nervo escapular dorsal.

Alguns nervos são acompanhados por vasos relativamente grandes e constantes que suprimem o seu plexo epineural, tornando possível levantar estes nervos como retalhos nervosos vascularizados (Figura 4.4 A; Figura 4.4 B; Figura 4.4 C).

Alguns exemplos destas associações verificaram-se entre o nervo medial braquial cutâneo e os ramos dos vasos axilares (Figura 4.4 A e 4.4 B); entre os nervos lateral e medial peitoral e os seus vasos homónimos que derivam dos vasos axilares (Figura 4.4 C); entre o nervo toracodorsal e os vasos toracodorsais com origem nos vasos subescapulares; entre o nervo radial e os vasos braquiais profundos emergidos da artéria braquial no lado dorsal do braço; entre o nervo musculocutâneo e um ramo descendente do vaso humeral circunflexo ventral; entre o nervo mediano e os vasos medianos ao nível do antebraço; e entre o nervo ulnar e os ramos dos vasos braquiais (equivalente na espécie humana aos vasos colaterais ulnar inferiores) no braço.

A rede paralela dos vasos e dos elementos do plexo braquial permite a mobilização de vários nervos como retalhos vascularizados (Figura 4.4 B; Figura 4.4 C).

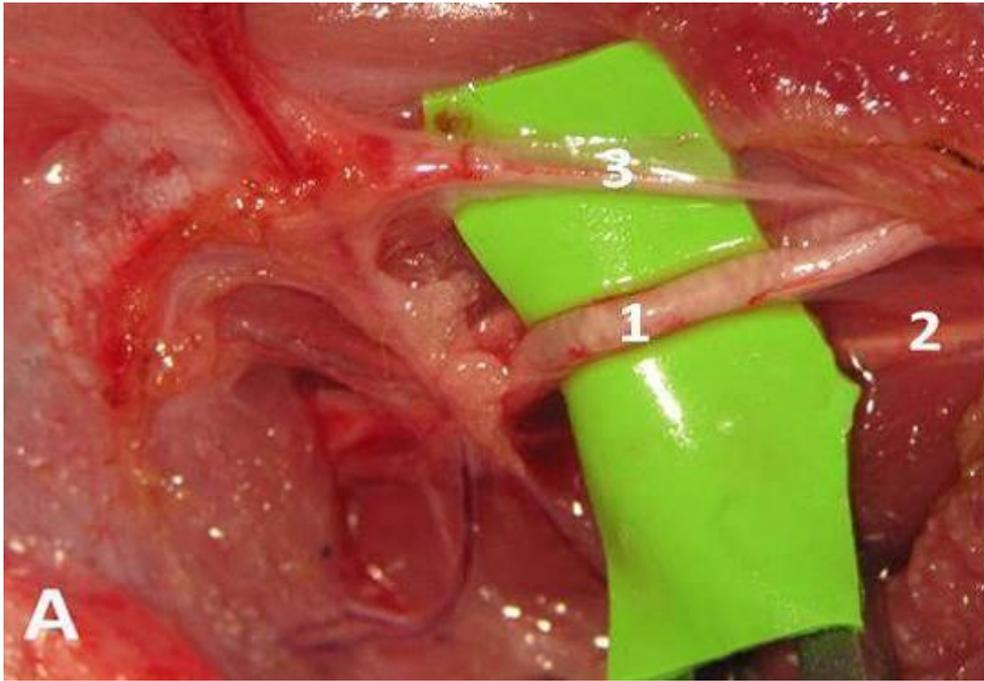


Figura 4.4 A - Foto da disseção da pata direita demonstrando a disseção do nervo cutâneo medial braquial (ampliação 10 x). 1 - Nervo mediano; 2 - Nervo ulnar; 3 - Nervo cutâneo braquial medial.

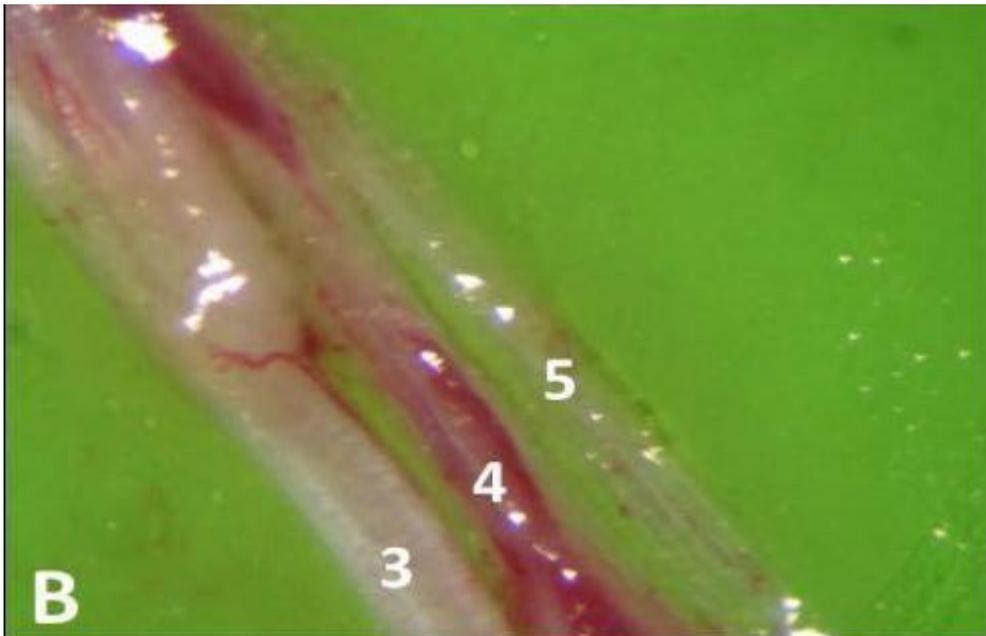


Figura 4.4 B - Foto de grande ampliação demonstrando o paralelismo entre o nervo cutâneo braquial e uma artéria e veia com origem e término, respectivamente, nos vasos axilares (ampliação 40 x). 3 - Nervo cutâneo braquial medial; 4 - Artéria acompanhando o nervo cutâneo braquial medial; 5 - Veia acompanhando o nervo cutâneo braquial medial.

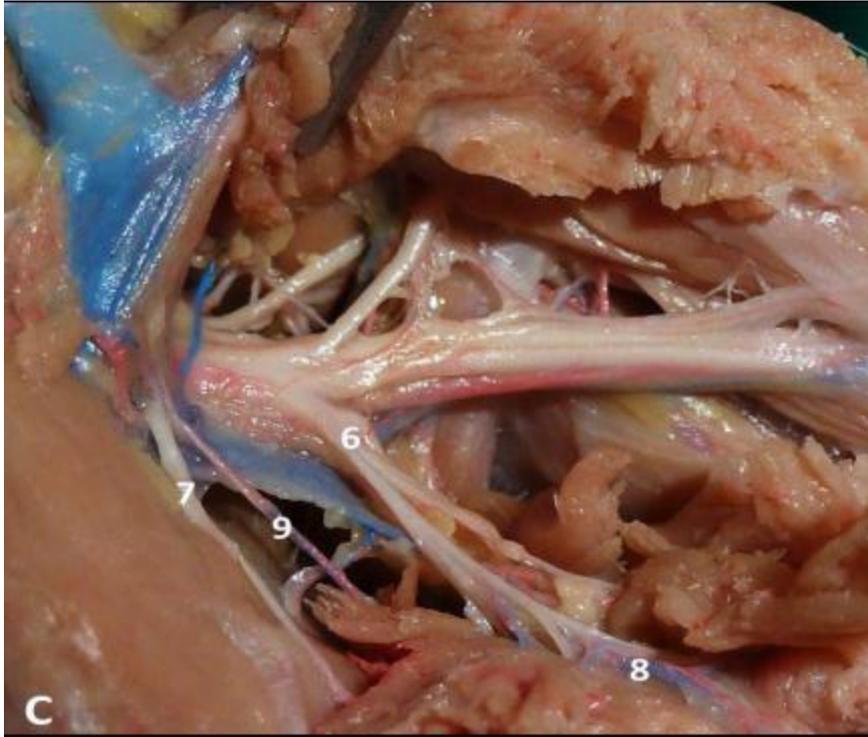


Figura 4.4 C - Dissecção do PB esquerdo demonstrando a vascularização arterial (vermelho) e venosa (azul) dos elementos nervosos. A imagem expõe os nervos peitoral lateral e peitoral medial a receber os vasos homónimos que começam e terminam nos vasos axilares. 6 - Nervo peitoral lateral; 7 - Nervo peitoral medial; 8 - Vasos a acompanhar o nervo peitoral lateral; 9 - Vasos a acompanhar o nervo peitoral medial.

4.4.2. A Microvascularização

As secções do PB coradas com hematoxilina-eosina, com Tricrómico de Masson e com o imunocorante CD-31 demonstram vasos sanguíneos múltiplos no epinervo, perinervo e endonervo em todos os níveis, da extremidade proximal das raízes à porção distal dos ramos terminais e colaterais (Figura 4.5). Os vasos no epinervo são mais escassos e de maior calibre do que no perinervo e, por sua vez, no perinervo os vasos são em menor número e de maior calibre do que os vasos no endonervo (Figura 4.5).

Os espécimes observados em microscopia electrónica de varrimento confirmaram estas descobertas e demonstraram que os sistemas vasculares epineural, perineural e endoneural são profusamente anastomosados ao longo de todo o comprimento e largura dos elementos do PB (Figura 4.6).

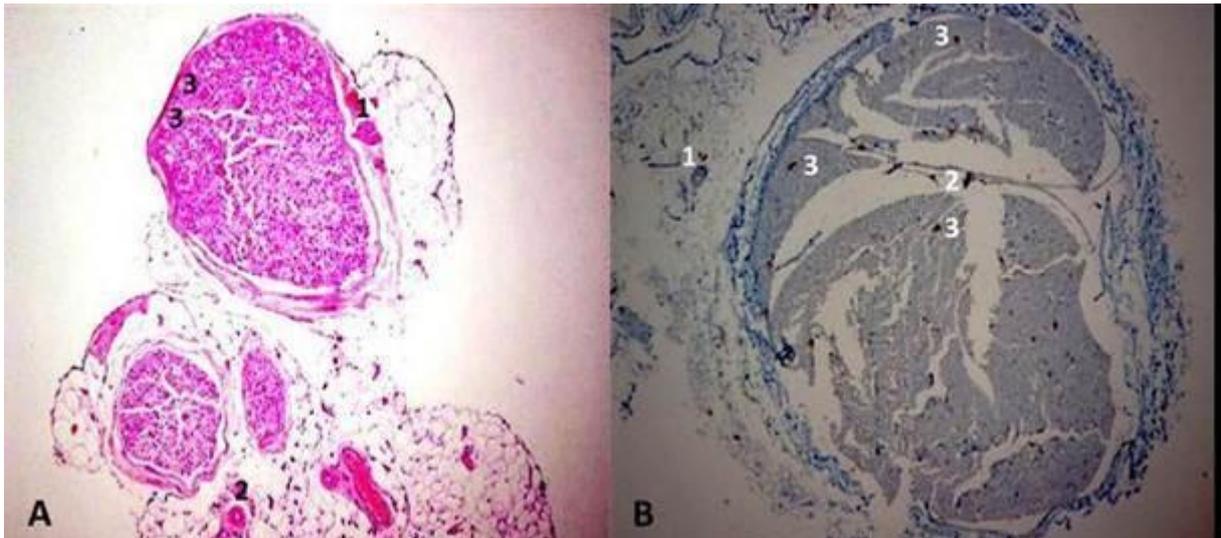


Figura 4.5 - Imagens de microcopia óptica da vascularização do plexo braquial. A: Foto de corte de raízes ventrais C6 do plexo braquial do rato com coloração de hematoxilina-eosina a expor os vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais (ampliação 40 x). B: Foto de uma secção do tronco superior do PB do rato corada com imunocorante CD-31 demonstrando os vasos sanguíneos epineurais, perineurais e endoneurais (ampliação 40 x).

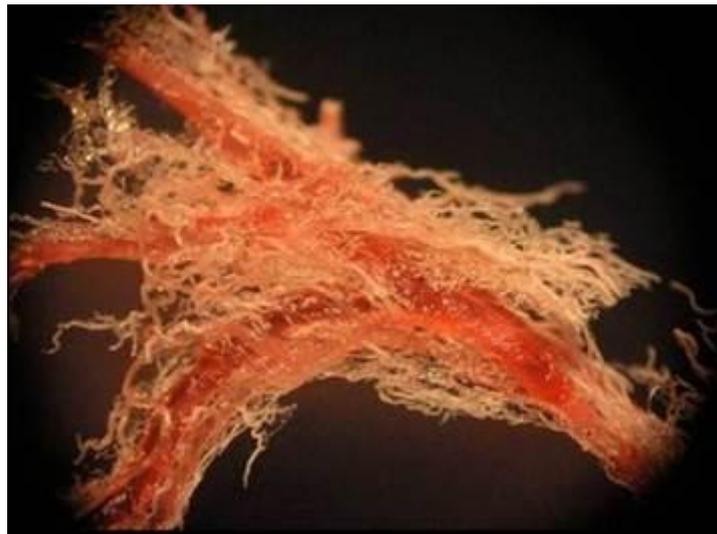


Figura 4.6 - Num segmento de um molde vascular de corrosão do plexo braquial do rato (antes da metalização) do tronco superior é possível observar uma densa rede vascular intraneural - o plexo vascular intraneural (ampliação 40 x).

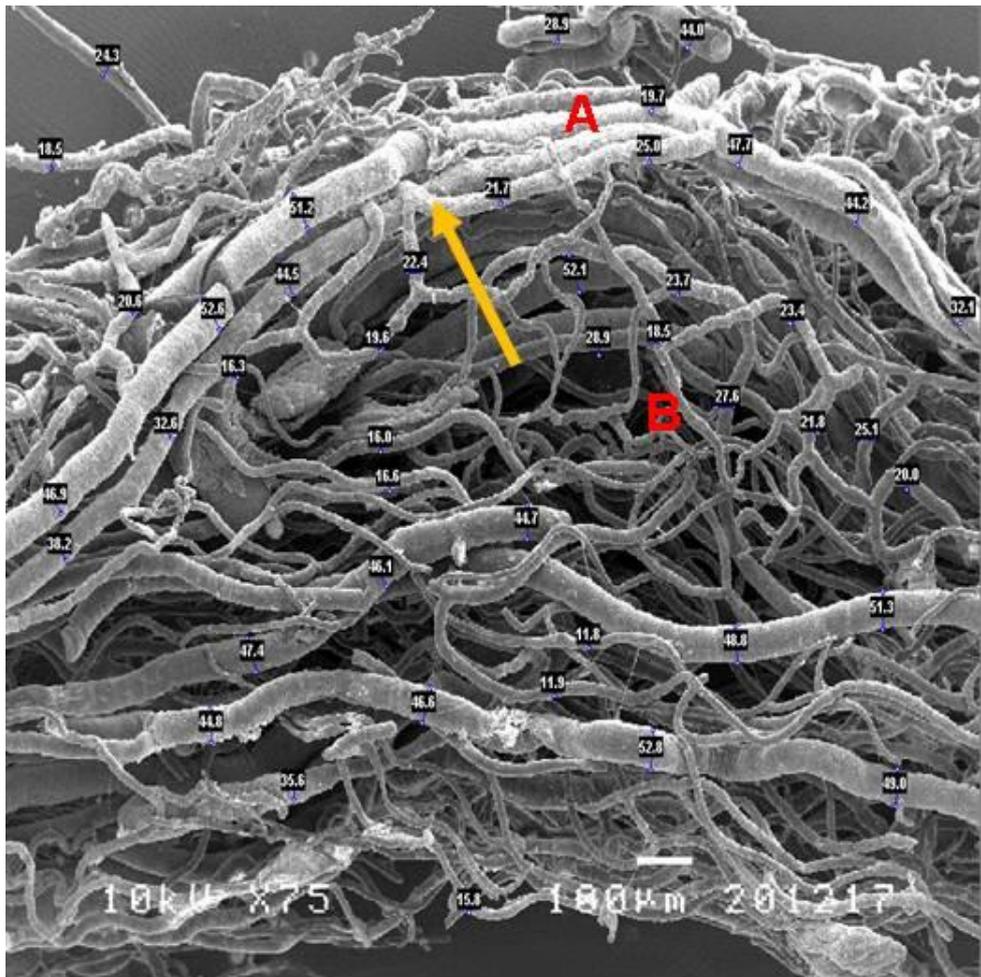


Figura 4.7 - Plexo Braquial do rato num segmento de um molde vascular de corrosão do tronco superior onde é possível observar uma densa rede vascular epineural (A) com múltiplas anastomoses (seta) em direcção ao plexo vascular intraneural (B) (ampliação 75 x - barra 100 μm).

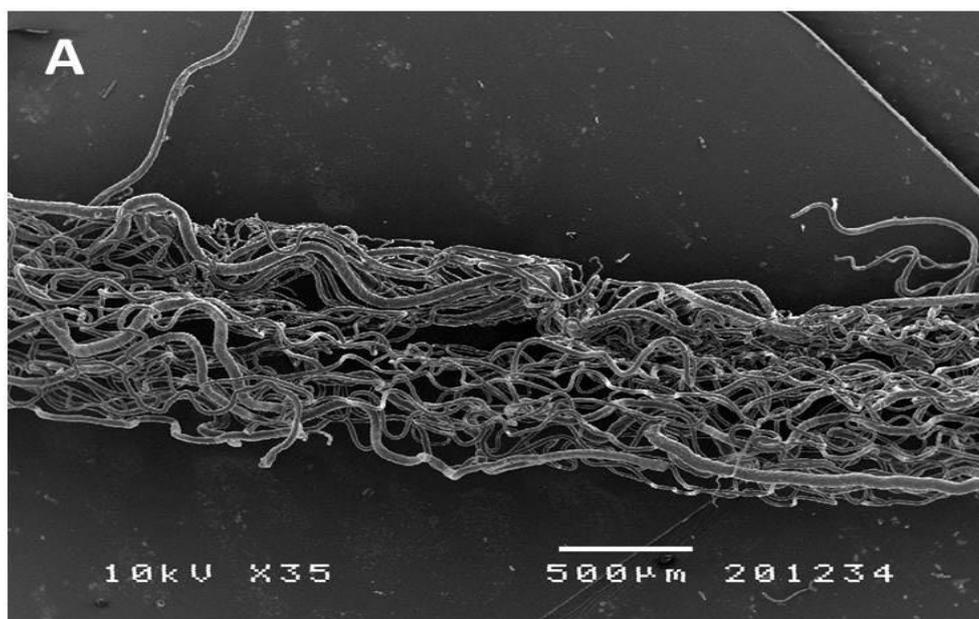


Figura 4.8 A - Imagens de Microscopia electrónica de varrimento da vascularização do plexo braquial do rato. Segmento de um molde vascular de corrosão do tronco superior onde se pode observar uma densa rede vascular intraneural - o plexo vascular intraneural (ampliação 35 x - barra 500 μm).



Figura 4.8 B - Um segmento do tronco superior sem corrosão demonstrando vasos numerosos (setas) a suprimir a superfície do tronco nervoso e a formar um plexo vascular epineural (ampliação 35 x - barra 500 µm).

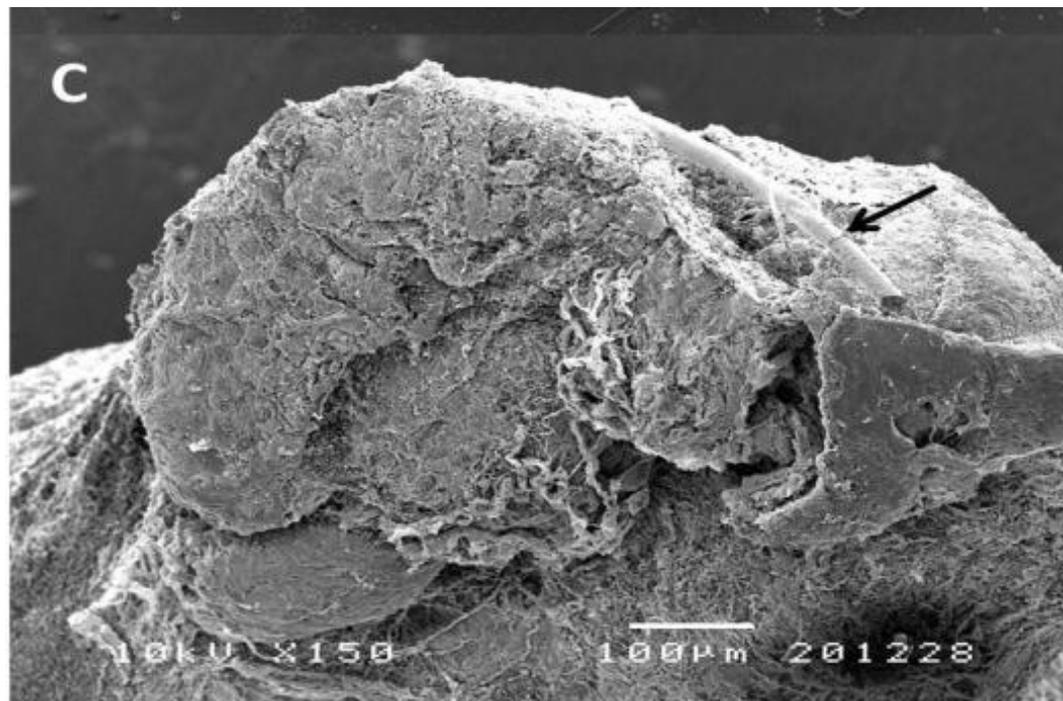


Figura 4.8 C - Um segmento sem corrosão de corte transversal da raiz C7 do PB, demonstrando uma artéria epineural (seta) a percorrer obliquamente por cima do nervo e a formar parte do plexo epineural (ampliação 50 x - barra 100 µm).

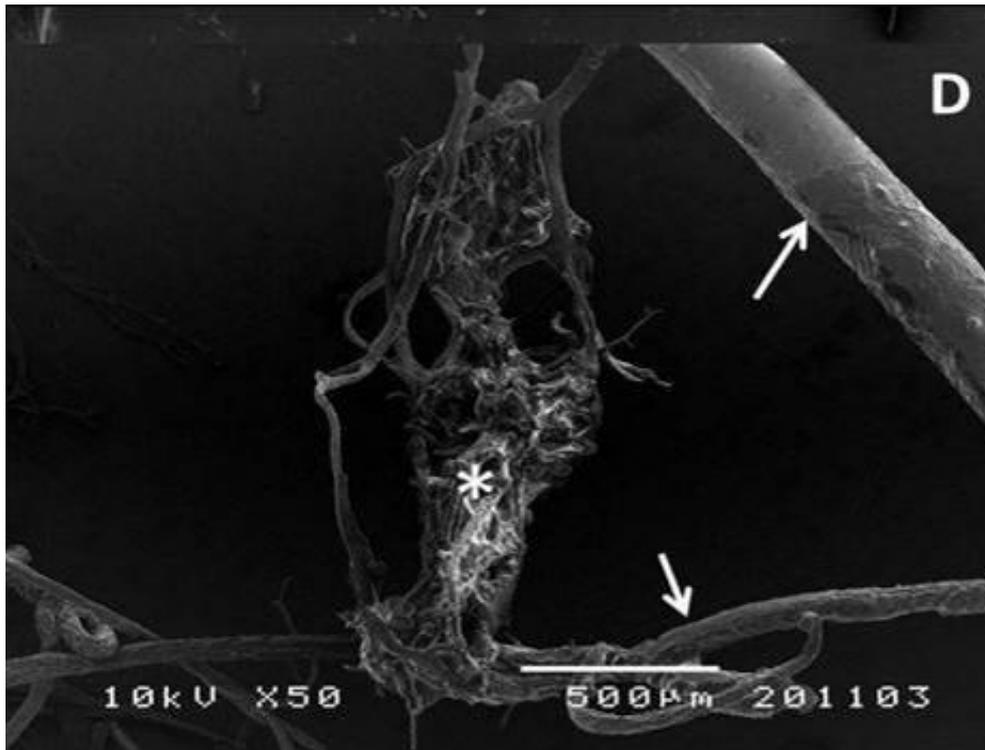


Figura 4.8 D - Numa secção transversa dum molde vascular com corrosão do tronco superior é possível observar o denso plexo vascular intraneural (*) interligado aos vasos extraneurais vizinhos (setas) (ampliação 50 x - barra 100 µm).

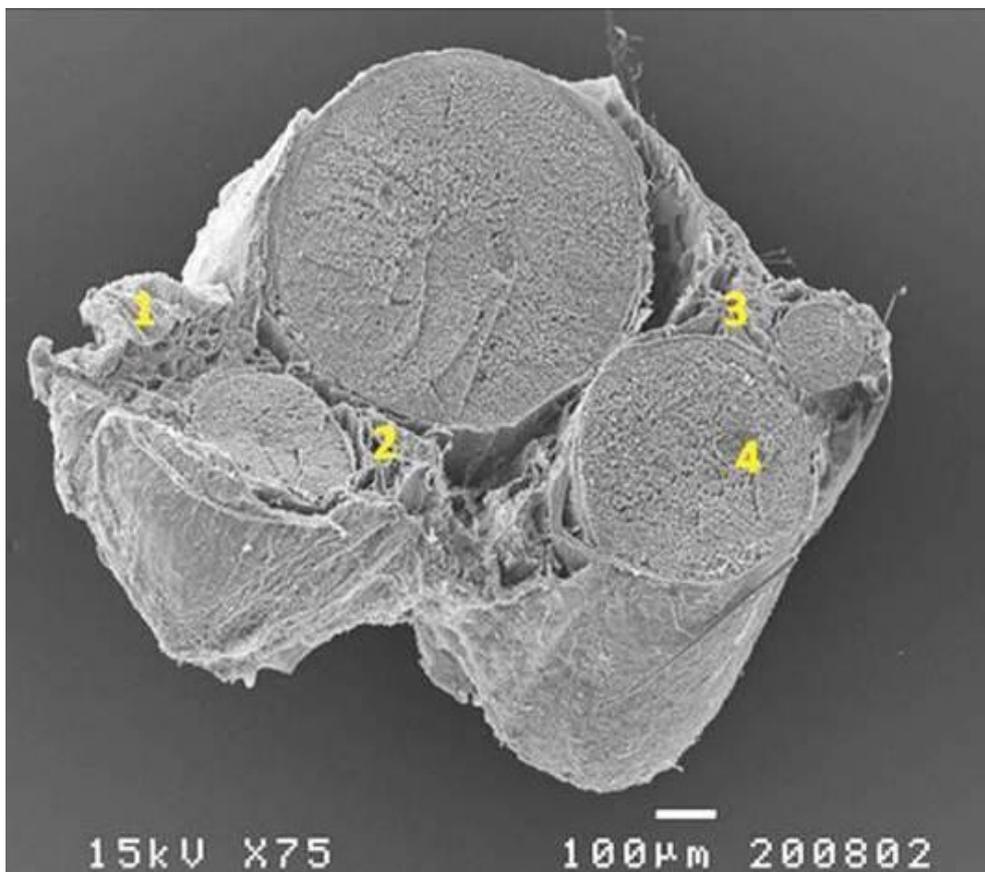


Figura 4.9 - Numa secção transversa do tronco superior sem corrosão é possível observar o denso plexo vascular epineural (1), intraepineural (2), perineural (3) e endoneural (4).

Pode concluir-se que o suprimento arterial e venoso do PB do rato deriva directa ou indirectamente dos vasos vizinhos.²⁹ Estes vasos formam plexos vasculares densos e interligados ao epinervo, perinervo e endonervo.

Várias componentes do PB do rato Wistar são acompanhadas, durante um trajecto relativamente longo, por vasos sanguíneos calibrosos e constantes que fornecem o seu plexo epineural, tornando possível o seu levantamento como retalhos nervosos e, incluindo, até, fibras predominantemente motoras, sensitivas ou fibras mistas.

4.5. Referências Bibliográficas

1. Vincent, R. (2006) *Adult and obstetrical brachial plexus injuries*. In *Peripheral Nerve Surgery: Practical applications in the upper extremity*. Editores Slutsky, D.J. e Hentz V.R., Churchill Livingstone, pp. 299-317.
2. Mathes, J.H. VR. (2006) *Plastic Surgery*. Volume VII: The Hand and Upper Limb, Part 1, Saunders, pp. 515-63.
3. Shenaq MK, J.Y.; Bullocks, Jamal (2005) *Brachial Plexus Injuries*. In *Current Therapy in Plastic Surgery*. Editores McCarthy, J.G.; Galiano, R.D.; Boutros, S.G., Saunders Elsevier, pp. 574-83.
4. Rosberg, H.E. et al. (2005) *Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm - analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden*. *J. Hand Surg. [Br]*, 1:35-9.
5. Rosberg, HEeLD. (2006) *Epidemiology of hand injuries in a middle-sized city in southern Sweden - a retrospective study with an 8-year interval*. *Scand J Plast Rec Surg Hand Surg* 2004:347-55.
6. Bertelli JAG, M.F. (2006) *Concepts of Nerve Regeneration and Repair Applied to the Brachial Plexus Reconstruction*. *Microsurgery*, 26:230-44.
7. *Cirurgia dos Nervos Periféricos*. In Patrício JAB, ed. *Microcirurgia, Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental*. 1.^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp.101-24.
8. Yanase, Y. (2004) *Micronerve suture and graft in the rat*. In Tamai S.; Usui, M. e Yoshizu, T. ed. *Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery*. 1.^a ed. Japan, Springer-Verlag, pp. 44-51.
9. Bontioti, E. (2005) *End-to-side nerve repair. A study in the forelimb of the rat*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de Lund. Suécia, pp. 36-41.
10. Bodine-Fowler, SCea. (1997) *Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques*. *Muscle Nerve*, 20:29-37.
11. Valero-Cabre, A.N. (2001) *X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair*. *Brain Res.*, 919:302-12.
12. Wall, P.D., et al. (1979) *Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa*. *Pain*, 7:103-11.
13. Bontioti, E.K.M. e Dahlin, L.B. (2003) *Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries*. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 8:159-68.
14. Bertelli JAS, A. e Pecot-Dechavassine, M. (1995) *The rat brachial plexus an its terminal branches: an experimental model for the study of peripheral nerve regeneration*. *Microsurgery*, 16:77-85.
15. Greene, E.C. (1959) *Anatomy of the rat*. New-York, Hafner.
16. Bertelli, J.A. (1991) *Reconstruction of the rat brachial plexus: Anatomico-morphological basis and functional evaluation*. 5.th International Congress of Hand Surgery, European Medical Bibliography of Hand Surgery (Suppl.), 1:264.
17. Riva, N.; Domi, T.; Lopez, I.D.; Triolo, D. e Fossaghi, A., et al. (2012) *The brachial plexus branches to the pectoral muscles in adult rats: morphological aspects and morphometric normative data*. *Frontiers in neuroanatomy*, 6:41.

18. Hellebrekers, LJB, L.H.; Flecknell, P.A. (2001) *Anaesthesia, analgesia and euthanasia*. In Principles of Laboratory Animal Science. Editores Van Zutphen, L.F.; Baumans, V.; Beynen, A.C., Elsevier, pp. 277-311.
19. Esperança-Pina, J.A. (1979) *Territórios arteriais esplênicos*. Bases anatomo-experimentais das esplenectomias parciais, Universidade Nova de Lisboa, FCM.
20. Goyri O'Neill J. (1983) *Vascularização da Placenta Humana*. Tese de Doutoramento apresentada na Faculdade de Ciências Médicas, pp. 33-41.
21. Esperança-Pina, J.A. (1973) *Circulação venosa cardíaca*. Estudo anatomo-experimental. 2.^a ed. Edição do autor, Lisboa.
22. Correia, M. (1983) *Vascularização arterial do rim*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
23. Pais, D.; Casal, D.; Santos, A. e Goyri-O'Neill, J. (2010) A variation in the origin of the median nerve associated with an unusual origin of the deep brachial artery. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 27:35-8.
24. Spalteholz, W. (1927) *Das durchsichtigmachen als biologische arbeitsmethode*. Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden 8, pp. 409-32.
25. Esperança-Pina, J.A. (1972) *A investigação anatomo-funcional em angiologia e as substâncias fluorescentes*. Prova Complementar de Doutoramento, FML.
26. Goyri O'Neill JV-H, G e Esperança-Pina, J.A. *Modificação à técnica de difanização-I*. In Actas do V International Symposium On Morphological Sciences, Rio de Janeiro.
27. Goyri O'Neill, J. (1984) *Técnica de Plastinização: Sua contribuição para o ensino e investigação em Anatomia*, pp. 92-101.
28. Pais, D. (1995) *Vascularização arterial e microvascularização testículo-epididimária*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
29. Almeida, Maria Angélica; Casal, Diogo; Mafra, Manuela; Mascarenhas-Lemos, Luís; Martins-Ferreira, José; Ferraz-Oliveira, Mário; Amarante, José Amarante e Goyri-O'Neill, João. (2013) *Brachial Plexus Morphology and Vascular Supply in the Wistar Rat Morfologia e Vascularização do Plexo Braquial no Rato Wistar*. Acta Med Port, 26 [3], Maio-Junho, pp. 243-250.

Capítulo 5

5. A VASCULARIZAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DO RATO WISTAR E COMPARAÇÃO ANGIOMORFOLÓGICA COM O NERVO MEDIANO HUMANO

5.1. Introdução

O rato (*Rattus norvegicus*) tem sido largamente usado nos estudos experimentais da reconstrução do nervo periférico, sendo até considerado o nervo mais utilizado nestes estudos.^{1, 2-6} O nervo isquiático do rato tem sido tradicionalmente usado nos estudos experimentais como um substituto do típico nervo humano, particularmente do nervo mediano.^{2,3,7}

Pelos estudos feitos, tem-se assumido que estes dois nervos (o nervo mediano humano e o nervo isquiático do rato) são muito semelhantes nos aspectos mais importantes, nomeadamente no que diz respeito à fisiologia na reparação nervosa.^{6,7,8,9} Porém, falta o conhecimento do grau de semelhança da vascularização destes dois nervos.^{2,9} Isto, por sua vez, tem implicações potenciais e significantes quando se estudam novas estratégias para a reparação do nervo mediano recorrendo-se ao nervo isquiático do rato como modelo.¹⁰⁻¹⁴

Uma vez que o suprimento vascular é considerado um factor fundamental para a reparação nervosa, quer no contexto experimental, quer no contexto clínico, nomeadamente na possibilidade de planeamento e de execução de retalhos nervosos livres, pediculados ou de retalhos compostos que incluem nervos^{10,14,15}, então, é muito importante ter um conhecimento pormenorizado da vascularização do nervo isquiático do rato, bem como do nervo mediano humano, e investigar se há semelhanças na vascularização destes dois nervos.

Assim, neste estudo, compara-se sistematicamente a macro e a microvascularização do nervo isquiático do rato com a macro e a microvascularização do nervo mediano humano, dando-se uma importância particular aos aspectos que podem ser de interesse experimental.

Trinta ratos adultos foram estudados em relação à vascularização do nervo isquiático. Estes dados foram comparados com os dados obtidos numa análise semelhante, em relação aos nervos medianos de 26 cadáveres humanos. As técnicas utilizadas foram as descritas no Capítulo 2 deste projecto, Materiais e Técnicas de Estudo.

5.2. Material e Métodos

Trinta ratos adultos com um peso entre os 300 e os 350 g foram sujeitos a anestesia geral através de uma injeção intra-peritoneal com uma mistura de ketamina e de xylazina, numa dose de 90 mg/kg e de 10 mg/kg, respectivamente.¹⁵ Os animais foram submetidos a laparotomia mediana e eutanasiados através da colocação de um cateter na aorta abdominal e de outro na veia cava para os exsanguinar, e foi repostado o volume sanguíneo através de uma solução de soro heparinizado (50 unid/ml).

Em 25 animais procedeu-se à injeção de uma suspensão coloidal de sulfato de bário (*Micropaque, Nicholas Lab*) misturado com 10 % de gelatina comercial (em partes iguais), corada com pigmento vermelho ou azul (*Pigment Tintolac Super, Robialac*). A solução vermelha foi injectada na aorta abdominal e a solução azul na veia cava caudal, de acordo com as técnicas correntemente adoptadas na nossa instituição.¹⁶⁻²¹

Os ratos foram dissecados utilizando-se um microscópio cirúrgico binocular (*Leica M 651*).

Foi registada a constituição e a distribuição do nervo isquiático e dos seus ramos, bem como a origem e o término das artérias e das veias que irrigam este nervo. Posteriormente, em 20 dos 25 ratos injectados, os nervos foram removidos e diafanizados segundo a técnica desenvolvida por Spalteholz e, mais tarde, modificada por Esperança-Pina e Goyri O'Neill.²²⁻²⁴ Estes nervos foram observados através de uma lupa binocular para estudar a sua vascularização.

Em 5 dos ratos injectados, os nervos foram fixados em formoldeído a 10 % e preparados para uma observação histológica, sendo corados com hematoxilina-eosina e com Tricrómico de Masson. Adicionalmente, as secções dos nervos foram marcadas com o imunocorante CD-31 para a observação do endotélio dos vasos.

Finalmente, em 5 ratos, uma solução de *Mercox* foi injectada na artéria aorta abdominal para a obtenção de moldes vasculares e, posteriormente, estes foram observados em microscopia electrónica de varrimento, de acordo com os protocolos correntemente adoptados na nossa instituição.¹⁶⁻²¹

5.3. A Macrovascularização do Nervo Isquiático do Rato Wistar

Pela dissecação do lado dorsal do membro posterior do rato, para o estudo da distribuição normal do nervo isquiático e da sua vascularização, foi possível perceber que o nervo isquiático do rato, com origem no plexo sagrado, recebe ramos dos vasos glúteo cranial, caudal e sagrado.

O nervo atinge a área dorsal da coxa através da incisura isquiática. Neste compartimento, o nervo recebe muitos vasos acompanhantes com origem nos vasos glúteos caudais que, por sua vez, emitem os vasos comitantes do nervo isquiático (Figura 5.1 A; Figura 5.1 B; Figura 5.1 C; Figura 5.1 D; Figura 5.1 E; Figura 5.1 F).

Na parte mediana da coxa, o nervo isquiático recebe, a partir dos vasos circunflexo, femoral e medial, um extenso feixe vascular com um calibre ligeiramente mais pequeno do que o calibre dos

próprios vasos comitantes do nervo isquiático (Figura 5.1 A; Figura 5.1 B; Figura 5.1 C). Os vasos poplíteos originam outros vasos em direção à porção distal do nervo isquiático e aos seus ramos terminais à volta da articulação do joelho (Figura 5.1 A; Figura 5.1 B; Figura 5.1 C; Figura 5.1 D).

Logo, seguindo a classificação de vascularização de Taylor (ver Capítulo 3), o nervo isquiático do rato pode ser classificado como um nervo de tipo D.^{25,27} Assim, o nervo isquiático do rato, tal como o nervo mediano humano, recebe múltiplos ramos vasculares a partir dos vasos vizinhos, particularmente daqueles que seguem um curso paralelo ao nervo, mesmo que transitório. Estes vasos fornecem ao plexo vascular epineural vários ramos ao longo do nervo, de uma forma relativamente variável (Figura 5.1 D; Figura 5.1 E; Figura 5.1 F).

Também à semelhança do nervo mediano humano, o nervo isquiático do rato recebe ramos dos vasos que suprimem os músculos vizinhos, particularmente onde os nervos fornecem ramos para esses músculos (Figura 5.1 A; Figura 5.1 B; Figura 5.1 C). Foi também frequente observar os vasos sanguíneos a acompanhar os ramos nervosos destinados aos músculos com uma direção oposta à dos nervos, estabelecendo anastomoses com o plexo vascular epineural (Figura 5.1 A; Figura 5.1 B).

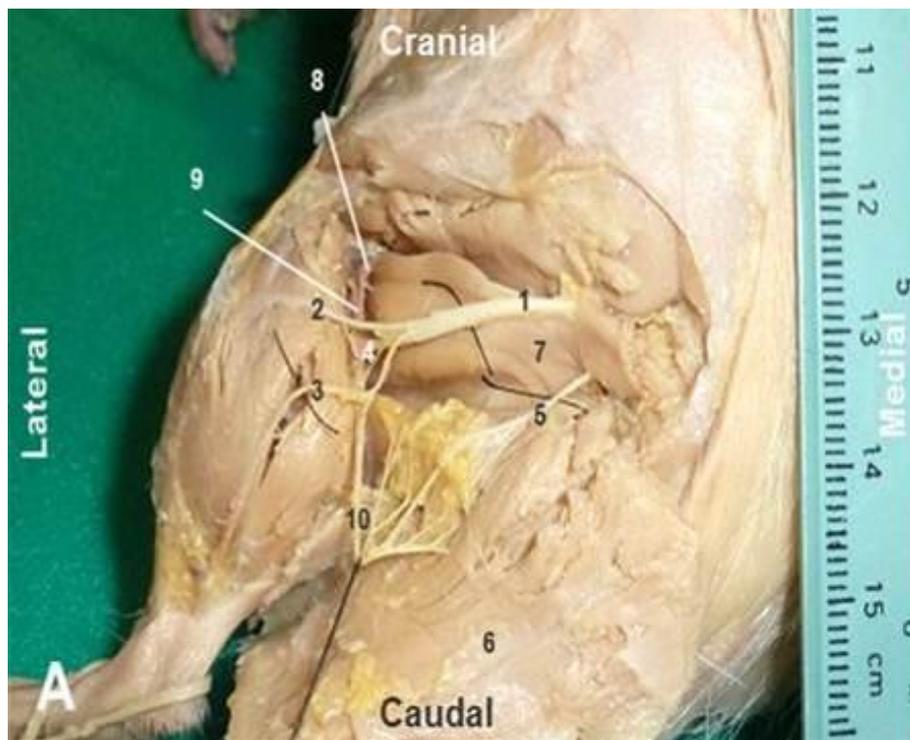


Figura 5.1 A - Percurso e distribuição do nervo isquiático:

- 1 - nervo isquiático; 2 - nervo peroneal comum; 3 - nervo caudal sural cutâneo; 4 - nervo tibial; 5 - ramo muscular do nervo isquiático; 6 - músculos glúteos; 7 - músculos adutores; 8 - artéria poplíteia; 9 - veia poplíteia; 10 - artéria e veia femoral caudal.

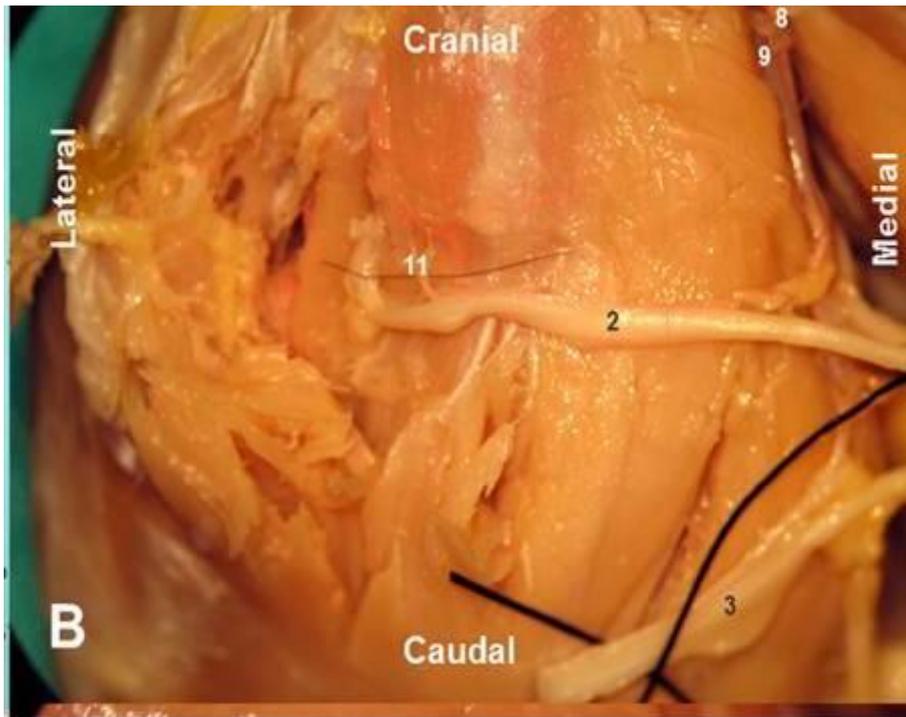


Figura 5.1 B - Fotografia de um dos ramos terminais do nervo isquiático (2 - nervo peroneal comum) ilustrando o contributo dos inúmeros vasos em redor, neste caso, dos vasos poplíteos (8 - artéria poplíteia; 9 - veia poplíteia) e dos ramos dos vasos que suprimem os músculos vizinhos (11), para o plexo epineural.

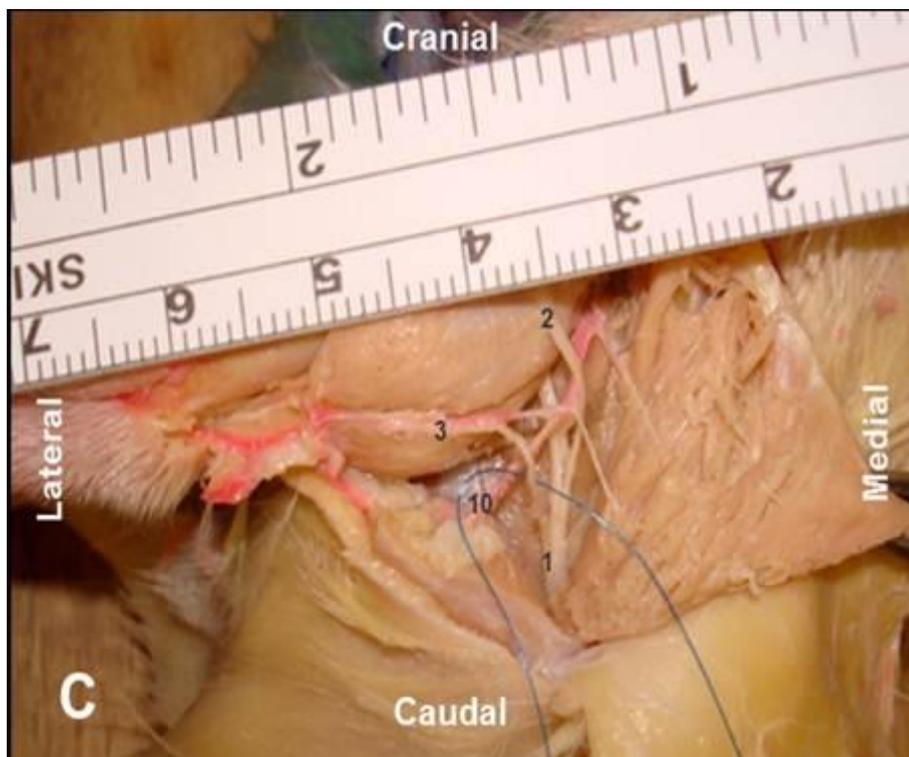


Figura 5.1 C - Fotografia realçando a proximidade topográfica entre o nervo isquiático (1), o nervo peroneal comum (2) e os vasos maiores (3; 10) no dorso do membro, os quais fornecem ramos para os nervos.

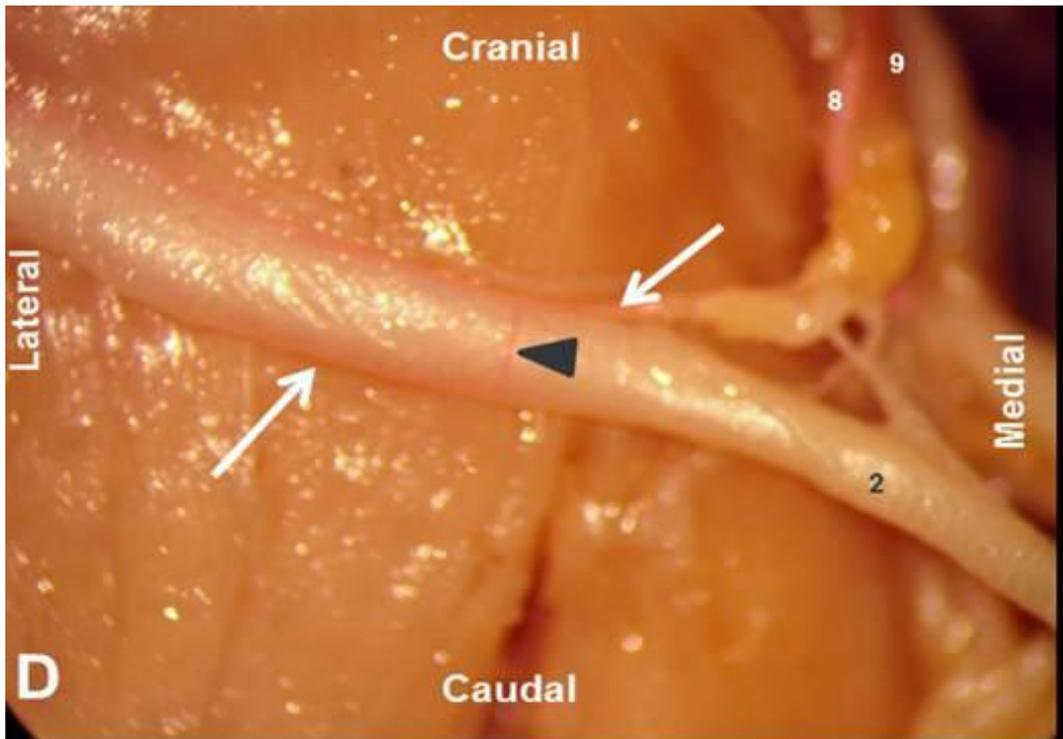


Figura 5.1 D - Ampliação de 25 x demonstrando os vasos epineurais (setas brancas) com um ramo transverso anastomótico entre eles (ponta da seta preta); 8 - artéria poplítea; 9 - veia poplítea.

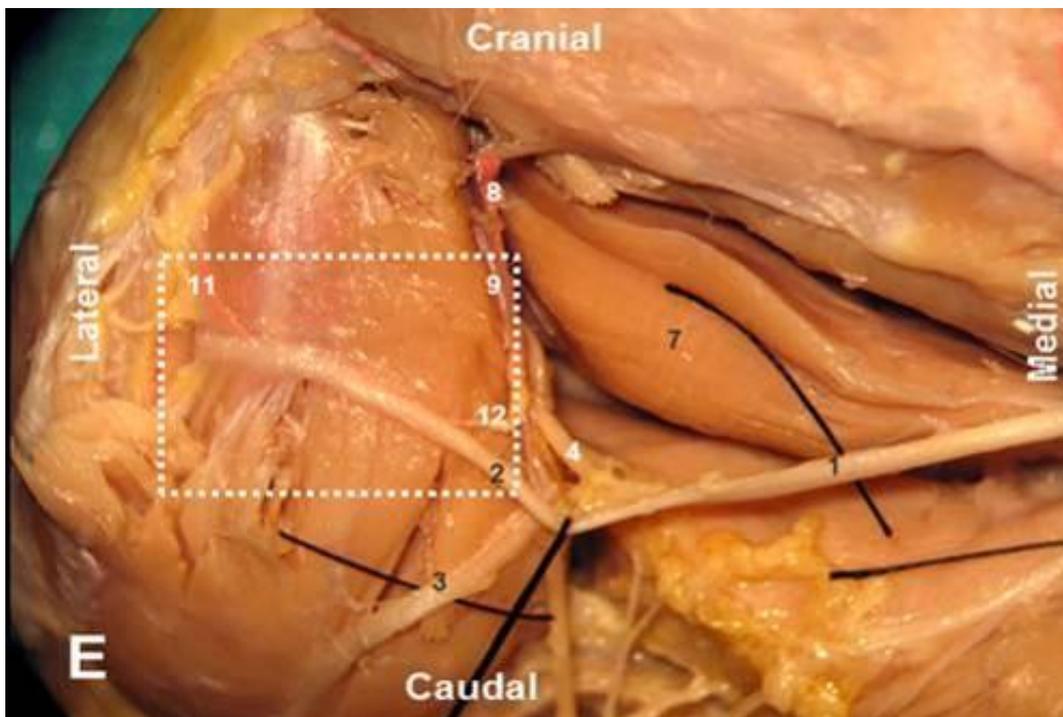


Figura 5.1 E - Exemplo do contributo, para os vasos epineurais, dos ramos dos grandes vasos vizinhos (8 - artéria poplítea; 9 - veia poplítea) e dos vasos fornecidos pela vascularização dos músculos inervados por aquele nervo (11;12). Estes últimos vasos têm um percurso contrário ao do nervo.
 1 - nervo isquiático; 2 - nervo peroneal comum; 3 - nervo caudal sural cutâneo; 4 - nervo tibial; 5 - ramo muscular do nervo isquiático; 6 - músculos glúteos; 7 - músculos adutores; 8 - artéria poplítea; 9 - veia poplítea; 10 - artéria e veia femoral caudal; 11 e 12 - vasos para o nervo a partir dos músculos vizinhos.

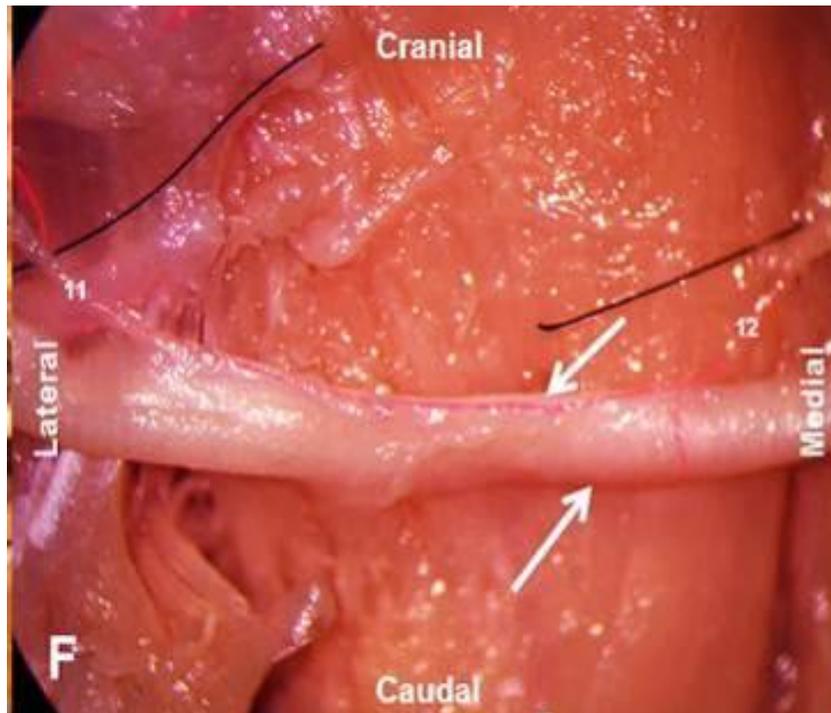


Figura 5.1 F - Área incluída na caixa representada na Figura 5.1 E (ampliação de 25 x).
Pela dissecação do nervo isquiático no microscópio cirúrgico binocular (*Leica M 651*) verifica-se que os vasos do plexo epineural percorrem longitudinalmente todo nervo e anastomosam-se entre si profusamente (Figura 5.2, Figura 5.3).

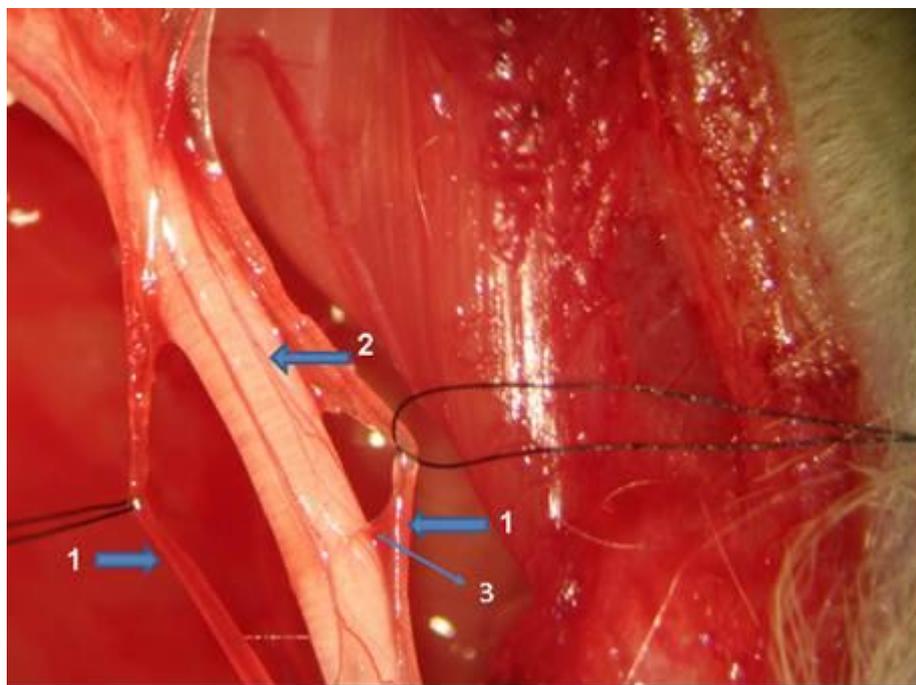


Figura 5.2 – Fotografia da dissecação do nervo isquiático (ampliação 25 x) ilustrando os vasos epineurais (1; 2) e as anastomoses entre eles (3).

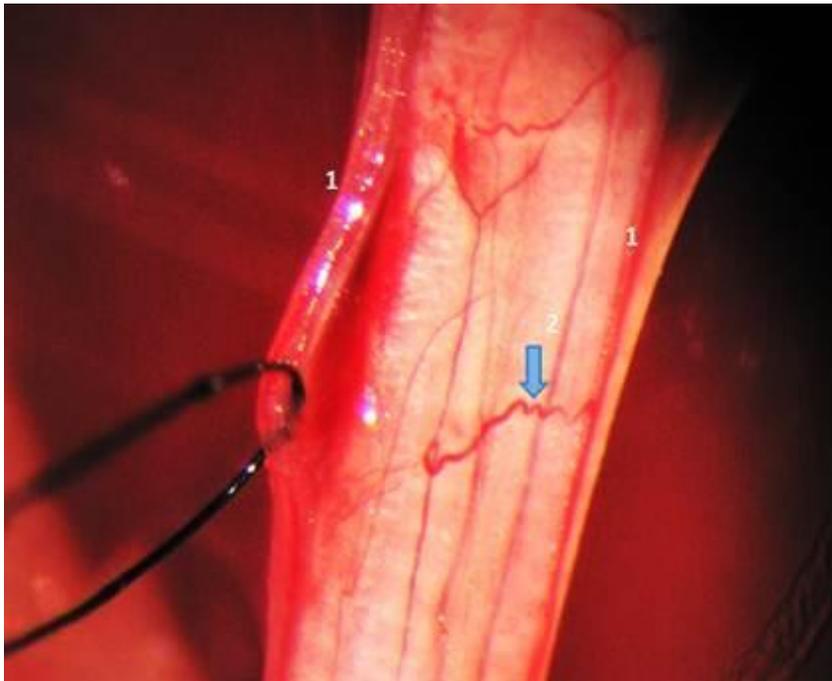


Figura 5.3 - Fotografia da disseção do nervo isquiático (ampliação 40 x) ilustrando os vasos epineurais (1) e as anastomoses entre eles (seta).

Pelo molde vascular de corrosão do nervo isquiático do rato, antes da metalização (Figura 5.4 A; Figura 5.4 B), pôde confirmar-se que a grande artéria isquiática comitante segue o trajecto do nervo desde a origem da artéria caudal glútea. Por sua vez, a artéria medial circunflexa femoral envia uma artéria anastomótica, com origem no lado medial da coxa, para suprimir o nervo, tal como a artéria poplítea contribui, por outro lado, para a vascularização do nervo isquiático perto da sua divisão terminal.

Pôde também verificar-se que os vasos epineurais e perineurais com origem na artéria isquiática comitante são profusamente anastomosados entre eles formando um plexo vascular longitudinal ao longo do eixo maior do nervo (Figura 5.4 B).



Figura 5.4 A - Fotografia de um molde vascular de corrosão do nervo isquiático: (1) grande artéria isquiática comitante, (2) artéria anastomótica suprimindo o nervo, (3) artéria poplítea (ampliação 10 x).



Figura 5.4 B - Porção mediana do nervo isquiático demonstrando os vasos epineurais e perineurais com origem na artéria isquiática comitente (1). Estes vasos são profusamente anastomosados entre eles, formando um plexo vascular longitudinal ao longo do eixo maior do nervo (ampliação 40 x).

Pela técnica de Diafanização, verificámos também que os vasos epineurais e perineurais são profusamente anastomosados entre si formando o plexo vascular extrínseco que se dispõe longitudinalmente ao longo do eixo maior do nervo (Figura 5.5 A; Figura 5.5 B).

Na Figura 5.5 C, pode ver-se a relação topográfica entre os vasos epineurais, perineurais e endoneurais:



Figura 5.5 A - Fotografia do nervo isquiático do rato em diafanização, injectado com um contraste colorido intravascular (ampliação 16 x), demonstrando o plexo vascular longitudinal epineural (1).

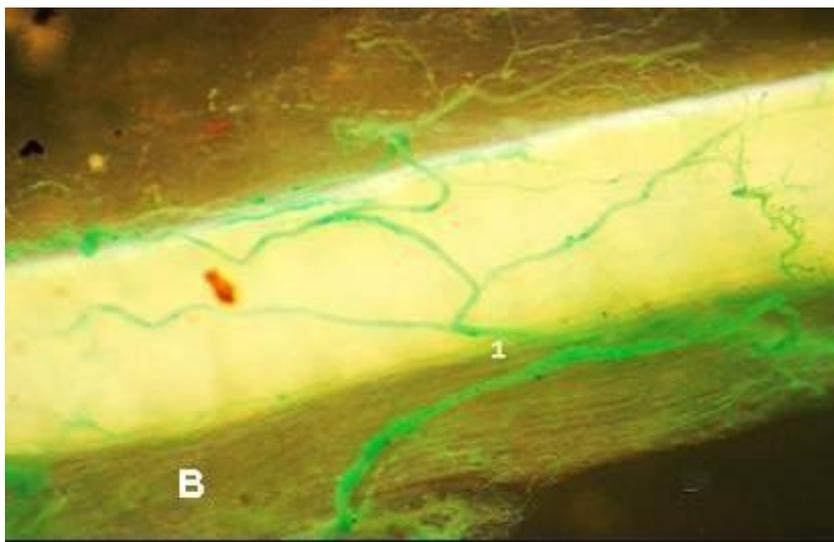


Figura 5.5 B - Fotografia do nervo isquiático do rato em diafanização, injectado com um contraste colorido intravascular (ampliação 25 x), demonstrando múltiplos vasos anastomóticos epineurais transversos e oblíquos na superfície do epinervo.
1 - Vasos epineurais.

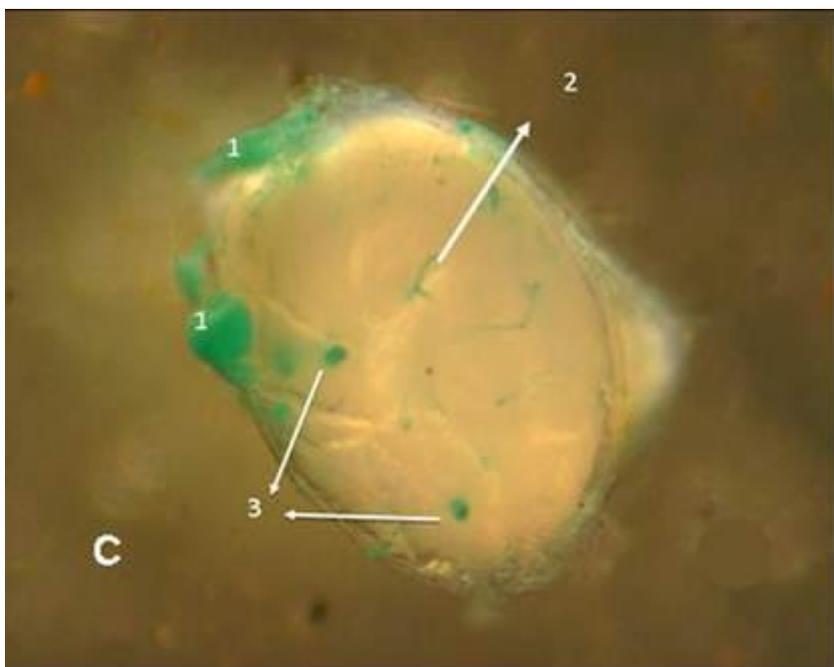


Figura 5.5 C - Fotografia em diafanização, de um corte transverso do nervo isquiático do rato (ampliação 25 x).
1 - vasos epineurais;
2 - vasos perineurais;
3 - vasos endoneurais.

5.4. A Microvascularização do Nervo Isquiático do Rato Wistar

Os estudos efectuados no nervo isquiático do rato Wistar através da Diafanização, da MEV e da Histologia, à semelhança dos estudos realizados recorrendo-se aos mesmos métodos, no nervo mediano humano, permitiram-nos identificar, também, os dois sistemas vasculares: o sistema vascular “extrínseco” e o sistema vascular “intrínseco”. O sistema vascular extrínseco é composto pelos vasos nutritivos existentes no epinervo externo e no epinervo interno, formando o plexo vascular extrínseco epineural. O sistema vascular intrínseco é constituído pelo plexo perineural e pelo plexo intrafascicular ou endoneural (Figura 5.5).

À semelhança do nervo mediano humano, cada fascículo do nervo isquiático do rato Wistar apresenta uma microvascularização intrínseca bem definida, composta pela combinação do plexo

vascular perineural com o plexo vascular endoneural.^{7-10,22-33} O nervo isquiático do rato Wistar, à semelhança do nervo mediano humano, apresenta também grandes vasos epineurais relativamente escassos que percorrem o eixo principal do nervo. (Figura 5.4 A, Figura 5.4 B).

Em MEV (Figura 5.6), foi possível verificar que os vasos epineurais e perineurais apresentam numerosas anastomoses entre eles próprios ao longo de todo o percurso do nervo. Os vasos epineurais enviam muitos ramos oblíquos que suprimem os plexos perineurais e endoneurais (Figura 5.6). Estes dois plexos são muito densos, particularmente o último, formando uma rede robusta ao longo de todo o percurso do nervo (Figura 5.6).

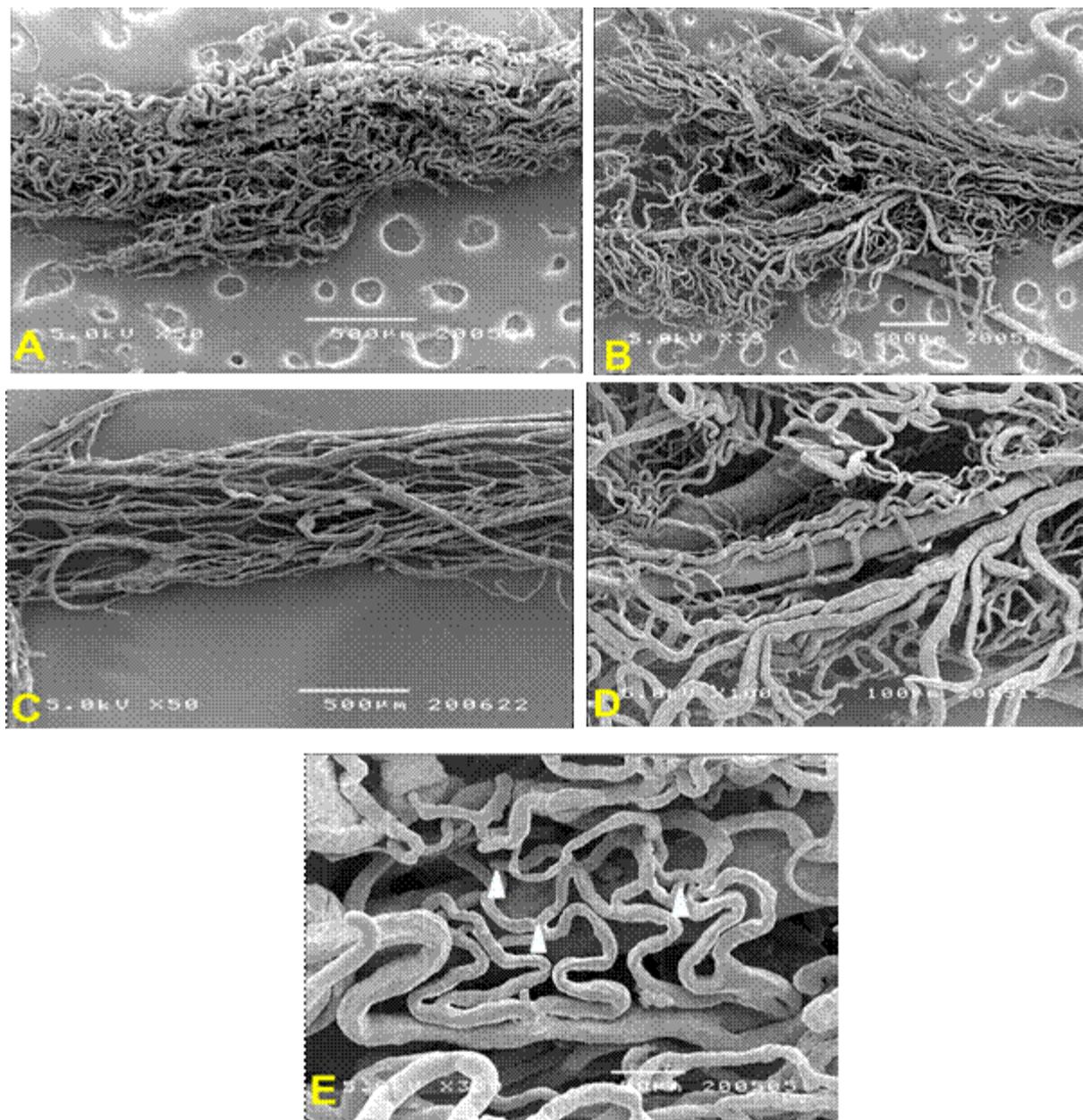


Figura 5.6 - Imagens de microscopia electrónica de varrimento da vascularização do nervo isquiático do rato: (A), porção proximal, (B) porção distal e (C) porção intermédia do nervo isquiático do rato demonstrando o arranjo predominantemente longitudinal dos vasos sanguíneos do epinervo e do perinervo ao longo do maior eixo do nervo e dos seus ramos terminais. D: Grande ampliação do nervo isquiático do rato demonstrando os vasos do endonervo a formar um denso plexo vascular que recebe múltiplos ramos de grandes vasos que vêm, de forma oblíqua, dos vasos perineurais. E: Grande ampliação do nervo isquiático do rato demonstrando múltiplas anastomoses (ponta das setas) entre os vasos endoneurais.

Histologicamente, o nervo isquiático do rato é oligofascicular, contrariamente ao nervo mediano humano que é polifascicular (Figura 5.7 A, Figura 5.7 B). Contudo, analisando a microvascularização destes dois nervos podemos concluir que esta é muito similar.

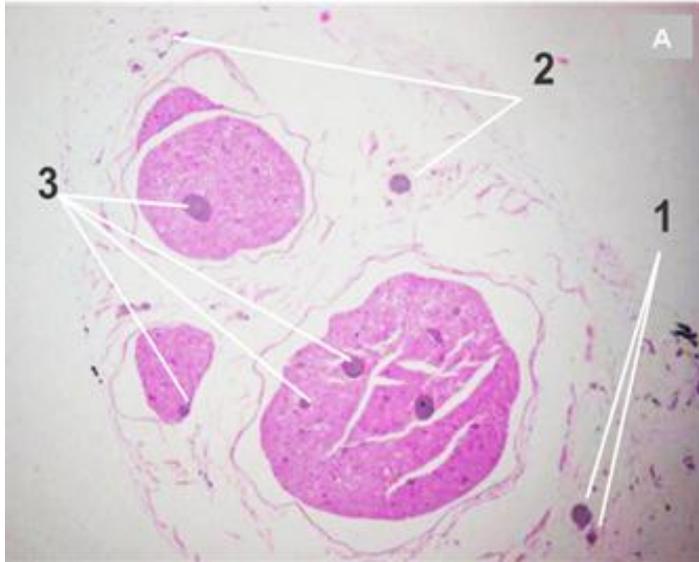


Figura 5.7 A - Fotografia da vascularização do nervo isquiático do rato em microscopia óptica, numa ampliação 40 x da secção do nervo, corada com hematoxilina-eosina para mostrar os vasos sanguíneos epineurais (1), perineurais (2) e endoneurais (3).

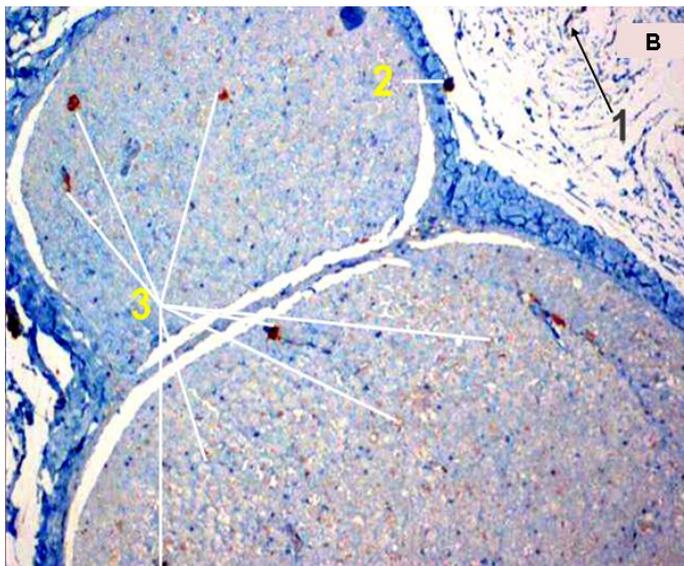


Figura 5.7 B - Fotografia de ampliação 100 x de uma secção do nervo isquiático do rato com imunocorante CD-31 para mostrar os vasos sanguíneos epineurais (1), perineurais (2) e endoneurais (3).

Uma das principais limitações do nosso trabalho foi o facto de que não conseguimos avaliar, de forma precisa, a localização e a medida de todos os vasos individuais que supriam o nervo isquiático do rato e o nervo mediano humano. Isto deveu-se à extrema fragilidade e ao pequeno diâmetro de muito destes vasos, o que impediu a preservação da sua integridade durante a dissecção. Esta dificuldade foi também referida por muitos autores que estudaram a vascularização dos nervos.^{10,15,34,35} Contudo, a finalidade de estudar a macro e microvascularização do nervo isquiático do rato e do nervo mediano humano nunca foi alcançada antes. Este conhecimento é considerado o mais relevante para propósitos experimentais.^{9,10,12,14,36}

5.5. Referências Bibliográficas

1. Yanase, Y. (2004) *Micronerve suture and graft in the rat*. In Tamai S, Usui M, Yoshizu T, ed. *Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery*. 1.^a ed. Japan, Springer-Verlag, pp. 44-51.
2. Varejão, A.S. (2003) *Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experimental*. Tese de Doutoramento Vila Real, Trás-os-Montes e Alto Douro.
3. Bontioti, E. (2005) *End-to-side nerve repair. A study in the forelimb of the rat*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade de Lund., Suécia, pp. 36-41.
4. Cenci, M.A.; Whishaw, I.Q. e Schallert, T. (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nature reviews Neuroscience*, 3:574-9.
5. Rupp, A.; Schmahl, W.; Lederer, W. e Matiasek, K. (2007) *Strain differences in the branching of the sciatic nerve in rats*. *Anatomia, histologia, embryologia*, 36:202-8.
6. Sunderland, S. (1991) *Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal*. 1.^a ed. New York, Churchill Livingstone, pp. 53.
7. Varejão, A.S. (2011) *Cirurgia dos Nervos Periféricos*. In Patrício, J.A.B., ed. *Microcirurgia: Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental*, 1.^aed, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp.101-105.
8. Dahlin, L.B. (2006) Nerve injury and repair: from molecule to Man. In Slutsky, D.J. Hentz VR, ed. *Peripheral Nerve Surgery: Practical Applications in the Upper Extremity*. Philadelphia, Elsevier, pp. 1-22.
9. Suami, H.; Taylor, G.I. e Pan, W.R. (2003) *Angiosome territories of the nerves of the lower limbs*. *Plast. Reconstr. Surg.*, 112:1790-8.
10. Terzis, J.K.; Skoullis, T.G. e Soucacos, P.N. (1995) *Vascularized nerve grafts. A review*. *Int. Angiol.*, 14:264-77.
11. Breidenbach, W.C. e Terzis, J.K. (1986) *The blood supply of vascularized nerve grafts*. *J. Reconstr. Microsurg.*, 3:43-58.
12. Breidenbach, W. e Terzis, J.K. (1984) *The anatomy of free vascularized nerve grafts*. *Clin. Plast. Surg.*, 11:65-71.
13. Adams, W.E. (1943) The blood supply of nerves. *Journal of anatomy*, 77:243.
14. Hong, M.K. e Taylor, G.I. (2006) *Angiosome territories of the nerves of the upper limbs*. *Plast. Reconstr. Surg.*, 118:148-60.
15. Hellebrekers LJB, L.H. e Flecknell, P.A. (2001) *Anaesthesia, analgesia and euthanasia*. In *Principles of Laboratory Animal Science*. ed. Van Zutphen, L.F.; Baumans, V.; Beynen, A.C. Elsevier, pp. 277-311.
16. Esperança-Pina, J.A. (1979) *Territórios arteriais esplénicos*. Bases anatomo-experimentais das esplenectomias parciais. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
17. Goyri O'Neill, J. (1983) *Vascularização da Placenta Humana*. Tese de Doutoramento apresentada na Faculdade de Ciências Médicas, pp. 33-41.
18. Esperança-Pina, J.A. *Circulação venosa cardíaca*. Estudo anatomo-experimental. 2.^a ed. Edição do autor, Lisboa.
19. Correia, M. (1983) *Vascularização arterial do rim*. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, FCM.
20. Pais, D. (1995) *Vascularização arterial e microvascularização testículo-epididimária*. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
21. Spalteholz, W. (1927) *Das durchsichtigmachen als biologische arbeitsmethode*. *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden* 8, pp. 409-32.
22. Esperança-Pina, J.A. (1972) *A investigação anatomo-funcional em angiologia e as substâncias fluorescentes*. Prova Complementar de Doutoramento, FML.
23. Goyri O'Neill JV-H, G e Esperança-Pina, J.A. (1982) *Modificação à técnica de difanização-I*. In *Actas do V International Symposium On Morphological Sciences*, Rio de Janeiro.
24. Goyri O'Neill J. (1984) *Técnica de Plastinização: Sua contribuição para o ensino e investigação em Anatomia*, pp. 92-101.
25. Taylor, G.I. (1999) *Free vascularized nerve transfer in the upper extremity*. *Hand clinics*, 15:673-95, ix-x.
26. Taylor, G.I.; Bates, D. e Newgreen, D.F. (2001) *The developing neurovascular anatomy of the embryo: a technique of simultaneous evaluation using fluorescent labeling*,

- confocal microscopy, and three-dimensional reconstruction. Plastic and reconstructive surgery, 108:597-604.*
27. Bell, M.A. e Weddell, A.G. (1984) *A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve. Muscle Nerve, 7:524-34.*
 28. Bell, M.A. e Weddell, A.G. (1984) A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain: a journal of neurology, 107 (Pt 3):871-98.*
 29. Lundborg, G. (1975) Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *The Journal of bone and joint surgery American Vol. 57:938-48.*
 30. Lundborg, G. (1988) *Intraneural microcirculation. The Orthopedic clinics of North America, 19:1-12.*
 31. Lundborg, G. (1982) Ischemic tissue injury-peripheral nerves. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery Supplementum, 19:10-5.*
 32. Lundborg, G. (1979) The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *The Journal of hand surgery, 4:34-41.*
 33. Nakajima, H.; Imanishi, N.; Fukuzumi, S.; Minabe, T. e Aiso, S., et al. (1998) Accompanying arteries of the cutaneous veins and cutaneous nerves in the extremities: anatomical study and a concept of the venoadipofascial and/or neuroadipofascial pedicled fasciocutaneous flap. *Plastic and reconstructive surgery, 102:779-91.*
 34. Sunderland, S. (1945) *Blood supply of peripheral nerves; practical considerations. Arch. Neurol. Psychiatry, 54:280-2.*
 35. Adams WE. (1942) The blood supply of nerves: I. Historical review. *Journal of anatomy, 76:323-41.*
 36. el-Barrany, W.G.; Marei, A.G. e Vallee, B. (1999) Anatomic basis of vascularised nerve grafts: the blood supply of peripheral nerves. *Surgical and radiologic anatomy:SRA, 21:95-102.*

Capítulo 6

6. Reconstrução de defeito de nervo periférico com utilização de diferentes condutos e na presença de um fornecimento vascular axial; modelo animal o rato Wistar

6.1. Introdução

A reparação cirúrgica de qualquer lesão de nervo periférico obriga ao uso de técnicas de microcirurgia e de equipamento apropriado. A secção do nervo periférico, muitas vezes, resulta numa perda funcional permanente se os meios e as técnicas cirúrgicas não forem as mais convenientes.

A reparação do nervo lesionado por simples sutura das extremidades seccionadas só pode ser feita se não houver perda de tecido nervoso, ou se esta perda for de dimensões pequenas, pois a regeneração nervosa só é atingida de uma forma eficaz se a continuidade do nervo for restabelecida através de uma sutura directa sem tensão das respectivas extremidades seccionadas.

No caso de existir uma perda de substância de tecido nervoso, a reparação na clinica é geralmente feita com auto-enxerto de nervo ou através de um conduto biológico ou sintético¹. A maior limitação para o sucesso da reparação de uma lesão extensa do nervo periférico é a existência de um número restrito de opções para a reconstrução do nervo periférico, particularmente quando existe perda de substância de nervo.²⁻⁷ Além disso, os tradicionais enxertos de nervo não só são poucos, como também estão associados a morbilidade da zona dadora³⁻⁵, como o caso da perda de sensibilidade por serem nervos sensíveis ou como a existência de neuromas com sequelas dolorosas. Por isso, têm sido procuradas alternativas para o autoenxerto com vários condutos artificiais de nervo, hoje em dia, utilizadas para criar uma ponte em pequenos defeitos de nervo.⁸⁻¹⁴

Porém, inicialmente, estes condutos nervosos artificiais não são vascularizados e o seu interior depende da neoangiogenese para obter a sua própria vascularização sanguínea.¹⁵ Isto é um aspecto vital da fisiologia da reparação nervosa, porque há evidências substanciais que apoiam o facto de que a vascularização local é crucial para obter a máxima regeneração do nervo periférico, especialmente nos casos associados a lesão dos tecidos moles.¹⁶⁻²⁰ Acrescente-se ainda que o uso de um conduto artificial para a reconstrução de nervo numa ferida contaminada não é o ideal devido ao risco de infecção²⁻⁷. Nestes casos que são frequentes na prática clínica, um conduto biológico é preferível.²⁻⁷

É também importante referir que, a partir do segmento proximal da lesão nervosa, os neurónios ao iniciarem a regeneração em direcção ao segmento distal²¹ terão que migrar

através da obstrução motivada pela presença dos fascículos do auto-enxerto²². Existe, assim, uma vantagem relevante e uma justificação para o uso de um conduto de nervo em vez do auto-enxerto. É, por isso, importante encontrar um método que substitua o uso do auto-enxerto de nervo, promovendo a melhor regeneração nervosa com uma recuperação funcional muito próxima do normal, sem sequelas significativas.

Têm sido ainda usados vários materiais sintéticos como poli-D e L-lactidas^{1,21} em condutos para permitir a regeneração do nervo. Normalmente, os condutos artificiais de nervo são feitos de materiais absorvíveis^{1,21-26}, e devem ter uma taxa e um tempo de degradação que permitam que ele mantenha a sua forma e a sua permanência até a recuperação funcional ser alcançada.²¹

Existem relativamente poucos estudos sobre o uso de membrana amniótica e de veias autólogas como condutos para a reconstrução de defeitos nervosos periféricos. Tem havido alguns estudos experimentais²³ e clínicos que envolvem enxertos de veia autóloga e aloenxertos com membrana amniótica para reparar defeitos nervosos.^{25,27-31} Não obstante, estes estudos são escassos e mostram que, após o período inicial, durante o qual a recuperação é melhor com enxertos de veia ou aloenxertos de membrana amnióticas quando comparados com os auto-enxertos de nervo, a médio-longo prazo, há um resultado semelhante com todas estas opções.²⁵⁻³²

Uma explicação para estes resultados é o facto de que, inicialmente, os componentes estruturais da veia e da membrana amniótica promovem um crescimento nervoso vigoroso, mas, posteriormente, podem estar associados a uma perfusão sanguínea insuficiente do nervo em crescimento.^{12,13,23,25} Não se sabe se a presença de um suprimento vascular axial pode melhorar o resultado obtido com a opção do uso de veia autóloga ou de membrana amniótica.

Neste estudo realizado em 45 ratos Wistar, mede-se a eficácia na reparação de um defeito de 10 mm de comprimento do nervo isquiático do rato. Esta reparação foi feita com veia autóloga, com tubo de membrana amniótica humana imunoinerte e com o tradicional autoenxerto nervoso na presença de uma vascularização axial. Foi também feita a comparação entre os resultados deste estudo e os resultados obtidos por um estudo idêntico realizado por nós anteriormente, mas sem a presença de vascularização axial.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da nossa Instituição.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Obtenção e preparação dos diferentes condutos

6.2.1.1. Obtenção da veia jugular externa

Os condutos biológicos utilizados na reconstrução do defeito criado no nervo isquiático do rato Wistar foram a veia jugular externa autóloga e o tubo de membrana amniótica humana imunoinerte. A veia jugular externa foi colhida previamente à exposição do nervo isquiático, com o animal sob anestesia geral, posicionado em decúbito dorsal, com os membros dianteiros em abdução, tendo-se o cuidado de não ficarem em abdução extrema para que não se provoque depressão respiratória.

A anti-sepsia cutânea foi realizada com uma solução de álcool iodado a 20 %, tendo-se em atenção o volume usado para prevenir a hipotermia. Foram respeitadas as normas da assepsia cirúrgica e da prevenção da infecção.

A abordagem da veia jugular externa foi feita através de uma incisão cutânea longitudinal no lado externo do pescoço do animal mantido em extensão. Foram feitas laqueações proximal e distal distanciadas entre si, por forma a permitir a remoção de 12 mm da veia para a reparação do defeito de 10 mm que iria ser criado no nervo isquiático do animal. A veia foi mantida em soro fisiológico até ser utilizada. Justifica-se a dimensão de 12 mm de veia para o enxerto de nervo para garantir a realização das suturas ao nervo sem tensão. Depois de verificada a hemóstase, foi encerrada a ferida cutânea com *Nylon 4/0*.

Seguiu-se, então, a abordagem do nervo isquiático em que o animal foi colocado em decúbito ventral com os 4 membros em abdução, tendo-se também o cuidado de os membros dianteiros não ficarem em abdução extrema, para que não se provocasse depressão respiratória. A exposição do nervo isquiático foi feita através de uma incisão cutânea na parte externa da coxa e do afastamento dos músculos glúteos.

6.2.1.2. Elaboração de tubo de Membrana Amniótica Humana Imunoinerte

A membrana amniótica humana imunoinerte que usámos neste estudo e nos estudos realizados anteriormente²³ está descrita no Capítulo 1. Assim, a membrana amniótica imunoinerte, em doses individuais com 2 cm de largura e de comprimento, foi transportada do Centro de Histocompatibilidade para o Biotério em condições que garantissem a sua criopreservação e, em seguida, foi feita a sua conservação na Câmara existente no Biotério da FCML a -80 °C, até ao dia da sua utilização.

Para a utilização da membrana, esta foi retirada da Câmara a -80 °C no início da cirurgia, e colocada em soro fisiológico à temperatura ambiente para se obter a sua

descongelamento. Os tubos ou condutos de MAH foram constituídos com um diâmetro e um comprimento que garantissem a reconstrução do defeito criado no nervo na sua totalidade, sem constrição dos topos do nervo, nem suturas que causassem tensão entre o topo proximal e o distal (Figura 6.1, Figura 6.2).

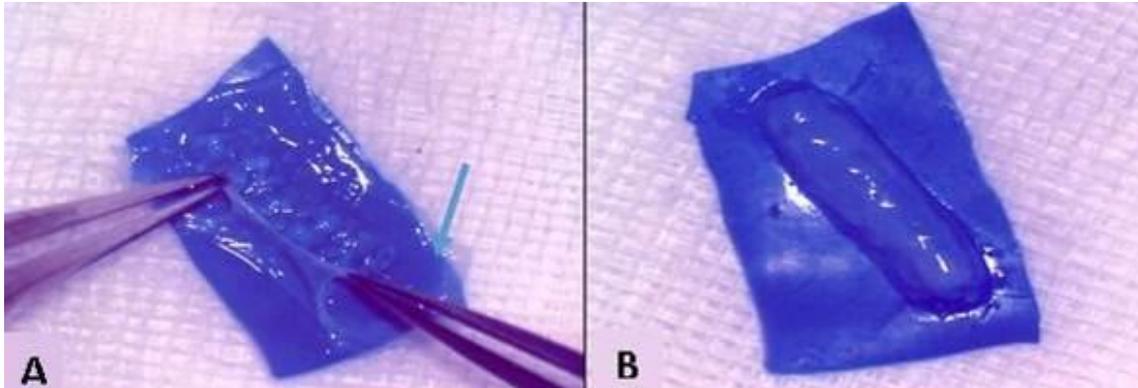


Figura 6.1. - A - Membrana amniótica humana; B - Tubo de Membrana amniótica humana.



Figura 6.2. - C - Tubo de membrana amniótica humana interposto entre as extremidades do nervo isquiático (ampliação 16 x).

6.3. Procedimentos Cirúrgicos para a Reconstrução do Defeito Nervoso

6.3.1. Considerações gerais

O modelo animal mais adoptado pelos investigadores no nervo periférico é o nervo isquiático do rato Wistar para o estudo das funções motora e sensitiva e da regeneração nervosa. Também optámos por este modelo animal pelas semelhanças anatómo-fisiopatológicas existentes entre o nervo isquiático do rato Wistar e o nervo mediano humano, particularmente da sua vascularização³³, considerando-se que, mesmo em microscopia

electrónica de varrimento para moldes vasculares, a morfologia entre os dois nervos é indistinguível. Esta semelhança entre os dois nervos suporta o uso do nervo isquiático do rato Wistar como material de experimentação animal para o nervo mediano humano.³³

No estudo actual e no anterior, o animal de experimentação utilizado foi o Rato Wistar, proveniente do Biotério da FCM-UNL com alvará emitido pela DGV, de onde consta a autorização de utilização de animais, pequenos roedores, ao abrigo do disposto na Portaria 1005/92 de 23 de Outubro. Todos os procedimentos praticados nos animais, inclusive a eutanásia, regem-se pelas normas já descritas no Capítulo 2, no que diz respeito às Considerações Éticas e de Bem-estar do Animal.

Todas as intervenções executadas no animal de experimentação foram realizadas exclusivamente pela investigadora principal para que não existissem desvios de ordem individual.

6.3.2. Princípios Básicos Cirúrgicos no Animal de Experimentação

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ratos adultos da linhagem Wistar, com um peso médio de 200-300 gramas, obtidos no Biotério da FCM-UN. Qualquer procedimento que provocasse dor ou sofrimento ao animal foi realizado sob anestesia geral através de uma injeção intra-peritoneal de quetamina/xilazina nas doses 90 mg/Kg e de 10 mg/Kg, respectivamente ou, na falta da xilazina, recorreu-se ao *diasepan* nas mesmas proporções.³⁴ Nunca foram usados barbitúricos durante a cirurgia ou no pós-operatório, nem durante a própria cirurgia para colheita das biópsias, pois poderiam levar ao desenvolvimento de vasodilatação afectando os exames histológicos.

A cirurgia realizou-se com o animal posicionado em decúbito ventral com os membros dianteiros e traseiros em abdução. Foram respeitadas todas as normas da assepsia cirúrgica e a anti-sepsia cutânea foi realizada com uma solução de álcool iodado a 20 %.

A exposição do nervo isquiático direito obteve-se através de uma incisão cutânea transversal na parte externa da coxa, seguida da separação das fibras musculares do músculo bicepde femoral, de modo que se pudesse expor o nervo isquiático, permitindo a realização das diversas técnicas cirúrgicas propostas neste estudo e já publicadas por nós²⁸.

Terminados os estudos funcionais da regeneração nervosa, foram feitas as colheitas dos nervos isquiáticos intervencionados e dos respectivos nervos isquiáticos contra laterais para a biopsia para os estudos estruturais e morfométricos das peças cirúrgicas.

É importante realçar que as colheitas dos nervos isquiáticos são feitas sob anestesia geral, idêntica à usada para as cirurgias, e não com o animal eutanasiado previamente, pois o nervo é muito sensível à isquemia, iniciando-se muito precocemente alterações histológicas do nervo. Após estes procedimentos cirúrgicos foi realizada a eutanásia através de *overdose* por anestesia geral ou na câmara de CO₂ de eutanásia do Biotério da FCM-UN dentro do seu horário de funcionamento.

6.3.3. Procedimentos Cirúrgicos

Sob condições assépticas, em 45 ratos Wistar do sexo feminino, com um peso entre 200-300 gramas, foi excisado um segmento de 7 mm de nervo isquiático dt., preservando-se o plexo vascular epineural (Figura 6.3) e obtendo-se, assim, após a retração dos topos do nervo seccionado, uma solução de continuidade do nervo de 10 mm.

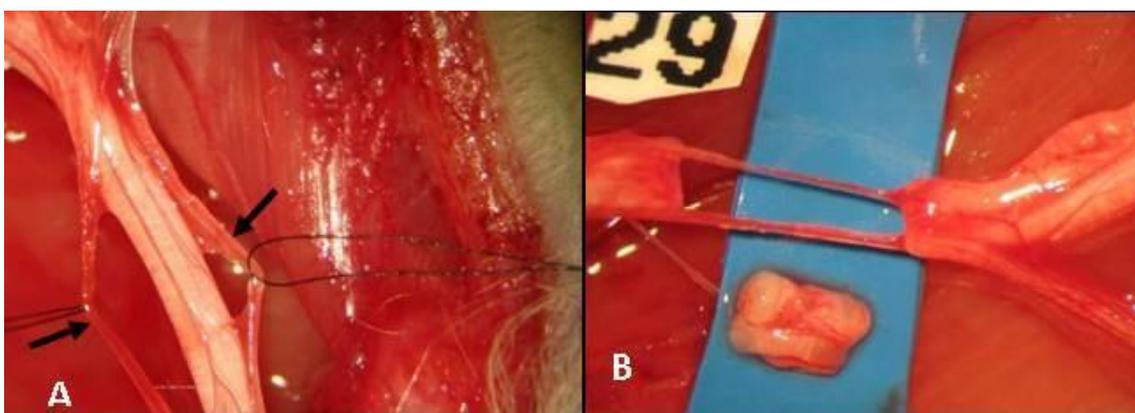


Figura 6.3 A - Plexo vascular epineural (setas); B - Excisão de 7 mm de nervo isquiático com preservação do plexo epineural (ampliação 25 x).

Os ratos foram, então, aleatoriamente submetidos à reconstrução do defeito nervoso com um dos seguintes procedimentos: auto-enxerto do segmento excisado (Grupo A, n = 15); enxerto autólogo de veia jugular externa (Grupo B, n = 15); conduto produzido com membrana amniótica humana imunoinerte (Grupo C, n = 15).

No Grupo A (n = 15), o defeito nervoso de 10 mm, criado por uma excisão de 7 mm de nervo e com o plexo vascular epineural do sistema vascular extrínseco preservado, foi reparado com autoenxerto do fragmento de nervo excisado (Figura 6.4). A neurorrafia foi feita com pontos separados de *Nylon* 10/0, realizando-se uma anastomose epineural²⁸, segundo o esquema que se apresenta na Figura 6.5.

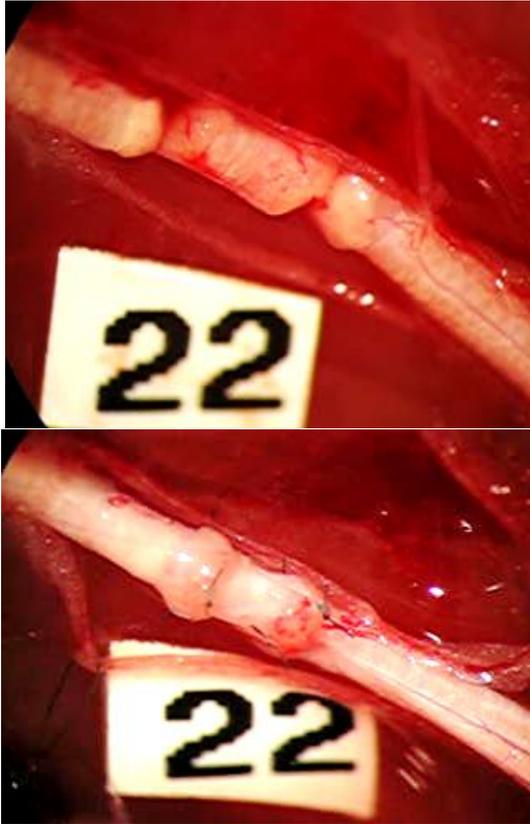


Figura 6.4 - Exemplo de auto-enxerto de nervo com plexo epineural preservado; anastomose epineural com pontos separados de *Nylon 10/0* (ampliação 25 x).

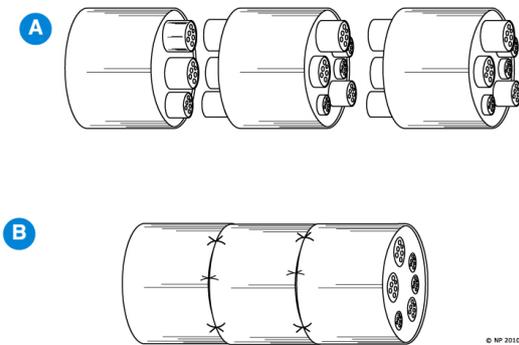


Figura 6.5 - Representação esquemática de enxerto autólogo de nervo com anastomoses epineurais.

No Grupo B (n = 15), o defeito nervoso foi reparado com uma ponte de enxerto de veia jugular externa autóloga do rato Wistar. Procedeu-se, também, à excisão de 7 mm de nervo com a preservação do plexo epineural, e realizou-se a anastomose epineural com pontos separados de *Nylon 10/0*, com a introdução prévia de cerca de 2 mm dos topos do nervo dentro da veia, considerando-se, assim, a veia como o conduto orientador da regeneração nervosa (Figura 6.6).

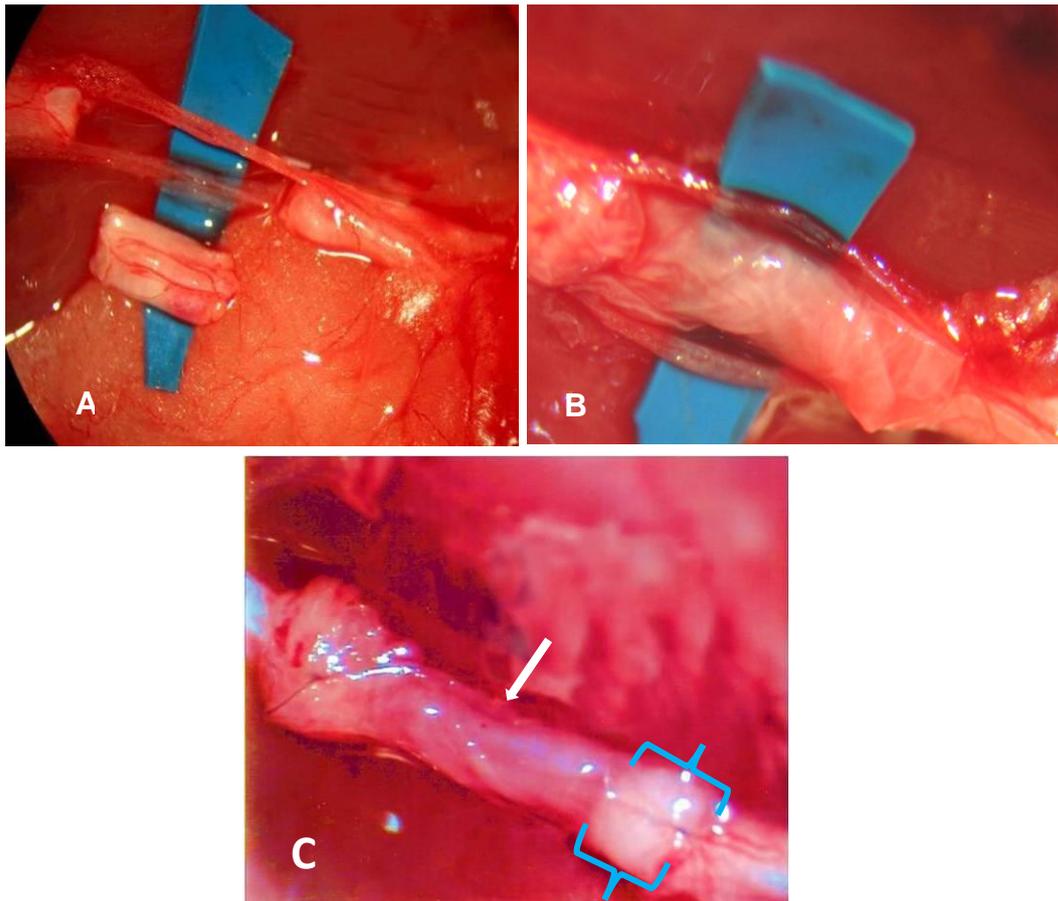


Figura 6.6 - Exemplo de enxerto de veia jugular externa autóloga do rato Wistar: A - Excisão de 7 mm de nervo com preservação do plexo epineural (ampliação 16 x); B - Mostra o conduto de veia para realizar o enxerto (ampliação 16 x); C - Anastomose da veia ao nervo para preenchimento do defeito criado (ampliação 16 x); D - pormenor da anastomose epineural com introdução, cerca de 2 mm, do topo (1) do nervo dentro da veia (ampliação 25 x).

No Grupo C (n = 15) o defeito nervoso foi reconstruído com um tubo de membrana amniótica humana imunoinerte. Procedeu-se, também, à excisão de 7 mm de nervo com a preservação do plexo epineural, e realizou-se, do mesmo modo, a anastomose epineural com pontos separados de *Nylon* 10/0 e com a introdução prévia de 2 mm dos topos de secção do nervo dentro do conduto de MAH, tornando este conduto também orientador da regeneração nervosa (Figura 6.7).

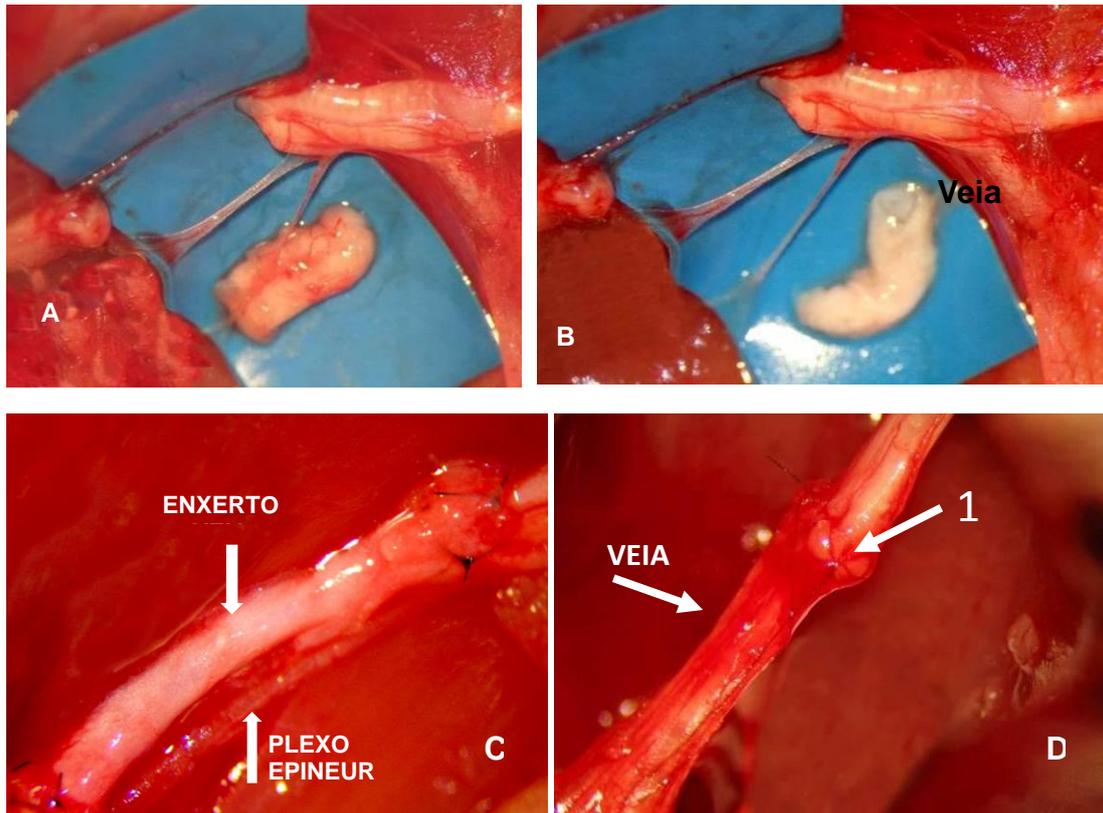


Figura 6.7 - Exemplo de reconstrução com conduto de membrana amniótica humana. A - excisão de 7 mm de nervo mantendo o plexo epineural íntegro (ampliação 25 x); B - conduto de MAH interposto entre os topos do nervo (ampliação 25 x); C - pormenor que mostra a presença de cerca de 2 mm de nervo (chavetas) dentro do conduto de MAH e anastomose epineural (ampliação 40 x).

Os animais foram todos operados com o uso de um microscópio cirúrgico estereotaxico binocular (*Leica M 651*) e com material cirúrgico específico para microcirurgia. Os ratos foram inspeccionados diariamente em relação a sinais de infecção, níveis de actividade do animal, limpeza e sinais de auto-mutilação.³⁴ O peso dos ratos foi avaliado semanalmente.

6.4. Avaliação da Regeneração Nervosa

Todos os animais, às 4, 8 e 12 semanas, foram avaliados funcionalmente e estruturalmente. O estudo funcional foi realizado através da análise do traçado da marcha, pela electroneurografia e pela análise da força de flexão ao nível do tornozelo às 4, 8 e 12 semanas. O estudo estrutural das peças operatórias foi também realizado em cada grupo, às 4, 8 e 12 semanas e logo depois do estudo funcional.

A colheita das peças operatórias e do nervo isquiático de controlo foi realizada com o animal sob anestesia geral, como já referido previamente. Estruturalmente, foram, então, feitas avaliações morfológicas e morfométricas do nervo isquiático proximamente e distalmente à lesão e na zona de reconstrução. Foi também concretizada a avaliação do peso dos músculos gêmeos e solhear e foi feita a avaliação da recuperação das vias sensitivas com marcadores axonais retrógrados de fluorescência através do uso de *True Blue*.

Além disso, em cada grupo, às 12 semanas, um rato foi submetido a uma injeção na aorta abdominal de uma solução de *Mercox* para se obterem os moldes vasculares de corrosão da região do nervo reconstruído, que foram observados com uma lupa binocular e, finalmente, com um microscópio electrónico de varrimento (*JEOL JSM-5410*), com uma voltagem de aceleração de 1.2-30kV, de acordo com os protocolos correntemente adoptados pelos autores da Instituição.³⁵⁻³⁹

6.4.1. Avaliação Funcional

6.4.1.1. Análise do Traçado da Marcha e Cálculo do SFI

Todos os animais foram submetidos à validação do índice de funcionalidade do isquiático ou *sciatic functionality index* (SFI), antes da cirurgia, às 4 semanas e no final da experiência.^{10,11,40} Os animais foram colocados numa extremidade de um corredor de madeira com 42 cm de comprimento e 8,2 cm de largura, interligado a uma caixa negra fechada no final do corredor para atrair o rato para o escuro. Os animais foram treinados a caminhar no corredor. No chão do corredor foi colocado um papel milimétrico sobre o qual o animal caminhou para a obtenção da impressão das pegadas das patas posteriores pintadas com azul-de-metileno a 2.5 %, diluído em H₂O (Figura 6.8).



Figura 6.8 - Fotografia do corredor de madeira onde se pode ver a impressão das pegadas.

As medidas analisadas foram obtidas pela impressão das duas patas posteriores, considerando a pata direita como a experimental, designada (E), e a pata esquerda a de controlo, ou seja, a do lado do isquiático não-operado, designada (N).

A distância entre os 1.º e 5.º dedos é designada (TS), *toe spread* = Largura da Pegada.

A distância entre o 2.º e 4.º dedos é designada (ITS), *intermediate toe spread* = Largura Intermédia da Pegada, e (PL), *the print length* = Comprimento da Impressão da Pegada ^{11,40} (Figura 6.9).

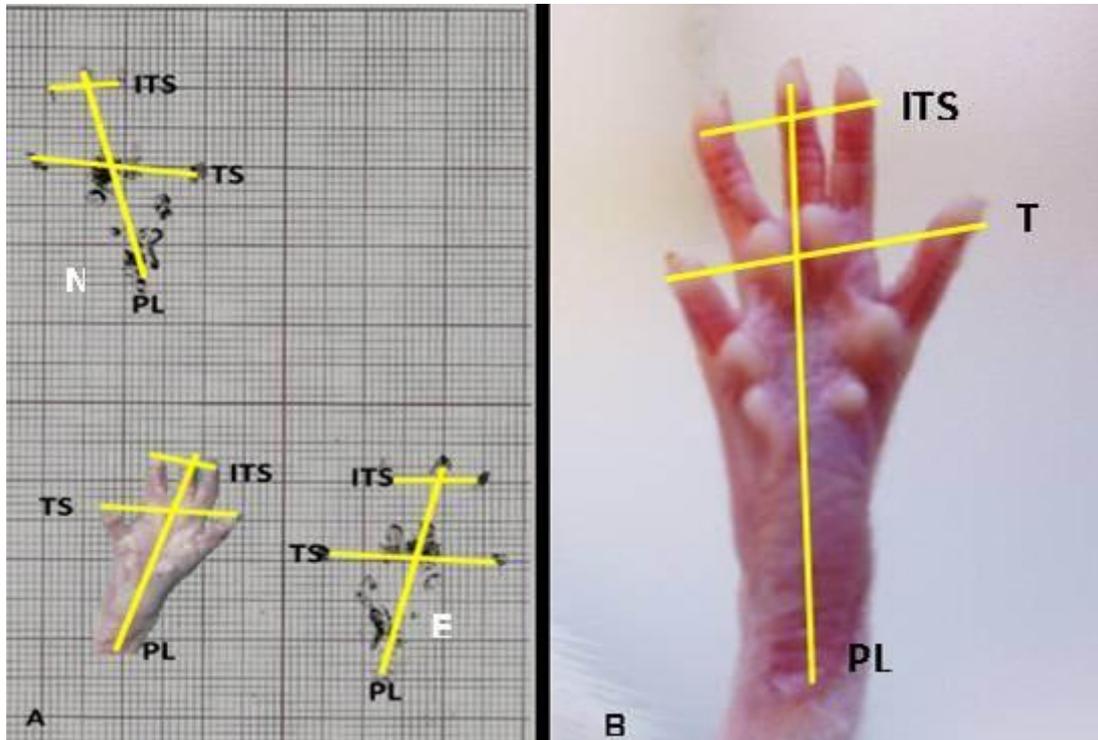


Figura 6.9 A - Exemplo da impressão das patas do nervo isquiático normal (N) e do nervo isquiático experimental (E); B - Fotografia da parte plantar da pata normal: representação anatômica dos parâmetros para a obtenção do índice de funcionalidade do isquiático - *sciatic functionality index* (SFI).

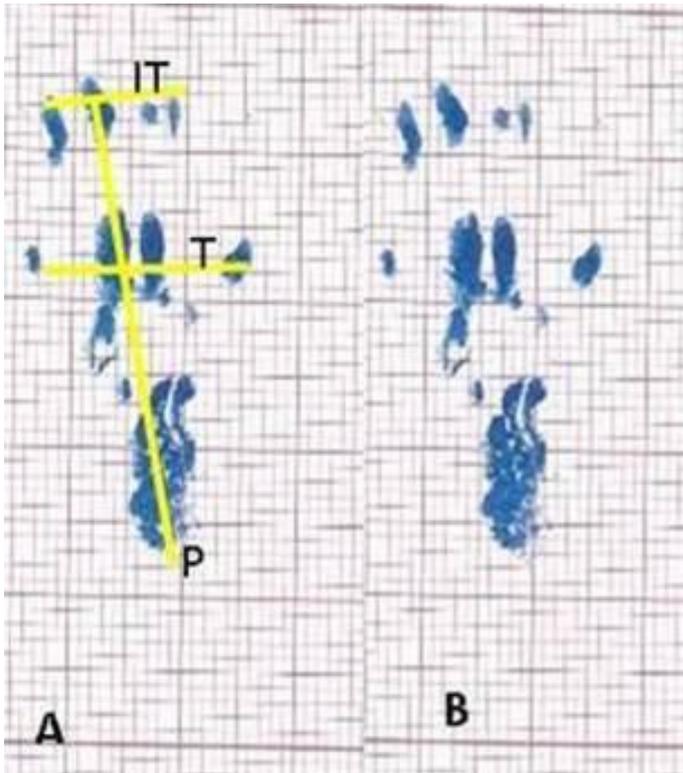


Figura 6.10 - A Representação prática dos parâmetros numa pegada normal; B - A mesma pegada normal sem a marcação dos parâmetros.

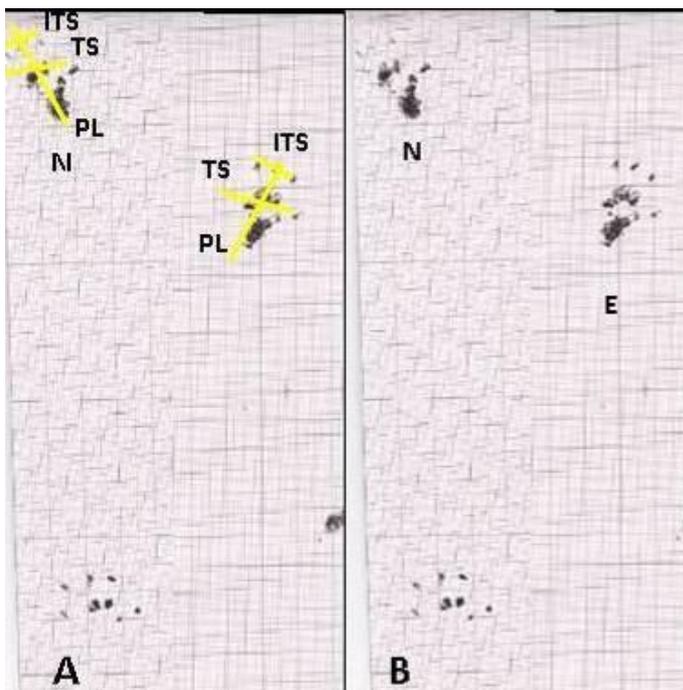


Figura 6.11 - A - Exemplo de representação dos parâmetros nas pegadas em marcha para o cálculo do SFI às 12 semanas num animal do Grupo A; N - pata normal; E - pata experimental resultante de enxerto de nervo autólogo com preservação da plexo epineural; B - O mesmo registo da impressão das pegadas em marcha sem a representação dos parâmetros.

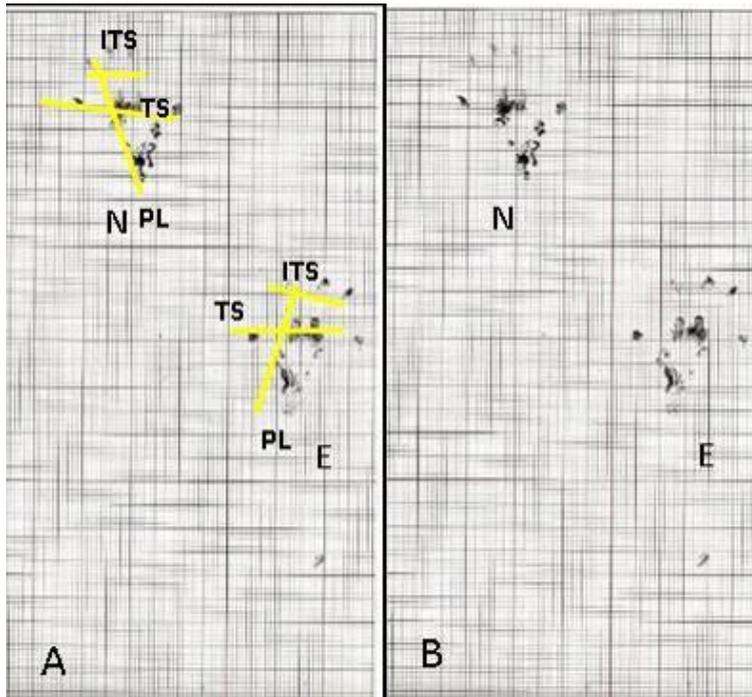


Figura 6.12 A - Exemplo de representação dos parâmetros nas pegadas em marcha para o cálculo do SFI às 12 semanas num animal do Grupo B; N - pata normal; E - pata experimental resultante de enxerto de veia autóloga com preservação da plexo epineural; B - O mesmo registo da impressão das pegadas em marcha sem a representação dos parâmetros.

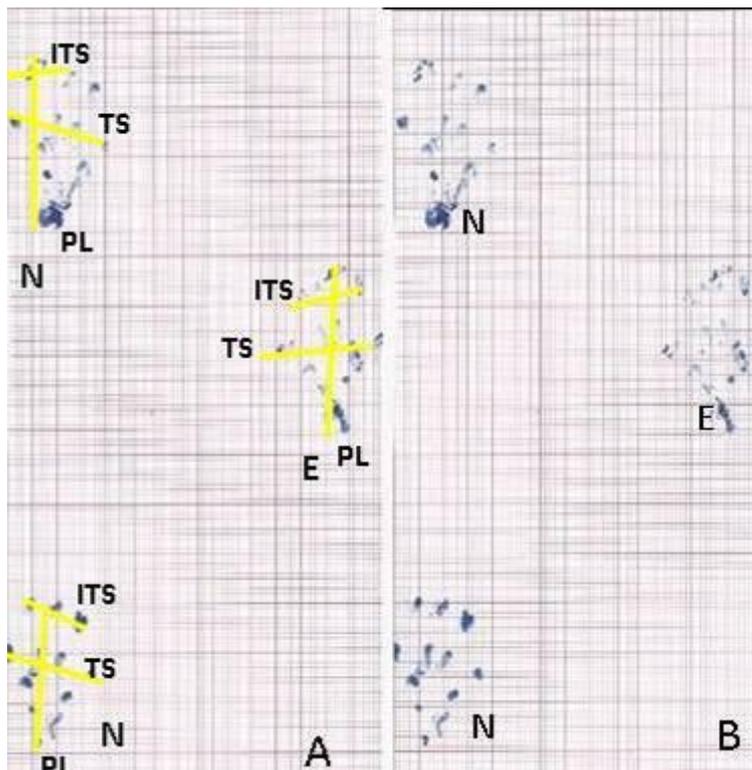


Figura 6.13 - A - Exemplo de representação dos parâmetros nas pegadas em marcha para o cálculo do SFI às 12 semanas num animal do Grupo C; N - pata normal; E - pata experimental resultante de enxerto de MAH com preservação do plexo epineural; B - O mesmo registo da impressão das pegadas em marcha sem a representação dos parâmetros.

Para determinar o SFI foi utilizada a seguinte fórmula de Bain *et al.*^{40, 41}: $SFI = -38,3$. Com esta fórmula estima-se que um valor de SFI próximo de 100 representa uma deficiência total dos membros posteriores, enquanto um score de 0 indica a recuperação total do nervo isquiático.^{11,40,41}

6.4.1.2. Medição da Velocidade de Condução Nervosa Motora (*Motor Nerve Conduction Velocity*) - MNCV

Sob anestesia geral e com a visualização directa do nervo isquiático, foi medida a velocidade de condução nervosa motora (MNCV) nos dois membros com o equipamento *Neuromatic 2000 M/C Neuromyograph*, tal como descrito por Varejão.¹¹

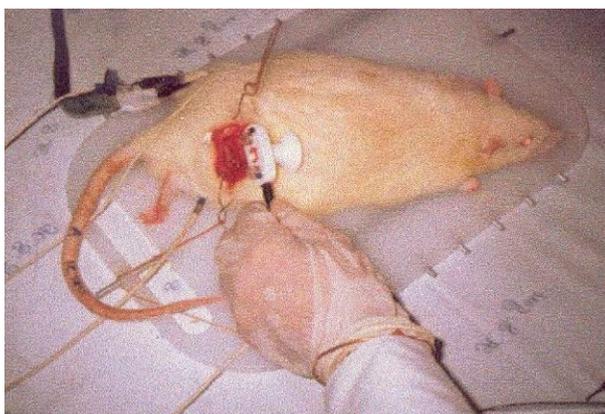


Figura 6.14 - Fotografia do rato em posição exemplificativa para a obtenção da MNCV.

Depois de determinada a MNCV, e com o animal ainda sob anestesia geral, foi avaliada a força de flexão dos membros posteriores.

6.4.1.3. Avaliação da Força de Flexão

A força de flexão foi avaliada nos dois lados pela estimulação directa do nervo com um neuro-estimulador *Plexival Medival*. Este aparelho está padronizado para ter uma corrente eléctrica de intensidade de 4.0 miliampère, com frequência de 4 hertz, para uma duração de 50 microsegundos. A pata é mantida em posição de descanso e fixada ao dinamómetro transdutor (*Sauter FH-5*) com uma linha de sutura paralela à mesa. As leituras foram avaliadas para 30 segundos e obteve-se um valor médio destas leituras.

6.4.1.4. Pesagem dos músculos gêmeos e solhear

Adicionalmente, em todos os animais, o peso dos músculos gêmeos e solhear do lado parético (Dt.) e contra-lateral (Esq.) foram comparados, dividindo-se aqueles valores e multiplicando-se os mesmos por 100 % (para a percentagem de recuperação dos músculos gêmeo e solhear) (Figura 6.15).



Figura 6.15 - Fotografia de exemplo do grupo de músculos gêmeos e solhear. As fotografias são referentes a um rato do Grupo A (enxerto autólogo de nervo às 12 semanas) A - Músculos do lado esq. não-operado; B - Músculos do lado dt. operado com uma recuperação do peso de 72/73 % em relação ao peso do lado de controlo - esquerdo.

6.4.2. Avaliação estrutural

6.4.2.1. Análise Morfológica e Morfométrica

Imediatamente depois da avaliação funcional ter sido feita e com os animais sob anestesia geral, os nervos isquiáticos foram dissecados com o uso de um microscópio cirúrgico estériotáxico binocular (*Leica M651*) e foram realizados registos fotográficos da regeneração do nervo isquiático de todos os nervos. Verificou-se a existência de continuidade em todos os nervos com um diâmetro da zona de regeneração coincidente ou muito próxima do normal e uma intensa neovascularização epineural.

A figura 6.16 exemplifica uma regeneração nervosa pós-reconstrução com um enxerto de nervo autólogo, onde pode observar-se uma intensa neovascularização epineural na zona de regeneração de nervo, assinalada com o número 2.

Da mesma forma, na figura 6.17, a qual exemplifica uma regeneração através de enxerto de veia jugular autóloga, pode também verificar-se a continuidade do nervo entre os pontos de sutura assinalados com setas e são também visíveis os neovasos epineurais.

O exemplo de neoregeneração nervosa através de conduto de membrana amniótica imunoinerte (MAH) pode observar-se nas figuras 6.18 A e 6.18 B, com destaque para a presença da intensa neovascularização epineural e do diâmetro da zona de regeneração semelhante ao normal, bem como a parte distal do nervo assinalada com o número 3 na Figura 6.18 A e com o número 2 na Figura 6.18 B.

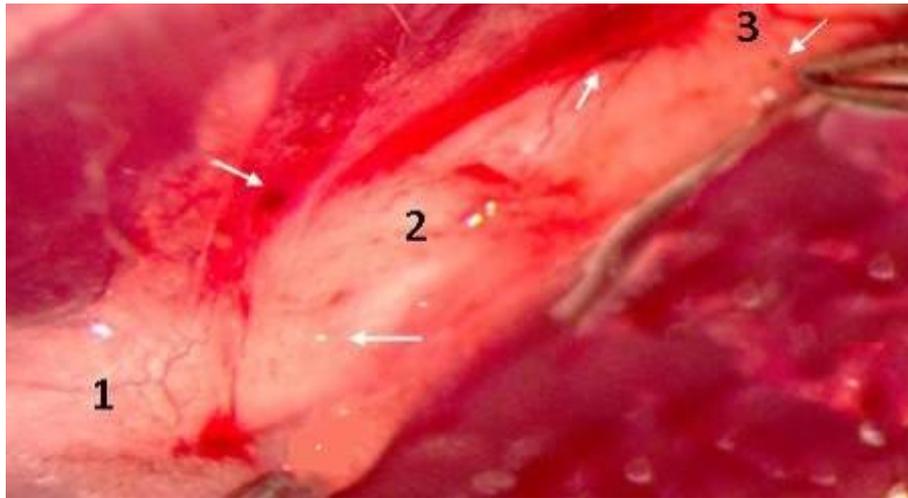


Figura 6.16 - Fotografia de regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto autólogo de nervo com a vascularização extrínseca preservada (Grupo A), (ampliação 25 x). 1 - Extremidade proximal do nervo; 2 - Regeneração nervosa (entre 1 e 3); 3 - Extremidade distal do nervo regenerado. As setas assinalam os pontos da sutura de Nylon 10/0.

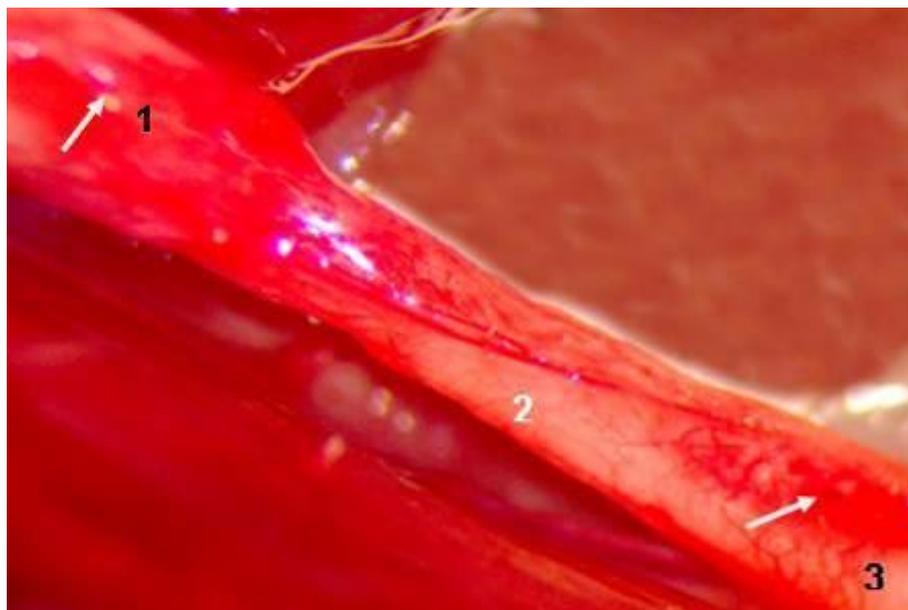


Figura 6.17 - Fotografia de regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto veia jugular autóloga (Grupo B), com a vascularização extrínseca preservada (ampliação 25 x). 1 - Extremidade proximal do nervo; 2 - Regeneração nervosa; 3 - Extremidade distal do nervo regenerado (ampliação 25 x). As setas assinalam os pontos da sutura de neurorafia com Nylon 10/0.

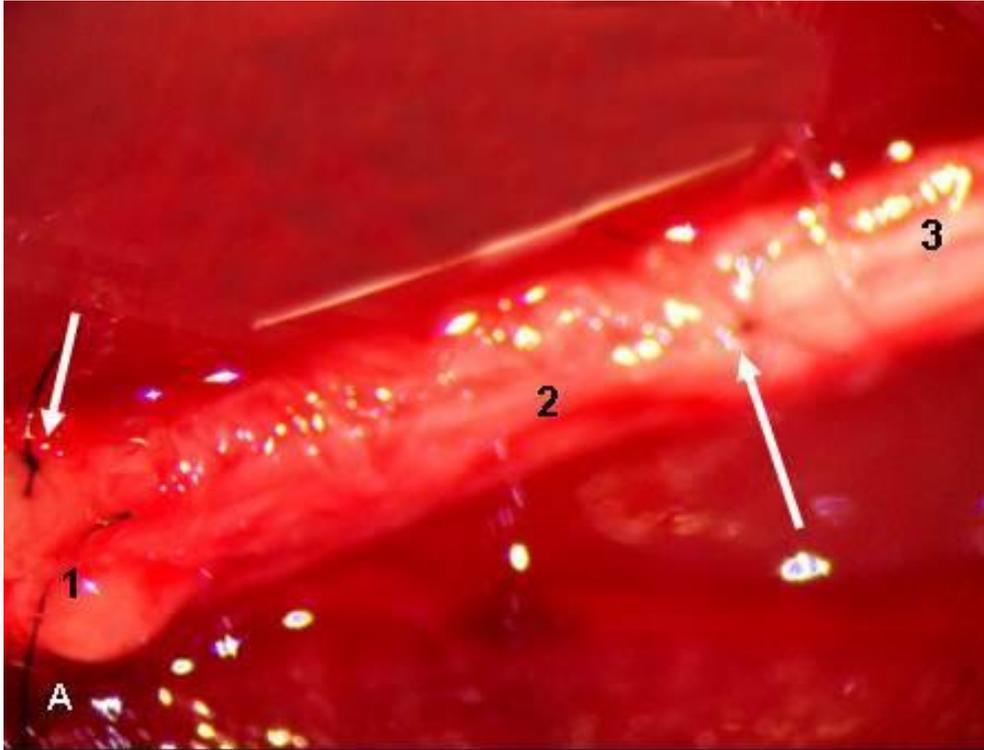


Figura 6.18 A - Fotografia da regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto com MAH com vascularização extrínseca preservada (Grupo C) (ampliação 25 x). 1 - Extremidade proximal do nervo; 2 - Regeneração nervosa; 3 - Extremidade distal do nervo regenerado. As setas assinalam os pontos da sutura com Nylon 10/0.

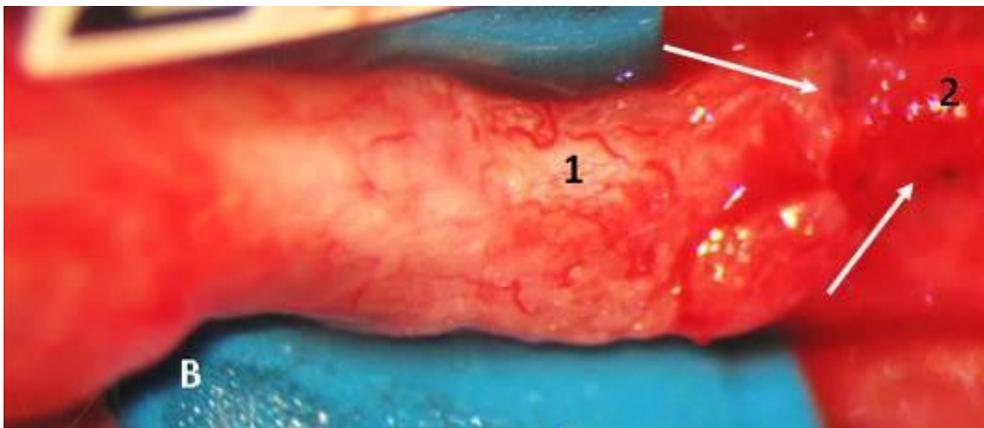


Figura 6.18 B - Pormenor da Figura 6.17 - Fotografia da regeneração nervosa às 12 semanas de enxerto com MAH com vascularização extrínseca preservada (Grupo C), (ampliação 40 x). 1 - Regeneração nervosa, 2 - Extremidade distal do nervo regenerado. As setas destacam os pontos da sutura.

Mantendo o animal sob anestesia geral, foram removidos os nervos isquiáticos com a extremidade proximal marcada através de um fio de sutura para que fossem identificados os cortes histológicos da extremidade proximal do nervo, da área de enxerto e da extremidade distal do nervo. Os nervos, imediatamente depois de removidos, foram fixados em formaldeído a 10 % e preparados para o exame histológico.

Foram ainda corados com hematoxilina-eosina, com Tricrômico de Masson para o tecido conjuntivo, com imunohistoquímica para os neurofilamentos, com anticorpos anti-Acetilcolinesterase para a marcação de fibras mielínicas e com anticorpos anti-Periferina para a marcação de axônios amielínicos. Adicionalmente, as secções de nervos são marcadas com imunocorante CD-31 para realçar o endotélio dos vasos.

Estes procedimentos para a realização das análises morfológica e morfométrica foram também aplicados aos nervos do estudo realizado anteriormente: Grupo D, Grupo E e Grupo F. Nos Grupos C e F, onde foi utilizado o conduto de membrana amniótica humana (MAH) imunoinerte, os nervos de cada subgrupo (às 4, 8,12 semanas), foram corados com anticorpos para colagénio-1 ant-humano e colagénio-1 ant-rato (Figura 6.19. A e B, respectivamente) para destacar a persistência do tubo de membrana amniótica humana. Com a coloração de hematoxilina-eosina evidenciou-se, por outro lado, a MAH (Figura 6.20).

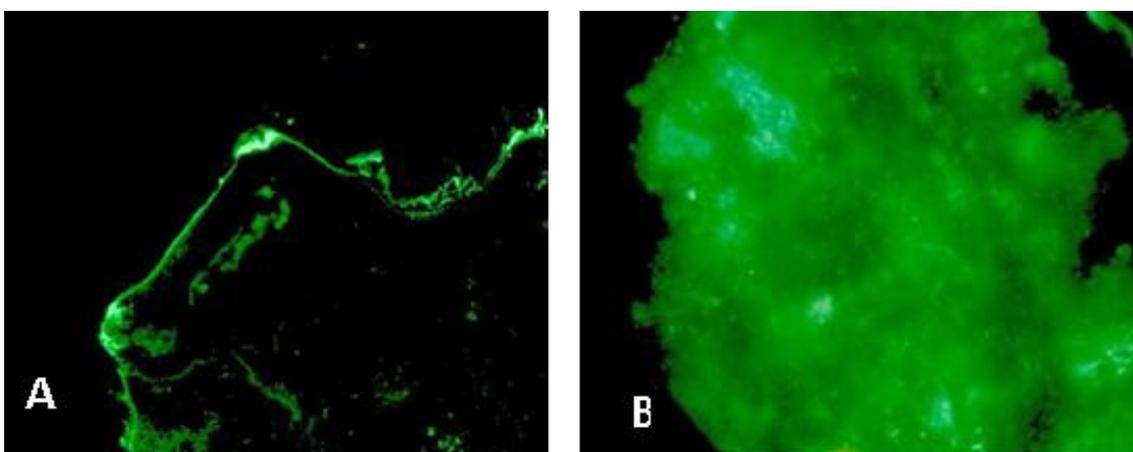


Figura 6.19 - A - colagénio-1 ant-humano; B - colagénio-1 ant-rato.

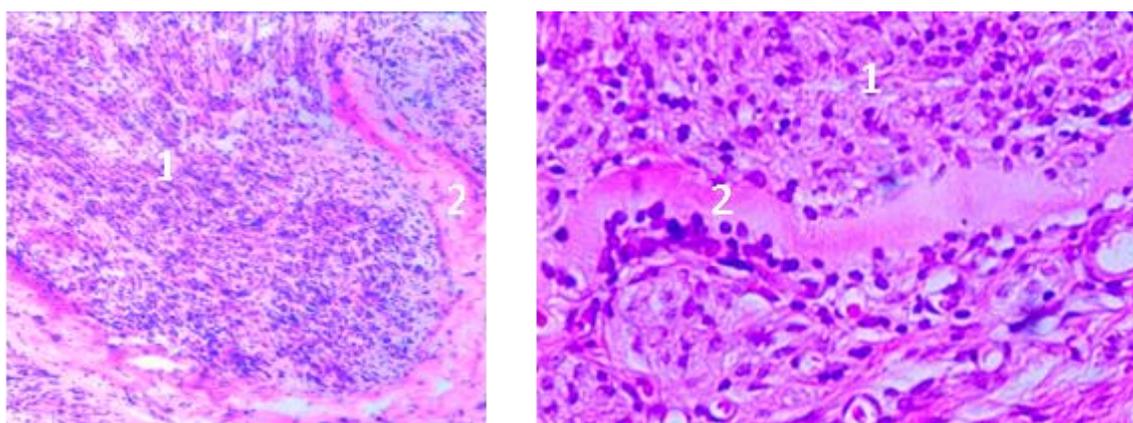


Figura 6.20 - Fotografia de coloração com hematoxilina-eosina a expor a presença da MAH.
1 - Neurofilamentos; 2 - MAH (membrana amniótica humana imunoinerte).

As preparações histológicas de todos os grupos, foram observadas e fotografadas num microscópio óptico digital (*Leica DMLB2*) (Figura 6.21 a Figura 6.30). Foram ainda determinados, nas áreas de secção, a densidade de neurofilamentos, o número total de fibras mielínicas e o total de fibras amielínicas. Para a contagem dos neurofilamentos e das fibras foi utilizado o programa *ImageJ*, e para evitar “o efeito de margem” foi aplicado o método do dissector bidimensional.^{11,42,43}

Todos estes procedimentos das análises morfológica e morfométrica foram também realizados nos nervos dos três grupos do estudo realizado anteriormente, nos quais não foi preservada a vascularização extrínseca epineural.

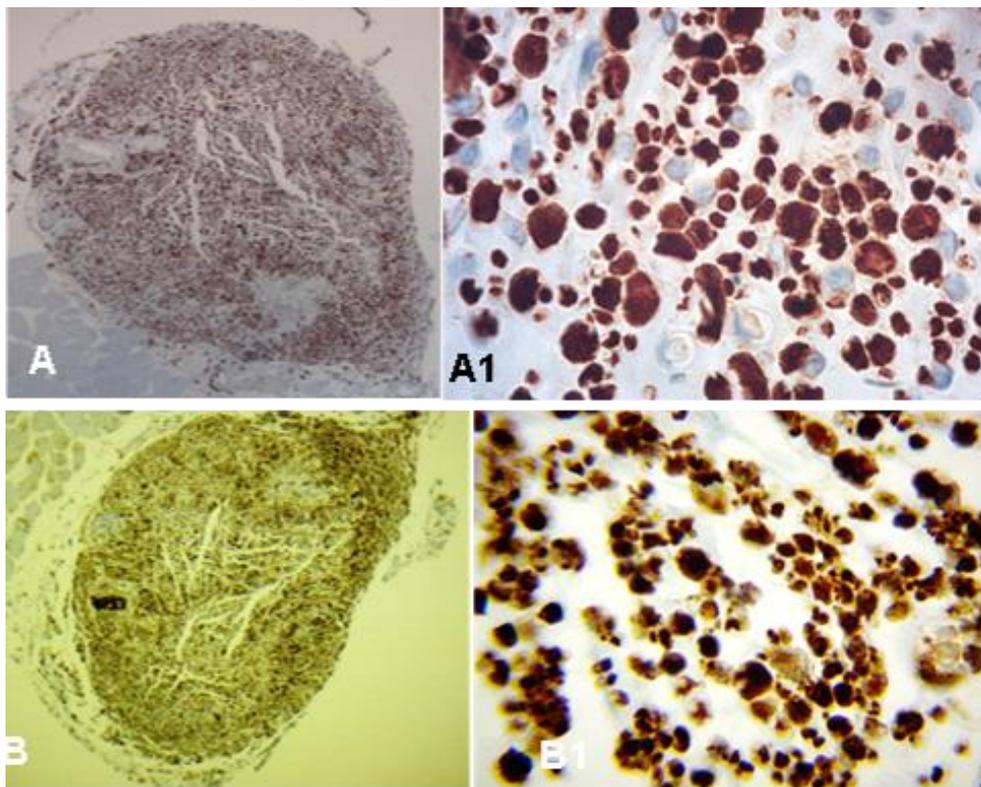


Figura 6.21 - Fotografias de histologias do Grupo A; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo autólogo, na presença de vascularização epineural extrínseca. A e A1 - Neurofilamentos (ampliação 10 x e ampliação 100 x); B e B1 - Fibras amielínicas (ampliação 10 x e ampliação 100 x).

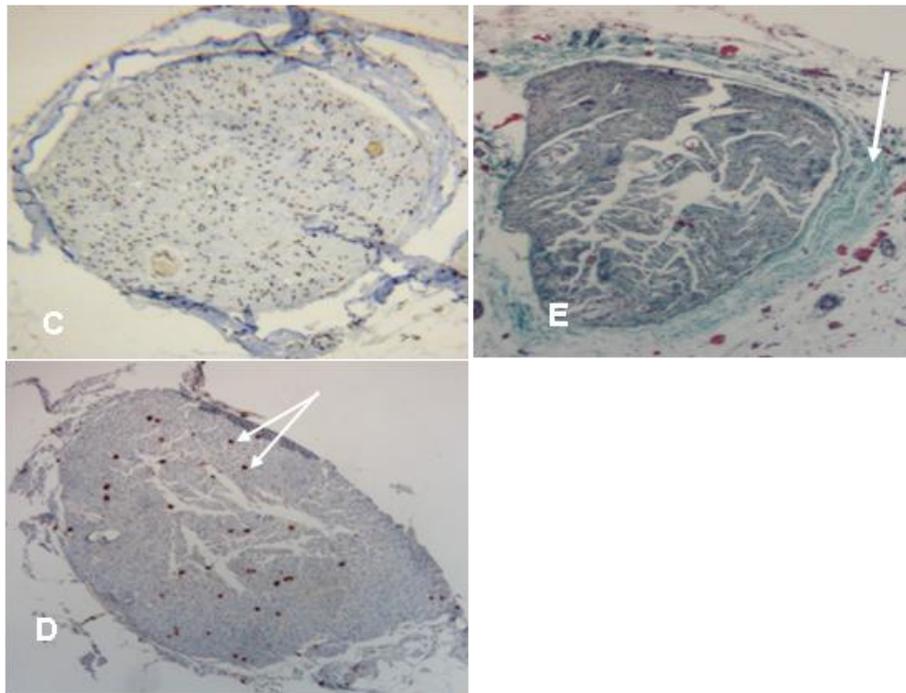


Figura 6.22 - Fotografias de histologias do Grupo A; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo autólogo na presença da vascularização epineural extrínseca. C - Fibras mielínicas (ampliação 10 x e ampliação 100 x), D - Coloração com CD-31 (ampliação 10 x) para a marcação dos vasos (setas). E - Coloração com Tricrômico de Masson (ampliação 10 x) assinalando o perinervo (seta).

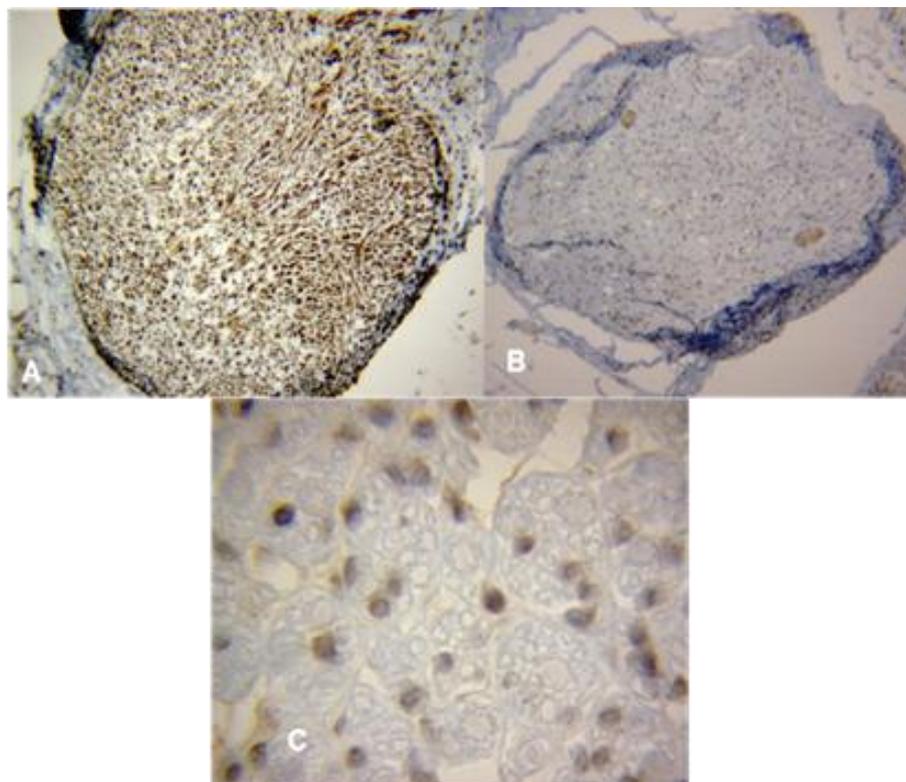


Figura 6.23 - Fotografias de histologias do Grupo B; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de veia autóloga na presença da vascularização epineural extrínseca. A - neurofilamentos, B, C - fibras mielínicas (ampliação 10 x e ampliação 100 x).

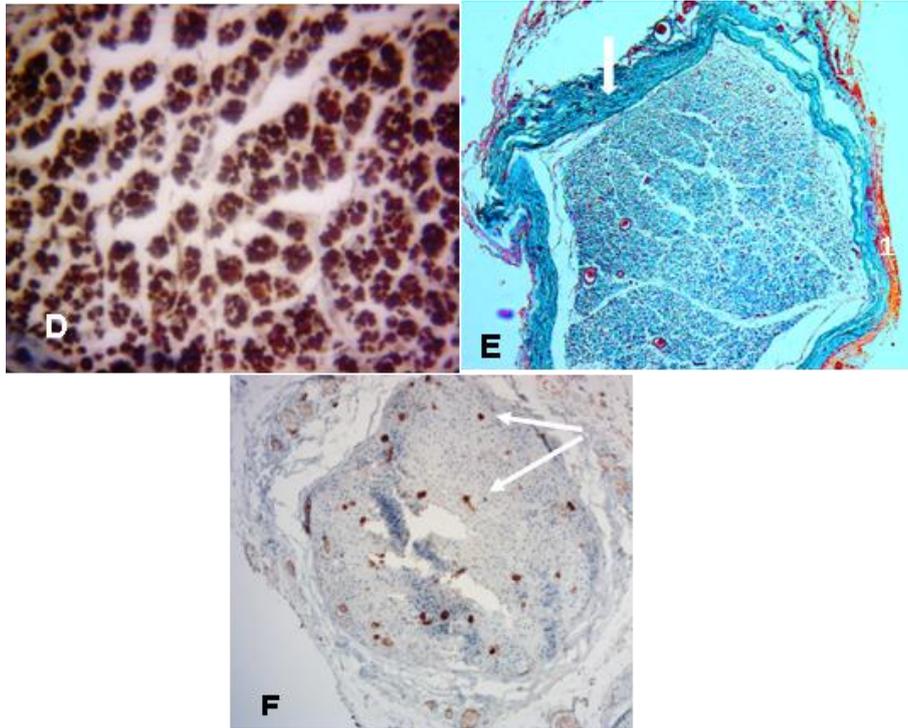


Figura 6.24 - Fotografias de histologias do Grupo B; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de veia autóloga na presença da vascularização epineural extrínseca. D - Fibras amielínicas (ampliação 100 x), E - Coloração com Tricrômico de Masson (ampliação 10 x) assinalando o perinervo (seta), F - coloração com CD-31 (ampliação 100 x) para a marcação dos vasos (setas).

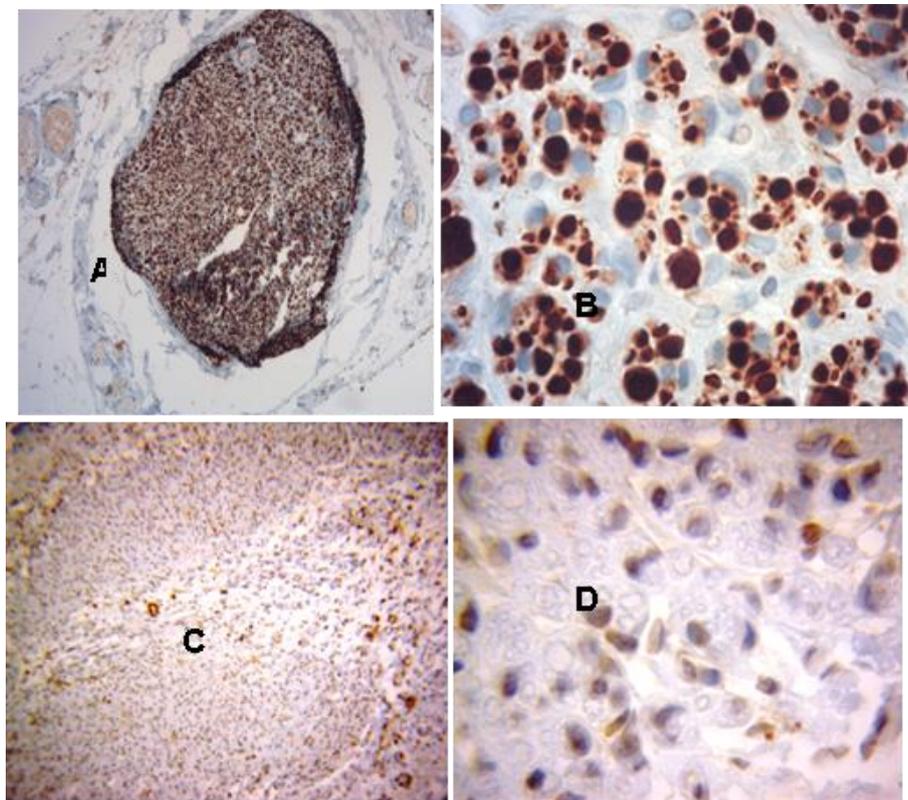


Figura 6.25 - Fotografias de histologias do Grupo C; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de MAH, na presença de vascularização epineural extrínseca. A e B - Neurofilamentos (ampliação 10 x e ampliação 100 x), C e D - Fibras mielínicas (ampliação 10 x e ampliação 100 x).

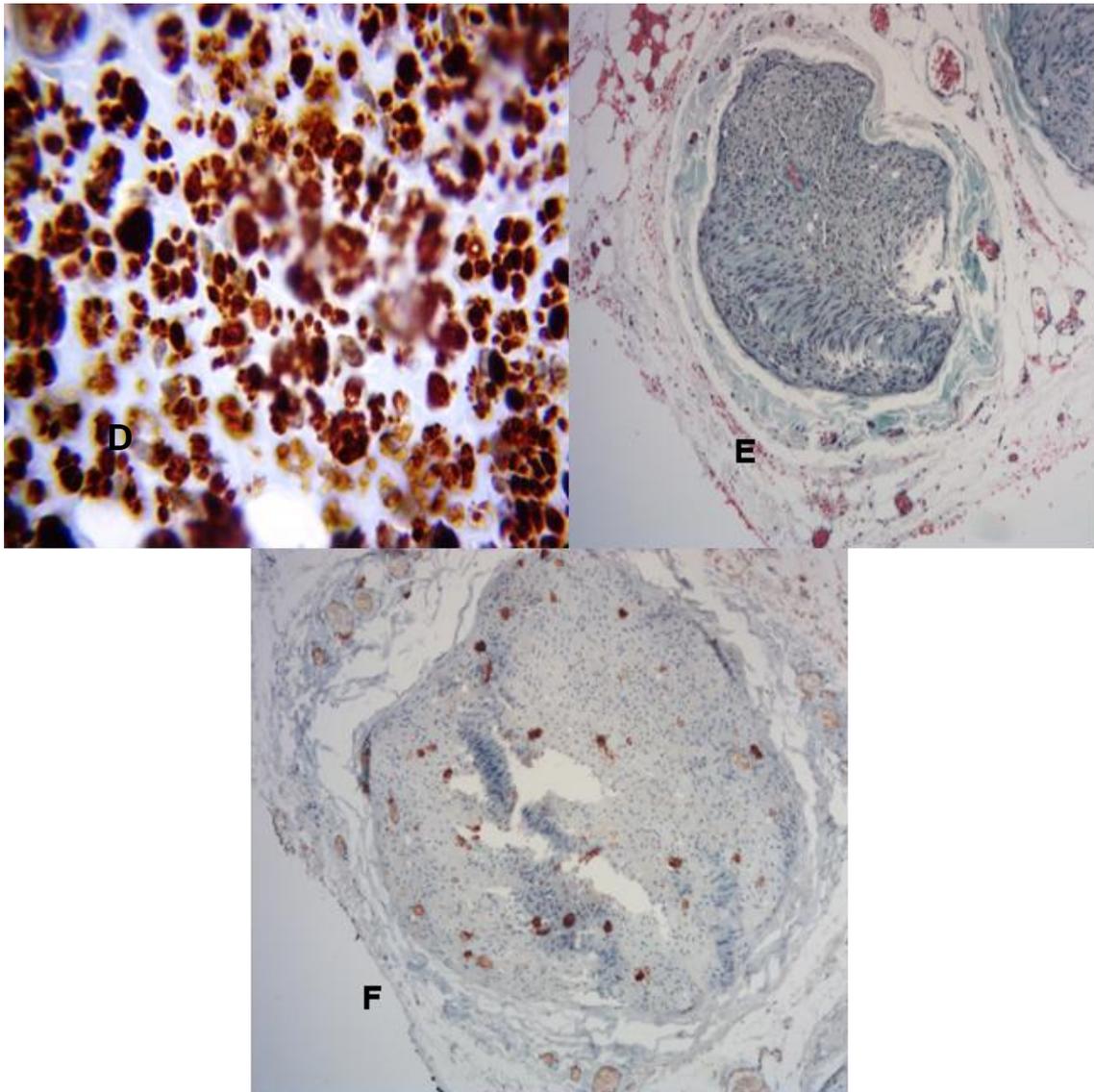


Figura 6.26 - Fotografias de histologias do Grupo C; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de MAH, na presença de vascularização epineural extrínseca. D - Fibras amielínicas (ampliação 100 x), E - coloração com Tricrômico de Masson (ampliação 10 x), F - coloração com CD-31 (ampliação 10 x) para a marcação dos vasos (setas).

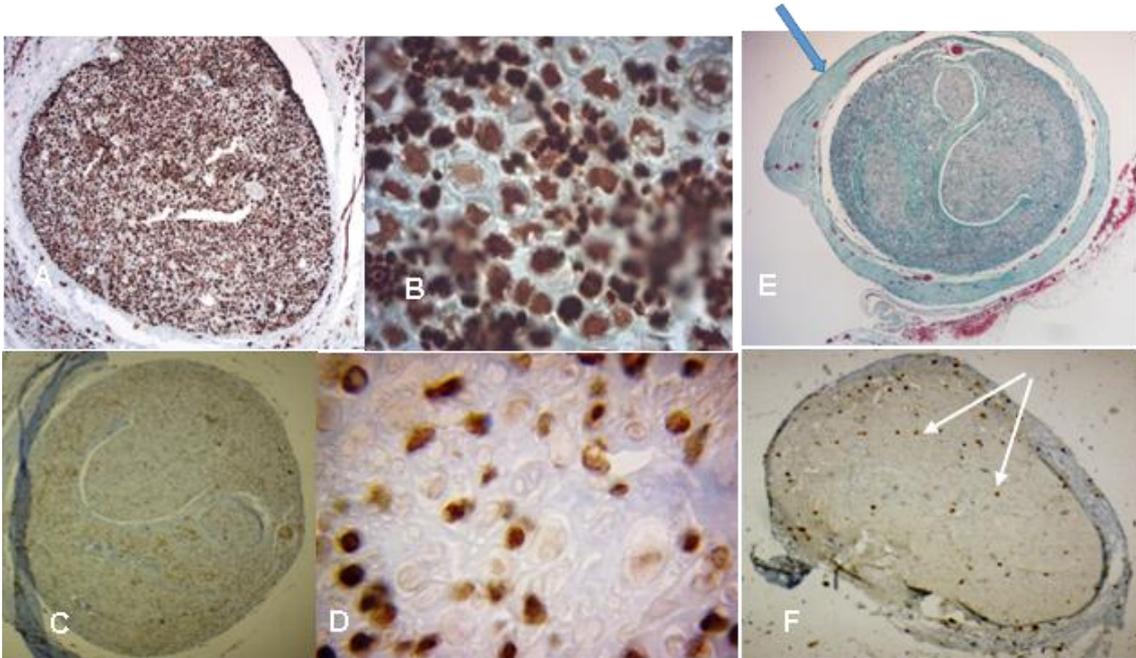


Figura 6.27 - Fotografias de histologias do Grupo D; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo autólogo, sem a presença de vascularização epineural extrínseca. A - Neurofilamentos (ampliação 10 x); B - Fibras amielínicas (ampliação 100 x); C e D - Fibras mielínicas (ampliação 10 x e ampliação 100 x); E - Coloração com Tricrômico de Masson (ampliação 10 x) assinalando o perinervo (seta); F - Coloração com CD-31 (ampliação 10 x) para a marcação dos vasos (setas).

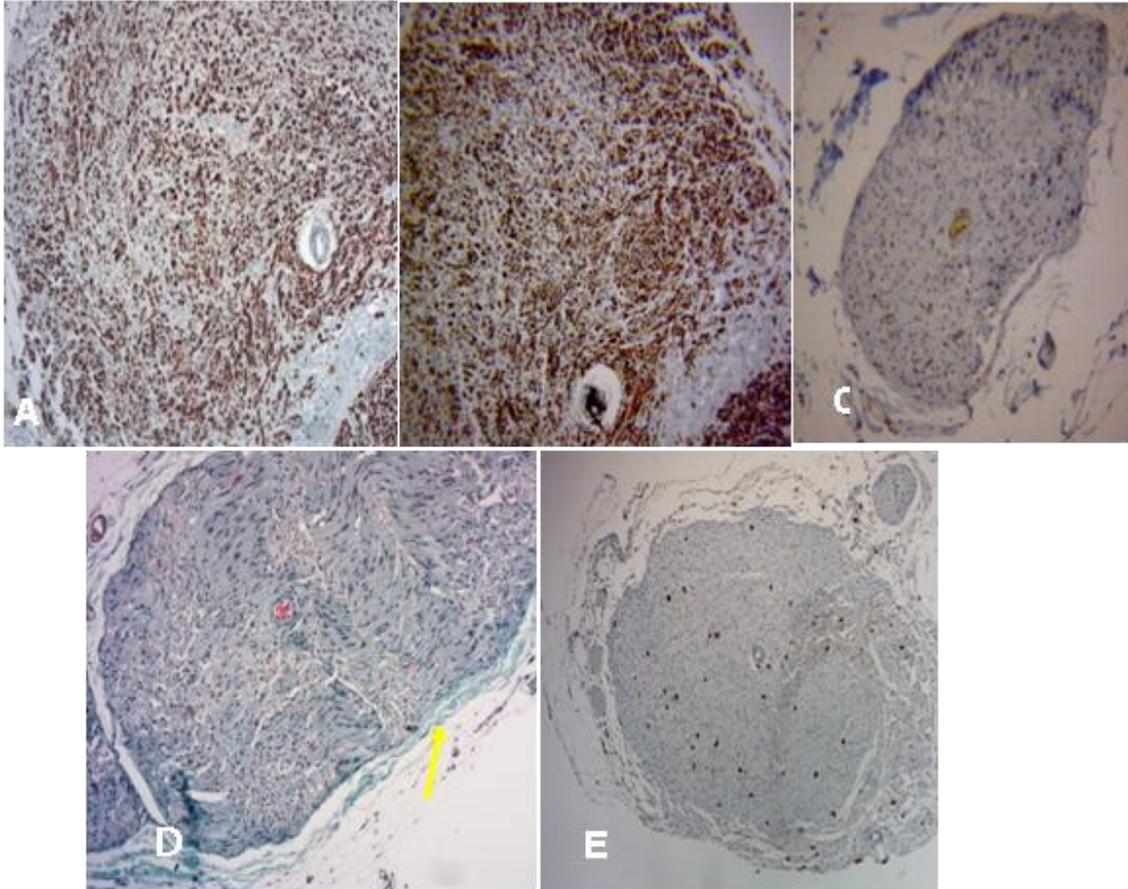


Figura 6.28 - Fotografias de histologias do Grupo E; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de veia autóloga, sem a presença de vascularização epineural extrínseca. A - Neurofilamentos (ampliação 10 x); B - Fibras amielínicas (ampliação 100 x); C - Fibras mielínicas (ampliação 10 x); D - Coloração com Tricrômico de Masson (ampliação 10 x) assinalando o perinervo: veia (seta); E - Coloração com CD-31 (ampliação 10 x) para a marcação dos vasos (setas).

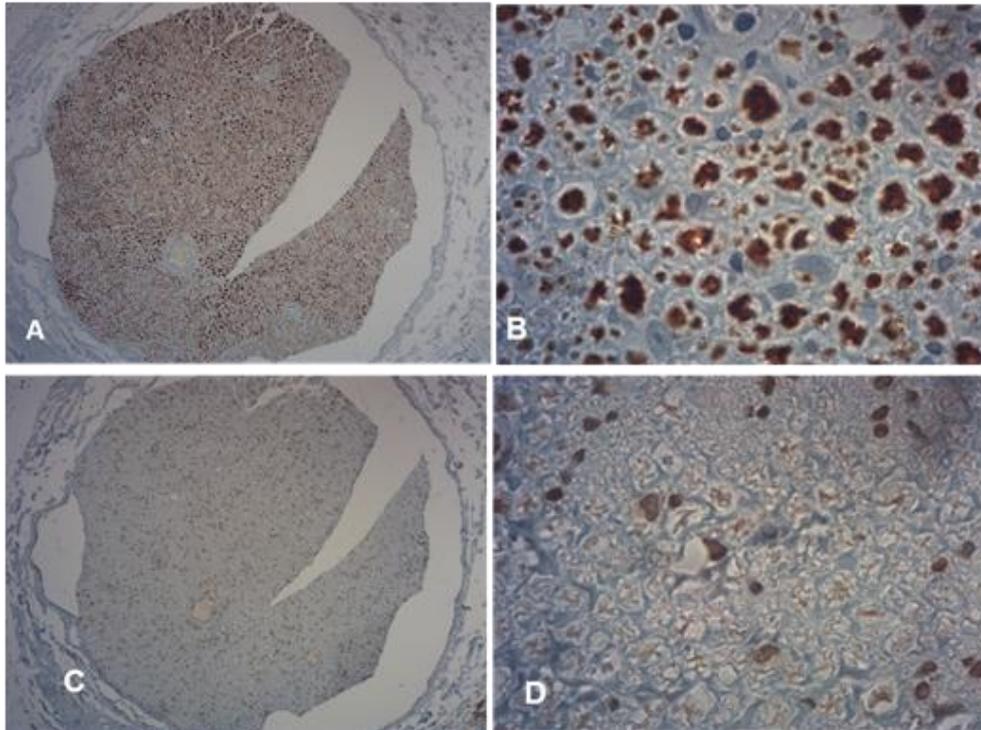


Figura 6.29 - Fotografias de histologias do Grupo F; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto de conduto de MAH, sem a presença de vascularização epineural extrínseca. A e B - Neurofilamentos (ampliação 10 x, ampliação 100 x); C e D - fibras mielínicas (ampliação 10 x, ampliação 100 x).

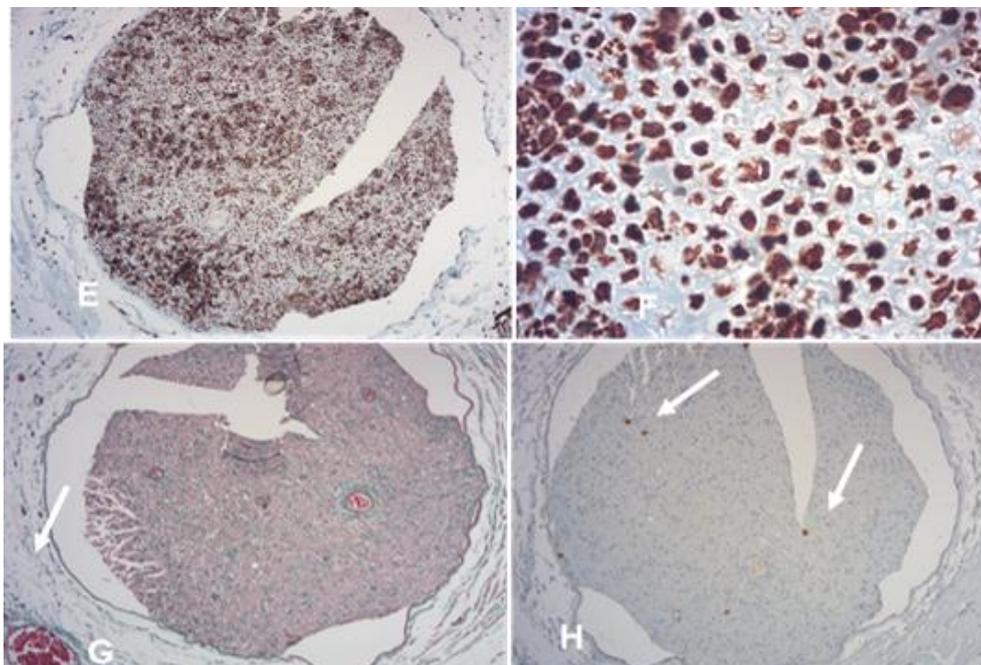


Figura 6.30 Fotografias de histologias do Grupo F; Reconstrução do defeito nervoso com enxerto conduto de MAH, sem a presença de vascularização epineural extrínseca. E e F - Fibras amielínicas (ampliação 10 x, ampliação 100 x); G- Coloração com Tricrômico de Masson (ampliação 10 x) assinalando (seta) o perinervo: MAH (seta); H - Coloração com CD-31 (ampliação 10 x) para a marcação dos vasos (setas).

6.4.2.2. Marcação Axonal Retrógrada com Marcador Fluorescente *True Blue*

Na 12.^a semana, um animal de cada Grupo, A, B e C, foi submetido a marcadores retrógrados com *True Blue* (TB) para avaliar a recuperação da conexão anatômica correcta do tracto sensitivo. Ao 84.^o dia, fez-se uma injeção intracutânea de 12 µl de *True Blue* 2,5 % (*Sigma-Aldrich*) na parte mediana da face plantar da pata direita. Ao 10.^o dia post injeção, os animais foram eutanasiados.

Os mielómeros de L1 a L4 e os respectivos gânglios espinhais dorsais ou DRG (*dorsal root ganglia*) foram removidos, tal como as secções coronais do córtex cerebral nas áreas motora primária e somestésica primária. Estas partes do neuro-eixo foram imersas em 4 % de paraformaldeído, em 10 % de sucrose e em 0.1 M de PBS (*phosphate buffered saline*) a um pH de 7,4 durante 4 horas. Depois da fixação, os DRG foram transferidos para 15 % de sucrose em PBS pelo menos durante 15 horas. Finalmente, os DRG foram transferidos para 30 % de sucrose em PBS por um período de, pelo menos, 15 horas, e foram congelados em azoto líquido. De seguida, foram feitos cortes de 20 µm no criostato e estes foram descongelados e montados em lâminas de vidro revestidas de polilisina.^{10,45}

Os DRG foram, então, examinados através da fluorescência no microscópio de fluorescência (*Leica DMIRE 2*). A presença de fluorescência foi avaliada no que aparentou ser a maior secção transversa.¹⁰ As imagens foram morfometricamente analisadas com o recurso ao programa *Image J*^{10,11}.

6.4.2.3. Metodologia de Avaliação Histomorfométrica

Para esta metodologia foram seleccionadas as secções dos nervos isquiáticos submetidas a marcações para neurofilamentos, para acetilcolinesterase e para periferina. Cada uma destas secções foi observada em, pelo menos, 3 campos de 1000 x. A partir das imagens assim obtidas, e usando-se a metodologia descrita por Varejão e Geuna, assim como o *software Image J*, determinou-se o número médio de fibras marcadas por cada uma destas técnicas de imunohistoquímica, bem como a sua densidade média.^{10,11,42,43,46-48}

Todos os valores são expressos, de seguida, no seu valor médio ± desvio-padrão.

6.4.2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada com recurso ao *software SPSS 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences)*. Para comparar os valores médios do número de fibras nervosas no nervo isquiático nos diferentes grupos, bem como os valores médios da sua

densidade, recorreu-se ao teste de T-Student e à ANOVA. Considerou-se significativo um valor de $p < 0,05$. Recorreu-se ainda ao teste do Qui-Quadrado para comparar as proporções.

6.5. Resultados

O bem-estar e a saúde dos animais foram consideradas normais em todos os grupos durante todo o estudo. Todos os animais tiveram uma actividade adequada, inclusive no que diz respeito à sua aparência e à aquisição de peso ao longo do estudo. Nenhum dos animais apresentava sinais de autofagia dos membros. Três animais em cada grupo desenvolveram uma úlcera crónica na pata posterior direita que não comprometia a marcha ou outra actividade (Figura 6.30).



Figura 6.31 - Fotografia das patas posteriores onde se expõe a úlcera da pata dt. referente ao nervo isquiático dt. operado.

6.5.1 Avaliação Funcional

6.5.1.1 Traçado da Marcha e Cálculo do Índice de Funcionalidade do Isquiático: *sciatic functionality index (SFI)*;

No Grupo A, a média de SFI foi de -40,3; -34,1; e -24,5 às 4, 8 e 12 semanas respectivamente. No Grupo B, os parâmetros foram de -38,8; -30,7; e -9,4 nos mesmos períodos. No Grupo C, as médias de SFI foram de -36,6; -33,8; e -28,0 também às 4, 8 e 12 semanas, respectivamente. Estas diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas.

Evolução do índice de funcionalidade do nervo isquiático

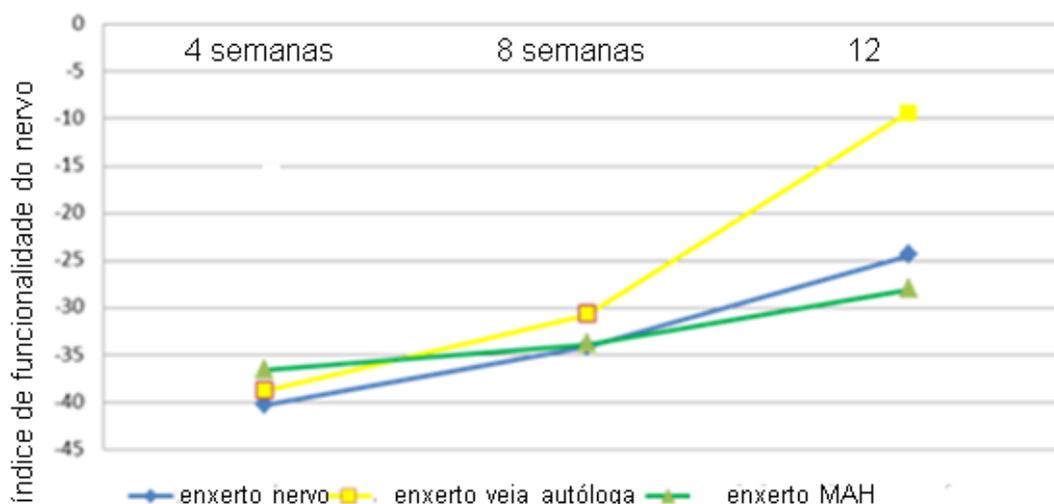


Tabela 1 - Comparação do índice funcional do nervo isquiático nos diferentes grupos, às 4, 8 e 12 semanas.

6.5.1.2. Velocidade de Condução Nervosa Motora (*Motor Nerve Conduction Velocity*) - MNCV

O valor médio relativamente à recuperação da velocidade de condução motora (*motor nerve conduction velocity*) ou MNCV, nos membros não-operados, foi de $47,0 \pm 4,2$ m/s. Às 12 semanas, o valor médio foi de 60,12 % relativamente à recuperação da velocidade de condução motora dos nervos isquiáticos do Grupo A, o qual diz respeito à reconstrução com enxerto de nervo autólogo.

No Grupo B, da reconstrução com enxerto de veia jugular autóloqa, o valor médio da recuperação da velocidade de condução motora foi de 62,23 %, também às 12 semanas.

No Grupo C, da reconstrução com conduto de MAH, o valor médio da recuperação da velocidade de condução motora foi de 64,01 %, no mesmo período.

6.5.1.3. Pesagem dos músculos gémeos e solhear

A diferença relativamente à percentagem da recuperação do peso dos músculos gémeos e solhear nos diferentes grupos experimentais, às 12 semanas, foi a mais demarcada, assumindo os valores de 72,73 % no Grupo A, de 79,56 % no Grupo B e de 83,92 % no Grupo C (Tabela 2). As diferenças do peso dos músculos gémeos e solhear foram apenas estatisticamente significativas entre o Grupo A (reparação com autoenxerto de nervo) e o Grupo C (reparação com membrana amniótica humana).

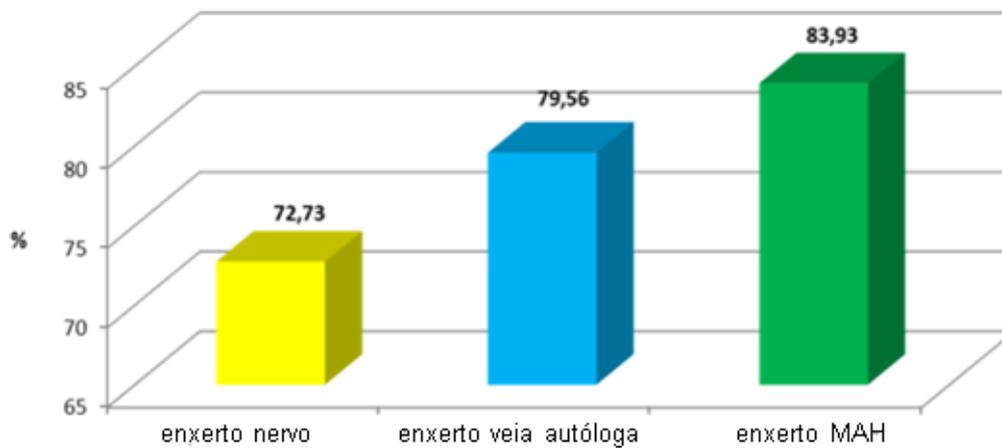


Tabela 2 - Percentagem do peso dos músculos gêmeos e solhear às 12 semanas de recuperação nos diferentes grupos.

6.5.1.4. Avaliação da Força de Flexão

A média da força de flexão no tornozelo no membro não-operado, ou seja, do lado de controle foi de $0,05 \pm 0,02$ N. A taxa de recuperação da força de flexão ao nível do tornozelo nos Grupos A, B e C foi de 61,32 %, de 58,45 % e de 63,17 %, respectivamente (Figura 6.34).

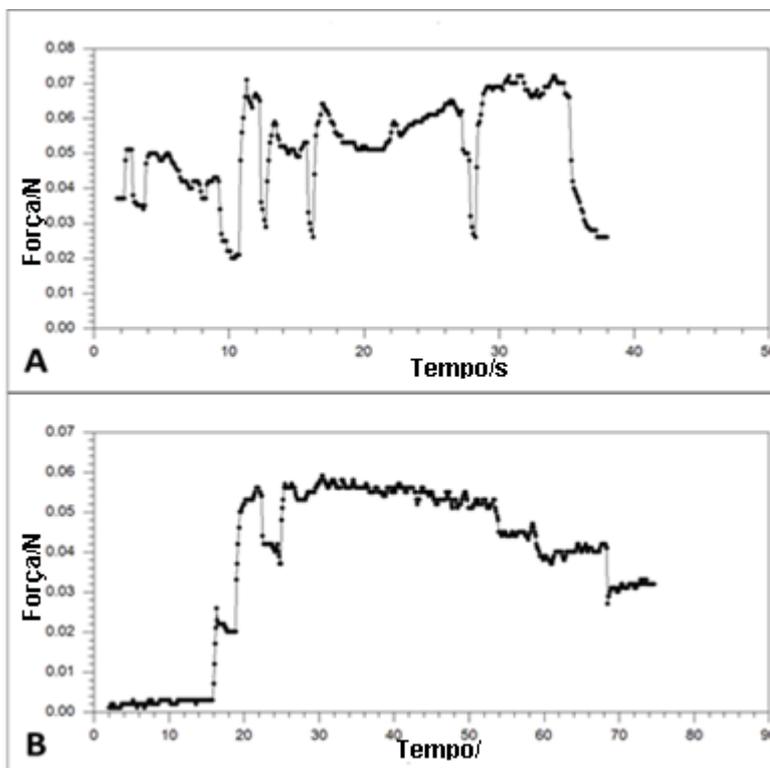


Figura 6.32 - A - Exemplo da medida típica da força de flexão ao nível do tornozelo do membro posterior do rato submetido a reconstrução do nervo com enxerto de veia (Grupo B); B - Medida da força de flexão no tornozelo do membro contra-lateral normal.

6.5.2 Avaliação estrutural

6.5.2.1 Análise Morfológica por dissecação, MEV e Diafanização

Em todos os grupos, às 4, 8 e 12 semanas, todos os nervos isquiáticos operados apresentaram, macroscopicamente, uma continuidade anatômica do nervo (Figura 6.16, Figura 6.17, Figura 6.18 A e Figura 6.18 B). Além disso, foi também visível, macroscopicamente, em todos, um denso plexo neovascular epineural desde as 4 semanas.

Da mesma forma, às 12 semanas, os moldes vasculares de corrosão prévios à metalização (Figura 6.33 e Figura 6.34) e metalizados (Figura 6.35) apresentaram uma continuidade dos plexos neovasculares na zona de reparação nervosa (Figura 6.33 A, letra E).

Pela técnica de Diafanização, obtivemos imagens semelhantes em que é também visível o denso plexo neovascular (Figura 6.36).

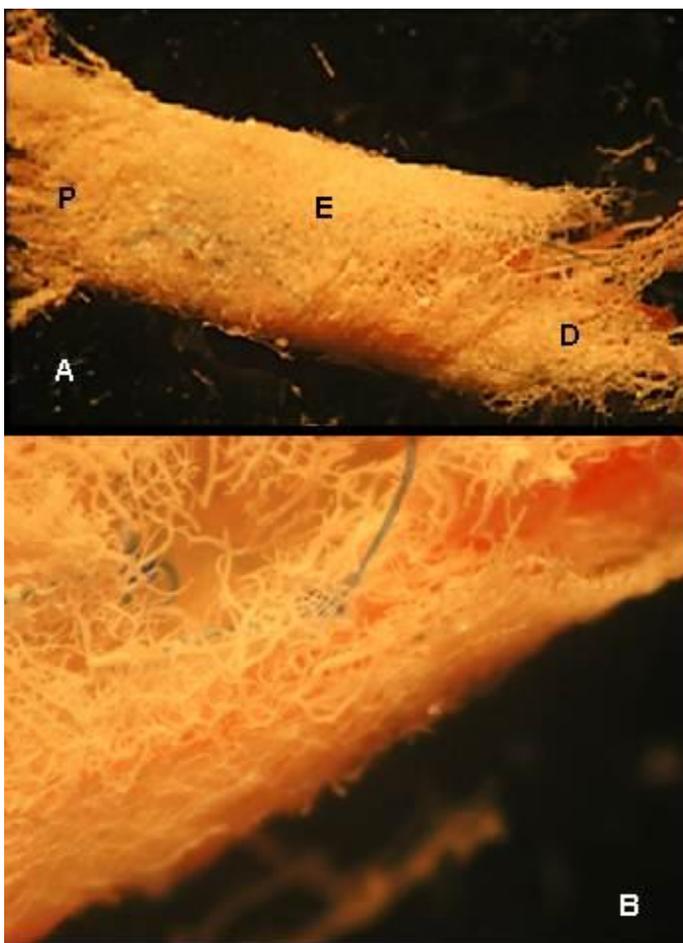


Figura 6.33 - Exemplo de moldes vasculares de corrosão prévios à metalização.

A: (ampliação 20 x) P - Porção proximal do enxerto nervoso; E - Zona de enxerto; D - Porção distal do enxerto nervoso;

B: (ampliação 40 x). São visíveis as pontes de sutura de Nylon 10/0 usadas na reparação

(fotografias realizadas através de lupa estereoscópica da marca *MEIJI*, modelo *EMZ-13TR*, *Olympus*).

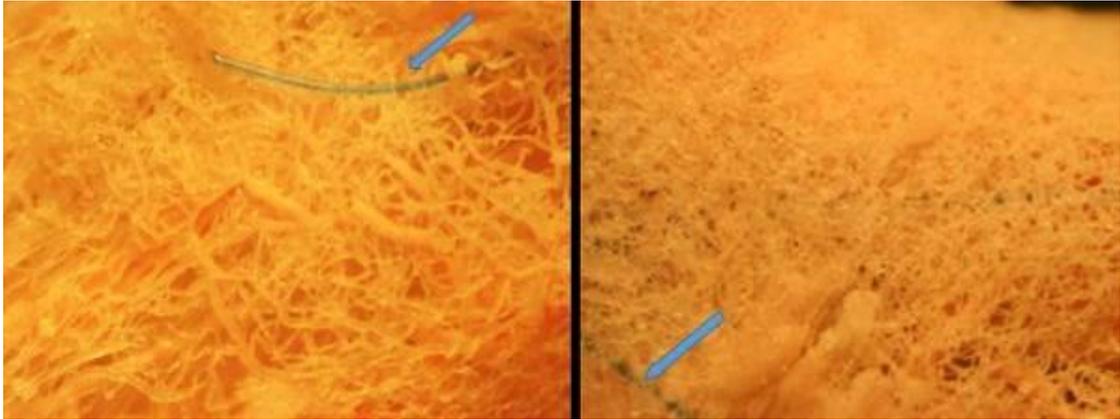


Figura 6.34 - Porção proximal do enxerto nervoso (ampliação 60 x); É possível observar a continuidade do plexo epineurial na zona de reparação nervosa; as setas apontam para as suturas de Nylon 10/0 usadas na reparação (fotografias realizadas através de lupa estereoscópica da marca *MEIJI*, modelo *EMZ-13TR*, *Olympus*).

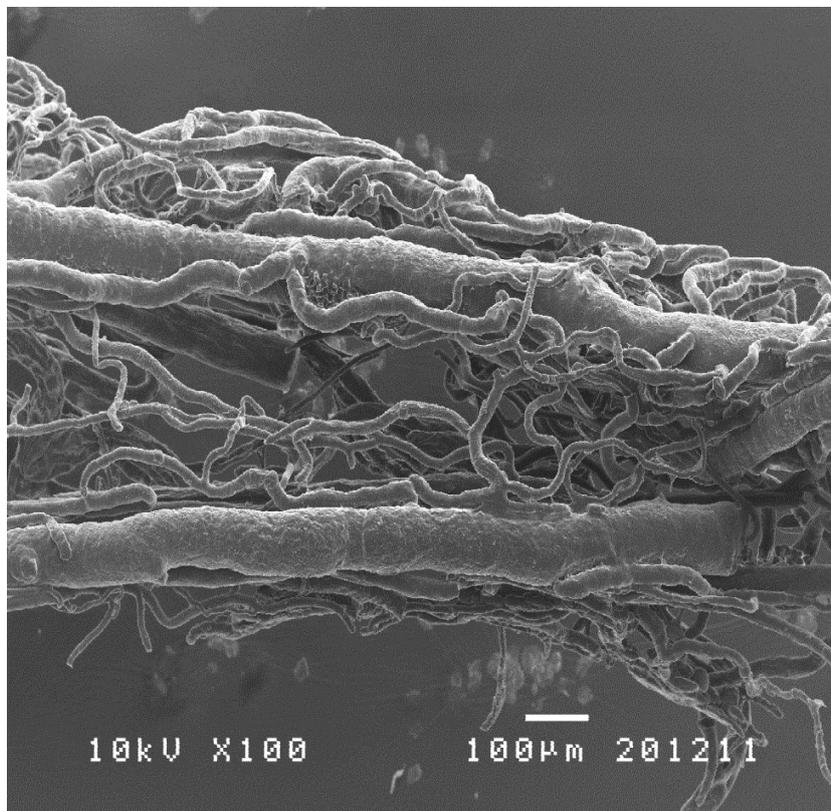


Figura 6.35 - Imagem de microscopia electrónica de varrimento dos plexos neovasculares endoneural, perineural e epineural do nervo isquiático, na zona de regeneração (ampliação 100 x - barra 100 µm).

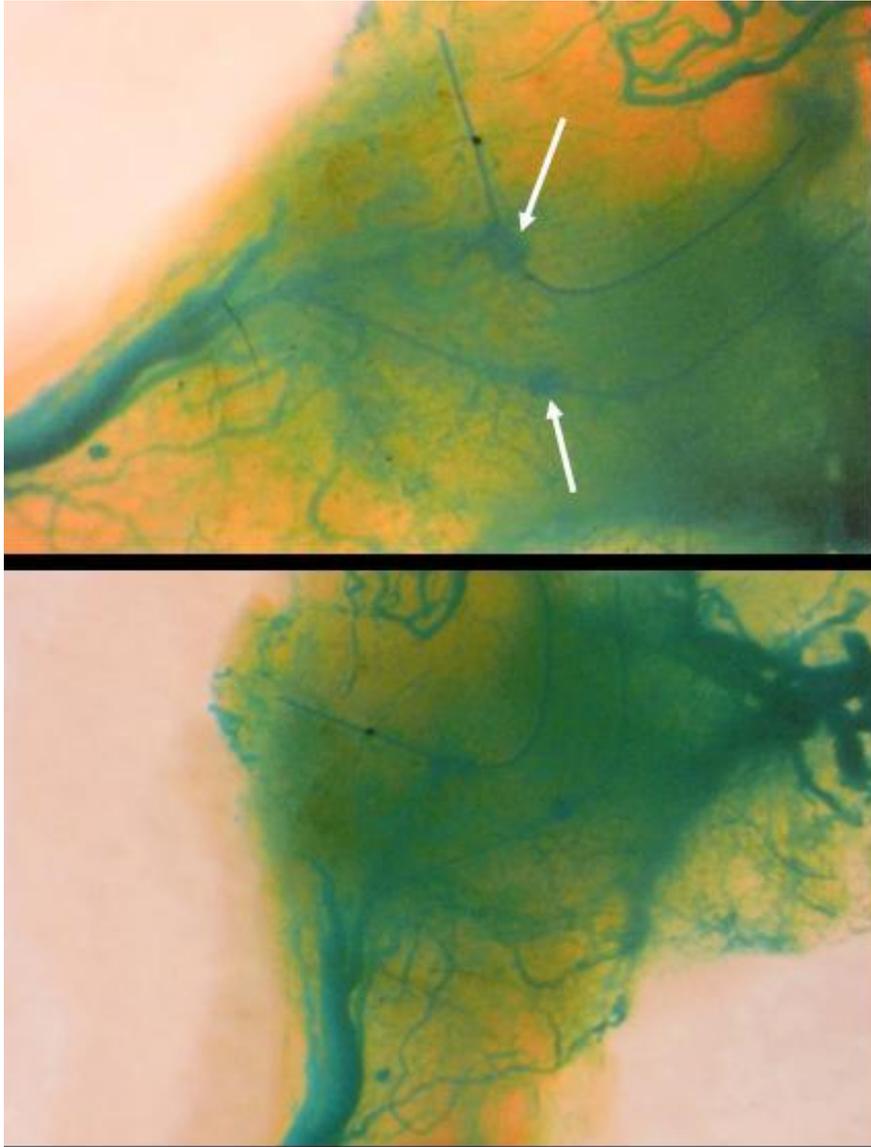


Figura 6.36 - Fotografia de Diafanização da zona de regeneração (ampliação 60 x) no nervo isquiático, onde se pode observar um denso plexo neovascular epineural e a continuidade desse plexo na zona de reparação nervosa; as setas apontam para as suturas de Nylon 10/0 usadas na reparação (fotografias realizadas através de lupa estereoscópica da marca *MEIJI*, modelo *EMZ-13TR*, *Olympus*).

6.5.2.2. Análise Morfológica por Microscopia de luz

A histologia demonstrou a recuperação de uma arquitectura relativamente normal do nervo em todos os segmentos do nervo isquiático operado (Figura 6.37, Figura 6.48, Figura 6.39). Em particular, verificou-se que os plexos endoneural, perineural e epineural estavam restaurados em todos os grupos (Figura 6.37, Figura 6.38, Figura 6.39).

A coloração histológica com hematoxilina-eosina permitiu ver que, em todos os grupos, existia uma recuperação da arquitectura normal do nervo, na secção de nervo distalmente à reparação nervosa, ou seja, já na região da divisão do nervo isquiático no nervo tibial, no nervo

perineal comum e no nervo cutâneo sural caudal, destacando-se o conteúdo dos axônios semelhante ao normal nos três nervos (Figura 6.37, Figura 6.38, Figura 6.39).

Também pode ver-se a persistência da estrutura da veia na coloração histológica com hematoxilina-eosina e na coloração com Tricrômico de Masson (Figura 6.38). Pela imunohistoquímica, utilizando-se anticorpos para o colagênio 1 anti-humano, verificou-se a persistência da membrana amniótica humana na 12.^a semana, nos ratos dos grupos C e F (Figura 6.39).

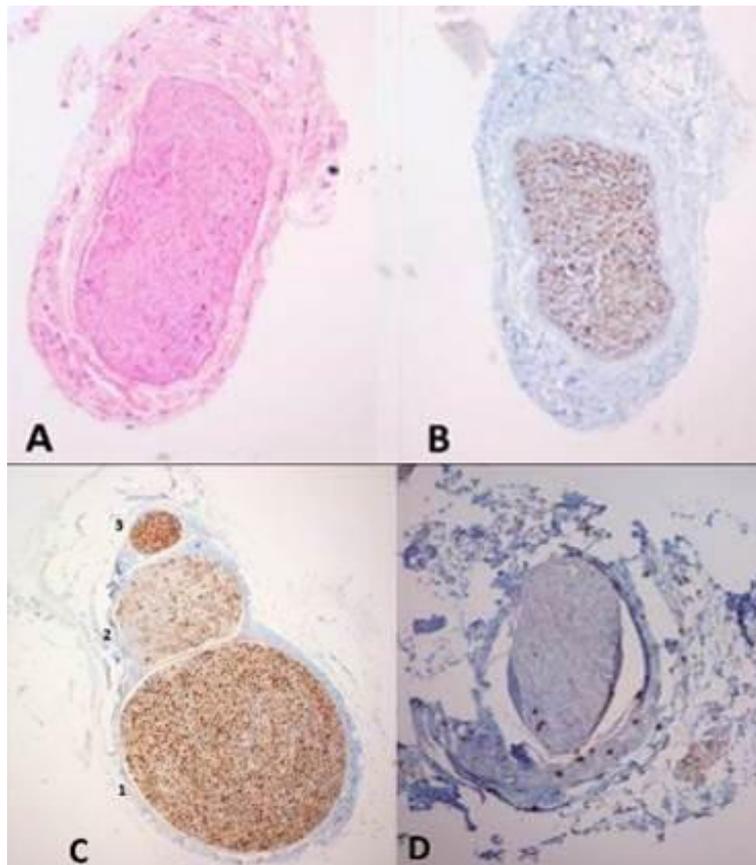


Figura 6.37 - Fotografias de Microscopia na 12.^a semana de pós-operatório, apresentando diferentes aspectos histológicos do nervo isquiático distalmente ao defeito nervoso criado no Grupo A (ratos submetidos a enxerto de nervo autólogo).

- A - Secção de nervo corada com hematoxilina-eosina exibindo a recuperação da arquitetura relativamente normal do nervo (ampliação 40 x);
- B - Coloração para os neurofilamentos justa distal da reparação nervosa destacando o conteúdo axonal do nervo (ampliação 40 x);
- C - Ampliação 40 x com a coloração para neurofilamentos mais distal do que em B, já na região da divisão do nervo isquiático num nervo tibial [1], num nervo peroneal comum [2] e num nervo cutâneo sural caudal [3], destacando-se o conteúdo axonal dos 3 nervos;
- D - Corte corado com CD-31 exibindo os múltiplos vasos endoneurais, perineurais e epineurais na terminação distal do enxerto nervoso original (ampliação 40 x).

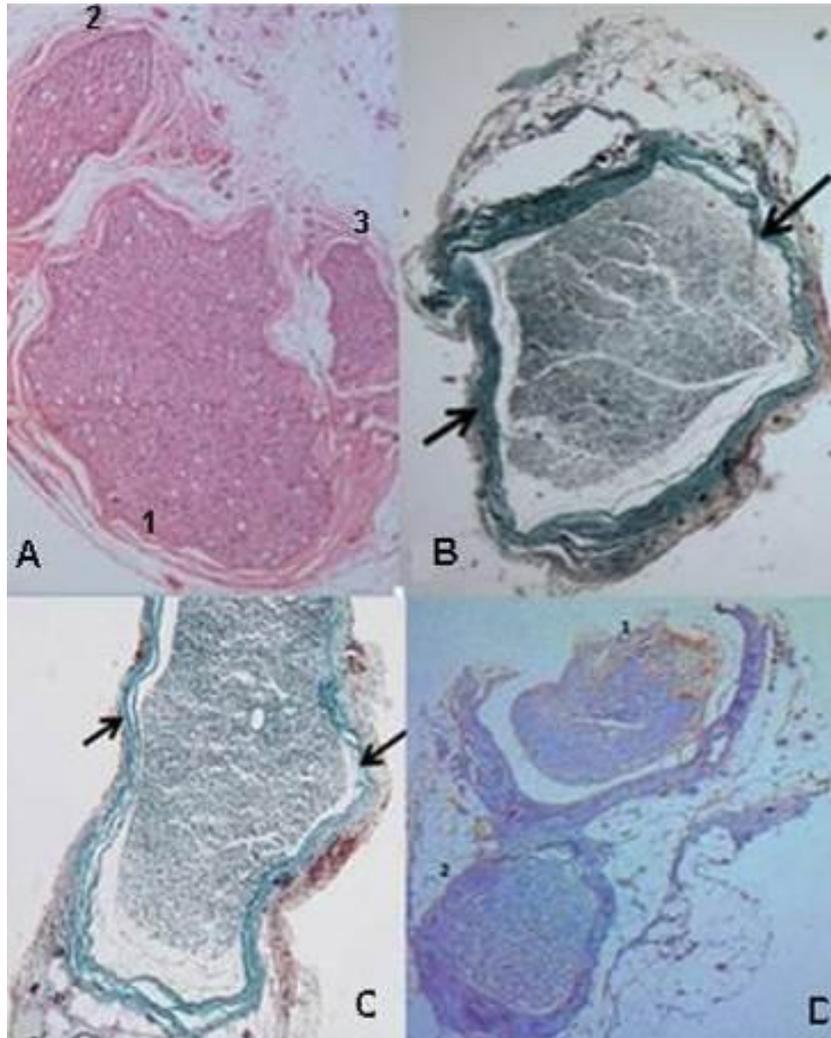


Figura 6.38 - Fotografias de Microscopia na 12.^a semana de pós-operatório, apresentando diferentes aspectos histológicos do nervo isquiático distalmente ao defeito nervoso criado no Grupo B (ratos submetidos a enxerto de veia jugular externa autóloga).

- A - Secção de nervo corada com hematoxilina-eosina mostrando a recuperação da arquitectura normal do nervo distalmente à reparação nervosa, já na região da divisão do nervo isquiático num nervo tibial [1], num nervo peroneal comum [2] e num nervo cutâneo sural caudal [3], destacando-se o conteúdo axonal dos 3 nervos (ampliação 40 x);
- B - Secção de nervo corada com Tricrómico de Masson apresentando o enxerto de veia (marcado com setas) a persistir às 12 semanas (40 x);
- C - Ampliação 100 x de secção de nervo, corada com Tricrómico de Masson, do enxerto de veia (marcado com setas) apresentando os múltiplos vasos endoneurais, perineurais e epineural;
- D - Corte de extremidade distal do nervo isquiático corado com CD-31 mostrando múltiplos vasos endoneurais, perineurais e epineural (ampliação 40 x).

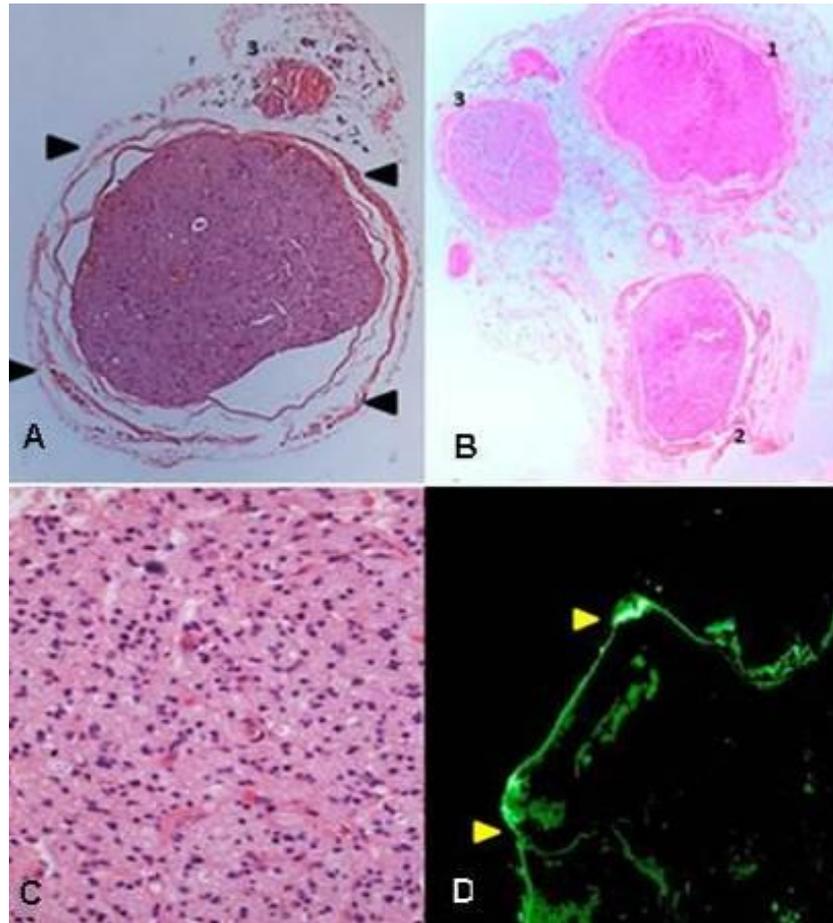


Figura 6.39 - Fotografias de Microscopia na 12.^a semana de pós-operatório, apresentando diferentes aspectos histológicos do nervo isquiático distalmente ao defeito nervoso criado no Grupo C (ratos submetidos a enxerto de conduto de membrana amniótica humana imunoínerte MAH).

A - Ampliação 40 x de secção de nervo corada com hematoxilina-eosina expondo a recuperação da arquitetura normal do nervo na porção distal do defeito do nervo isquiático; pode observar-se a persistência da membrana amniótica humana (pontas das setas);

B - Ampliação 40 x de secção de nervo corada com hematoxilina-eosina mostrando a recuperação da arquitetura normal do nervo na divisão terminal do nervo isquiático; nervo tibial [1], nervo peroneal comum [2] e nervo cutâneo sural caudal [3];

C - Ampliação 400 x - coloração com hematoxilina-eosina de secção do nervo isquiático na extremidade distal da reparação do defeito nervoso exibindo uma concentração muito densa de axónios e uma vascularização endoneural rica;

D - Ampliação 100 x – imunofluorescência marcando o colagénio 1 anti-humano, onde se apresenta a persistência da membrana amniótica no defeito do nervo às 12 semanas (ponta das setas).

6.5.2.3. Microscopia de Fluorescência

A fluorescência neuronal retrógrada do defeito nervoso marcada com *True Blue*, a parte proximal do nervo isquiático e o gânglio da raiz dorsal lombar (*dorsal root ganglia*) ou DRG no lado operado (examinadas as peças no microscópio de fluorescência *Leica DMIRE 2*) foram similares em todos os grupos às 12 semanas (Figura 6.40). Em todos os grupos experimentais foi também possível identificar o marcador fluorescente nos corpos celulares dos neurónios granulosos (IV camada granulosa interior) na área contra-lateral somato sensível primária (Figura 6.40 E).

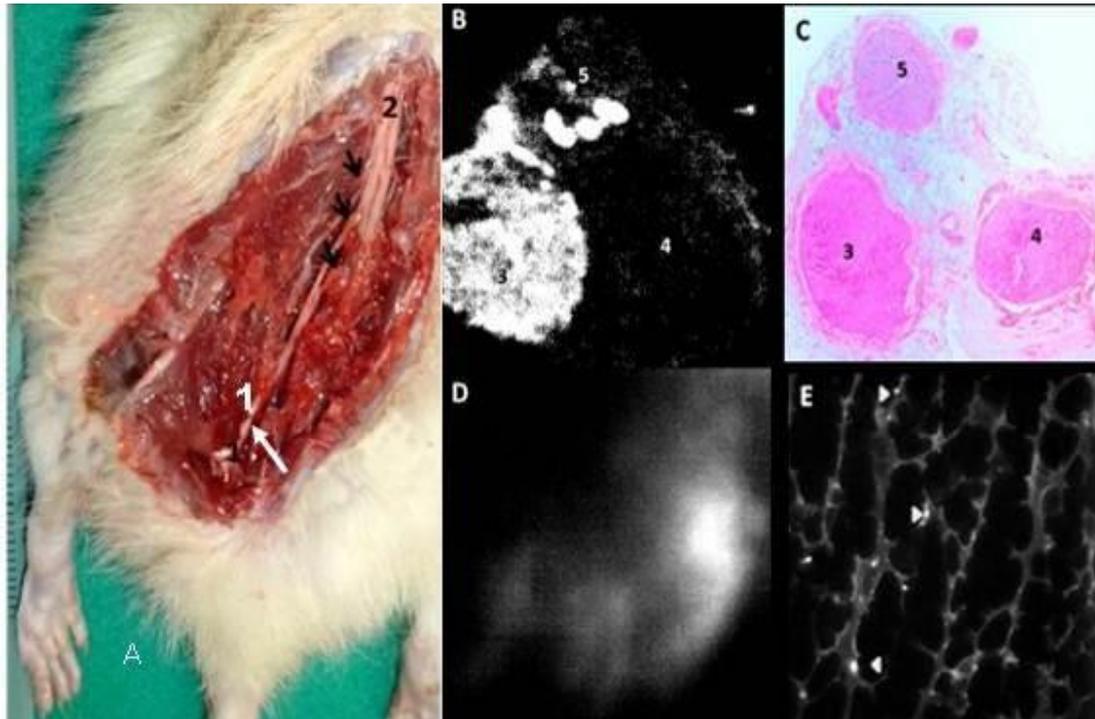


Figura 6.40 - Típica marcação retrógrada com o marcador *True Blue*.

- A - Fotografia da vista dorsal do membro posterior e do dorso mostrando uma dissecção do nervo isquiático (1) da pélvis à sua origem no plexo sacrado, o gânglio da raiz lombar dorsal (setas) e a espinal medula (2);
- B - Fotografia de imagem (ampliação 40 x) de fluorescência da porção terminal do nervo isquiático às 12 semanas após o enxerto com veia autóloga para reparar o defeito de tecido nervoso 3 - nervo tibial; 4 - nervo peroneal comum; 5 - nervo cutâneo sural caudal;
- C - Fotografia de coloração com hematoxilina-eosina (ampliação 40 x) de secção obtida na mesma secção da imagem de fluorescência exibindo as três divisões terminais do nervo isquiático; ilustra ainda que a fluorescência na imagem C está confinada ao nervo tibial e ao nervo cutâneo sural caudal, que enerva a área cutânea, onde foi injectado o corante;
- D - Fotografia (ampliação 40 x) de imagem de fluorescência do gânglio da raiz dorsal de segmento de L3 da espinal medula do mesmo lado em que foi reparado o nervo isquiático, apresentando a retenção do corante injectado na pele no território desse nervo;
- E - Fotografia (ampliação 40 x) de imagem de fluorescência dos neurónios granulosos (IV camada granulosa interior) na área contra-lateral somato sensível primária mostrando a marcação dos corpos celulares neuronais com cristais de *True Blue* (pontas das setas).

6.5.2.4. Análise Morfométrica

6.5.2.4.1. Metodologia de Avaliação Histomorfométrica

Nos quadros e gráficos que se seguem, apresentam-se os resultados desta análise da regeneração nervosa através dos três tipos de condutos diferentes: na presença de vascularização extrínseca epineural (Grupo A, Grupo B, Grupo C) e com o mesmo tipo de condutos, mas sem ter sido preservada a vascularização extrínseca epineural (Grupo D, Grupo E, Grupo F).

6.5.2.4.2. Avaliação histomorfométrica com marcação imunohistoquímica para Neurofilamentos

Grupo Experimental	Número médio de fibras \pm Desvio-Padrão	Densidade média de Fibras \pm Desvio-Padrão
Enxerto de Nervo com Vascularização Extrínseca Preservada	12 894,89 \pm 876,93	20,18 \pm 2,05
Enxerto de Membrana Amniótica com Vascularização Extrínseca Preservada	25 372,08 \pm 2 687,64	26,37 \pm 1,50
Enxerto de Veia com Vascularização Extrínseca Preservada	43 152,35 \pm 1 436,01	53,36 \pm 3,84
Enxerto de Nervo sem Vascularização Extrínseca Preservada	8 594,85 \pm 544,43	26,96 \pm 3,84
Enxerto de Membrana Amniótica sem Vascularização Extrínseca Preservada	29 789,12 \pm 2124,40	15,57 \pm 0,96
Enxerto de Veia sem Vascularização Extrínseca Preservada	31 643,46 \pm 210,43	45,00 \pm 3,85

Tabela 3 - Número médio de fibras marcadas para neurofilamentos e respectiva densidade média.

Número médio de fibras marcadas por imunohistoquímica para neurofilamentos nos diferentes grupos experimentais

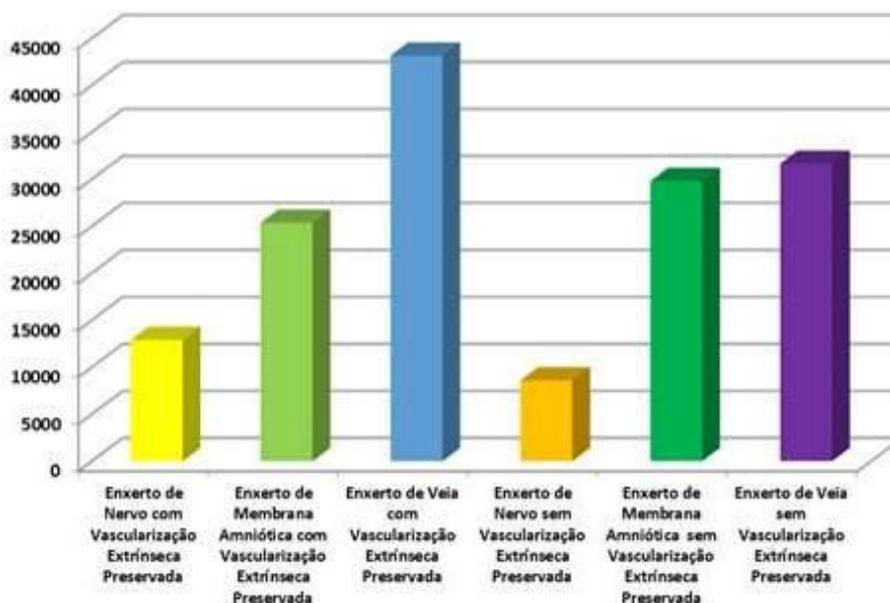


Tabela 4 - Número médio de fibras marcadas para neurofilamentos.

O número médio de fibras marcadas para os neurofilamentos na zona de reparação nervosa era significativamente diferente nos diferentes grupos ($p < 0,001$). O número médio de fibras foi maior no enxerto de veia com vascularização preservada (Grupo B) do que nos outros grupos (Grupo A, Grupo C, Grupo D, Grupo E, Grupo F) ($p < 0,05$).

Quando preservada a vascularização extrínseca do nervo, o número médio de fibras foi maior nas reconstruções com enxerto de nervo (Grupo A) e com enxerto de veia (Grupo B) ($p < 0,05$). Pelo contrário, não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre o número médio de fibras entre os dois grupos (Grupo C e Grupo F), nos quais foi usado o enxerto de membrana amniótica com vascularização extrínseca preservada, *versus* sem a vascularização extrínseca preservada.

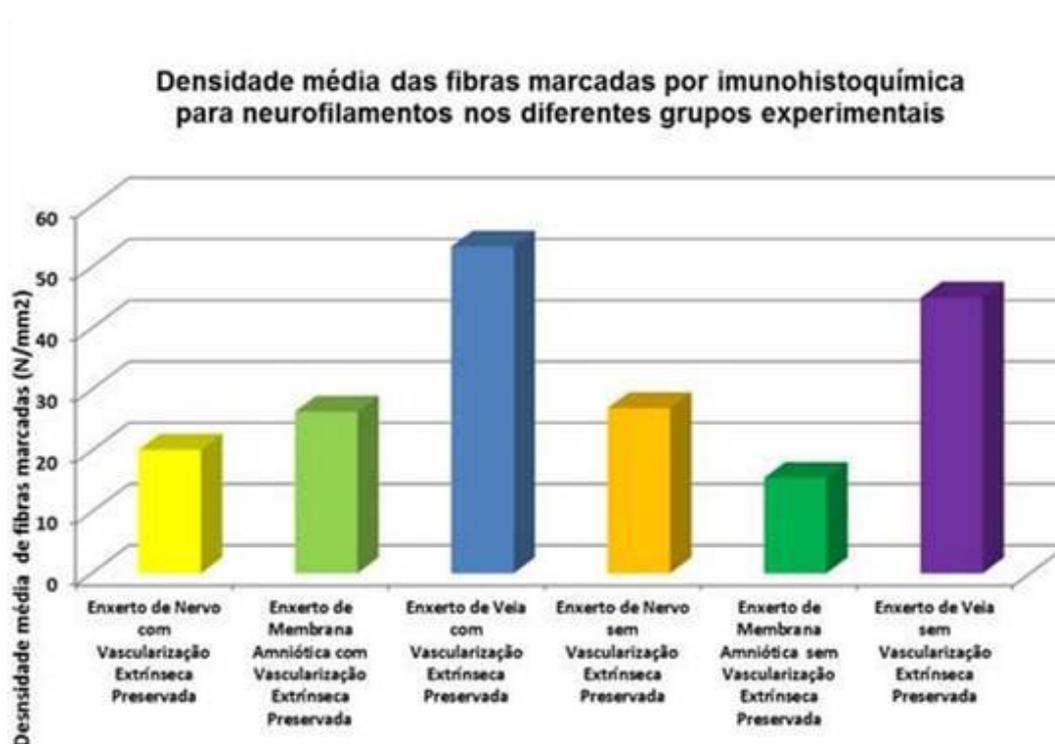


Tabela 5 - Densidade média das fibras marcadas para neurofilamentos.

Na marcação para neurofilamentos, a densidade das fibras foi maior nos grupos que foram submetidos à reconstrução do hiato nervoso com um segmento de veia (Grupo B, Grupo E) ($p < 0,001$).

O grupo em que a reconstrução do defeito nervoso foi realizada com veia e com a preservação da vascularização extrínseca (Grupo B) apresentou uma maior densidade de fibras do que o grupo em que a reconstrução também foi efectuada com veia, mas em que não se preservou a vascularização extrínseca (Grupo E) ($p < 0,05$).

A preservação da vascularização extrínseca assegurou, também, uma maior densidade de fibras no grupo submetido à reconstrução com enxerto de membrana amniótica (Grupo C) em relação ao Grupo F em que não foi preservada a vascularização extrínseca ($p < 0,05$).

Nos grupos experimentais em que se efectuou a reconstrução com enxerto de nervo registou-se uma maior densidade de fibras no Grupo D, sem vascularização extrínseca preservada, em relação ao Grupo A, com vascularização extrínseca preservada, embora a diferença não fosse estatisticamente significativa.

6.5.2.4.3 Avaliação histomorfométrica com marcação imunohistoquímica para Acetilcolinesterase

Grupo Experimental	Número médio de fibras ± Desvio-Padrão	Densidade média de Fibras ± Desvio- Padrão
Enxerto de Nervo com Vascularização Extrínseca Preservada	8 559,31 ± 1 122,56	14,36 ± 2,80
Enxerto de Membrana Amniótica com Vascularização Extrínseca Preservada	5 207,12 ± 705,74	5,36 ± 0,56
Enxerto de Veia com Vascularização Extrínseca Preservada	5 289,40 ± 407,58	6,01 ± 0,19
Enxerto de Nervo sem Vascularização Extrínseca Preservada	4 586,76 ± 549,25	9,16 ± 0,27
Enxerto de Membrana Amniótica sem Vascularização Extrínseca Preservada	8 885,97 ± 971,07	4,10 ± 0,02
Enxerto de Veia sem Vascularização Extrínseca Preservada	8 091,95 ± 420,02	11,20 ± 1,32

Tabela 6 - Quadro representativo do número médio de fibras marcadas com Acetilcolinesterase e respectiva densidade média.

Número médio de fibras marcadas com imunohistoquímica para a Acetilcolinesterase nos diferentes grupos experimentais

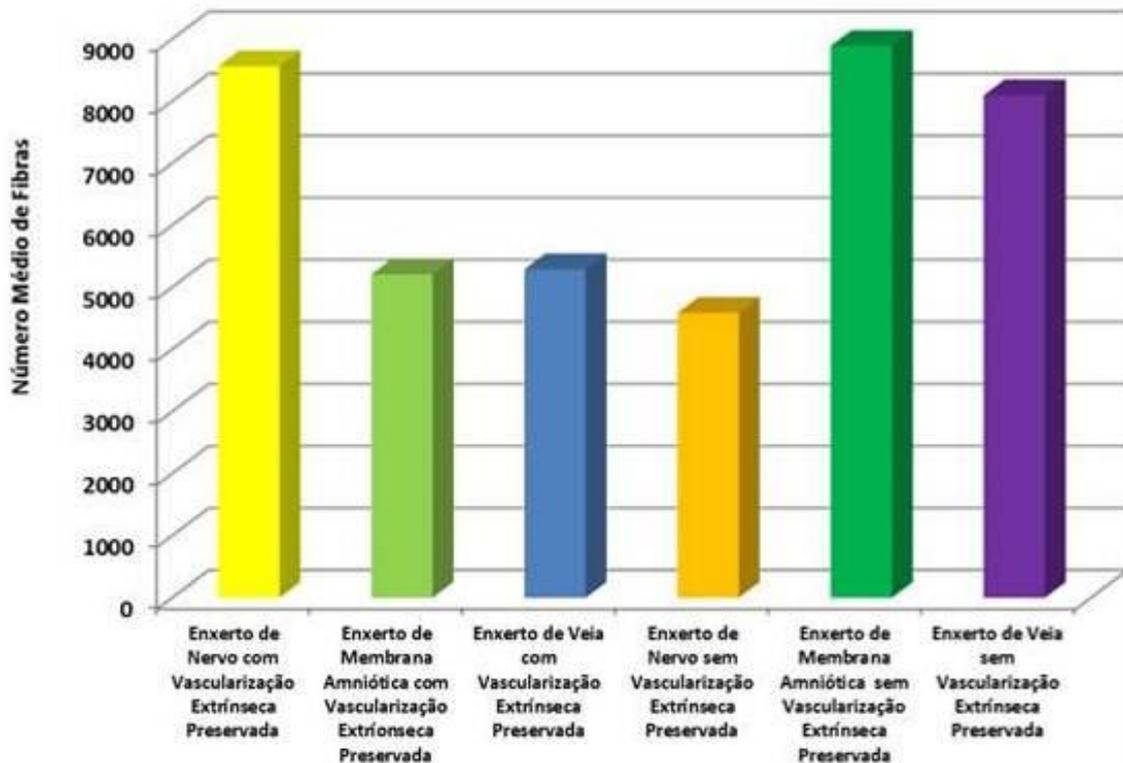


Tabela 7 - Número médio de fibras marcadas com Acetilcolinesterase.

Com a marcação para a acetilcolinesterase registou-se um número médio de fibras maior nos seguintes grupos: Grupo A - reconstrução com enxerto de nervo, preservando-se a vascularização extrínseca; Grupo F - reconstrução com membrana amniótica, sem preservação da vascularização extrínseca; e Grupo E - reconstrução com enxerto de veia, sem preservação da vascularização extrínseca ($p < 0,05$).

Contudo, não se registaram diferenças com significado estatístico entre estes três grupos, nem entre os restantes grupos entre si (Grupo B, Grupo C, Grupo D).

Densidade média de fibras marcadas com Acetilcolinesterase nos diferentes grupos

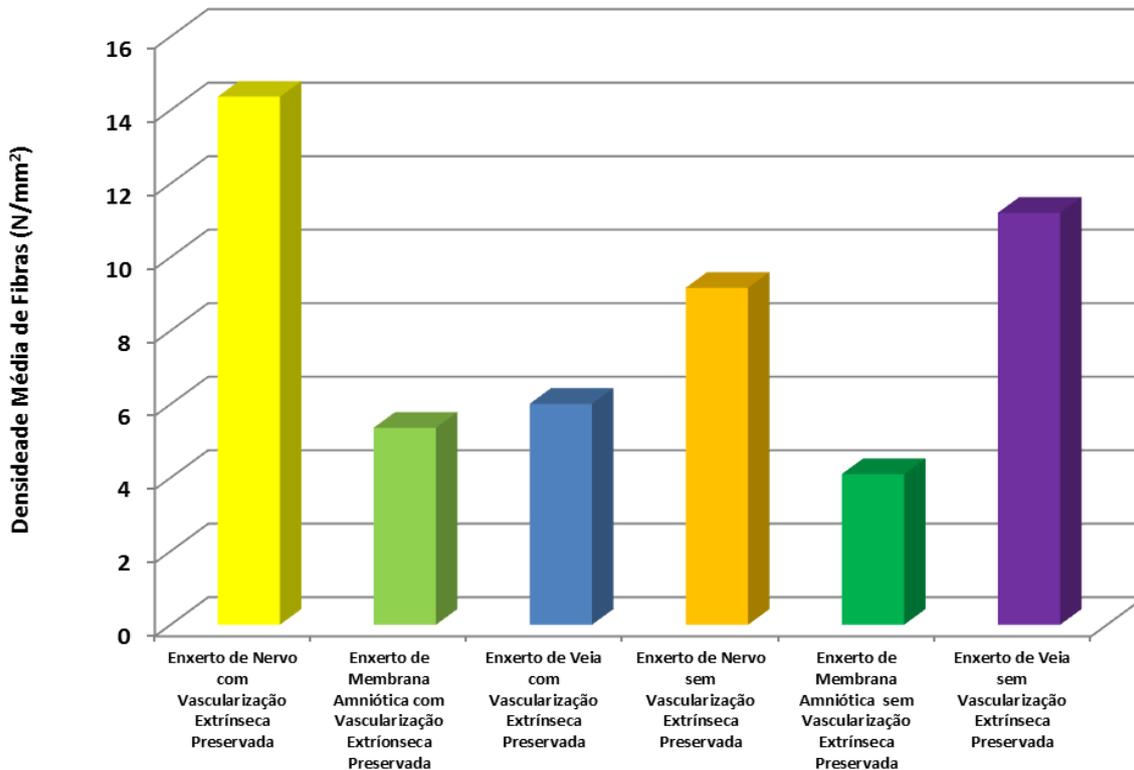


Tabela 8 - Densidade média de fibras marcadas com Acetilcolinesterase.

Relativamente à densidade média de fibras marcadas para a acetilcolinesterase, registou-se um valor mais elevado no grupo que foi submetido a reconstrução com enxerto de nervo, preservando-se a vascularização extrínseca (Grupo A), sendo este grupo seguido pelo Grupo E, da reconstrução com enxerto de veia, sem a vascularização extrínseca preservada, relativamente aos restantes grupos ($p < 0,05$).

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os restantes grupos.

6.5.2.4.3 Avaliação Histomorfométrica com marcação imunohistoquímica para Periferina

Grupo Experimental	Número médio de fibras ± Desvio-Padrão	Densidade média de Fibras ± Desvio-Padrão
Enxerto de Nervo com Vascularização Extrínseca Preservada	4 791,89 ± 641,46	9,57 ± 1,55
Enxerto de Membrana Amniótica com Vascularização Extrínseca Preservada	9 548,29 ± 1 035,47	10,22 ± 0,57
Enxerto de Veia com Vascularização Extrínseca Preservada	16 869,54 ± 1 444,88	21,09 ± 2,66
Enxerto de Nervo sem Vascularização Extrínseca Preservada	4 179,67 ± 236,10	9,80 ± 0,75
Enxerto de Membrana Amniótica sem Vascularização Extrínseca Preservada	18 980,63 ± 1 871,43	9,08 ± 0,13
Enxerto de Veia sem Vascularização Extrínseca Preservada	10 850,16 ± 795,88	14,68 ± 1,03

Tabela 9 - Número médio de fibras marcadas com Periferina.

Número médio de fibras marcadas com Periferina nos diferentes grupos exoperimentais

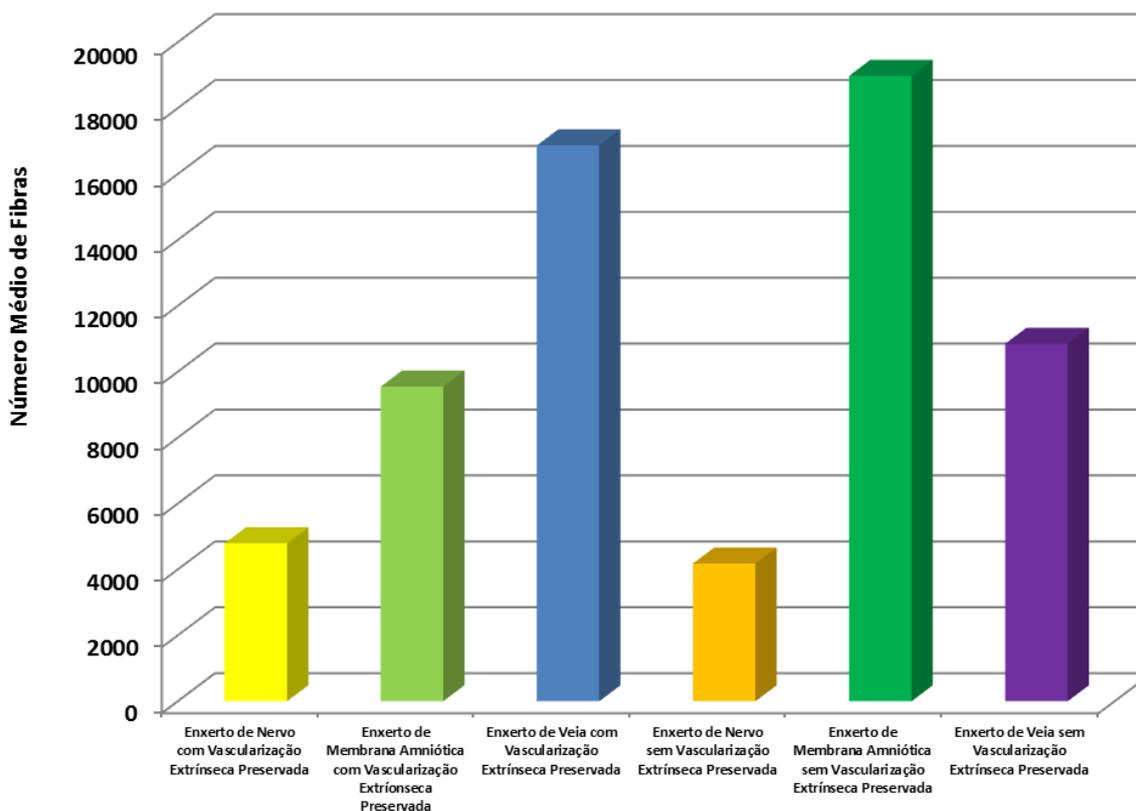


Tabela 10 - Número médio de fibras marcadas com Periferina.

Relativamente à marcação com periferina, observou-se um número maior de fibras marcadas com a utilização de enxerto de veia, com vascularização extrínseca preservada, (Grupo B) e com enxerto de membrana amniótica, sem vascularização extrínseca preservada, (Grupo F) ($p > 0,05$).

Não foram encontradas diferenças com significado estatístico entre os restantes grupos.

Densidade média de fibras marcadas com Periferina nos diferentes grupos experimentais

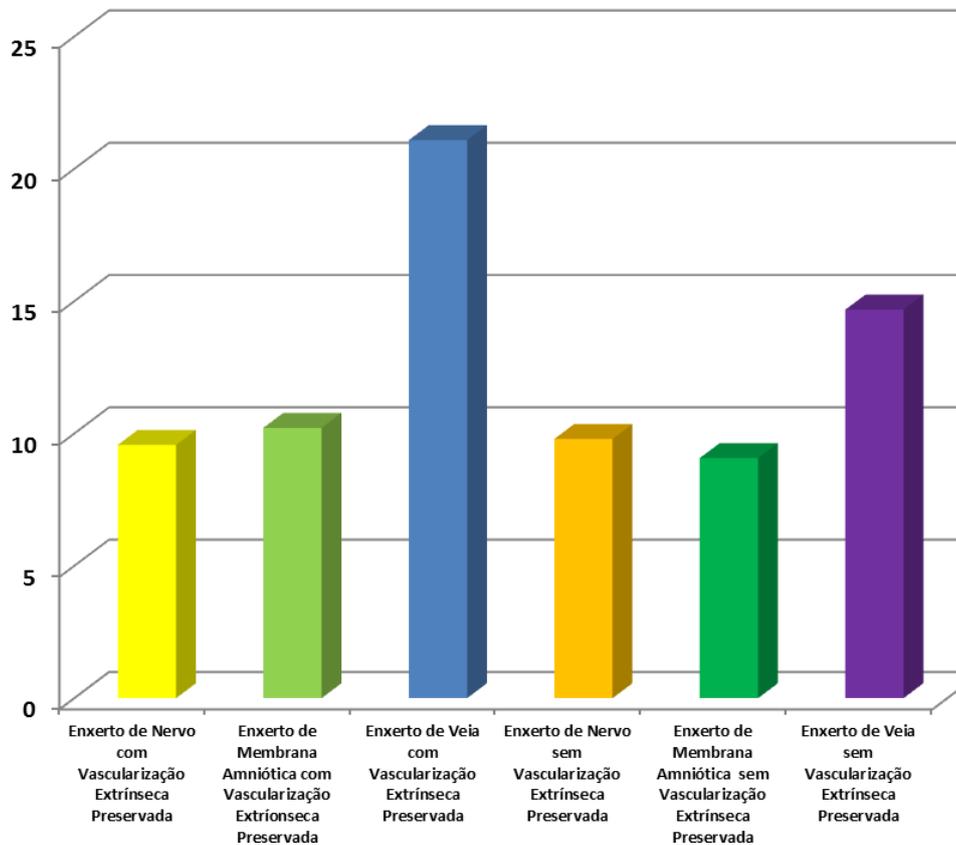


Tabela 11 - Densidade média de fibras marcadas com Periferina.

No que diz respeito à densidade de fibras marcadas pela periferina, registou-se um valor maior nas reconstruções com interposição de enxerto de veia (Grupo B, Grupo E), especialmente no grupo em que se manteve a vascularização extrínseca (Grupo B) ($p < 0,05$). Na avaliação dos restantes grupos, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas.

6.5.2.4.4. Resumo analítico da avaliação histomorfométrica

Nesta avaliação, relativamente ao número médio e à densidade média de neurofilamentos nos diferentes grupos, existe uma prevalência dos valores na reconstrução do defeito nervoso com veia autóloga, com destaque para a reconstrução em que foi preservada a vascularização extrínseca epineural. Na reconstrução com veia, sem a presença da vascularização extrínseca epineural,

verifica-se, também, uma prevalência dos valores encontrados relativamente a todos os restantes grupos.

Quanto ao número médio de fibras marcadas com Acetilcolinesterase, ou seja, de fibras mielínicas, existe uma prevalência dos: Grupo A - reconstrução do defeito nervoso com enxerto de nervo, na presença da vascularização extrínseca epineural; Grupo E - reconstrução com enxerto veia autóloga, sem vascularização extrínseca epineural preservada; e Grupo F - reconstrução com enxerto de membrana amniótica humana imunoinerte, sem vascularização extrínseca epineural preservada; existindo, contudo, uma grande proximidade dos valores entre esses três grupos.

Os valores encontrados para a densidade média das fibras marcadas com Acetilcolinesterase demonstram uma proximidade entre o Grupo A e o Grupo E. Nas contagens realizadas para contabilizar o número médio e a densidade média de fibras marcadas com Periferina ou fibras amielínicas, existe uma prevalência do Grupo B e do Grupo E, referentes à reconstrução do defeito nervoso com veia autóloga, com vascularização extrínseca epineural preservada ou sem a presença da vascularização extrínseca epineural.

É importante referir que, excluindo-se o efeito da vascularização extrínseca, constatou-se um número médio maior de fibras nas reparações com enxerto de veia (Grupo B, Grupo E) e com enxerto de membrana amniótica (Grupo C, Grupo F) do que na reparação com interposição de um enxerto de nervo (Grupo A ou Grupo D) ($p < 0,05$).

Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada com recurso ao software *SPSS 21.0*.

Para comparar os valores médios do número de fibras nervosas no nervo isquiático nos diferentes grupos, bem como os valores médios da sua densidade, recorreu-se ao teste de T-Student e à ANOVA. Considerou-se significativo um valor de $p < 0,05$.

6.6. Referências Bibliográficas

1. Rutkowski, Gregory E., e Heath, Carole A. (2002) "Development of a Bioartificial Nerve Graft. II. Nerve Regeneration in Vitro"; *Biotechnol. Prog.* 18 (2), pp. 373-379.
2. Kakinoki, R.; Ikeguchi, R.; Nakayama, K. e Nakamura, T. (2007) Functioning transferred free muscle innervated by part of the vascularized ulnar nerve connecting the contralateral cervical seventh root to the median nerve: case report. *J. Brachial Plex Peripher Nerve Inj.*, 2:18.
3. Birch, R. (2011) Clinical aspects of nerve injury. In Birch, R., ed. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*. 2.^a ed. London, Springer; pp. 161-77.
4. Birch, R. (2011) Nerve repair. In Wolfe, S.W.; Hotchkiss, R.N.; Pederson, W.C. e Kozin, S.H. ed. *Green's Operative Hand Surgery*. 6.^a ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, pp. 1035-74.
5. Dahlin, L.B. (2006) *Nerve injury and repair: from molecule to Man*. In Slutsky, D.J. e Hentz, V.R., ed. *Peripheral Nerve Surgery: Practical Applications in the Upper Extremity*. Philadelphia, Elsevier; pp. 1-22.

6. Casal, D., Gomez, M.M.; Antunes, P.; Candeias, H. e Almeida, M.A. (2013) Defying standard criteria for diital replantation: A case series. *International journal of surgery case reports*, 4:597-602.
7. Gomez, M.M. e Casal, D. (2012) Reconstruction of large defect of foot with extensive bone loss exclusively using a latissimus dorsi muscle free flap: a potential new indication for this flap. *The Journal of foot and ankle surgery: official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*, 51:215-7.
8. Dornseifer U, Fichter AM, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, et al. Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model. *Microsurgery* 2011;31:632-41.
9. Dornseifer, U.; Matiasek, K.; Fichter, M.A.; Rupp, A. e Henke, J., et al. (2007) Surgical therapy of peripheral nerve lesions: current status and new perspectives. *Zentralblatt fur Neurochirurgie*, 68:101-10.
10. Rupp, A. (2007) *Functional, electrophysiologic and morphometric evaluation of peripheral nerve regeneration after bridging a 14 mm gap in the rat sciatic nerve Munich*. Ludwig-Maximilians.
11. Varejão, A. (2003) Regeneração do Nervo Periférico: Recuperação funcional num modelo experimental. Tese de Doutorado Vila Real, Trás-os-Montes. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
12. Konofaos, P. e Ver Halen, J.P. (2013) Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *Journal of reconstructive microsurgery*, 29:149-64.
13. Lin, M.Y.; Manzano, G. e Gupta, R. (2013) Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand clinics*, 29:331-48.
14. Whitlock, E.L.; Tuffaha, S.H.; Luciano, J.P.; Yan, Y. e Hunter, D.A., et al. (2009) Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle & nerve*, 39:787-99
15. Angelica-Almeida, M.; Casal, D.; Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L. e Martins-Ferreira, J., et al. (2013) Brachial plexus morphology and vascular supply in the wistar rat. *Acta médica portuguesa*, 26:243-50.
16. Brandt, J.; Dahlin, L.B. e Lundborg, G. (1999) *Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects*. *J. Hand. Surg. Br.*, 24:284-90.
17. Millesi, H. (1981) *Bridging defects: autologous nerve grafts*. *Acta Neurochir. Suppl.*, 100:37-8.
18. Koshima IH, K. (1981) *Experimental studies on vascularized nerve grafts in rats*. *J. Microsurg.*, 2:225-6.
19. Breidenbach WT, J.K. (1984) *The anatomy of free vascularized nerve grafts*. *Clin. Plast. Surg.*, 11:65-71.
20. Jabaley, M.E. (2006) *Primary Nerve Repair*. In *Peripheral Nerve Surgery: Practical Applications in the Upper Extremity*. ed. Slutsky, D.J.; Hentz, V.R., Churchill Livingstone, pp. 23-38.
21. Rutkowski, Gregory E., e Heath, Carole A. (2002) "Development of a Bioartificial Nerve Graft. I. Design based on a Reaction-diffusion Model". *Biotechnol. Prog.* 18, pp. 362-372.
22. Hudson, Terry W.; Evans, Gregory R.D. e Schmidt, Christine E. (2000) "Engineering strategies for Peripheral Nerve Repair". *Clinica in Plastic Surgery* 26, pp. 485-497.
23. Maira Angelica Almeida; M. Manuel Mouzinho; Joao Anacleto; Teresa Ramos; Laura Silva (2002). Repair of Rat Sciatic Nerve Gaps with Human Amniotic Membrane Tube, and Using Interposition of Autologous Vein Conduits. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 18(3): Abstracts-Part I, pp. 203-258.
24. Mligiliche, Nurru; Endo, Katsuaki; Okamoto, Keiko; Fujimoto, Etsuko e Ide, Chizuka (2002) "Extracellular matrix of Human Amnion Manufactured into Tubes as Conduits for Peripheral Nerve Regeneration". *J. Biomed Mater Res.* 63, pp. 591-600.
25. Mohammad, Jamal; Shenaq, Jay; Rabinovsky, Eric e Shenaq, Saleh (2000) "Modulation of Peripheral Nerve Regeneration: A Tissue-Engineering Approach. The Role of Amnion Tube Nerve Conduit Across a 1-Centimeter Nerve Gap". *Plast. Reconstr. Surg.* Feb.105, pp. 660-666.
26. Mohammad, J.A.; Warnke, P.H.; Pan, Y.C. e Shenaq, S. (2000) "Increased axonal regeneration through a biodegradable amniotic tube nerve conduit: effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid medi.a" *Ann. Plast. Surg.* 44, pp. 59-64.
27. Keskin M.; Akbas, H.; Uysal, O.A.; Canan, S.; Ayyldz, M., et al. (2004) Enhancement of nerve regeneration and orientation across a gap with a nerve graft within a vein conduit graft: a

- functional, stereological, and electrophysiological study. *Plastic and reconstructive surgery*, 113:1372-9.
28. Angélica-Almeida M. (2011) *Cirurgia dos Nervos Periféricos*. In Patrício JAB, ed. *Microcirurgia: Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental*. 1.^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 101-14.
 29. Pu, L.L.; Syed, S.A.; Reid, M.; Patwa, H. e Goldstein, J.M., et al. (1999) Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. *Plastic and reconstructive surgery*, 104:1379-85.
 30. Chiu, D.T. e Strauch, B. (1990) A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plastic and reconstructive surgery*, 86:928-34.
 31. Stahl, S. e Rosenberg, N. (1999) *Digital nerve repair by autogenous vein graft in high-velocity gunshot wounds*. *Military medicine*, 164:603-4.
 32. Duan, X.L.; Xu, Y.Z. e Zeng, Z.C. (2004) [Bridging rat sciatic nerve defects with the composite nerve-muscle autografts wrapped with human amnion matrix membrane]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban. Journal of Central South University Medical Sciences*, 29:279-83.
 33. Angélica-Almeida, M.; Casal, D.; Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L.; Martins-Ferreira, J., Ferraz-Oliveira, M.; Pais, D.; Amarante, J. e Goyri-O'Neill, J. (2014) *Angiomorphological comparison of the sciatic nerve of the rat and the human median nerve: implications in experimental procedures*. *Archives of Anatomy*, 2 (1):31-51.
 34. Hellebrekers LJB, L.H. e Flecknell, P.A. (2001) *Anaesthesia, analgesia and euthanasia*. In *Principles of Laboratory Animal Science*. ed. Van Zutphen, L.F.; Baumans, V.; Beynen, A.C. Elsevier; pp. 277-311.
 35. Esperança-Pina, J.A. (1979) *Territórios arteriais esplénicos*. Bases anatomo-experimentais das esplenectomias parciais. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
 36. Goyri O'Neill, J. (1983) *Vascularização da Placenta Humana*. Tese de Doutoramento apresentada na Faculdade de Ciências Médicas, pp. 33-41.
 37. Esperança-Pina, J.A. (1973) *Circulação venosa cardíaca*. Estudo anatomo-experimental. 2.^a ed. Edição do autor, Lisboa.
 38. Correia M. (1983) *Vascularização arterial do rim*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
 39. Pais, D. (1995) *Vascularização arterial e microvascularização testículo-epididimária*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, FCM.
 40. Brown, C.J.; Mackinnon, S.E.; Evans, P.J.; Bain, J.R. e Makino, A.P., et al. (1989) *Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index*. *Microsurgery*, 10:226-35.
 41. Angélica-Almeida, M.; Casal, D.; Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L.; Silva, E.; Farinho, A.; Iria I.; Martins-Ferreira, J.; Ferraz-Oliveira, M.; Videira, P.; Vassilenko, V.; Amarante, J. e Goyri-O'Neill, J. (2014) *Evaluation of the efficacy of different conduits to bridge a 10 millimeter defect in the rat sciatic nerve in the presence of an axial blood supply*. *Archives of Anatomy*, 2(1):8-30.
 42. Geuna, S.; Tos, P.; Battiston, B.; Guglielmone, R. e Giacobini-Robecchi, M.G. (2000c) Morphological analysis of peripheral nerve regenerated by means of vein grafts filled with fresh skeletal muscle. *Anatomy and Embryology* 201, pp. 475-482.
 43. Geuna, S.; Tos, P.; Guglielmone, R.; Battiston, B. e Giacobini-Robecchi, M.G. (2001) *Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves*. *Anatomy and embryology*, 204:1-10.
 44. Palomero-Gallagher, N. e Zilles, K. (2004) *Isocortex*. In Paxinos, G. ed. *The rat nervous system*. 3.^a ed. Sydney, Australia. Elsevier, pp. 729-57.
 45. Jivan, S.; Novikova, L.N.; Wiberg, M. e Novikov, L.N. (2006) *The effects of delayed nerve repair on neuronal survival and axonal regeneration after seventh cervical spinal nerve axotomy in adult rats*. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, 170:245-54.

Capítulo 7

7.1. Discussão

Pensamos que a discussão dos vários temas a que se dedicou este estudo deverá ser feita individualmente, em subcapítulos, pois embora os temas se relacionem entre si, existem aspectos particulares e importantes de cada um que deverão ser destacados.

Assim, dividiu-se a discussão em três subcapítulos:

1 - A vascularização do nervo mediano humano e a comparação com a vascularização do nervo isquiático do rato Wistar;

2 - A vascularização do Plexo Braquial do rato Wistar;

3 - Regeneração de defeito de nervo periférico com a utilização de diferentes condutos e na presença de um fornecimento vascular axial; modelo animal: o rato Wistar.

7.1.1. A vascularização do nervo mediano humano e a comparação com a vascularização do nervo isquiático do rato Wistar

Comparando o nosso conjunto de 30 ratos dissecados e de 26 cadáveres humanos, com os 34 ratos dissecados reportados por Bell e Weddell (1984), e com os 4 cadáveres usados no estudo de Taylor (2006) da vascularização dos nervos do membro superior, verificamos que o conjunto presente é o maior da literatura, particularmente quando se fala da vascularização do nervo isquiático do rato e do nervo mediano humano.^{1,2,3,4} É interessante ainda verificar que a maior parte das nossas descobertas relativamente à composição dos vasos sanguíneos destes dois nervos coincidem com estas e outras referências relativamente à composição dos vasos destes dois nervos.^{1, 5,6,7-12}

Durante o estudo da vascularização do nervo isquiático do rato Wistar e do nervo mediano humano pela dissecção, deparámo-nos com uma dificuldade relacionada com o facto de não termos conseguido avaliar, precisamente, a localização e a medida de todos os vasos individuais que suprimiam o nervo isquiático do rato e o nervo mediano humano, o que se deveu à extrema fragilidade e ao pequeno diâmetro de muitos destes vasos, o que, por sua vez, impediu a preservação da sua integridade durante a dissecção. Esta dificuldade foi referida por muitos autores que estudaram a vascularização dos nervos.^{1,6,9,13,14}

Contudo, a finalidade em estudar a macro e microvascularização do nervo isquiático do rato e do nervo mediano humano nunca foi alcançada antes. Este conhecimento é um dos mais relevantes para propósitos experimentais.^{1,6,15,16,17} O nosso estudo permitiu-nos compreender que tanto o nervo mediano humano como o nervo isquiático do rato recebem vários ramos dos vasos sanguíneos

próximos e dos vasos sanguíneos que fornecem os músculos vizinhos, especialmente onde os nervos originam ramos para os músculos. A sua microvascularização é, também, muito semelhante.

É importante referir que a principal diferença entre o nosso estudo e muitos dos estudos clássicos feitos em relação ao nervo isquiático do rato Wistar e ao nervo mediano humano é a descoberta, nos espécimes que analisámos, da importância dos vasos que suprimem os músculos vizinhos para a vascularização de ambos. Este facto foi recentemente, de uma forma clara, demonstrado pelo grupo de Taylor nos espécimes de cadáver humano, mas tem sido largamente ignorado por outros autores, particularmente no contexto de estudos anatómicos humanos.^{1-7,18,19}

Estas descobertas podem ser de um grande valor experimental clínico, pois muitos problemas clínicos afectam o nervo mediano, tais como as síndromes compressivas que estão largamente associados à isquemia do nervo.²⁰⁻²⁴ Por exemplo, estes dados anatómicos sugerem que o cirurgião, ao efectuar neurólises, poderá, com grande probabilidade, provocar lesões nos pequenos vasos que acompanham os ramos nervosos nas estruturas adjacentes.²⁵

Outra consequência desta informação é que, contrariamente ao ensino tradicional, durante a tentativa de avanço dos topos proximais e distais para ligar um hiato de nervo é, provavelmente, imprudente excluir os pequenos ramos nervosos musculares emitidos pelas duas extremidades do nervo na vizinhança do defeito, pois este procedimento exclui também os vasos sanguíneos nutritivos dos segmentos do nervo.^{25,26} Isto pode, de facto, levar a um agravamento da isquemia, condenando a reparação nervosa a uma taxa de sucesso inferior àquela que se poderia obter usando-se retalhos nervosos vascularizados, ou seja, através da vascularização individual preservada.²⁷

Por sua vez, isto pode ajudar a explicar os melhores resultados que são referidos por vários autores quando se usam retalhos nervosos para reparar os defeitos nervosos em situações de isquemia relativa, ou em casos de grandes áreas de fibrose ou em áreas que foram submetidas previamente a radioterapia.^{1,6,16}

A classificação de Taylor foi, inicialmente, idealizada para contribuir para a possibilidade de uma transferência nervosa com retalho livre.² Todavia, essa classificação, está a aumentar o seu uso como um método prático para fornecer informação relativa à vascularização dos nervos. Nesta classificação, o tipo A refere-se a um nervo não-ramificado e suprimido de forma segmentar por um vaso em paralelo; o tipo B a um nervo ramificado suprimido da mesma maneira que o de tipo A; o tipo C a um nervo não-ramificado com um longo pedículo vascular cursando no epinervo; o tipo D a um nervo não-ramificado com múltiplos pedículos vasculares com origem em diferentes vasos; e o tipo E a um nervo ramificado com vascularização análoga à do tipo D.

De acordo com esta classificação, no presente estudo, o nervo mediano segue um padrão de tipo A no braço, um padrão de tipo E no antebraço proximal e distal, e um padrão de tipo C no antebraço médio. O nervo isquiático do rato, no dorso da coxa, onde este é mais frequentemente usado na experimentação, era um nervo de tipo D. É importante salientar ainda que a vascularização do plexo epineural do nervo isquiático do rato, na área dorsal da coxa, é semelhante à vascularização do plexo epineural do nervo mediano humano no antebraço, mas significativamente diferente da do braço e da mão.

Isto deverá ser tido em conta quando se realizam procedimentos experimentais que impliquem a dissecação do nervo isquiático do rato para avanços do nervo, ou na sua transferência à distância, particularmente, quando a finalidade é a extrapolação dos resultados para a espécie humana. No todo, o trabalho presente coincide com a literatura publicada previamente em que o nervo isquiático do rato Wistar é semelhante ao nervo mediano humano nos aspectos basais anatómicos e fisiológicos, inclusive em relação ao padrão geral da vascularização.⁵

7.1.2. Vascularização do Plexo Braquial do Rato Wistar

O estudo sistemático da anatomia do PB data do século dezanove, com o trabalho de J. F. Wash, que caracterizou a “normal variedade” do PB com base num estudo extensivo de dissecação.²⁸ A estes estudos juntaram-se outros, especialmente os de Herringham, Kerr, Wilfred Harris, Ruth Miller, Alnot Hueten, Narakas, Bonnel, Adolphi and Ko Hirasawa, e, mais recentemente, Pandey and Shukla.²⁹⁻³⁷ Estes trabalhos documentaram largamente a grande variabilidade dos constituintes do PB.³⁸⁻⁴¹ Pelo contrário, os estudos morfológicos do PB do rato são muito escassos.^{38,42}

É interessante que, tal como Green e Chiasson, analisámos o facto de que o PB nesta espécie era formado por anastomoses entre os ramos ventrais de C4 a T2 na maioria das espécies.^{38,43} Isto contrasta com o trabalho de Bertelli que nega o contributo de T2 na génese do PB do rato, depois de ter dissecado 42 espécimes.³⁸ Também, em contraste com o trabalho deste último autor e em concordância com os dois primeiros referidos, verificámos que o PB do rato pode ser significativamente diferente do humano em vários aspectos, nomeadamente o facto de não ser facilmente divisível em troncos lateral, medial e posterior, e de ter, frequentemente, origens diferentes nos seus ramos terminais e laterais (Figura1).^{38,43}

Relativamente às diferenças nos ramos terminais do PB do rato, o nervo mediano, por exemplo, tipicamente originado em três raízes derivadas de C7 a T2, é, sem dúvida, o ramo mais espesso do PB do rato. Nos humanos, o nervo mediano é usualmente formado pela junção da corda medial e lateral.⁴⁴ Além disso, na ausência da corda posterior no PB do rato, o nervo axilar e o nervo radial têm origem em ramos dorsais separados das raízes nervosas de C4-C6 e de C7-C8, respetivamente. Nos humanos, os nervos axilares e radial derivam da corda posterior.⁴⁵

A ausência comum desta corda no rato também determina que os nervos subescapulares superior e inferior, bem como o nervo toracodorsal, que usualmente são provenientes da corda posterior nos humanos, tenham uma origem diferente no rato.⁴⁶ Assim, nos conjuntos que estudámos, o nervo subescapular superior era usualmente originado nas raízes C5-C6, enquanto os nervos subescapular inferior e o toracodorsal derivavam da raiz nervosa C7. Contudo, tendo em consideração que todos os conjuntos mencionados, tal como este, são relativamente pequenos, acreditamos que é necessário mais estudos para clarificar a anatomia do PB do rato.

Nos animais, em particular nos ratos, o estudo da vascularização dos nervos é muito limitada.^{38,42,47-50} De qualquer modo, este conhecimento pode ser de grande utilidade, definindo e implementando técnicas cirúrgicas que envolvem o PB e os seus ramos colaterais e terminais.⁴⁷

Borelli *et al.* apresentaram o maior estudo que conseguimos encontrar na literatura sobre a vascularização do PB do rato.³⁸ Contudo, o relato destes autores era baseado exclusivamente na vascularização macroscópica dos nervos depois de se injectar uma solução corada de látex no sistema arterial de 10 ratos.³⁸ Por conseguinte, no nosso ponto de vista, este estudo presentemente desenvolvido, que envolve 30 ratos, representa o maior trabalho publicado sobre a macro e micro vascularização do PB do rato e seus ramos.

Uma das principais limitações do presente trabalho foi, sobretudo, de natureza qualitativa. De facto, não tivemos os recursos apropriados para efectuar uma avaliação detalhada do calibre dos vasos que vascularizam os constituintes do PB do rato Wistar. De qualquer modo, esse conhecimento não é indispensável para a realização de cirurgias no PB do rato. Além disso, este assunto não foi referido por outros autores. Assim, esta limitação no conhecimento da vascularização do PB do rato requer a realização de mais estudos.

Nos humanos, o primeiro e maior contribuidor para o conhecimento da vascularização dos nervos periféricos foi Sir Sydney Sunderland.^{1,6,14} Este autor concluiu, depois de estudar cuidadosamente a topografia e a morfologia dos vasos *nervorum*, que a localização, o número e o calibre destes vasos era muito variável.^{1,6,14} Sunderland resumiu as suas descobertas afirmando que nenhum vaso na vizinhança de um nervo enviaria ou receberia ramos desse nervo.^{1,6,14}

Recentemente, o grupo de Taylor referiu que, nos humanos, os nervos do membro superior e inferior não acompanhados por vasos dominantes recebem um contributo importante de vasos que vascularizam os músculos vizinhos.^{1,6} De acordo com este autor, isto aconteceria algumas vezes, mesmo quando existissem grandes vasos nutrientes vizinhos, com pequenos vasos a interligar o sistema longitudinal anastomótico do nervo e a vascularização para o músculo.^{1,6} Neste estudo, confirmaram-se as conclusões de Sunderland e de Taylor que dão um grande suporte para o uso do rato como modelo para o estudo de lesões isquémicas do sistema nervoso periférico.

Existem alguns dados que revelam que enxertos nervosos vascularizados (também conhecidos como “retalhos nervosos”) podem ser superiores ao tradicional enxerto nervoso (desprovido da sua própria vascularização) em várias situações, especialmente se a vascularização local for precária.^{1,6,12} Estes enxertos nervosos vascularizados podem promover a invasão do enxerto nervoso por macrófagos que estimulam a remoção de fragmentos de mielina e que contribuem para a manutenção das células de Schwann, que, por sua vez, poderão tornar a regeneração nervosa mais rápida e completa.⁵¹

Observámos ainda que vários dos ramos do PB eram acompanhados por vasos sanguíneos relativamente largos e constantes que suprimiam o seu plexo epineural, tornando possível levantar estes nervos como retalhos nervosos. Além disso, este trabalho sugere que os seguintes componentes do PB podem ser mobilizados como retalhos: o nervo toracodorsal no tórax lateral; o nervo medial peitoral e o nervo lateral peitoral na parte ventral do tórax; o nervo medial braquial cutâneo no braço; o nervo radial na parte dorsal do braço; o nervo musculocutâneo entre as duas

cabeças do músculo bicípite braquial; o nervo mediano a nível do antebraço; e o nervo ulnar no braço.

A utilidade experimental de alguns destes retalhos é muito prometedora. Por exemplo, o nervo medial braquial cutâneo pode ser utilizado como um modelo para retalhos nervosos sensitivos e os nervos peitoral medial e lateral e o nervo toracodorsal podem ser modelos predominantemente de retalhos nervosos motores.⁴¹ A maioria dos outros nervos mencionados acima podem ser ainda usados como retalhos nervosos mistos.

Bertelli *et al.* tinham já referido a possibilidade do uso dos nervos ulnar e medial braquial cutâneo e antebraquial cutâneo como retalhos dos nervos.¹⁴ Contudo, tanto quanto os autores puderam determinar, o conceito do uso dos restantes nervos como retalhos nervosos era ainda novo na literatura. Esta informação poderá ser usada, por exemplo, para comparar a eficácia da reparação nervosa utilizando-se, ora retalhos nervosos motores, ora sensitivos, ora mistos, no modelo do rato Wistar.

7.1.3. Reconstrução de Defeito no Nervo Periférico através da utilização de diferentes condutos e na presença de um fornecimento vascular axial; modelo animal: o rato Wistar

No rato Wistar, a seguir à neurotome, há um período de latência de 1 a 4 dias depois do qual inicia-se um auto-crescimento axonal a partir do topo nervoso proximal, numa velocidade de 3 milímetros por dia.⁵² Estes valores são normalmente maiores do que os registados na espécie humana, onde a fase de latência é, em média, de 9 dias e a velocidade máxima de crescimento axonal é apenas de 1 a 2 milímetros por dia.⁵²

O defeito nervoso criado neste estudo foi de 10 mm de comprimento e a distância do topo nervoso proximal até ao músculo gêmeo foi de 15 mm.⁵² Daí que, teoricamente, o período de 12 semanas de observação usado neste estudo tenha sido adequado para uma avaliação apropriada da regeneração nervosa no nosso modelo.⁵² De facto, de acordo com a literatura, na maioria das experimentações da regeneração nervosa no modelo do isquiático do rato, as avaliações são feitas ao fim de 12 semanas, com avaliações intermédias na 4.^o e 8.^o semanas, como neste projeto.^{5,52}

Este trabalho experimental demonstra que tanto o enxerto de veia autóloga como o enxerto de membrana amniótica humana imunoinerte, associados com os vasos sanguíneos locais, ou seja, preservado o plexo epineural, podem ser usados para reparar um defeito nervoso de 1 cm no nervo isquiático do rato de forma tão efectiva como o auto-enxerto de nervo, que é, hoje em dia, a opção cirúrgica *standard* para estes defeitos.^{20,21,53} De facto, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais relativamente aos parâmetros estruturais e funcionais que foram avaliados, com excepção da percentagem do peso recuperado dos músculos gêmeos e solhar, que foi de uma forma significativa mais elevada no grupo C do que no grupo A.

Seguindo a “teoria da especificidade do fascículo”, seria melhor adoptarem-se guias ou condutos nervosos do que enxerto nervosos ou mesmo suturas nervosas directas quando a topografia dos fascículos não pode ser clinicamente determinada, o que é muito frequentemente.^{5,54} Isto deve-se ao facto de que os axónios motores no segmento proximal do nervo crescem espontaneamente e preferencialmente em direcção aos axónios motores no segmento distal do nervo, se não estiverem bloqueados por outro tipo de axónios.^{5,54,55} Neste sentido, o enxerto de veia autóloga e o tubo de membrana amniótica humana seriam ideais.⁵

De acordo com a literatura, estes tubos oferecem várias vantagens adicionais, nomeadamente: contêm factores neurotróficos importantes; são biocompatíveis; parecem causar uma resposta imunitária muito baixa ou mesmo nula; são flexíveis e, por isso, facilmente adaptáveis aos difíceis acessos das feridas; e estão prontamente disponíveis ou são facilmente manufacturados em diferentes tamanhos ou diâmetros, permitindo o melhor ajuste ao defeito nervoso.⁵⁶⁻⁶²

O uso da membrana amniótica foi reportado na literatura, pela primeira vez, na reconstrução do nervo periférico em 2000.⁵⁹ Sabe-se que, desde então, apenas mais dois estudos experimentais foram dirigidos tendo esta opção como objeto de análise.^{63,66} Um destes artigos avalia a preparação e a integração de condutos nervosos com membrana amniótica humana tratada pela fotoquímica. O outro artigo refere a utilidade de incluir a membrana amniótica dentro de condutos para enxertos nervosos compostos ou “nervo-músculo”.^{63,64} Adicionalmente, têm existido referências no uso da membrana amniótica humana para prevenir e tratar aderências perineurais.⁶⁵⁻⁶⁸

Neste estudo, a membrana amniótica usada é consideravelmente diferente da membrana referida nesses estudos, pois tem como característica relevante o facto de ser imunoinerte, estando assim preservada qualquer reacção imunológica adversa, de acordo com os trabalhos que fizemos anteriormente.^{60,69} Esta característica da membrana amniótica humana usada neste estudo foi reconfirmada pela imunohistoquímica efectuada nos animais do grupo C, à semelhança do que havia sido feito nos animais do grupo F do estudo anterior, confirmando-se a presença da membrana amniótica até às 12 semanas de pós-operatório.^{60,69} Portanto, parece que a membrana amniótica forma uma barreira à volta dos axónios em crescimento, prevenindo possíveis aderências às estruturas vizinhas.

O uso de enxertos de veia autóloga para a reparação do nervo periférico, por outro lado, foi mencionado na literatura pela primeira vez em 1982.⁷⁰ Desde então, numerosos estudos têm indicado estes condutos na experimentação e na clínica.^{47,61,62,71-81} Os enxertos de veia têm sido combinados com factores de crescimento, células estaminais e pedaços de músculos no interior dos tubos para promover melhor a recuperação nervosa.^{61,62,63,64,71-83} Contudo, determinamos que esta é a primeira vez que os condutos de membrana amniótica imunoinerte e o enxerto autólogo de veia foram deliberadamente associados com os eixos vasculares vizinhos (o plexo extrínseco preservado) para obter o grau de recuperação nervosa, em comparação com o tradicional enxerto de nervo.^{57,58,60 80,84}

Além disso, histologicamente, estas duas opções ficaram associadas a uma estrutura morfológica perto da equivalente do nervo normal, distal à reparação nervosa, e mesmo na ponte (enxerto) da reparação do defeito nervoso, particularmente no que diz respeito à vascularização do nervo periférico.⁸³

Os resultados que obtivemos com os métodos que usámos para a avaliação da recuperação funcional e para a avaliação da regeneração morfológica pela morfometria levam-nos também a concordar com os estudos de alguns autores que encontraram uma correlação entre a recuperação funcional e a regeneração morfológica, avaliada pela morfometria dos nervos regenerados.^{5,85} Isto permite um maior suporte para o uso clínico destes dois condutos na reparação de, pelo menos, defeitos nervosos pequenos. Apesar de, em termos médios, o defeito de 10 mm criado no nervo isquiático do rato Wistar corresponder a cerca de $\frac{1}{4}$ do comprimento normal do nervo do rato, devem ser realizados mais estudos para demonstrar se os defeitos nervosos maiores poderão ser reparados de uma maneira semelhante, com sucesso, com a metodologia aqui utilizada.

7.2. Conclusões e Perspetivas de Futuro

Apesar dos grandes avanços nas técnicas de microcirurgia e do uso de material cirúrgico sofisticado na cirurgia de reconstrução de lesão do nervo periférico, ainda não se atingiu um grau de regeneração com uma recuperação funcional coincidente com a função normal. O objectivo primordial desta tese foi o de estudar a vascularização do nervo periférico e a forma como esta poderia influenciar a regeneração do nervo periférico.

Nos capítulos 3 e 5 sobre o estudo da vascularização do nervo mediano humano e sobre o estudo da vascularização do nervo isquiático do rato Wistar, concluímos que, o nervo isquiático do rato é semelhante ao nervo mediano humano nos aspectos basais anatómicos e fisiológicos, inclusive no que diz respeito ao padrão geral da vascularização. O nervo mediano humano e o nervo isquiático do rato são, pois, muito similares em relação à vascularização. É importante sublinhar que esta homologia suporta o uso do nervo isquiático do rato como um modelo experimental adequado para lesões do nervo mediano humano.

É também importante sublinhar que a principal diferença entre o nosso estudo e outros estudos semelhantes é o facto de termos constatado a importância que os vasos que suprimem os músculos vizinhos têm para a vascularização dos nervos isquiático do rato Wistar e do nervo mediano humano.

Com estes conhecimentos podem ser sugeridos e planeados enxertos nervosos vascularizados para a reconstrução do nervo periférico lesado, porque esse tipo de enxertos poderão tornar a regeneração nervosa mais rápida e mais completa.

O Capítulo 4 sobre a “Vascularização do Plexo Braquial do Rato Wistar” permite-nos verificar que a vascularização do BP do rato não é muito diferente da reportada na espécie humana, embora morfológicamente, o PB do rato seja um pouco diferente do PB humano. O suprimento arterial e venoso do PB do rato deriva directa ou indirectamente dos vasos vizinhos. Estes vasos formam plexos vasculares densos e interligados no epinervo, no perinervo e no endonervo.

Várias componentes do PB do rato são acompanhadas, durante um trajecto relativamente longo, por vasos sanguíneos relativamente calibrosos e constantes que fornecem o seu plexo

epineural, tornando possível o seu levantamento como retalhos nervosos. Assim, embora a morfologia do PB do rato não seja exactamente idêntica à humana, ele partilha uma homologia significativa. No entanto, a sua vascularização não é significativamente diferente do padrão descrito na espécie humana, tornando-o um modelo útil para estudos experimentais da patologia e tratamento dos nervos periféricos.

Este trabalho sugere que várias componentes do PB do rato podem ser usadas como retalhos nervosos, incluindo as fibras nervosas motoras, sensitivas ou mistas. Esta informação pode facilitar, de futuro, novos procedimentos experimentais neste modelo animal, por exemplo, para comparar a eficácia da reparação nervosa usando retalhos nervoso motores, ou sensitivos ou mistos no rato Wistar. Estes novos procedimentos experimentais são importantes pela sua possibilidade de aplicação na clínica.

No capítulo 6, este trabalho experimental demonstrou que o enxerto de veia autóloga e o tubo de membrana amniótica humana imunoinerte poderiam ser usados para reparar um defeito nervoso de 1 cm no nervo isquiático do rato Wistar, na presença da vascularização axial vizinha, com bons resultados na recuperação funcional e na morfologia normal do nervo, incluindo a vascularização. Sabe-se que a partir do segmento proximal da lesão nervosa, os neurónios iniciam a regeneração em direcção ao segmento distal. Uma vantagem de usar um conduto de nervo em vez de um auto-enxerto de nervo é a de que os axónios em regeneração irão migrar, sem a obstrução dos fascículos do auto-enxerto de nervo.

É também importante salientar que a reconstrução nervosa usando estes dois tubos mostrou uma arquitectura típica do nervo, incluindo uma distribuição normal endoneural, perineural e epineural dos vasos sanguíneos.

Verificámos também que a membrana amniótica humana imunoinerte é bem tolerada como tubo, persistindo ainda à volta do crescimento nervoso até às 12 semanas. Isto pode evitar aderências nervosas, o que é também um aspecto interessante de aplicação desta membrana na clínica.

É fundamental o conhecimento pormenorizado da macro e da microvascularização do nervo periférico para a compreensão da sua influência na regeneração nervosa e para se descrever novas técnicas cirúrgicas para a reconstrução do nervo periférico lesado, com melhores resultados na recuperação funcional. Falando-se de perspectivas futuras, o tema desta tese é um ponto de partida para a continuação da investigação nesta matéria para se alcançar resultados melhores na resolução da patologia da lesão do nervo periférico, algo tão frequente na prática clínica.

7.3. Referências Bibliográficas

1. Hong, M.K. e Taylor, G.I. (2006) Angiosome territories of the nerves of the upper limbs. *Plast. Reconstr. Surg.*,118:148-60.
2. Taylor, G.I. (1999) *Free vascularized nerve transfer in the upper extremity*. Hand clinics, 15:673-95, ix-x.

3. Bell, M.A. e Weddell, A.G. (1984) *A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve*. *Muscle Nerve*, 7:524-34.
4. Bell, M.A. e Weddell, A.G. (1984) A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain: a journal of neurology*, 107 (Pt 3), pp. 871-98.
5. Varejão A. (2003) Regeneração do Nervo Periférico: Recuperação funcional num modelo experimental. Tese de Doutorado Vila Real, Trás-os-Montes. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
6. Suami, H.; Taylor, G.I. e Pan, W.R. (2003) Angiosome territories of the nerves of the lower limbs. *Plast. Reconstr. Surg.*, 112:1790-8.
7. Taylor, G.I.; Bates, D. e Newgreen, D.F. (2001) The developing neurovascular anatomy of the embryo: a technique of simultaneous evaluation using fluorescent labeling, confocal microscopy, and three-dimensional reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 108:597-604.
8. Lundborg, G. (1975) Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *The Journal of bone and joint surgery*, American vol.1975, 57:938-48.
9. Lundborg, G. (1988) *Intraneural microcirculation*. *The Orthopedic clinics of North America*, 19:1-12.
10. Lundborg, G. (1982) Ischemic tissue injury-peripheral nerves. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*. Supplementum, 19:10-5.
11. Lundborg, G. (1979) The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *The Journal of hand surgery*, 4:34-41.
12. Nakajima, H.; Imanishi, N.; Fukuzumi, S.; Minabe, T. e Aiso, S., et al. (1998) Accompanying arteries of the cutaneous veins and cutaneous nerves in the extremities: anatomical study and a concept of the venoadipofascial and/or neuroadipofascial pedicled fasciocutaneous flap. *Plastic and reconstructive surgery*, 102:779-91.
13. Sunderland, S. (1945) Blood supply of peripheral nerves; practical considerations. *Arch. Neurol. Psychiatry*, 54:280-2.
14. Adams, W.E. (1942) The blood supply of nerves: I. Historical review. *Journal of anatomy*, 76:323-41.
15. Terzis, J.K.; Skoullis, T.G. e Soucacos, P.N. (1995) *Vascularized nerve grafts*. A review. *Int. Angiol.*, 14:264-77.
16. Breidenbach, W. e Terzis, J.K. (1984) *The anatomy of free vascularized nerve grafts*. *Clin. Plast. Surg.*, 11:65-71.
17. el-Barrany, W.G.; Marei, A.G. e Vallee, B. (1999) Anatomic basis of vascularised nerve grafts: the blood supply of peripheral nerves. *Surgical and radiologic anatomy*. SRA, 21:95-102.
18. Sunderland, S. (1991) *Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal*. 1.^a ed. New York, Churchill Livingstone, pp. 53.
19. Millesi, H. (1979) Microsurgery of Peripheral Nerves. *World Journal of Surgery*, 3:67-79.
20. Dahlin, L.B. (2006) Nerve injury and repair: from molecule to man. In D.J. S, Hentz VR, ed. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. 1.^a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; pp. 1-22.
21. Szabo, R.M. e Koo, J.T. Compression neuropathies of the median nerve. In D.J. S, Hentz VR, ed. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. 1.^a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, pp. 219-41.
22. Mackinnon, S.E. e Novak, C.B. (2011) Compression neuropathies. In Wolfe, S.W.; Hotchkiss, R.N.; Pederson, W.C. e Kozin, S.H., ed. *Green's operative hand surgery*. 6.^a ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, pp. 977-1014.
23. Pais, D.; Casal, D.; Santos, A. e Goyri-O'Neill, J. (2010) A variation in the origin of the median nerve associated with an unusual origin of the deep brachial artery. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 27:35-8.
24. Lundborg, G. (1970) Ischemic nerve injury. Experimental studies on intraneural microvascular pathophysiology and nerve function in a limb subjected to temporary circulatory arrest. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery Supplementum*, 6:3-113.
25. Birch, R. (2011) *Nerve repair*. In Wolfe, S.W.; Hotchkiss, R.N.; Pederson, W.C. e Kozin, S.H., ed. *Green's Operative Hand Surgery*. 6.^a ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 1035-74.

26. Yanase, Y. (2004) *Micronerve suture and graft in the rat*. In Tamai, S.; Usui, M. e Yoshizu, T. (2004) ed. *Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery*. 1.^a ed. Japan, Springer-Verlag, pp. 44-51.
27. Jabaley, M.E. (2006) *Primary Nerve Repair*. In *Peripheral Nerve Surgery: Practical Applications in the Upper Extremity*. Editores Slutsky, D.J.; Hentz, V.R., Churchill Livingstone, pp. 23-38.
28. Ferreira, A.C. (1988) *Lesões do Plexo Braquial*. Tese de Doutorado Apresentada na Faculdade de Medicina de Lisboa, pp. 31-58.
29. Bonnel FA, Y.; Bruner, P. et al. (1980) *Anatomical and surgical principles of the brachial plexus in newborn children*. 2:12. *Int. J. Microsurg.*
30. Bonnel, F. (1977) *Configuration interne histophysiologique du plexus brachial*. *Ver. Chir. Orthop*, 63:35.
31. Pandey, S.K. e Shukla, V.K. (2007) *Anatomical variations of the cords of brachial plexus and the median nerve*. *Clin. Anat.*, 20:150-6.
32. Herringham, W.P. (1886) *Minute anatomy of the brachial plexus*. *Proc. R. Soc. Lond.*, 41:423.
33. Kerr, A.T. (1918) *The brachial plexus of nerves in man, the variations in its formation and its branches*, *Am. J. Anat.*, 23:285.
34. Harris, WL, V.W. (1939) *The importance of accurate muscle analysis in lesions of the brachial plexus*. *Br. Med.*, 2:1035.
35. Miller, R.A. (1939) *Observation upon the arrangement of the axillary and brachial plexus*. *Am. J. Anat.*, 64:143.
36. Alnot JYH, B. (1977) *La systématisation du plexus brachiale*. *Ver. Chir. Orthop.*, 63:27.
37. Narakas, A. (1977) *The surgical management of brachial plexus injuries*. Vol. 1 Ch. 9, In *Reconstructive Microsurgery*, ed. Daniel, R.K.; Terzies, pp. 443.
38. Bertelli, JAS, A.; Pecot-Dechavassine, M. (1995) *The rat brachial plexus an its terminal branches: an experimental model for the study of peripheral nerve regeneration*. *Microsurgery*, 16:77-85.
39. Greene, E.C. (1959) *Anatomy of the rat*. New-York, Hafner.
40. Bertelli, J.A. (1991) *Reconstruction of the rat brachial plexus: Anatomico-morphological basis and functional evaluation*. 5.^o International Congress of Hand Surgery, European Medical Bibliography of Hand Surgery (Suppl.), 1:264
41. Riva, N.; Domi, T.; Lopez, I.D. e Triolo D, Fossaghi A., et al. (2012) *The brachial plexus branches to the pectoral muscles in adult rats: morphological aspects and morphometric normative data*. *Frontiers in neuroanatomy*, 6:41.
42. Green, C.E. (1968) *Anatomy of the Rat*. 1.^o ed. New-York, Hafner Publishing Company, 124-153.
43. Chiasson, R.B. (1980) *Laboratory anatomy of the white rat*. USA, William C. Brown Company Publishers, 124-127.
44. Pais, D.; Casal, D.; Santos, A. e Goyri-O'Neill, J. (2010) A variation in the origin of the median nerve associated with an unusual origin of the deep brachial artery. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 27:35-8.
45. Pandey, S.K. e Shukla, V.K. (2007) *Anatomical variations of the cords of brachial plexus and the median nerve*. *Clin. Anat.*, 20:150-6.
46. Tubbs, R.S.; Jones, V.L.; Loukas, M.; Comert, A. e Shoja, M.M., et al. (2010) *Anatomy and landmarks for branches of the brachial plexus: a vade mecum*. *Surgical and radiologic anatomy*. *SRA*, 32:261-70.
47. Angélica-Almeida, M. (2011) *Cirurgia dos Nervos Periféricos*. In Patrício, J.A.B., ed. *Microcirurgia: Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental*. 1.^a ed. Lisbon: Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 101-14.
48. Afifi, A.K. e Bergman, R.A. (2005) *Neurohistology*. In Afifi, A.K. e Bergman, R.A., ed. *Functional Neuroanatomy*. 2.^a ed. New-York, McGraw-Hill, pp. 10.
49. Popesko, P.; Ratjová, V. e Horák, J. (1992) *Rat*. In *A Colour Atlas of the Anatomy of Small Laboratory Animals*. 1.^o ed. Bratislava, Saunders, pp. 13-104.
50. Walker, W.F. e Homberger, D.G. (1997) *Nervous Coordination: Nervous System*. In Walker, W.F. e Homberger, D.G. ed. (1997) *Anatomy and Dissection of the Rat*. 3.^a ed. New-York, USA, W.H. Freeman and Company, pp. 89-92.
51. Koshima, IH, K. (1981) *Experimental studies on vascularized nerve grafts in rats*. *J. Microsurg.*, 2:225-6.

52. Rupp, A. (2007) *Functional, electrophysiologic and morphometric evaluation of peripheral nerve regeneration after bridging a 14 mm gap in the rat sciatic nerve* Munich, Ludwig-Maximilians.
53. Birch, R. (2011) *Clinical aspects of nerve injury*. In Birch, R., ed. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*. 2.^a ed. London, Springer, pp. 161-77.
54. Politis, M.J. e Steiss, J.E. (1985) *Electromyographic evaluation of a novel surgical preparation to enhance nerve-muscle specificity that follows mammalian peripheral nerve trunk transection*. *Experimental neurology*, 87:326-33.
55. Seckel, B.R.; Ryan, S.E.; Gagne, R.G.; Chiu, T.H.; Watkins E, Jr. (1986) Target-specific nerve regeneration through a nerve guide in the rat. *Plastic and reconstructive surgery*, 78:793-800.
56. Dornseifer, U.; Fichter, A.M.; Leichtle, S.; Wilson, A. e Rupp, A., et al. (2011) *Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model*. *Microsurgery*, 31:632-41.
57. Konofaos, P. e Ver Halen, J.P. (2013) Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *Journal of reconstructive microsurgery*, 29:149-64.
58. Lin, M.Y.; Manzano, G. e Gupta, R. (2013) *Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair*. *Hand clinics*, 29:331-48.
59. Mohammad, J.; Shenaq, J.; Rabinovsky, E. e Shenaq, S. (2000) *Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach*. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plastic and reconstructive surgery*, 105:660-6.
60. Maria Angelica Almeida; M. Manuel Mouzinho; Joao Anacleto; Teresa Ramos e Laura Silva (2002) Repair of Rat Sciatic Nerve Gaps with Human Amniotic Membrane Tube, and Using Interposition of Autologous Vein Conduits. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 18(3), Abstracts-Part I, pp. 203-258.
61. Pu, L.L.; Syed, S.A.; Reid, M.; Patwa, H. e Goldstein, J.M. et al. (1999) *Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap*. *Plastic and reconstructive surgery*, 104:1379-85.
62. Terzis, J.K. e Kostas, I. (2007) Vein grafts used as nerve conduits for obstetrical brachial plexus palsy reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 120:1930-41.
63. Duan, X.L.; Xu, Y.Z. e Zeng, Z.C. (2004) [Bridging rat sciatic nerve defects with the composite nerve-muscle autografts wrapped with human amnion matrix membrane]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical Sciences*, 29:279-83.
64. O'Neill, A.C.; Randolph, M.A.; Bujold, K.E.; Kochevar, I.E., e Redmond, R.W., et al. (2009) Preparation and integration of human amnion nerve conduits using a light-activated technique. *Plastic and reconstructive surgery*, 124:4 28-37.
65. Meng, H.; Li, M.; You, F.; Du, J. e Luo, Z. (2011) *Assessment of processed human amniotic membrane as a protective barrier in rat model of sciatic nerve injury*. *Neuroscience letters*, 496:48-53.
66. Kim, S.S.; Sohn, S.K.; Lee, K.Y.; Lee, M.J. e Roh, M.S., et al. (2010) Use of human amniotic membrane wrap in reducing perineural adhesions in a rabbit model of ulnar nerve neurolysis. *The Journal of hand surgery*. European volume, 35:214-9.
67. Henry, F.P.; Goyal, N.A.; David, W.S.; Wes, D. e Bujold, K.E., et al. (2009) *Improving electrophysiologic and histologic outcomes by photochemically sealing amnion to the peripheral nerve repair site*. *Surgery*, 145:313-21.
68. Ozgenel, G.Y. e Filiz, G. (2004) Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurotized rat sciatic nerve. *Journal of reconstructive microsurgery*, 20:153-7.
69. Ramos, Maria Teresa Furtado; Costa Laura Maria Bugalhão; Roberto, Maria Angélica Rato da Silva. *A method of preparation of amniotic membrane renders the tissue immunologically inert*. Depósito n.º 102589, Instituto Nacional da Propriedade Industrial de 30 de Março de 2001, Patente 102 589.
70. Chiu, D.T.; Janecka, I.; Krizek, T.J.; Wolff, M. e Lovelace, R.E. (1982) *Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration*. *Surgery*, 91:226-33.
71. Keskin, M.; Akbas, H.; Uysal, O.A.; Canan, S. e Ayyildiz, M., et al. (2004) Enhancement of nerve regeneration and orientation across a gap with a nerve graft within a vein conduit graft: a functional, stereological, and electrophysiological study. *Plastic and reconstructive surgery*, 113:1372-9.
72. Stahl, S. e Rosenberg, N. (1999) *Digital nerve repair by autogenous vein graft in high-velocity gunshot wounds*. *Military medicine*, 164:603-4.

73. Conley, J.J. (1959) *Vocal rehabilitation by autogenous vein graft*. The Annals of otology, rhinology, and laryngology, 68:990-5.
74. Li, C.Y. e Cao, D.C. (2000) [Experimental study on repair of peripheral nerve defect by basic fibroblast growth factor combined with autogenous vein graft conduit]. Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery, 14:14-6.
75. Tang, J.; Wang, X.M.; Hu, J.; Luo, E. e Qi, M.C. (2008) Autogenous standard versus inside-out vein graft to repair facial nerve in rabbits. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi / Chinese Medical Association*, 11:104-9.
76. Tang, J.B.; Gu, Y.Q. e Song, Y.S. (1993) *Repair of digital nerve defect with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2*. J. Hand. Surg. Br., 18:449-53.
77. Walton, R.L.; Brown, R.E.; Matory, WE, Jr.; Borah, G.L. e Dolph, J.L. (1989) Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. *Plastic and reconstructive surgery*, 84:944-9; discussion 50-2.
78. Xu, J.; Varitimidis, S.E.; Fisher, K.J.; Tomaino, M.M. e Sotereanos, D.G. (2000) The effect of wrapping scarred nerves with autogenous vein graft to treat recurrent chronic nerve compression. *The Journal of hand surgery*, 25:93-103.
79. Zhao, Y.F. (1982) [Repair of the extracranial facial nerve defect by autogenous vein graft: an experimental study]. Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = *Chinese journal of stomatology*, 27:81-3, 127-8.
80. Maria Angélica Almeida; Martins, Pedro; Mavios, Carlos; Mafra, Manuela; Merdeiros, Luisa (2000) *Interposition of Vein Conduits in Repair of Periferal Nerve Gap - A Study in Sciatic Nerve of Wistar Rat*. Microsurgery, Vol. 20(6) Abstract pp. 284.
81. Chiu, D.T. e Strauch, B. (1990) A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plastic and reconstructive surgery*, 86:928-34.
82. Rodrigues. M.C.; Rodrigues, AA, Jr.; Glover, L.E.; Voltarelli, J.; Borlongan, C.V. (2012) Peripheral nerve repair with cultured schwann cells: getting closer to the clinics. *The Scientific World Journal*, 413091.
83. Angélica-Almeida, M.; Casal, D.; Mafra, M.; Mascarenhas-Lemos, L.; Silva, E.; Farinho, A.; Iria, I.; Martins-Ferreira, J.; Ferraz-Oliveira, M.; Videira, P.; Vassilenko, V.; Amarante, J. e Goyri-O'Neill, J. (2014) *Evaluation of the efficacy of different conduits to bridge a 10 millimeter defect in the rat sciatic nerve in the presence of an axial blood supply*. Archives of Anatomy, 2(1):8-30.
84. Whitlock, E.L.; Tuffaha, S.H.; Luciano, J.P.; Yan, Y. e Hunter, D.A., et al. (2009) *Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps*. Muscle & nerve, 39:787-99.
85. Elias F. Oliveira; Nilton Mazzer; Cláudio H. Barbieri e Marcelo Selli (2001) *Correlation between Functional Index and Morphometry to Evaluate Recovery of the Rat Sciatic Nerve Following Crush Injury: Experimental Study J reconstr Microsurg*, 17(1), pp. 069-076.