

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**TÉCNICAS CIRÚRGICAS E MICROCIRÚRGICAS APLICADAS AO
SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO, SISTEMA VASCULAR E
RETALHOS NUM MODELO ANIMAL**

Pedro Miguel Nunes Dias de Carvalho

Orientadora

Professora Doutora Ana Colette Pereira de Castro Osório Maurício

Co-Orientadores

Professor Doutor Horácio Urgel Silva Monteiro da Costa

Professora Doutora Ana Lúcia Emília de Jesus Luís

Porto 2010

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**TÉCNICAS CIRÚRGICAS E MICROCIRÚRGICAS APLICADAS AO
SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO, SISTEMA VASCULAR E
RETALHOS NUM MODELO ANIMAL**

Pedro Miguel Nunes Dias de Carvalho

Orientadora

Professora Doutora Ana Colette Pereira de Castro Osório Maurício

Co-Orientadores

Professor Doutor Horácio Urgel Silva Monteiro da Costa

Professora Doutora Ana Lúcia Emília de Jesus Luís

Porto 2010

Resumo

Este Trabalho de Estágio surgiu como uma oportunidade de aprofundar conhecimentos numa temática que, para mim, se revela de especial interesse.

O desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e microcirúrgicas configura uma área com enorme potencial e aplicabilidade prática no âmbito da Medicina Veterinária, designadamente através da capacidade que encerram na prossecução de respostas para desafios que comumente surgem na prática clínica. Este percurso associa-se inevitavelmente à procura e descoberta de soluções, nas quais os biomateriais e sistemas celulares assumem um papel fundamental.

O desenvolvimento do Estágio enquadra-se no treino e aperfeiçoamento de reconstrução de tecidos no âmbito da Medicina Regenerativa, com recurso a animais de experimentação, para transposição das técnicas para Medicina e Medicina Veterinária. Assim, como preparação, a minha formação incluiu a realização do curso *Laboratory Animal Science*, de acordo com as recomendações da FELASA – *Federation of Laboratory Animal Science Associations*, categoria C e critérios da Direcção-Geral de Veterinária para esta categoria.

A reconstrução tecidual abordou com especial incidência as técnicas cirúrgicas e microcirúrgicas subordinadas ao Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Vascolar (SV), associando biomateriais a sistemas celulares, nomeadamente células estaminais mesenquimais de origem extra-fetal.

Esta abordagem está inserida no âmbito de vários projectos de investigação, desenvolvidos pelo Grupo de Cirurgia Experimental, que inclui uma equipa multidisciplinar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho e Núcleo BIOMATCELL, e financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (POCT/CVT/64220/2006 e QREN BIOMATCELL).

Com a realização deste trabalho, foi possível desenvolver estratégias microcirúrgicas para melhorar a regeneração nervosa, vascular e exequibilidade de retalhos, salientando o efeito positivo da associação de biomateriais e sistemas celulares no caso do SNP e SV e a determinação do local, relação base/comprimento e vascularização dos retalhos estudados.

Todos os procedimentos foram realizados com aprovação das Autoridades Veterinárias Portuguesas e de acordo com as normas directivas do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC).

Agradecimentos

Este é um ponto de viragem num caminho que não percorri sozinho, e por isso, a quem o trilhou comigo aqui deixo os meus mais sinceros agradecimentos:

À minha Mãe, pelo exemplo que é para mim, pela força com que me levantou sempre que tropecei e de quem me orgulho muito de ser filho.

Ao meu Pai que, desde tenra idade, me apresentou o mundo da Medicina Veterinária e com o qual partilho esta paixão.

À minha Mana Susana, pelo apoio e espicaçar de consciência que sempre me acordou.

À Andreia, minha Namorada, por me ter dado a mão e partilhado esta aventura comigo. Por ser quem é, e todos os dias me ajudar a descobrir quem sou.

À Professora Doutora Ana Colette Maurício, minha Orientadora, por ter aceite conduzir-me neste desafio e pela constante disponibilidade e amizade com que o fez. Sem a sua visão, uma célula seria apenas uma célula.

Ao Professor Doutor Horácio Costa, meu Co-Orientador, pela inspiração que me trouxe e pelo reconhecimento de que existem micromundos por explorar.

À Professora Doutora Ana Lúcia Luís, minha Co-Orientadora, pelo exemplo de trabalho e simpatia com que me transmitiu valiosos ensinamentos.

À equipa multidisciplinar do ICBAS, FEUP, CHVNG/E e Núcleo BIOMATCELL responsável pela minha integração nos projectos desenvolvidos.

À Clínica Veterinária de Santo Ovídio pela disponibilização dos meios técnicos, e um agradecimento particular à D. Elsa pela paciência e boa disposição que demonstrou no apoio logístico ao trabalho.

À Criovida e Corpo técnico pela oportunidade de contactar com um admirável mundo novo.

À Leica®, na pessoa do Pedro, por acreditar neste projecto disponibilizando microscópios de microcirurgia.

Aos meus amigos Filipe, Alex, Bruno, João, Xico e Julinho, guerreiros neste percurso académico, pela coragem e cumplicidade com que lutaram a meu lado.

Ao meu querido Xixa e insubstituível Patrícia, que me demonstraram que “não há longe nem distância”.

Ao Tété por ter sempre acreditado e me apoiado desde tenra idade, a ele também “devo parte de quem sou.”

Ao Amadeu Cabral, pela disponibilidade e amizade incondicional que demonstrou.

Por fim, a todos que fizeram e fazem parte da minha vida....

Obrigado!

ÍNDICE GERAL

	Página
Resumo	i
Agradecimentos	ii
Índice Geral	iv
Índice de Figuras	vi
I – INTRODUÇÃO	1
1. Princípios da microcirurgia	1
2. Instrumentos e fios de sutura microcirúrgicos	1
II – TÉCNICAS MICROCIRÚRGICAS – O TECIDO NERVOSO PERIFÉRICO	3
1. Fisiologia do tecido nervoso periférico	3
2. Classificação da lesão do nervo periférico	3
3. Factores condicionantes da regeneração nervosa	3
3.1. Factores de carácter geral	3
3.2. Tipo e local da lesão	4
3.3. Factores biomoleculares e celulares	5
3.4. Coaptação técnica e factores condicionantes	5
3.4.1. Neurorrafia topo-a-topo ou sutura directa	6
3.4.2. Neurorrafia término-lateral	8
3.4.3. Enxertos nervosos	8
3.4.4. Cola de fibrina	9
3.4.5. Coaptação por laser	9
III – ESTUDOS PRÁTICOS DE LESÃO DO TIPO AXONOTMESE	9
1. Indução de lesão do tipo axonotmese	9
2. Procedimentos pré-cirúrgicos e cirúrgicos comuns	10
3. As variáveis em estudo: <i>Exercício e Quitosano e células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton</i>	10
3.1. Estudo 1 – “Exercício”	10
3.2. Estudo 2 – “Quitosano e células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton”	11
4. Testes funcionais, histológicos e morfométricos	12
IV – TÉCNICAS MICROCIRÚRGICAS – O TECIDO VASCULAR	12
1. Tipos de anastomose	13
1.1. Anastomose término-terminal e conceitos fisiológicos condicionantes	13
1.2. Interdigitação telescópica	14
1.3. Anastomose término-lateral e conceitos fisiológicos condicionantes	14
1.4. <i>Cuffing</i> (envolvimento por baínha)	15

2. Técnicas de coaptação	15
2.1. Suturas	16
2.1.1. Técnicas de anastomose término-terminal	16
2.1.2. Técnicas de anastomose término-lateral	17
2.2. Laser	18
2.3. Electrocoaptação	18
2.4. Dispositivos mecânicos	18
3. Biomateriais naturais e sintéticos para próteses vasculares	19
V – ESTUDO DA AXIALIDADE VASCULAR NOS RETALHOS CUTÂNEOS	20
1. Introdução	20
2. Circulação cutânea e conceitos subordinados	21
3. Retalhos randomizados	23
4. Retalhos axiais	25
5. Aplicações clínicas	27
VI – BIBLIOGRAFIA	28
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Microscópio operatório de suporte móvel.	1
Figura 2 – Instrumentos microcirúrgicos de Jacobson.	2
Figura 3 – Estojo de microcirurgia na actualidade.	2
Figura 4 – Especificações da agulha cirúrgica.	2
Figura 5 – Diagramas dos tipos de agulhas microcirúrgicas.	2
Figura 6 – Classificação da lesão nervosa segundo Sunderland.	3
Figura 7 – Anastomose Epineural.	6
Figura 8 – Anastomose Epineural.	7
Figura 9 – Anastomose Interfascicular.	7
Figura 10 – Esquema de sutura com anel metálico.	8
Figura 11 – <i>Clamp</i> de maxilas lisas.	10
Figura 12 – Nervo ciático após lesão de axonotmese.	10
Figura 13 – Membranas de Quitosano.	11
Figura 14 – Aspecto da porosidade da membrana de Quitosano em microscopia de varrimento.	11
Figura 15 – Células estaminais mesenquimais não diferenciadas da matriz do cordão umbilical.	11
Figura 16 – Fibras nervosas normais.	12
Figura 17 – Fibras nervosas de lesão de axonotmese.	12
Figura 18 – Fibras nervosas de lesão de axonotmese tratadas com quitosano.	12
Figura 19 – Diagrama de retracção e contracção após arteriotomia.	13
Figura 20 – Aspecto de topos vasculares para anastomoses término-terminais.	14
Figura 11 – Anastomose T-T através de Interdigitação telescópica.	14
Figura 22 – Fenómenos de contracção e retracção numa arteriotomia.	15
Figura 23 – Anastomose término-terminal.	16
Figura 24 – Contrapressão no lúmen vascular para anostomose.	16
Figura 25 – Biangulação excêntrica.	16
Figura 26 – Anastomose T-T com sutura contínua.	17
Figura 27 – Arteriotomia longitudinal para anastomose T-L.	18
Figura 28 – Aplicação do biomaterial Dacron® na reparação vascular de carótida ovina.	20
Figura 29 – Esquema da classificação de retalhos.	21
Figura 30 – Diagrama da circulação cutânea.	22
Figura 31 – Molde estrutural em película de Raio X e marcador dérmico.	23
Figura 32 – Delimitação, incisão e levantamento de retalhos randomizados.	24
Figura 33 – Registo cronológico dos retalhos randomizados.	24
Figura 34 – Arborização vascular da artéria epigástrica superficial caudal.	26

Figura 35 – Registo fotográfico dos retalhos axiais.	26
Figura 36 – Planeamento cirúrgico do tamanho do retalho e rotação do mesmo.	27
Figura 37 – Retalho axial com rotação para cobertura de defeito do membro inferior ipsilateral.	27
Figura 38 – Aplicabilidade clínica do retalho epigástrico superficial caudal.	28

I – INTRODUÇÃO

1. Princípios da microcirurgia

A Microcirurgia integra um conjunto de técnicas cirúrgicas realizadas para além dos limites da normal definição visual humana, requerendo, como tal, uma ampliação com recurso a lupas ou a microscópios cirúrgicos. Os procedimentos contemporâneos que recorrem a técnicas microcirúrgicas incluem a reparação de vasos e nervos, transferência de tecidos e reimplantação de membros (Yap & Butler 2007).

A escolha do equipamento de ampliação depende da preferência do cirurgião e das estruturas anatómicas a reconstruir. Para dissecação e preparação de vasos, podem ser utilizadas lupas cirúrgicas, que variam entre 3,5 a 8,0x de ampliação, enquanto para técnicas mais delicadas, tais como anastomoses nervosas ou vasculares, o microscópio revela-se uma ferramenta fundamental (Costa 1994).

Os microscópios cirúrgicos contemporâneos compõem-se genericamente por 2 cabeças binoculares posicionadas a 180° (com articulação independente); visão estereoscópica; luz coaxial por fibra óptica (lâmpada de halogéneo 12V 100W); zoom de 1 para 4 e focagem por pedal eléctrico; braços articulados com amplitude de movimento nos planos horizontal, vertical e oblíquo; fotografia, monitor e vídeo documentação e ensino (Costa 1994) (Figura 1).

Apesar da diversidade de modelos, existem princípios físicos que se revelam denominadores comuns a todos os microscópios operatórios: a ampliação é inversamente proporcional à dimensão do campo visual pois este torna-se progressivamente mais reduzido nos planos horizontal (diâmetro) e vertical (profundidade). As ampliações mais vulgarmente utilizadas no decurso de uma microcirurgia estão compreendidas entre 4 a 10x (ampliações baixas) para preparação; entre 10 a 20x (ampliações moderadas) para dissecação; entre 20 a 30x (ampliações altas) para sutura; superior a 30x (ampliações muito altas) para identificação (Costa 1994).



Figura 1 – Microscópio operatório de suporte móvel no chão (figura gentilmente cedida por Leica®).

2. Instrumentos e fios de sutura microcirúrgicos

O equipamento instrumental básico para microcirurgia inclui: pinças tipo *Wright*, porta-agulhas e tesouras microcirúrgicas, mini *Satinsky*, mini *bulldogs*, *clamps* vasculares e aplicador de *clamps* (Pchierri *et al.* 2009) (Figuras 2 e 3).



Figura 2 – Instrumentos microcirúrgicos de Jacobson, usados em 1965 para a primeira reimplantação de polegar (Tamai 2009).



Figura 3 – Estoque de microcirurgia na actualidade (figura gentilmente cedida por Ana Colette Maurício 2010).

Os microinstrumentos devem apresentar determinadas características que se revelam fulcrais durante o procedimento cirúrgico: possuírem um acabamento baço para não reflectir luz sob o microscópio, serem longos o suficiente para repousar confortavelmente na mão e terem molas de leve tensão para evitar fadiga durante a cirurgia (Pchierri *et al.* 2009).

Quanto aos fios de sutura, seria apenas em 1971 que Acland produziria uma microagulha que viria a ser a precursora do fabrico estandardizado em escala. Esta frágil agulha apresentava 4mm de comprimento e 70 μ m de diâmetro, a qual estava fixa num fio de sutura de nylon de 18 μ m. Actualmente, existe uma disponibilidade de agulhas com diâmetros entre 30 a 200 μ m, arcos desde 2,5 e 9,7mm, cordas de 2 a 8mm e curvaturas de $\frac{1}{4}$ (90°), $\frac{3}{8}$ (135°) e $\frac{1}{2}$ círculo (180°), fixadas a materiais de sutura entre os 8/0 e 12/0 com 2/3 dos seus arcos espatulados para um posicionamento mais fino e melhor prensão às maxilas do porta-agulhas (Costa 1994; Pchierri *et al.* 2009) (Figuras 4 e 5).

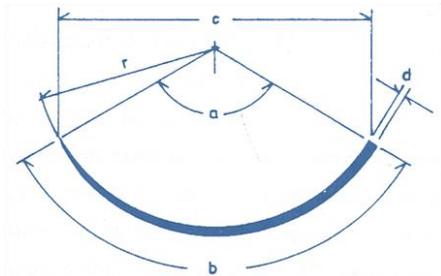


Figura 4 – Especificações da agulha: a) ângulo; b) arco; c) corda; d) diâmetro; r) raio (Adaptado de Costa 1994).



Figura 5 – Diagramas dos tipos de agulhas microcirúrgicas: microagulha de secção redonda e ponta cilíndrica para sutura vascular; microagulha de secção e ponta piramidal para maior penetração, destinada à sutura vascular e nervosa; microagulha com secção espatulada para deslizamento interfascicular, e ponta piramidal com maior penetração, para suturas nervosas (da esquerda para a direita) (Adaptado de Costa 1994).

II – TÉCNICAS MICROCIRÚRGICAS – O TECIDO NERVOSO PERIFÉRICO

1. Fisiologia do tecido nervoso periférico

No Sistema Nervoso Periférico (SNP), os neurónios agrupam-se em gânglios que podem ser sensitivos ou motores consoante a sua função, e os axónios que deles derivam organizam-se em nervos. A fibra nervosa é estruturada em 3 camadas distintas: i) A camada mais exterior denomina-se **epinervo** e é composta por tecido conjuntivo laxo que envolve completamente o nervo – este tecido conjuntivo compõe-se de matriz de colagénio tipo I e III, fibroblastos, tecido adiposo e vasos sanguíneos (*vaso nervorum*) e assume como função a protecção ao meio interno; ii) Internamente, o **perinervo** separa os axónios em fascículos dispondo-se em camadas concêntricas de fibroblastos – protege o endonervo de agressões externas (já que possui capacidade para resistir a fenómenos de estiramento até 750 mmHg) e é o seu mediador nos processos de difusão; iii) O **endonervo** envolve os axónios e as células de Schwann individualmente, dispondo-se a nível intrafascicular - apresenta na sua constituição uma matriz de fibras de colagénio tipo I, fibroblastos e vasos sanguíneos (Junqueira & Carneiro 1999; Luís 2008).

2. Classificação da lesão do nervo periférico

O SNP está muito mais exposto a lesões comparativamente ao Sistema Nervoso Central (SNC). Esta exposição anatómica propicia o SNP a lesões que, empiricamente, se podem considerar de esmagamento ou compressão, secção ou secção com perda de substância (Luís 2008). Algumas classificações foram propostas, embora as que nos dias de hoje mais comumente se utilizem são as propostas por Seddon e Sunderland. Segundo Seddon a lesão pode ser classificada em **Neurapraxia**, **Axonotmese** e **Neurotmese**; enquanto que para Sunderland, a neurotmese pode ainda ser classificada em três tipos distintos (Ristic 2000; Battiston & Tos 2003) (Figura 6) (Anexo I).

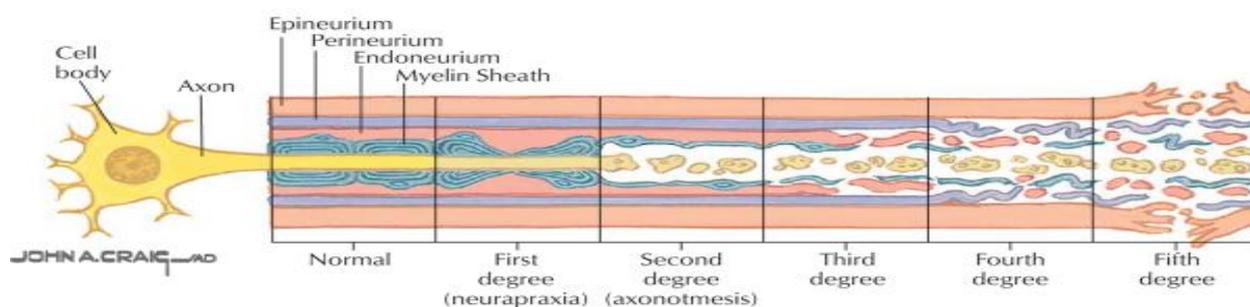


Figura 6 – Classificação da lesão nervosa segundo Sunderland (Adaptado de Greene 2006).

3. Factores condicionantes da regeneração nervosa

3.1. Factores de carácter geral

Neste grupo de factores podemos incluir a idade e estado de saúde do paciente. A **idade** apresenta-se como um factor preponderante no prognóstico já que, é do conhecimento geral,

em tenras idades a regeneração é potenciada quando comparada ao estado adulto. Esta regeneração é devida a uma maior plasticidade do SNC. No que concerne o estado de **saúde** do paciente, a patologia que concorre com a lesão nervosa pode desempenhar um papel preponderante na regeneração, é o caso das patologias metabólicas (Battiston & Tos 2003).

3.2. Tipo e local da lesão

O resultado funcional na reparação vai ser condicionado pelo **local da lesão** já que as fibras nervosas apresentam uma maior complexidade no seu segmento proximal, isto é, o nervo vai-se tornando mais “simples” à medida que vai deixando no seu trajecto ramos sensoriais e motores. Por esta razão, atribui-se um melhor prognóstico do sentido proximal para distal: plexo – tronco nervoso – nervo periférico definido – ramos terminais (Battiston & Tos 2003).

Outro factor que influencia o processo regenerativo do tronco nervoso são as margens da lesão: uma lesão com as **margens** bem definidas vai apresentar melhores resultados regenerativos do que outra onde os topos se apresentem “prensados” ou “danificados”. Neste caso a sua secção é obrigatória já que resultaria numa reacção de fibrose com prejuízo para a regeneração nervosa (Battiston & Tos 2003).

O **tecido circundante** à lesão nervosa também condiciona a regeneração já que o nervo deve ser resguardado numa envoltória bem vascularizada e não alterada. Os problemas na pele circundante ou tecido necrótico têm de ser removidos e por vezes o recurso a *flaps* locais (ou mesmo distantes) é recomendado (Battiston & Tos 2003).

Se o nervo danificado apresenta margens bem definidas ou se a zona esmagada pode ser convertida, por secção, numa lesão limpa sem significativa **perda de substância nervosa**, então a sutura directa está recomendada (Battiston & Tos 2003). Se, inversamente, existe perda significativa de tecido nervoso, então deve-se recorrer a enxertos nervosos interfasciculares autólogos para preencher a lacuna, guiar a regeneração e proteger o axónio da cicatriz circundante (Millesi 1970). No entanto, o uso de enxertos tem consequências na área dadora, *a priori* são, como a perda sensorial e risco de formação de neuroma. Esta foi uma das principais razões que levou ao desenvolvimento de técnicas para preenchimento da lacuna nervosa, como os tubos-guia (Anexo II).

Uma lesão por **avulsão** tem um carácter especial de prejuízo nervoso, uma vez que não pode ser reparada por meio de suturas ou enxertos. Uma técnica de reparação nervosa tem sido descrita na tentativa de reparar lesões por avulsão: a coaptação término-lateral (T-L). A coaptação de um topo nervoso num nervo vizinho tem revelado boa recuperação funcional em diversos trabalhos experimentais (Battiston & Tos 2003).

3.3. Factores biomoleculares e celulares

Nas células nervosas, após a secção do tronco nervoso, ocorrem inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas, que condicionam a síntese dos elementos do citoesqueleto necessários para substituir a perda de substância axónica. Os factores biomoleculares podem ser divididos em três grupos distintos: factores neurotróficos, factores neurotrópicos e factores promotores de neurite.

Os **factores neurotróficos** são proteínas endógenas solúveis que influenciam a sobrevivência, desenvolvimento e plasticidade morfológica das células nervosas. Estes factores são sintetizados pelos neurónios, músculos, glândulas e classificados com base nos seus receptores (Battiston & Tos 2003; Luís 2008) (Anexo I).

O crescimento direccionado do axónio é condicionado pelos **factores neurotrópicos**. Estes, libertados pelo segmento distal do axónio, vão promover um gradiente de concentração que vai criar uma direcionalidade para restabelecer a unidade axonal (Battiston & Tos 2003).

Quanto aos **factores promotores de neurite** (NPF), estes são responsáveis pela formação e crescimento do cone de orientação para a regeneração nervosa. A laminina e a fibronectina são exemplos de substâncias incluídas na matriz extracelular enquanto o N-CAM e o L-1 são factores moleculares presentes na superfície celular que promovem a adequada adesão para a regeneração das fibras (Battiston & Tos 2003).

No âmbito dos factores biomoleculares e celulares importa destacar o papel da associação de fármacos e sistemas celulares como **células estaminais** na regeneração nervosa (Anexo III).

3.4. Coaptação técnica e factores condicionantes

Para além dos factores já descritos e da técnica cirúrgica, importa agora focar os aspectos que o cirurgião pode controlar. É o caso da **tensão no local da sutura**, um dos factores que mais negativamente influencia a regeneração do axónio. Estudos recentes apontam para um endurecimento dos topos da lesão nervosa durante as cinco semanas subsequentes após a mesma, com um máximo entre a primeira e a segunda semana. Este endurecimento vai contribuir para um aumento da tensão no local da reparação (Allan & Trumble 2004). Para qualquer tipo de reparação nervosa, pós-lesão ou retardada propositadamente, é necessário algum estiramento nervoso para conseguir a aproximação dos topos. Esta aproximação não deve exceder os 10% de estiramento devido ao compromisso vascular que este impõe no suprimento nervoso, constatação documentada por Trumble em 2000. Pelas razões abordadas, é evidente que uma reparação livre de tensão é fundamental para a regeneração e, embora a interposição de enxertos nervosos seja uma opção, a maioria dos cirurgiões opta por não recorrer a estes mas sim a outras estratégias para “ganhar” comprimento nervoso. É o

caso da mobilização do nervo no local através do desbridamento da fásia constritora e dissecação ou secção de ramificações nervosas bem como uma mobilização articular no sentido de atenuar a tensão posicional (Allan & Trumble 2004).

A orientação dos fascículos nas suturas nervosas contribui significativamente para o resultado final. Hikosaka em 1979 constatou que um mau **alinhamento dos topos** é o factor mais condicionante da regeneração axonal (Luís 2008). Após a transecção do nervo, os fascículos tendem a herniar para fora da bainha epineural devido à alta pressão do fluído endoneural. Na reparação cirúrgica os fascículos podem apresentar-se mal orientados, quer para dentro ou fora da fibra, causando um mau direccionamento das fibras em regeneração (Myckatyn & Mackinnon 2007) (Figura 7A). Por esta razão, um **corte “limpo”** dos topos é essencial para um correcto realinhamento dos fascículos (Myckatyn & Mackinnon 2007), podendo o cirurgião, para isso, recorrer a uma lâmina microcirúrgica (Battiston & Tos 2003) (Figura 7B).



Figura 7 – Anastomose Epineural: **A)** Uma excessiva tensão na sutura epineural, pode direccionar mal os fascículos; **B)** Os fascículos devem ser alinhados entre eles e o epineuro, tornando-se assim desnecessárias suturas interfasciculares (adaptado de Myckatyn & Mackinnon 2007).

O **fio de sutura** também influencia a reparação: em trabalhos realizados por Giddins em 1989, foi atestado que reparações da extremidade distal do antebraço com fios 9/0, permitiam melhor contacto entre os topos e com menor dano, do que fios 10/0 que partiam à mais pequena tensão e 8/0 que mostraram ser demasiado invasivos no tecido nervoso (Allan & Trumble 2004). Quanto ao tipo de fio de sutura, a maioria continua a preferir o monofilamento não absorvível (nylon ou polipropileno) devido à sua biocompatibilidade e ausência de reacção inflamatória (Battiston & Tos 2003).

3.4.1. Neurorrafia topo-a-topo ou sutura directa

Quando após uma lesão nervosa, sem perda de substância e em que os topos proximal e distal não apresentam defeito (para além da secção), a opção cirúrgica que usualmente é adoptada pelo cirurgião é a **sutura topo-a-topo clássica** depois de confirmar a ausência de tensão da fibra nervosa a coaptar, ou neutralizando-a através da flexão das articulações adjacentes durante a cirurgia (Millesi 2006).

De entre as suturas topo-a-topo a que mais usualmente tem sido usada na reparação nervosa é a **sutura epineural**. O objectivo da reparação é estabelecer a continuidade do nervo com o devido alinhamento rotacional e ausência de tensão. Para isso, o cirurgião orienta-se por um

marcador externo que pode ser um vaso sanguíneo na superfície do topo proximal e distal ou apenas fazendo coincidir as imagens espelho dos topos nervosos (Rowshan 2004) (Figura 8). A coaptação é conseguida com sutura de nylon 8/0 para nervos maiores ou 10/0 para os mais pequenos. Se com duas suturas de nylon 8/0 a aproximação dos topos não é conseguida, então existe tensão excessiva e opta-se por interposição de enxerto nervoso (Mueller 2006).

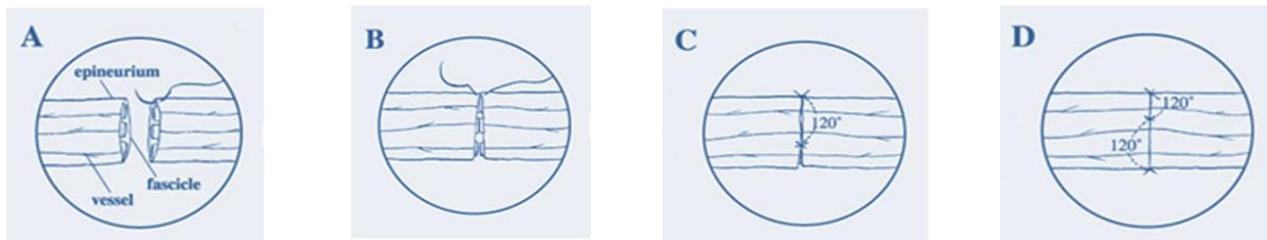


Figura 8 – Anastomose Epineural: **A)** O primeiro ponto é inserido a 1 mm do topo e nivelado para evitar danos fasciculares; **B)** A agulha é inserida no topo oposto, por baixo do epineuro, e paralela ao eixo nervoso até à sua saída a 1 mm do topo oposto; **C)** A segunda sutura é realizada a 120° da primeira na circunferência epineural; **D)** O nervo deve então ser rodado e a terceira sutura efectuada (Adaptado de Hsu 2003).

Embora esta técnica seja a menos morosa, também é a menos precisa, mas permite aos factores neurotróficos actuarem no sentido de influenciar o crescimento axonal (Rowshan 2004; Mueller 2006; Myckatyn & Mackinnon 2007).

Em teoria, a **sutura interfascicular** é uma técnica mais precisa de reparação nervosa. Os topos nervosos são seccionados e os grupos fasciculares motores e sensoriais identificados, para reduzir a probabilidade de axónios motores serem direccionados para terminações sensoriais de órgãos ou axónios sensoriais para placas motoras. O epineuro também necessita de dissecação, embora com especial cuidado para preservar o perineuro que suporta a vascularização nervosa (Rowshan 2004; Mueller 2006) (Figura 9).

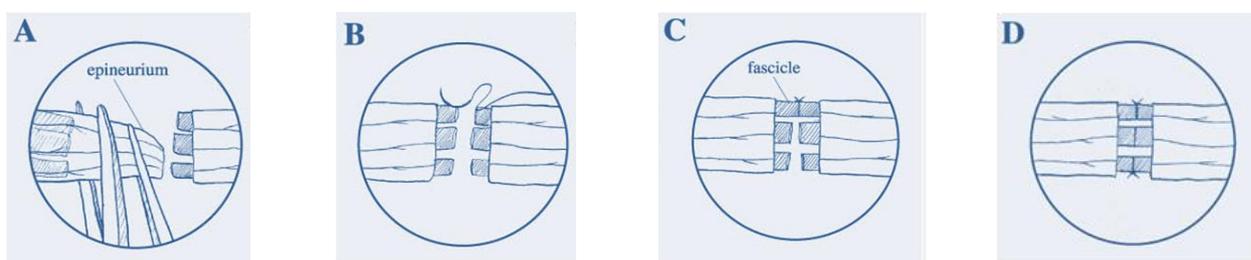


Figura 9 – Sutura Interfascicular: **A)** Um pequeno segmento de epineuro é removido para expor os fascículos; **B)** A agulha é inserida no perineuro a 0,5mm da superfície de corte num ângulo de 45° e exteriorizada no fascículo oposto de maneira idêntica; **C)** As suturas são realizadas sem tensão; **D)** É necessária apenas uma sutura para fascículos até 1mm de diâmetro (Adaptado de Hsu 2003).

A técnica seleccionada vai depender do tempo decorrido após a lesão, da natureza e localização da mesma (condicionante da identificação do arranjo fascicular do nervo). A localização, de entre os factores enumerados, será o factor que mais condiciona o tipo de sutura já que, proximalmente, o padrão fascicular é normalmente polifascicular o que impele o cirurgião a optar pela técnica epineural; contrapondo, em lesões mais distais, os nervos são normalmente mono- ou oligofasciculares apresentando melhores resultados uma sutura

interfascicular (Rowshan 2004; Myckatyn & Mackinnon 2007).

Outra abordagem à coaptação topo-a-topo consiste na interposição de um **anel metálico externo** na sutura nervosa (Figura 10). Esta técnica intenta criar uma maior área de coaptação (10-20%), potenciando assim a regeneração nervosa com a identificação de um maior número de axónios presentes no topo distal da fibra reparada (Kayikcioglu *et al.* 2004).

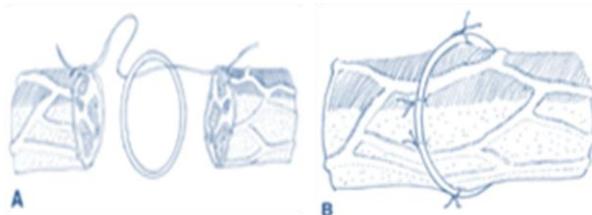


Figura 10 – A) e B) Esquema de sutura com anel metálico (Adaptado de Kayikcioglu *et al.* 2004).

3.4.2. Neurorrafia término-lateral

A neurorrafia término-lateral consiste na coaptação do topo proximal da fibra nervosa lesionada com uma zona lateral de uma fibra nervosa intacta, através da realização de uma “janela” epineural e/ou perineural (ainda não é consensual se a janela perineural é necessária). Esta técnica tem sido aplicada na prática clínica mas com resultados controversos já que estes têm variado entre o “entusiasmante” e o “pouco proveitoso” (Millesi & Tzolakidis 2005).

3.4.3. Enxertos nervosos

Na abordagem à neurorrafia da fibra nervosa seccionada, a lacuna que separa os topos nervosos vai condicionar a técnica cirúrgica. Se uma sutura 9/0 não for suficiente para a coaptação dos topos, ou se é necessária uma manipulação postural para a aproximação dos mesmos, então o recurso a um enxerto é preferível (Myckatyn & Mackinnon 2007). De entre os enxertos disponíveis para o cirurgião devemos destacar os autoenxertos, aloenxertos e os biomateriais tubulares naturais ou sintéticos.

Os **enxertos nervosos autólogos** são, correntemente, o método de eleição na reparação nervosa com perda de substância. No entanto, o uso de um autoenxerto implica o sacrifício de um ou mais nervos funcionais cuja disponibilidade é limitada e podem não apresentar “qualidade” suficiente para um necessário suporte à regeneração axonal (Mackinnon & Nakao 1997; Johnson *et al.* 2005). Os nervos utilizados são geralmente sensitivos, muito embora não promovam boa regeneração de axónios motores quando comparados com nervos motores ou mistos (Ichiara *et al.* 2008; Luís 2008). Finalmente, e embora alguns estudos apontem para uma completa recuperação de sensação após reparação com enxertos autólogos, a taxa de recuperação de função motora é inferior a 40% (Ichiara *et al.* 2008).

Muitos dos esforços da Engenharia de Biomateriais têm recaído na criação de canais tubulares, naturais ou sintéticos, capazes de substituir os enxertos autólogos: **tubos-guia** (Johnson *et al.* 2005) (Anexo II). De entre os biomateriais naturais são de destacar os enxertos

com veias usados para reparar defeitos até 3 cm, mas com resultados aquém dos homólogos sintéticos. Por esta razão o seu uso está recomendado para reparação de nervos “não críticos” (Myckatyn & Mckinnon 2007).

3.4.4. Cola de fibrina

A cola de fibrina é composta essencialmente por fibrinogénio, apoproptina (que são inibidores fibrinolíticos) e trombina (activador de fibrinogénio). O seu uso permite uma coaptação mais fácil e rápida (Battiston & Tos 2003; Martins *et al.* 2005) apresentando-se como uma alternativa fiável às suturas convencionais. Os bons resultados obtidos na regeneração axonal parecem ficar a dever-se a um menor fenómeno inflamatório bem como a um menor compromisso vascular no local da lesão. Esta opção de coaptação cirúrgica tem sido usada (especialmente na Europa) para reparação de nervos com menor diâmetro onde, a menor secção da fibra, torna-a mais susceptível à inflamação. Na reparação de nervos com maior diâmetro, a inflamação não afecta a área de regeneração axonal e contribui para proteger a fibra lesionada, por conseguinte opta-se pela sutura convencional (Martins *et al.* 2005).

3.4.5. Coaptação por laser

A coaptação por laser evita a introdução de materiais estranhos no local de reparação e é baseada em processos de desnaturação e renaturação proteica criados pelo calor do feixe do laser. Embora muitos autores argumentem que a reparação por laser conduz à formação de uma menor cicatriz, falta-lhe no entanto solidez suficiente para resistir às forças de tensão (Battiston & Tos 2003).

III – ESTUDOS PRÁTICOS DE LESÃO DO TIPO AXONOTMESE

Estudo do exercício e associação de biomateriais a factores celulares na regeneração do nervo ciático de rato após lesão do tipo axonotmese

Muitos estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos sobre os factores condicionantes na regeneração de nervo periférico. De entre estes, o exercício e a associação do biomaterial quitosano a células estaminais mesenquimais de origem extra-fetal, foram os factores avaliados em dois trabalhos científicos (ainda em publicação) nos quais tive oportunidade de participar, e que descrevo até às limitações da minha colaboração e ausência de resultados (até à data em análise).

1. Indução de lesão do tipo axonotmese

Para avaliação da qualidade de regeneração nervosa face aos factores supracitados, foi necessário proceder à lesão do nervo ciático (axonotmese) de um modo reprodutível em todos os animais em todos os trabalhos. Com esse intuito, recorreu-se a um **clamp de maxilas lisas**

e 3mm de largura (fabricado pelo *Institute of Industrial Electronic and Material Sciences, University of Technology, Vienna, Austria*), que aplica uma força de 54N, durante 30 segundos (Figura 11). O nervo ciático de rato e a lesão por esmagamento deste, é um dos modelos preferidos para estudo de lesões de axonotmese porque provoca uma perda de continuidade axonal e consequente degenerescência Walleriana mas preserva uma parte estrutural do nervo – os tubos do endoneuro –, o que permite uma regeneração sustentada por células de Schwann reactivas (embora morosa quando comparada à neuropraxia) (Luís *et al.* 2007; Mazzer *et al.* 2008) (Anexo I). A primeira análise pós-lesão é macroscópica: é notório o esmagamento do nervo com aumento de diâmetro num plano e diminuição no plano ortogonal (Mazzer *et al.* 2008) (Figura 12).



Figura 11 – *Clamp* de maxilas lisas utilizado nos trabalhos descritos.



Figura 12 – Aspecto do nervo ciático após lesão de axonotmese com *clamp* de maxilas lisas.

2. Procedimentos pré-cirúrgicos e cirúrgicos comuns

Os animais foram alojados em caixas (4 por caixa), e mantidos por um período de 2 semanas de aclimatização em sala com temperatura, humidade e ciclo luz/escuridão controlados. A alimentação foi assegurada por granulado apropriado à espécie e água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de quetamina (9 mg/100g) e xilazina (1,25 mg/100g); a área femoral foi tosquiada com lâmina cirúrgica e desinfetada com solução anti-séptica e o nervo ciático foi exposto através de incisão cutânea e desbridamento dos músculos anexos. Após a realização dos procedimentos cirúrgicos subordinados a cada um dos estudos, procedeu-se à sutura cutânea com fio de nylon 4/0 e administrou-se antibioterapia de enrofloxacina subcutaneamente (sc) na posologia de 5 mg/kg a cada animal.

3. As variáveis em estudo: *Exercício e Quitosano e células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton*

3.1. Estudo 1 – “Exercício”

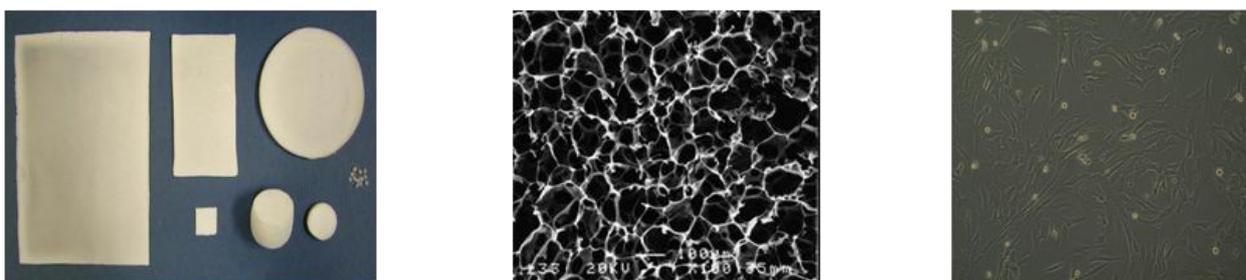
Neste estudo, decorrido na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV – UTL), pretendeu-se relacionar o exercício com a regeneração nervosa periférica após lesão de axonotmese. Para isso, seleccionaram-se 32 ratos *Sprague-Dawley* machos e separaram-se, aleatoriamente, em 4 grupos de igual valor numérico: (1) axonotmese do nervo ciático e exercício passivo; (2) axonotmese do nervo ciático e exercício em passadeira mecânica; (3) axonotmese do nervo ciático; (4) grupo de controlo.

Após as intervenções descritas anteriormente, que culminaram com o esmagamento do nervo

ciático e posterior sutura cutânea, os animais foram submetidos às diversas variáveis em estudo entre a semana 2 e semana 12 pós-lesão: o grupo 1 foi submetido a exercício passivo de mobilização manual da articulação tibio-társica de 3 minutos/dia durante 5 dias/semana; o grupo 2 efectuou exercício em passadeira mecânica a uma velocidade de 10 m/min durante 30 minutos/dia; aos grupos 3 e 4 não foi efectuado qualquer exercício.

3.2. Estudo 2 – “Quitosano e células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton”

O âmbito deste estudo centrou-se na avaliação *in vivo*, da associação de quitosano e células estaminais mesenquimais isoladas da geleia de Wharton (Anexo III) para regeneração de nervo periférico após lesão de axonotmese. Pretendeu-se assim ultrapassar algumas das limitações evidenciadas em trabalhos anteriormente realizados: i) a necessidade de aguardar a vascularização dos enxertos nervosos através do método de inoculação dos vasos; ii) ultrapassar a fibrose que pode resultar da associação dos músculos, inibindo uma progressão célere; e iii) colmatar a desvascularização proveniente do uso de materiais aloplásticos evitando fibrose e necrose quando na presença de soluções de continuidade mais extensas. A escolha do quitosano para realização deste estudo não foi arbitrária. A sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixo custo, efeitos anti-bacterianos e propriedades de catalizador regenerativo, têm atraído a comunidade científica que nele tem depositado interesse para estudos efectuados nesta área. Uma outra característica determinante para a sua escolha como biomaterial foi a sua microporosidade, que se revela pertinente aquando da associação a um sistema celular (Amado *et al.* 2008) (Anexo III) (Figuras 13, 14 e 15).



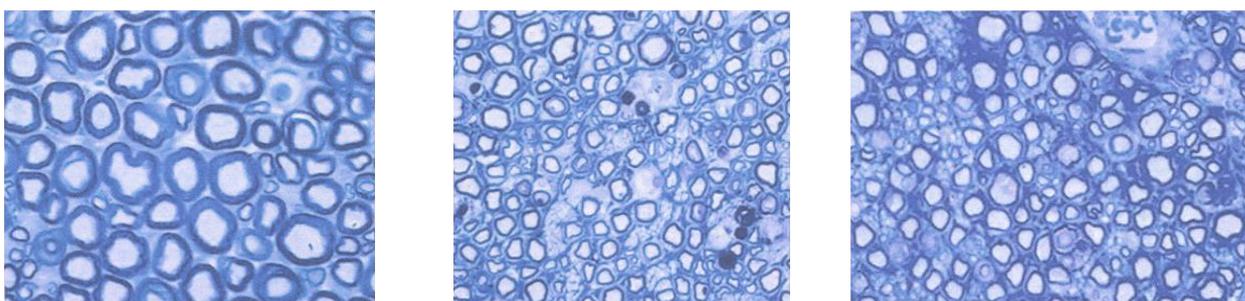
Figuras 13, 14 e 15 – 13) Membranas de Quitosano; **14)** Aspecto da porosidade da membrana de Quitosano em microscopia de varrimento; **15)** Células estaminais mesenquimais não diferenciadas, da matriz do cordão umbilical (da esquerda para a direita) (Figuras gentilmente cedidas por Ana Colette Maurício).

Os procedimentos cirúrgicos realizaram-se no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge no Porto. Para este trabalho foram seleccionados 30 ratos adultos *Sprague-Dawley* machos e divididos em 5 grupos de 6 animais cada: (1) controlo sem qualquer lesão; (2) com lesão de axonotmese; (3) com axonotmese do nervo ciático e revestimento por membrana de quitosano; (4) com axonotmese do nervo ciático e revestimento por membrana de quitosano em associação com células estaminais mesenquimais não diferenciadas, obtidas por isolamento enzimático a partir da geleia de Wharton; e (5) com axonotmese do nervo ciático e

revestimento por membrana de quitosano em associação com células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton, diferenciadas *in vitro* na presença de factores neurotróficos.

4. Testes funcionais, histológicos e morfométricos

Durante o período de 12 semanas, foram realizados semanalmente **testes de avaliação funcional** aos diferentes grupos, no sentido de verificar a resposta musculo-esquelética às diferentes variáveis. O teste de reacção postural de extensão (**RPE**) avalia a função motora nervosa e consiste no registo da força (em gramas) que o membro exerce quando o animal suspenso, antecipa o contacto com uma plataforma fixa de uma balança digital; o teste de avaliação sensorial (**WRL**) que quantifica o reflexo flexor que o animal exhibe ao retirar o membro quando exposto a um estímulo térmico, mecânico ou eléctrico; análise das pegadas (**SFI** e **SSI**) para quantificar a recuperação funcional do nervo ciático após a lesão, com recurso ao registo por imagem das pegadas do animal num corredor; e a **análise cinemática** que verifica se a função locomotora é efectuada correctamente, recorrendo-se ao registo da locomoção do rato, com câmaras de alta velocidade e marcação de pontos anatómicos relevantes para avaliação biomecânica (Luís 2008). Após as 12 semanas, procedeu-se à eutanásia dos animais (com pentobarbital sódico *ad effectum*, ip) para **análise histológica e morfométrica** dos nervos ciáticos e dos músculos regionais enervados por este. Foram recolhidas secções de nervo lesionado (e grupos musculares cuja enervação é da responsabilidade do nervo ciático no estudo 1 – músculos solear, extensor digital longo, gastrocnémios e tibial anterior). Os músculos recolhidos do membro experimental e do membro contralateral foram ainda pesados para determinação do grau de atrofia (Figuras 16, 17 e 18).



Figuras 16, 17 e 18 – Fotografias de alta resolução de fibras nervosas. Da esquerda para a direita: **16)** Fibras nervosas normais; **17)** Fibras nervosas de lesão de axonotmese; **18)** Fibras nervosas de lesão de axonotmese mas tratadas com quitosano (Amado *et al.* 2008).

IV – TÉCNICAS MICROCIRÚRGICAS – O TECIDO VASCULAR

Um grande número de técnicas de anastomose microvascular tem sido desenvolvido nos últimos anos. Adicionalmente, a variabilidade das apresentações clínicas requer, da parte do

cirurgião, familiaridade com as diferentes técnicas anastomóticas que aqui se baseiam na classificação em duas categorias principais: o tipo de anastomose e o método de coaptação.

1. Tipos de anastomose

1.1. Anastomose término-terminal e conceitos fisiológicos condicionantes

Foi a anastomose adoptada no princípio pois a intuição humana considerou mais simples e lógica na abordagem a duas estruturas tubulares (Zhong *et al.* 2003). Esta forte preferência é constatada por Daniel em 1977, no seu livro *Reconstructive Microsurgery*: “o *sine qua non* na transferência de um retalho livre é uma anastomose término-terminal [T-T] com discrepância de diâmetro dos vasos” (Costa 1994).

Retracção longitudinal do vaso e contracção

Uma das mais antigas constatações em cirurgia é a de que um vaso parcialmente seccionado sangra abundantemente mais do que outro totalmente seccionado. A explicação para este fenómeno prende-se com a capacidade de retracção longitudinal e contracção circular da artéria totalmente seccionada bem patente em episódios traumáticos que se apresentam frequentemente em urgência clínica (Figura 19).

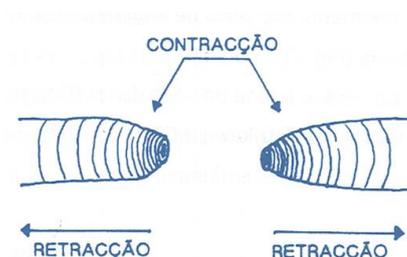


Figura 19 – Diagrama de retracção e contracção após arteriotomia (Adaptado de Costa 1994).

Nas anastomoses T-T o fenómeno da retracção longitudinal não pode ser evitado, o que pode, *per sí*, representar a maior condicionante para o sucesso da anastomose. Mesmo quando a anastomose é realizada sem qualquer tensão longitudinal (por meio de enxertos venosos de interposição), esta retracção é um factor de espasmo ao nível da anastomose. A principal contrariedade assenta no facto de a diminuição de comprimento do vaso, provocada pela retracção longitudinal, potenciar o espasmo circular induzido pelas forças centrípetas de contracção. Por este motivo, aquando da preparação de uma anastomose após a adventicectomia, os topos vasculares são dilatados com micropinças dilatadoras apropriadas (Costa 1994).

Interposição de um enxerto venoso

O uso de enxertos venosos deve ocorrer quando a tensão para aproximação dos vasos a coaptar é demasiada. A fácil distensão venosa torna mais acessível a técnica com veias do que o recurso a artérias. Para além do exposto, a acessibilidade na recolha de veias do paciente é maior. A maior parte dos enxertos venosos de interposição devem ser colocados em sentido reverso para permitir um fluxo continuado sem obstrução valvular (Mueller *et al.* 2006).

Existem técnicas que podem ser utilizadas no sentido de colmatar a **discrepância de diâmetros** entre o vaso e o enxerto, no sentido de tornar a anastomose mais exequível, evitando ou diminuindo a súbita constrição ou deflexão: i) para discrepâncias inferiores a uma

relação de 2:1, a dilatação mecânica intraluminal é geralmente suficiente; ii) se a diferença nos diâmetros dos topos vasculares está entre 2:1 e 3:1, podemos recorrer à secção do topo do vaso de menor diâmetro; iii) quando na presença de discrepâncias superiores a 3:1, devemos optar por uma anastomose T-L ou recorrer a um microenxerto venoso de interposição. Importa ainda referir que, aquando da secção de um dos topos para colmatar uma incongruência vascular entre 2:1 e 3:1, podemos recorrer à secção oblíqua (que não deve exceder 30° sob pena de incrementar a turbulência), espatulação triangular (onde a secção longitudinal não deve exceder o seu perímetro) ou inclusão de uma área da parede lateral do vaso dador (Costa 1994, Mueller *et al* 2006) (Figura 20).



Figura 20 – **A)** Aspecto do topo vascular após secção oblíqua a 30°; **B)** Espectulação triangular; **C)** Inclusão da parede lateral do vaso dador; e **D)** Microenxerto venoso de interposição (Adaptado de Costa 1994).

1.2. Interdigitação telescópica

Este método de intuscepção foi introduzido em microcirurgia por Lauritzen em 1978 e ficou conhecida por *sleeve anastomosis* (Zhong *et al.* 2003). A técnica consiste fundamentalmente na triangulação lateral da parede do vaso receptor, aumentando-lhe o diâmetro, o que permite o acoplamento de um vaso idêntico com o topo de secção transversal; este topo vascular vai ser introduzido dentro do lúmen do vaso triangulado, como um telescópio, sendo a sua fixação efectuada somente por dois pontos de sutura, colocados em planos verticais opostos (Costa 1994) (Figura 21). Muitos cirurgiões preferem esta técnica à T-T “pura” já que revela algumas vantagens: é mais rápida, exige menor dissecação da íntima, não há relatos de aneurisma no local de anastomose e apresenta altas taxas de patência com baixos índices de complicações pós-operatórias (Zhong *et al.* 2003).

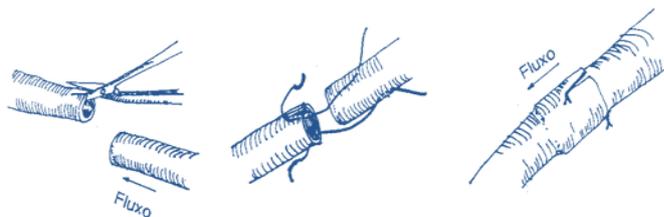


Figura 21 – Anastomose T-T através de Interdigitação telescópica (Adaptado de Zhang *et al.* 1991).

1.3. Anastomose término-lateral e conceitos fisiológicos condicionantes

O desenvolvimento da técnica de anastomose T-L surge envolta num certo cepticismo devido à teórica desvantagem hemodinâmica, atrasando progressivamente o seu estudo e evolução. A aplicação clínica deste conceito surgiu na área da Neurocirurgia e posteriormente, devido ao sucesso das suas aplicações clínicas, na área da Cirurgia Reconstructiva com vantagens hemodinâmicas e anatomocirúrgicas (Costa 1994).

A anastomose T-L permite uma versatilidade no **planeamento cirúrgico** já que, mantendo o fluxo longitudinal do vaso receptor, não restringe o local ou o nível da anastomose, permitindo

que a anastomose se localize sempre fora e o mais longe possível do local da lesão. O problema da discrepância dos vasos não existe, pois a forma e o tamanho da arteriotomia no vaso receptor pode ser programada conforme o diâmetro do vaso do retalho. Assim, a selecção do retalho é independente do diâmetro do vaso receptor (Costa 1994; Zhong *et al.* 2003). O problema da **preservação da irrigação** pela divisão de fluxo arterial distal da artéria receptora pela artéria do retalho é apenas teórico – nunca foi clinicamente observado e, em condições normais, o fluxo nas artérias principais é apenas uma fracção do fluxo potencial máximo. Sendo o retalho implantado por anastomoses T-L, a irrigação local e distal vai ser aumentada por dois motivos: a irrigação distal continua a ser efectuada pelo fluxo longitudinal da artéria receptora principal; o fenómeno de neo-vascularização promovido através da massa tecidual do retalho, vai irrigar áreas potencialmente desvascularizadas (Costa 1994; Zhong *et al.* 2003). A **ausência de retracção longitudinal e baixa probabilidade de espasmo** são duas vantagens da arteriotomia na execução da anastomose T-L. A arteriotomia na artéria receptora, significa a sua divisão parcial: este facto impossibilita que o fenómeno de retracção longitudinal, presente quando uma artéria é completamente seccionada, apresente algum papel na redução de fluxo sanguíneo e no espasmo arterial, pois a artéria receptora mantém o seu comprimento original. De facto, essas forças tão prejudiciais aquando da realização de uma anastomose T-T, tornam-se benéficas para a anastomose T-L, já que promovem o alargamento do diâmetro da arteriotomia (Costa 1994) (Figura 22).



Figura 22 – Esquema dos fenómenos de contracção e retracção numa arteriotomia (Adaptado de Costa 1994).

1.4. **Cuffing (envolvimento por baínha)**

No início, esta técnica era frequentemente adoptada para prevenir derrame da área anastomosada. Actualmente porém, temos a noção de que pequenas “fugas” se resolvem sem intervenção do cirurgião e derrames maiores podem ser solucionados com a adição de suturas na camada adventícia (Zhong *et al.* 2003).

2. **Técnicas de coaptação**

Muitos têm sido os métodos de coaptação de anastomoses vasculares desenvolvidos ao longo das últimas décadas. Os principais objectivos dos diversos métodos de fixação prendem-se com simplicidade e rapidez de execução sem baixar as taxas de patência e por isso com o mínimo risco de trombose intravascular. O parco fluxo sanguíneo, alteração nos constituintes do sangue e danos nas paredes vasculares são os principais factores que levam a trombose intravascular. Os métodos de fixação anastomótica descritos incluem: anastomose por sutura; técnicas de laser; electrocoaptação; dispositivos mecânicos; e colas e adesivos anastomóticos (Zhong *et al.* 2003).

2.1. Suturas

2.1.1. Técnicas de anastomose término-terminal

Convencionalmente, os vasos a anastomosar são posicionados topo a topo com *clamp* microvascular. Posteriormente inspeccionam-se os topos e a íntima dos vasos para se verificar a ausência de resíduos trombóticos, assim como excesso de tecido ou irregularidades, para se proceder à sutura (normalmente com nylon 8/0, 9/0 ou 10/0) (Figura 23).

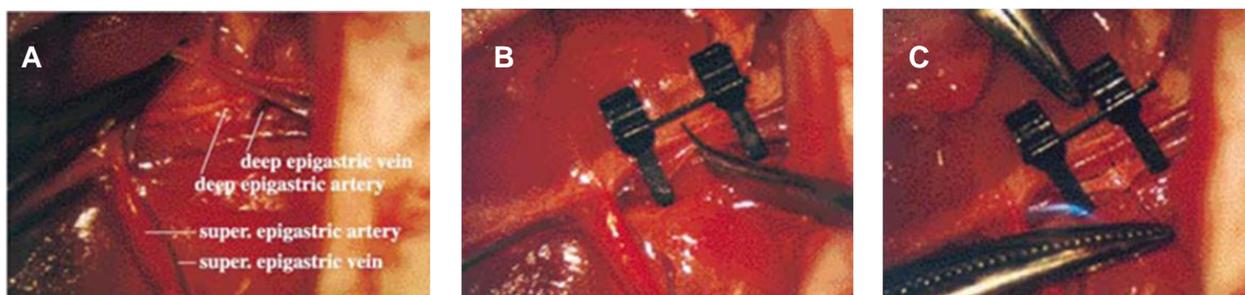


Figura 23 – Anastomose término-terminal (10x): **A)** Relação anatômica entre a artéria e veia femorais e as suas tributárias; **B)** Posição do *clamp* microvascular e arteriotomia; **C)** Suturas de referência a 180° (biangulação simétrica) para posterior anastomose (Adaptado de Hsu & Hsieh 2003).

A sutura neste tipo de anastomose começou por seguir o princípio da colocação de dois pontos diametralmente opostos em 180° (**biangulação simétrica**), que serviriam posteriormente de referência equatorial para a subsequente sutura das paredes anterior e posterior. A penetração ou transfixação da parede posterior aquando da sutura da parede anterior é inaceitável e revela-se a principal contrariedade desta técnica, principalmente na anastomose de vasos de menor diâmetro (entre 0,6 e 1mm). Este erro técnico pode ser evitado através da irrigação do lúmen vascular para distensão do vaso e introdução de pinças microcirúrgicas no mesmo, exercendo pressão contrária aquando da sutura (Costa 1994, Yap & Butler 2007) (Figura 24).

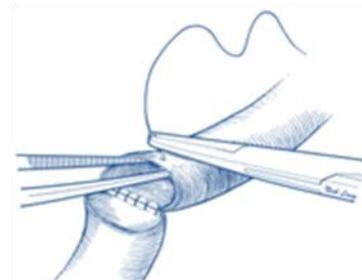


Figura 24 – Contrapressão no lúmen vascular para anastomose (Adaptado de Yap & Butler 2007).

Cobbet, em 1967, introduziu um conceito simples mas decisivo na execução de uma boa microanastomose – a **biangulação excêntrica**. Esta técnica sugere a colocação de duas suturas de referência separadas por 120° (nas posições de 10 e 2 horas, de acordo com os ponteiros do relógio) que criam um plano paraequatorial quando é exercida tracção sobre as mesmas (Figura 25). A parede anterior torna-se assim mais curta e tensa e a posterior mais longa e laxa com o conseqüente afastamento e queda da última em relação à primeira. É assim menos provável (ou virtualmente impossível) a transfixação durante a sutura da parede anterior. Esta técnica é a que mais frequentemente se pratica na execução de anastomoses T-T e a visualização da parede posterior do vaso é feita pela

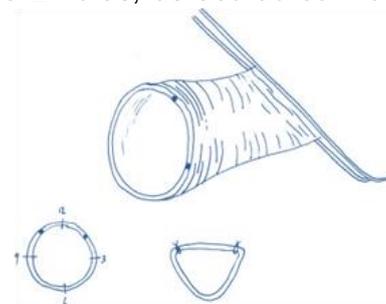


Figura 25 – Biangulação excêntrica (Adaptado de MacDonald 2005).

rotação dos *clamps* microvasculares ou, na ausência de espaço, pela rotação das suturas de referência através de micropinças (Costa 1994; MacDonald 2005).

A sutura contínua apresenta algumas vantagens como maior rapidez de execução, necessidade de menor número de nós na anastomose e melhor distribuição da tensão de sutura ao longo da parede do vaso (Figura 26). Na prática cirúrgica as anastomoses arteriais são normalmente executadas com sutura interrompida enquanto as anastomoses venosas com sutura contínua. Inúmeros estudos demonstraram ausência de diferenças significativas na taxa trombótica entre estas duas técnicas (Yap & Butler 2007).

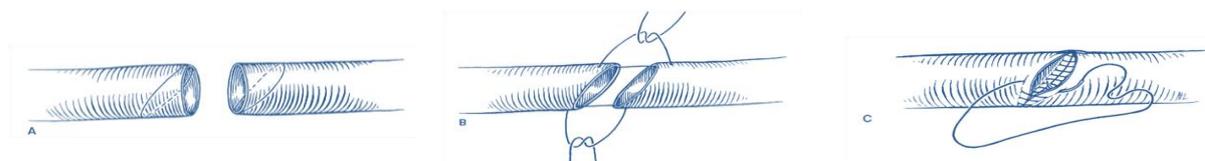


Figura 26 – Anastomose T-T com sutura contínua: **A)** Os vasos (dador e receptor) podem ser seccionados num ângulo oblíquo para aumentar o diâmetro dos topos e facilitar a sutura; **B)** e **C)** Biangulação simétrica com sutura contínua (Adaptado de Yap & Butler 2007).

Na relação hemodinâmica entre fluxos provenientes de **vasos de diferente calibre**, a anastomose entre um vaso de pequeno calibre e um de maior diâmetro deve ser evitada devido à turbulência gerada, enquanto o inverso provoca menos turbulência, aumentando a probabilidade de sucesso. À medida que a discrepância entre vasos aumenta, o sucesso da anastomose T-T diminui. Quando o cirurgião é confrontado com uma discrepância de diâmetro dos vasos a anastomosar, pode recorrer à secção do vaso de menor diâmetro até 30°. Em vasos onde a relação da discrepância é maior que 2:1 torna-se preferível o recurso a enxertos venosos de interposição (Costa 1994, Mueller *et al* 2006).

2.1.2. Técnicas de anastomose término-lateral

Existem opiniões divergentes no que concerne à execução de anastomoses T-L. As principais diferenças relacionam-se com o ângulo de entrada do pequeno vaso e a forma da arteriotomia. Em relação ao ângulo de entrada, e embora a esmagadora maioria dos autores considere preferível um ângulo o mais agudo possível, estudos efectuados por Nam e Acland em 1978 não encontraram diferenças significativas de fluxo em anastomoses T-L efectuadas a 45° e 90° no cão. Quanto à forma da arteriotomia a abordagem pode ser por uma fenda longitudinal, transversal, periforme ou elíptica (esta última com a vantagem técnica de permitir a identificação e separação dos bordos da arteriotomia resultando numa menor probabilidade de transfixação). A arteriotomia realizada por fenda longitudinal apresenta algumas vantagens em relação às outras técnicas. O procedimento é simples podendo ser executado com microbisturi, num ângulo de 15° ou 30°; a fenda pode ser aumentada se necessário ou reparada se demasiado longa e o lúmen da artéria receptora aumenta, já que nenhuma porção da parede arterial é excisada como no método clássico (Costa 1994; Gu *et al.* 2006) (Figura 27).

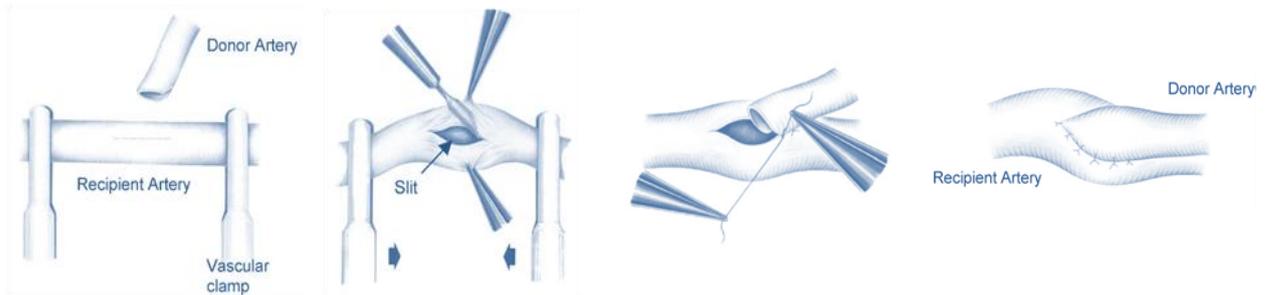


Figura 27 – Arteriotomia longitudinal para anastomose T-L: preparação dos vasos; execução da fenda longitudinal; sutura; aspecto da anastomose completa (da esquerda para a direita) (Adaptado de Gu *et al.* 2006).

A sequência de colocação dos *clamps* microvasculares na artéria receptora não é arbitrária: o primeiro a ser colocado é o *clamp* distal e só depois o proximal no intuito de promover uma dilatação arterial facilitando o seu manuseamento. Seguidamente procede-se à preensão da parede vascular com uma pinça de microcirurgia (ou *microclamp* de arteriotomia ou tracção por fio de microcirurgia 9/0), e realiza-se uma arteriotomia elíptica no vaso receptor com microtesoura (ou arteriotomia longitudinal como previamente explicado). Quanto à sequência das suturas da anastomose, existem duas abordagens: a mais vulgarmente utilizada consiste na colocação de duas suturas de referência nos dois extremos da arteriotomia suturando, posteriormente, as paredes anterior e posterior; outra abordagem consiste na sutura por pontos separados, colocados no sentido dos ponteiros do relógio, correndo o perímetro da anastomose (Costa 1994; Hsu & Hsieh 2003).

2.2. Laser

Alguns investigadores têm realizado estudos para avaliar a coaptação anastomótica através do uso de laser. Os feixes laser mais usados são os de Árgon, Dióxido de Carbono, Neodymium (YAG), entre outros. A grande vantagem na sua utilização prende-se com a rapidez no uso, ausência de suturas que actuam como corpos estranhos, inexistência de trauma à passagem da agulha e acesso a zonas mais profundas (Zhong *et al.* 2003). Em estudos histológicos que incidiram no uso de anastomose por laser, o processo de cicatrização evidenciado não diferiu das restantes técnicas. O grande senão na sua aplicação – e embora apresente taxas de patência similares – prende-se com a predisposição para aneurismas (Zhong *et al.* 2003).

2.3. Electrocoaptação

O princípio subjacente a esta técnica é provocar uma aderência por coágulo localizado, através da passagem de corrente eléctrica de alta frequência no tecido com *forceps* eléctricos bipolares. O grande problema desta técnica prende-se com a determinação da corrente necessária para provocar a quantidade certa de coagulação (Zhong *et al.* 2003).

2.4. Dispositivos mecânicos

Têm sido estudadas alternativas às suturas vasculares clássicas, com o intuito de evitar as

consequências no crescimento e distensão vascular após a anastomose. Estas alternativas incluem os dispositivos acopladores, agrafadores vasculares e anéis vasculares (Anexo IV).

3. Biomateriais naturais e sintéticos para próteses vasculares

Existe uma necessidade premente no desenvolvimento de novas próteses vasculares com boa aplicabilidade em vasos de pequeno diâmetro. Não obstante, têm sido feitos esforços na criação de biomateriais que se aproximam dos seus análogos naturais – é o caso do Dacron® (poliéster de multifilamentos) e do politetrafluoroetileno (PTFE) (Wang *et al.* 2007).

Uma das grandes vantagens dos **biomateriais naturais** em relação aos sintéticos, reside nas taxas de patência elevadas dos primeiros relativamente aos segundos. A preferência cirúrgica recai no uso de enxertos de veias ou ureteres autólogos ou de terceiros (Field 2003). Os biomateriais naturais apresentam uma matriz extracelular que serve de substrato ao crescimento e diferenciação celular. Para além da inerente compatibilidade celular, estes materiais apresentam já a forma desejada e, na maioria dos casos, a resistência dos órgãos dos quais originaram (Wang *et al.* 2007).

Os **biomateriais sintéticos** disponíveis podem ser classificados de acordo com a sua origem: têxtil ou não têxtil. Após a associação de um biomaterial ao tecido vascular, o tecido conectivo começa a infiltrar-se por entre os poros da parede do biomaterial até atingir o lúmen, onde fornece suporte estrutural à adesão de coágulo. Este revestimento interno recém-estruturado é denominado pseudoíntima. O tecido conectivo que está na génese desta camada tem um crescimento mais ou menos exuberante em torno da prótese, formando uma espécie de cápsula, cuja espessura depende da reactividade do biomaterial e das características do tecido circundante. Idealmente, a prótese deve apresentar-se bem incorporada sem potenciar uma excessiva invasão de tecido conectivo (Hoballah 2000). De entre os biomateriais mais utilizados e estudados são de salientar o PTFE e o Dacron®, já mencionados anteriormente.

O **PTFE** é um biomaterial não têxtil e não biodegradável, com uma carga electronegativa na sua superfície luminal de características antitrombóticas e com excelentes resultados em enxertos venosos de 7-9mm. Outra vantagem do PTFE relaciona-se com o facto de este não distender com o tempo (ao contrário do poliéster) e poder ser suportado por anéis colocados na superfície externa do conduto (Hoballah 2000). Uma das desvantagens em relação aos biomateriais naturais é a sua taxa de patência que, em cinco anos, é de 45% (muito abaixo dos 77% dos enxertos de veias autólogas) (Taylor 2007).

No que concerne ao **Dacron®**, este tipo de polímero têxtil tem sido usado com sucesso em enxertos vasculares de grande diâmetro (Wang *et al.* 2007) (Figura 28). De entre as suas principais características, destaca-se a porosidade e elasticidade (perdida após realização do

implante). Estes biomateriais podem ser revestidos ou impregnados com selantes como albumina, colagénio ou gelatina. A principal desvantagem destes polímeros é a sua tendência para dilatar com o tempo (Hoballah 2000).

Nem o Dacron® nem o PTFE permitem o desenvolvimento de endotelização do lúmen espontaneamente, podendo resultar na adesão de plaquetas e na formação de uma camada de fibrina que pode resultar em fenómenos trombóticos quer *per se* quer por hiperplasia da íntima (Hoballah 2000).

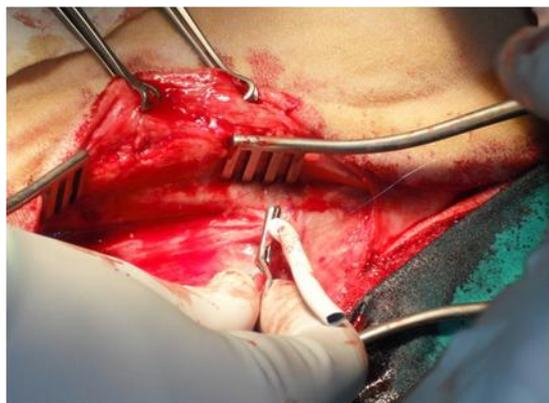


Figura 28 – Aspecto da aplicação do biomaterial Dacron® na reparação vascular de carótida ovina (Fotografia gentilmente cedida por Nuno Alexandre e Ana Colette Maurício 2010).

Tem sido estudada pelo nosso grupo de investigação e por outros grupos mundialmente, a **associação entre biomateriais e células estaminais** mesenquimais e hematopoiéticas, (Anexo III), no sentido de colmatar a lacuna da endotelização dos enxertos de biomateriais. Num estudo sobre a associação destas células a um polímero de ácido cítrico, verificou-se a inibição da agregação plaquetária, uma vez que se diferenciaram em células endoteliais (Allen *et al.* 2010).

V – ESTUDO DA AXIALIDADE VASCULAR NOS RETALHOS CUTÂNEOS

1. Introdução

Os retalhos cutâneos consistem em tecido cutâneo e subcutâneo que sobrevivem devido à sua própria vascularização. Estes diferenciam-se dos enxertos, já que os últimos são retirados de um local “dador” (ficando por isso sem circulação própria) e colocados num local distante, dependendo da nutrição vascular do local “receptor” (Mathes & Levine 2007).

No ano de 1889, Manhot definiu o padrão vascular da circulação cutânea. Em 1970, Milton demonstrou que a sobrevivência do retalho era baseada, não na relação largura/comprimento, mas no suprimento vascular que o nutre (Nesbit & Laub 2009). Em 1972, McGregor propôs uma classificação dos retalhos em Randomizados e Axiais. Só nas últimas quatro décadas é que renasceu o interesse pelo padrão vascular da pele e, ironicamente, a descrição dos retalhos musculocutâneo e fasciocutâneo distraiu a comunidade cirúrgica do órgão que tentava manter vivo – a pele! (Taylor 2007).

Tem havido uma prolífera atribuição de designações e classificações à circulação cutânea, normalmente baseadas no “design” do retalho e não na sua anatomia vascular. Importa por isso realçar que os “novos” retalhos – ilhas, neurocutâneos, directos, indirectos, axiais,

randomizados, super, septados, arteriais, musculocutâneos entre outros – são essencialmente os mesmos retalhos mas vistos por diferentes prismas (Taylor 2007) (Figura 29). Com a introdução do microscópio operatório, os retalhos deixaram de estar restritos ao local e puderam ser transferidos para qualquer parte do corpo através da técnica microvascular (Nesbit & Laub 2009).

Neste **estudo prático** foram abordados dois tipos de retalhos pediculados com base no seu suprimento vascular – o randomizado e o axial – bem como a vascularização que condiciona a sua viabilidade, dimensão e utilidade na prática clínica. Para isso foi usado como modelo animal o *Cavia porcellus* vulgarmente referenciado como cobaio ou Porquinho-da-Índia. Os animais, em número de 11, foram separados em dois grupos: A (com 4 animais) e B (de 7 animais), permanecendo cerca de dois meses em aclimatização e quarentena. À data das intervenções pesavam 350-500g, apresentando-se em bom estado de saúde e nutrição adequada. No grupo A, pretendeu-se estudar as limitações da relação largura (pediculada)/comprimento, dos retalhos abdominais transversos randomizados subordinados à vascularização abdominal. No grupo B, realizaram-se retalhos axiais epigástricos inferiores, cuja nutrição era assegurada pela artéria epigástrica superficial caudal e procuraram-se os limites craniais através de sucessivos incrementos no comprimento dos mesmos.

2. Circulação cutânea e conceitos subordinados

O estudo da anatomia e circulação cutânea do modelo animal é imprescindível para uma boa técnica e sucesso do procedimento cirúrgico (Costa 1994). Embora a circulação cutânea seja rica e extensa, os requerimentos metabólicos dos elementos cutâneos são baixos. Consequentemente, só uma pequena fracção do potencial circulatório cutâneo é necessária para a viabilidade cutânea, facto este pertinente para a sobrevivência dos variados retalhos cutâneos (Taylor 2007).

Uma consequência imediata da investigação subordinada ao princípio da *Axialidade Vascular* dos retalhos, desenvolvido por McGregor e Morgan, foi a definição quantitativa e qualitativa dos três sistemas de irrigação da pele: cutâneo directo, fasciocutâneo e musculocutâneo (Costa 1994).

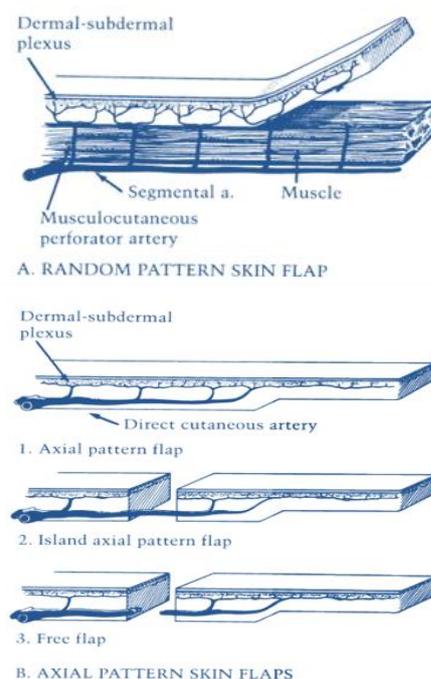


Figura 29 – Esquema da classificação de retalhos: **A)** Retalho randomizado; **B)** Retalho axial (Adaptado de Thorne 2007).

O **sistema musculocutâneo** é o sistema “fonte” da irrigação cutânea. Este sistema é composto por artérias e veias que “correm” dentro ou por entre os vários grupos musculares e cuja arborização determina a maior ou menor irrigação do tegumento, condicionando por isso a viabilidade e tamanho dos retalhos. Após a exteriorização vascular de entre os “blocos” musculares, as artérias (e veias) necessitam atravessar a fáscia profunda que, nestes pontos, se denominam como perfuradoras. A este nível, o sistema vascular assume-se como **sistema fasciocutâneo** e é responsável pela vascularização, não só da fáscia, mas também da superfície interna do tecido adiposo subcutâneo. A densidade, tamanho e direcção das perfuradoras cutâneas variam de região para região corporal, consoante o crescimento individual, diferenciação e requisitos funcionais da área por elas abrangida. Todas estas se interconectam numa rede tridimensional bastante complexa na derme, subderme, face interna da gordura subcutânea e face externa da fáscia (Costa 1994; Taylor 2007) (Figura 30). À medida que a vascularização deixa o estrato fasciocutâneo e entra no **sistema cutâneo directo**, assiste-se à diferenciação das artérias em arteríolas e capilares.

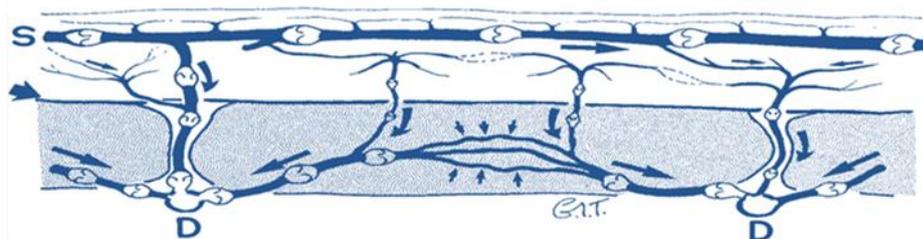


Figura 30 – Diagrama da circulação superficial (S) e profunda (D) da pele e músculo subjacente. Destaque para a bidireccionalidade de fluxo venoso na camada muscular (setas pequenas) (Adaptado de Taylor 2007).

A conexão verificada entre vasos cutâneos adjacentes pode ser estabelecida, quer por verdadeiras anastomoses (simples) sem alteração de calibre, quer por microanastomoses (retiformes) que se distribuem em elevado número na pele e tecido subcutâneo e desempenham uma importante função na regulação do fluxo sanguíneo do tegumento. Esta regulação de fluxo é determinante na sobrevivência do retalho, já que estas microanastomoses condicionam a resistência de fluxo entre a base e extremidade deste. Em circunstâncias de compromisso circulatório, como ocorre na execução de um retalho, as microanastomoses podem aumentar de calibre até verdadeiras anastomoses e, conseqüentemente, compensar a circulação na região distal do mesmo. Esta dilatação ocorre não só pelo relaxamento do tónus simpático, mas também pela hipertrofia e hiperplasia da parede dos vasos, com conseqüente aumento no diâmetro do lúmen vascular (Taylor 2007). As veias cutâneas também formam um plexo tridimensional com um extracto dominante na subderme. Embora algumas delas possuam válvulas orientando o sangue numa determinada direcção, a interligação é feita por veias avalvulares, o que permite uma bidireccionalidade de fluxo entre territórios venosos adjacentes (Taylor & Palmer 1987; Costa 1994; Taylor 2007).

As redes tridimensionais aqui discutidas, introduzem o conceito de **territórios vasculares cutâneos** (denominados em 1987 por Taylor como “angiosomas”). Este conceito sustenta que cada artéria axial cutânea é responsável pela irrigação de uma determinada área da pele (arteriosomas) e analogamente, cada veia axial drena o seu território (venossomas) (Taylor & Palmer 1987; Costa 1994). Além da demarcação dos territórios vasculares cutâneos, foi constatado que estas áreas territoriais não apresentam fronteiras estruturais mas dinâmicas, facto esse que levou à postulação de outro conceito: **Ponto de Equilíbrio Dinâmico das Pressões Vasculares** – define a relação adjacente dos territórios vasculares axiais cutâneos como sendo funcional e não estrutural: a maior pressão justa vaso axial nutritivo, vai diminuindo gradualmente pela rede vascular do território, até encontrar uma zona de pressão igual, pertencente ao território cutâneo adjacente. Em condições fisiológicas normais, as correntes sanguíneas não se misturam – é o conceito de **watershed** ou **queda de água**, no qual entre dois vasos axiais existe uma linha de equilíbrio de pressões que é aquela que demarca a fronteira entre os dois territórios vasculares cutâneos (Costa 1994).

3. Retalhos randomizados

Tendo em consideração que um retalho randomizado é caracterizado por não albergar no seu pedículo nenhum vaso com estrutura anatómica conhecida ou definida (Costa 1994), pode-se então inferir que este é suprido por contribuições vasculares aleatórias (e não dominantes) da derme e plexo subdérmico. Estudos clínicos permitiram constatar que a razão largura pedicular/comprimento é crítica para a sobrevivência do retalho (Costa 1994; Mathes & Levine 2007). Esta restrição limita a capacidade deste para viabilizar a cobertura de defeitos tegumentares extensos mas, quando respeitadas as limitações, torna-se uma opção de primeira escolha na abordagem às lesões com limites mais restritos (Mathes & Levine 2007).

A primeira abordagem ao estudo prático de retalhos randomizados, foi delinear a logística no que concerne ao número de animais, bem como a quantidade de retalhos que se poderia executar em cada animal, sem com isso inviabilizar ou comprometer cada retalho *per si* ou o desconforto animal. Seguidamente, intervieram-se os 4 animais do Grupo A, nos quais se executaram 16 retalhos randomizados, 4 por animal, com dimensões de 1x1cm, 1x2cm, 1x2,5cm e 1x3cm, pediculados junto à linha média abdominal longitudinal. No sentido de garantir uma igual dimensão, orientação e espaçamento dos retalhos, criou-se, com base numa película de Raio X, um modelo sólido e fiável que permitiu repetir em todos os animais o mesmo procedimento e assim sustentar a comparação entre os diversos retalhos dos diferentes animais (Figura 31).

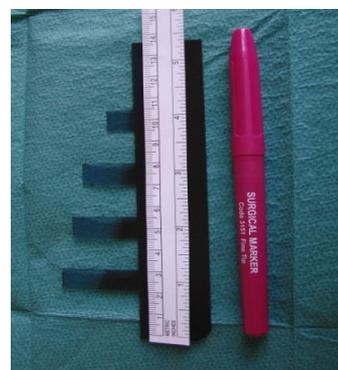


Figura 31 – Molde estrutural para execução dos quatro retalhos randomizados em película de Raio X e marcador dérmico.

Os retalhos foram então delineados (Figura 32A) e executados (Figura 32B) sob anestesia geral (preparada com quetamina e xilazina em administração ip), tendo-se procedido posteriormente ao levantamento dos mesmos (Figura 32C), no sentido de assegurar que a nutrição era proveniente do pedículo e não conjunta com os vasos perfuradores



Figura 32 – **A)** Delimitação dos retalhos com marcador dérmico; **B)** Incisão cutânea do perímetro tecidual; **C)** Aspecto dos retalhos após a delimitação cirúrgica e levantamento.

que emergem da fáscia subjacente. Recolocaram-se os retalhos no seu leito original e procedeu-se à sutura dos mesmos com nylon 5/0 (Figura 33A). Foi administrado a cada animal 2,5 ml de soro glicosado subcutâneo, bem como antibiótico (enrofloxacina) na dose de 5mg/kg, SID, durante 5 dias. Durante os dias subsequentes aos procedimentos cirúrgicos, efectuou-se um registo fotográfico com o intuito de avaliar a área de tecido necrosado, bem como a evolução do mesmo (Figura 33).



Figura 33 – Aspecto dos retalhos randomizados registados cronologicamente após a cirurgia: **A)** Pós-execução cirúrgica; **B)** 48 horas após; **C)** No 5º dia; e **D)** No 7º dia.

Assim, **48h** após a execução dos retalhos, os de dimensão 1x1cm e 1x2cm apresentavam-se com as margens bem definidas, bem vascularizados e sem presença de coloração que indiciasse tecido necrótico. No que diz respeito aos retalhos randomizados de 1x2,5cm, já era notória uma tonalidade violácea das margens distais, mas sem presença de zonas indicativas de necrose. Nos retalhos de 1x3cm, para além das margens distais semelhantes às referidas anteriormente, alguns continham já uma mancha arredondada, com diâmetro aproximado de 1,5mm e tonalidade castanha escura (Figura 33B). Ao **5º dia**, os dois retalhos de menor comprimento permaneciam viáveis na sua totalidade, enquanto os maiores (1x2,5cm e 1x3cm) evidenciavam necrose da porção distal com aproximadamente 0,5cm e 0,9cm, respectivamente (Figura 33C). O registo fotográfico do **7º dia** atesta o expectável baseado em estudos anteriores, já que permite estabelecer uma relação entre a base pedicular e o comprimento do

retalho de aproximadamente 2:1 (Figura 33D). Esta relação não encerra em si mesma uma garantia de sucesso, já que a viabilidade do retalho randomizado não é apenas dependente desta, mas também da vascularização cutânea do tecido onde é efectuado (vasos perfuradores e colaterais que o nutrem) e do estado de saúde do indivíduo.

4. Retalhos axiais

O retalho axial é aquele que alberga no seu pedículo um vaso nutritivo importante que corre e arboriza ao longo do seu comprimento e do qual depende a irrigação do seu território (Costa 1994). Clinicamente, é notório que um território vascular cutâneo pode ser “capturado” com segurança pela artéria cutânea na base do retalho, e que a necrose comumente ocorre ao nível das anastomoses retiformes na rede arterial do território vascular adjacente (Taylor & Palmer 1987; Taylor 2007). Devido a esta arborização, estes retalhos permitem ao cirurgião depositar uma maior confiança na sua exequibilidade quando o intuito é a cobertura de defeitos com tamanho moderado a grande. A sua única limitação, quando pediculados, é a topografia do arco de rotação. Porém, esta limitação foi “contornada” através de técnicas microcirúrgicas de transferência de tecidos livres, as quais requerem apenas disponibilidade vascular para “ancorar” o retalho livre (Mathes & Levine 2007).

Nesta segunda parte do estudo prático, pretendeu-se demonstrar a exequibilidade e aplicabilidade da técnica cirúrgica dos retalhos axiais, tomando como exemplo o retalho epigástrico superficial caudal no *Cavia porcellus*. Foi necessária uma boa compreensão dos conceitos vasculares previamente explanados neste capítulo, no sentido de os integrar, relacionar com os resultados expectáveis e aceitá-los como factores condicionantes da aplicabilidade clínica, nomeadamente o conceito de territórios vasculares e *watershed*.

Para tal, recorreu-se ao grupo B (N = 7 animais) previamente descrito, sujeito aos mesmos procedimentos pré e pós-cirúrgicos, apresentando como factor de variabilidade a técnica cirúrgica. Seguidamente, descrevem-se os tópicos que importa atentar, a par do procedimento cirúrgico, com vista ao sucesso do retalho.

Retalho epigástrico superficial caudal no *Cavia porcellus*

Anatomia aplicada

i. Vascularização

No sentido de compreender o tamanho do retalho axial passível de ser executado, deve-se atentar ao suprimento vascular (Figura 34). A partir da região ilíaca, a artéria epigástrica caudal, ramo da artéria circunflexa ilíaca profunda, penetra o músculo recto abdominal para se anastomosar com a artéria epigástrica craneal na região imediatamente caudal à cicatriz umbilical. O músculo recto abdominal é então atravessado por vasos perfurantes dirigindo-se para a região entre a zona xifóide e púbica. Quando estes atingem o estrato cutâneo, dividem-

-se em duas partes, com alguns vasos estendendo-se para a região média para se anastomosar com os homólogos contralaterais e outros direccionados lateralmente para suprir a parede abdominal. A parede abdominal caudal é por isso vascularizada pela artéria epigástrica superficial caudal (ramo directo da artéria pudenda externa) que se divide nos ramos lateral e medial, e pelas artérias perforantes supracitadas. O conceito de território vascular assume neste estudo um papel preponderante, já que é delimitado cranialmente pelas anastomoses presentes entre os ramos lateral e medial da artéria epigástrica superficial caudal e a artéria epigástrica superficial cranial, responsável pela vascularização do tórax ventral (Doncatto *et al.* 2007).



Figura 34 – Aspecto da arborização vascular da artéria epigástrica superficial caudal.

ii. Tamanho

O tamanho e forma dos retalhos axiais são os aspectos mais condicionados pela arborização vascular previamente descrita. No sentido de constatar esta subordinação, projectaram-se diferentes retalhos axiais no cobaio, pediculados na artéria epigástrica superficial caudal, com diferentes comprimentos. Esta variável foi explorada até se encontrar o limite distal de viabilidade do retalho axial, realizando-se: dois retalhos de 1x3cm, que visam confirmar o contraste entre a viabilidade do retalho randomizado e o retalho axial para as mesmas dimensões; um retalho axial com 1x4cm; e dois retalhos axiais com 1x5cm (Figura 35).

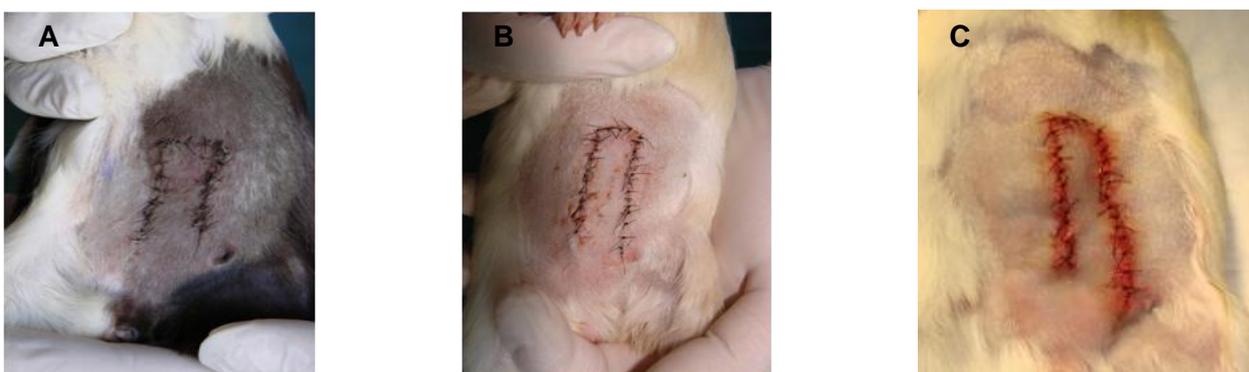


Figura 35 – Registo fotográfico do aspecto dos retalhos axiais: **A)** de 1x3cm ao 3º dia pós-cirúrgico; **B)** de 1x4cm fotografado ao 2º dia pós-cirúrgico; e **C)** de 1x5cm após a execução cirúrgica do mesmo.

A escolha dos diferentes comprimentos longitudinais dos retalhos baseou-se em fronteiras anatómicas, no sentido de as relacionar com os territórios vasculares que foram explorados. Esta referenciação anatómica foi determinada a partir de estudos vasculares efectuados em pequenos roedores (Doncatto *et al.* 2007), que constataram que o *términus* cranial da arborização da artéria epigástrica superficial caudal (*ie*, as anastomoses vasculares entre este e o território adjacente da artéria epigástrica superficial cranial) se localizava aproximadamente

na região abdominal cranial à cicatriz umbilical.

Os retalhos de 1x3cm e 1x4cm apresentaram viabilidade vascular em 100% da sua área, sem qualquer evidência de tecido necrótico, enquanto um dos de 1x5cm evidenciou coloração violácea dos cantos distais a partir das 48h após a execução do mesmo. Esta constatação permite inferir que o território vascular da artéria epigástrica superficial caudal começa a perder, nesta região abdominal, arborização vascular sendo a mesma da responsabilidade do território vascular adjacente cranial.

iii. Arco de Rotação

Uma noção relevante dos retalhos axiais é a existência de um ponto *pivot* e arco de rotação (Figura 36) que condiciona a exequibilidade e aplicação cirúrgica destes. O conhecimento de que estes retalhos podem apenas sofrer rotação em torno do seu ponto *pivot* e de que a margem do retalho exterior ao arco de rotação é a linha de maior tensão do mesmo, é fulcral para o planeamento cirúrgico (Thorne 2007).



Figura 36 – Planeamento cirúrgico do tamanho do retalho e rotação do mesmo.

5. Aplicações Clínicas

Depois da aferição do tamanho máximo do retalho epigástrico superficial caudal axial pediculado em 1cm, passível de ser executado com garantia de ausência de compromisso vascular para o tamanho do modelo animal em causa, realizou-se a rotação do mesmo de forma a demonstrar uma das aplicações cirúrgicas. Para isso, desenhou-se com marcador dérmico um defeito no membro inferior de dois cobaios e realizaram-se dois retalhos de 1x4cm sujeitos a rotação para a cobertura deste (Figura 37). O retalho manteve uma vascularização total, atestando o expectável.



Figura 37 – Retalho axial com rotação para cobertura de defeito do membro inferior ipsilateral.

O conhecimento da anatomia e vascularização cutâneas dos animais de companhia revela-se de grande importância para a clínica cirúrgica. Podemos inferir, pelo retalho epigástrico superficial caudal axial cutâneo do cobaio, que existe aplicabilidade clínica, bem como inúmeras vantagens anatomocirúrgicas: uma boa vascularização do retalho; independência da relação base/comprimento; cobertura regional (subordinada ao arco de rotação do retalho); e cobertura à distância através de um retalho microvascular (não demonstrada neste estudo mas inferida pelo estudo da sua vascularização, já que se revelou um excelente retalho para tal, e assim projectar a sua exequibilidade). A aplicabilidade clínica destes retalhos pediculados revela-se preponderante na reconstrução da parede abdominal, do membro inferior ipsilateral e perineal (Figura 38), enquanto os retalhos microvasculares com inferência a partir deste,

permitem a cobertura do membro inferior contralateral, membros superiores, cobertura da cabeça e pescoço, e cobertura torácica.

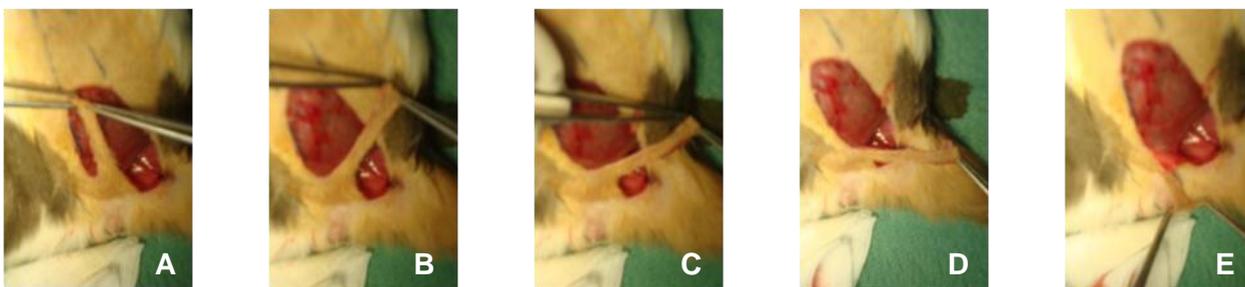


Figura 38 – Aplicabilidade clínica do retalho epigástrico superficial caudal: **A)** Normal enquadramento anatómico; **B)** Cobertura de defeitos abdominais; **C)** Cobertura de defeitos de flanco; **D)** Cobertura de defeitos no membro inferior ipsilateral; **E)** Cobertura de defeitos perineais.

VI – BIBLIOGRAFIA

- Allan CH, Trumble TE (2004) “Biomechanics of Peripheral Nerve Repair” **Journal of Operative Techniques in Orthopaedics** 14, 184-189
- Allen JB, Khan S, Lapidos KA, Ameer GA (2010) “Toward Engineering a Human Neoendothelium with Circulating Progenitor Cells” **Stem Cells** 28, 318-328
- Amado S, Simões MJ, Silva PA, Luís AL, Shirosaki Y, Lopes MA, Santos JD, Fregnan F, Gambarotta G, Raimondo S, Fornaro M, Veloso AP, Varejão AS (2008) “Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model” **Biomaterials** 1-11
- Baksh D, Yao R, Tuan RS (2007) “Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Mesenchymal Stem Cells From Umbilical Cord and Bone Marrow” **Stem Cells** 1384,1392-1425
- Battiston B, Tos P (2003) “Microsurgical Techniques for Peripheral Nerve Repair” in Malizos KN (Ed.) **Reconstructive Microsurgery**, Landes Bioscience, 7-23
- Calles-Vazquez MC, Viguera FJ, Sun F, Usón JM, Usón J (2005) “Vein and artery growth after anastomosis with vascular closure staple clips vs interrupted polypropylene suture: application in pediatric vascular surgery” **Journal of Pediatric Surgery** 40, 1428-1435
- Can A, Karahuseyinoglu (2007) “Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells” **Stem Cells** 2886, 2895-2925
- Costa HU (1994) “História e Evolução da Microcirurgia” in **Estudo Anatómico e Aplicações Clínicas de Retalhos Livres Microcirúrgicos** 1, 25-140
- Doncatto L, Silva J, Silva V, Martins P (2007) “Cutaneous Viability in a Rat Pedicled TRAM” **American Society of Plastic Surgeons** DOI: 10.1097/01.prs.0000258534.46634e7
- Greenberg MS (1994) “Injury Classification System” in **Handbook of Neurosurgery** 6th edition, 411- 412
- Greene WB (2006) “Disorders of nerves” in **Netter’s Orthopaedics**, 1st ed, Saunders Elsevier, 137-

- Gu H, Chua A, Tan BK, Hung KC (2006) "Nonlinear finite element simulation to elucidate the efficacy of slit arteriotomy for end-to-side anastomosis in microsurgery" **Journal of Biomechanics** 39, 435-443
- Hoballah JJ (2000) "Vascular Grafts, Patches, and Sutures" in **Vascular Reconstruction Anatomy, Exposures, and Techniques** 2, 17-26
- Hsu GL, Hsieh CH (2003) "End-to-end Anastomosis" in Hsu GL (Ed.) **A Laboratory Manual for Potency Microsurgery** 12, 17-20
- Ichihara S, Inada Y, Nakamura T (2008) "Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts" **Journal Injury** 39s4, s29-s39
- Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN (2005) "Regeneration and repair of peripheral nerves" **Journal Injury** 36s, s24-s29
- Junqueira LC, Carneiro J (1999) "Tecido Nervoso" in **Histologia Básica**, 9ª Ed. Editora Guanabara 129-178
- Karamursel S, Kayikçioğlu A, Ertoý D, Karamursel B, Dayican A, Çelebioglu S, Keçik A (2001) "Long-term Effects of Extraluminal Dilatation With a Rigid Circle on Arteriovenous Anastomotic Line in Venous Grafts Transposed into Arterial Defects" **Annals of Plastic Surgery** 47(3), 279-284
- Kayikçioğlu A, Karamursel S, Demirci M, Erdem S, Keçik A (2004) "A New Epineural Nerve Repair Technique With Metallic Circle" **Journal Surgical Neurology** 62, 387-392
- Luís AL (2008) "Introdução – Revisão Bibliográfica" in **Reparação de Lesões do Nervo Periférico num Modelo Animal** 1, 29-116
- Luís AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, Simões MJ, Santos JD, Fregnan F, Raimondo S, Veloso AP, Ferreira AJ, Silva PA, Varejão AS, Maurício AC (2007) "Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp" **Journal of Neuroscience Methods** 163, 92-104
- MacDonald JD (2005) "Learning to Perform Microvascular Anastomosis" **Skull Base** 15, 229-240
- Mackinnon SE, Nakao Y (1997) "Repair and reconstruction of peripheral nerve injuries" **Journal of Orthopaedic Science** 2, 357-365
- Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JPP (2005) "Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice?" **Journal Surgical Neurology** 64,10-16
- Mathes SJ, Levine J (2007) "Muscle Flaps and Their Blood Supply" in Thorne CH (Ed.) **Grabb & Smith's Plastic Surgery**, 6ª Ed, Lippincott W & W, 5, 42-51
- Mazzer PY, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VP (2008) "Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats" **J Neuroscience Methods** 173, 249-258
- Millesi H (1970) "Interfascicular nerve grafting" **Orthopaedic Clinic of North America** 2,419-421
- Millesi H (2006) "Factors Affecting the Outcome of Peripheral Nerve Surgery." **Microsurgery** 26,

295-302

- Millesi H, Tsolakidis S (2005) "End-to-side coaptation: An important tool in peripheral nerve surgery" **European Surgery** 37(4), 228-233
- Mueller RV, Arora B, Dry GM, Vedder NB (2006) "General Approach to Microsurgery" in Greer *et al.* (Ed.) **Handbook of Plastic Surgery**, VI, 505-554
- Myckatyn TM, Mackinnon SE (2007) "Microsurgical Repair of Peripheral Nerves and Nerve Grafts" in Thorne CH (Ed.) **Grabb & Smith's Plastic Surgery**, 6^a Ed, Lippincott W & W, 73-83
- Nesbit RD, Laub DR (2009) "Random Skin Flaps" in <http://emedicine.medscape.com/article/1284569> consultado em 31-03-2010
- Pichierri A, Frati A, Santoro A, Lenzi J, Delfini R, Pannarale L, Gaudio E, D'Andrea G, Cantore GP (2009) "How to set up a microsurgical laboratory on small animal models: organization, techniques, and impact on residency training" in **Neurosurg Rev** 32, 101-110
- Ristic S, Strauch RJ, Rosenwasser MP (2000) "The assessment and treatment of nerve dysfunction after trauma around the elbow." **Clinical Orthopaedics** 370, 138-153
- Rowshan K, Jones NF, Gupta R (2004) "Current Surgical Techniques of Peripheral Nerve Repair" **Operative Techniques in Orthopaedics** 14, 163-170
- Sagi A, Casanova R, Herrera GA, Engels BV (1987) "Microarterial sutureless anastomosis using a polymeric adhesive: an experimental study." **Journal of Reconstructive Microsurgery** 3, 209-210
- Shenaq SM, Kim JYS, Bienstock A, Roth FS, Yuksel E (2006) "Plastic and Reconstructive Surgery" in Brunickardi FC (Ed.) **Schwartz's Manual of Surgery**, 8th Ed, McGraw-Hill, 1169-1188
- Tamai S (2009) "History of Microsurgery" **American Society of Plastic Surgeons** 124 (6), 282-294
- Taylor GI (2007) "The Blood Supply of the Skin" in Thorne CH (Ed.) **Grabb & Smith's Plastic Surgery**, 6^a Ed, Lippincott W & W, 4, 33-41
- Taylor GI, Palmer JH (1987) "The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications" **British Journal Plastic Surgery** 40 (2), 113-141
- Thorne CH (2007) "Techniques and Principles in Plastic Surgery" in Thorne CH (Ed.) **Grabb & Smith's Plastic Surgery**, 6^a Ed, Lippincott W & W, 1, 3-14
- Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C (2007) "Development of small-diameter vascular grafts" **World Journal of Surgery** 31 (4), 682-689
- Yap LH, Butler CE (2007) "Principles of Microsurgery" in Thorne CH (Ed.) **Grabb & Smith's Plastic Surgery**, 6^a Ed, Lippincott W & W, 66-73
- Zhong T, Vaughan C, Bowen A (2003) "Microvascular Surgical Techniques" in Malizos KN (Ed.) **Reconstructive Microsurgery**, Landes Bioscience 1, 1-7

ANEXOS

ANEXO I – LESÃO DO NERVO PERIFÉRICO

PATOFISIOLOGIA DA LESÃO

A reparação da fibra nervosa após trauma continua a ser dos maiores desafios na Medicina Regenerativa e na Microcirurgia pois, em grande número de casos, revela-se incompleta ou insatisfatória (Johnson *et al.* 2005). Logo após a lesão axonal, desenvolve-se um fenómeno denominado **degenerescência Walleriana** no segmento distal à lesão e que pode culminar com a sua total reabsorção (Luís 2008). O início deste processo dá-se com a mitose das células de Schwann que vão preencher o local da lesão e, em conjunto com os macrófagos, digerir a bainha de mielina local. A degenerescência assume uma projecção centrífuga a partir do local da lesão e, no sentido retrógrado, estende-se até ao primeiro nóculo de Ranvier. Existem também implicações no corpo celular com a dissolução dos corpúsculos de Nissl (Johnson *et al.* 2005). O papel dos macrófagos e células de Schwann nesta fase é de especial importância pois, embora sejam responsáveis pela fagocitose dos detritos na zona lesionada, sintetizam uma variedade de moléculas para a matriz envolvente (factores neurotróficos e neurotrópicos), preponderantes na **regeneração**: factor de crescimento dos fibroblastos (bFGF); factor de crescimento similar à insulina-1 (IGF-1), citocinas (IL-1 e IL-6), entre outros (Johnson *et al.* 2005, Luís 2008). As células de Schwann emergem dos topos edemaciados (maioritariamente do topo distal), e iniciam um processo de proliferação cordonal orientada sobre a lacuna nervosa, denominada de bandas de Büngner (Johnson *et al.* 2005). Um grande número de pseudópodes axonais (cones de crescimento) emerge do segmento proximal com objectivo de se estenderem distalmente orientando-se pelas células de Schwann recém-estruturadas. Quando os axónios recém-formados (e orientados) atingem com sucesso o topo distal, as células de Schwann envolventes começam a sintetizar bainhas de mielina (Figura I). Cada cone axonal é capaz de produzir inúmeros prolongamentos devido ao suporte neurotrófico presente (como é o caso da IGF-1 responsável pela promoção da regeneração axonal) (Junqueira &

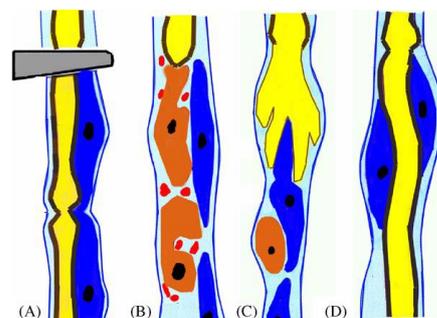


Figura I – Degeneração e regeneração do SNP: **A)** Lesão; **B)** Macrófagos digerem os detritos axonais; **C)** Cone de crescimento; **D)** Mielinização do axônio (Johnson *et al.* 2005).

Carneiro 1999, Johnson *et al.* 2005). A importância da regeneração axonal orientada pelas bandas de Büngner até ao topo distal, explica os diferentes graus de regeneração constatados entre lesões de axotmese e neurotmese: embora os axónios possam ser danificados na axotmese, as células de Schwann, a lâmina basal e o perineuro mantêm a continuidade e assim facilitam o processo regenerativo (Johnson *et al.* 2005). Se a lacuna nervosa entre os topos se revela demasiado grande ou se ocorreu reabsorção do topo distal, as neurofibras

crescem desordenadamente dando origem a uma estrutura dolorosa denominada **neuroma de amputação** (Junqueira & Carneiro 1999).

CLASSIFICAÇÃO DA LESÃO

Neurapraxia (lesão Sunderland tipo I)

Este tipo de lesão resulta de uma compressão ou estiramento da fibra nervosa, onde a integridade da mesma se mantém, preservando o alinhamento dos axónios, embora com algum compromisso das bainhas de mielina (Luís 2008) devido a uma acumulação de iões na zona axonal danificada. A esmagadora maioria dos clínicos não valorizava este tipo de lesão. No entanto, Sunderland, atento a esse facto, caracterizava-a por “perversão de função”. O sinal cardinal deste tipo de lesão é “mecano-sensível” e não a ausência de condução. Um exemplo clássico é o “cotovelo de tenista”. A recuperação de uma Neurapraxia afigura-se célere, dependendo da remielinização da zona danificada (Myckatyn & Mackinnon 2007).

Axonotmese (lesão Sunderland tipo II)

A axonotmese é um grau mais severo de lesão nervosa, quando comparada com a neurapraxia. Decorre de uma lesão axonal onde há preservação da bainha de tecido conjuntivo neural (endoneuro), do epineuro, células de Schwann e outras estruturas de sustentação, embora ocorra degenerescência Walleriana (Grant *et al.* 1999). A axonotmese condiciona o tempo de recuperação que é mais moroso, embora não necessite de reestruturação cirúrgica já que a fibra nervosa permanece totalmente orientada. No entanto, pode existir uma lesão clínica irreversível, quer por lesão do órgão alvo (atrofia muscular, por exemplo), quer por morte de corpos celulares após lesão axonal (Ristic *et al.* 2000; Shenaq *et al.* 2006; Luís 2008).

Neurotmesa (lesão Sunderland III-V)

A neurotmesa é o grau mais elevado de lesão em nervo periférico. Ocorre quando o axónio, a bainha de mielina e os componentes de tecido conjuntivo são lesados e rompidos ou transecionados. A cirurgia está indicada para pacientes com este grau de lesão (Sunderland graus III a V) (Grant *et al.* 1999). A intervenção cirúrgica facilita a orientação dos axónios do topo proximal e topo distal com vista à recuperação funcional dos órgãos-alvo, evitando a formação de neuromas e lesões nos órgãos alvo por ausência de estímulo neurológico (atrofia) (Myckatyn & Mackinnon 2007; Luís 2008).

Sunderland classificou a neurotmesa em três tipos, nomeadamente:

- (i) **Lesão Sunderland tipo III:** A solução de continuidade do endoneuro é interrompida; o epineuro e perineuro estão intactos; a recuperação vai de má a completa, consoante o grau de fibrose interfascicular; o nervo pode não parecer seriamente danificado (Greenberg 1994);

- (ii) **Lesão Sunderland tipo IV:** Interrupção de todos os elementos neuronais e de suporte à exceção do epineuro, o qual permanece intacto; o nervo, normalmente, revela-se entumescido (Greenberg 1994);
- (iii) **Lesão Sunderland tipo V:** Completa transecção com perda de continuidade e ausência de função motora, sensorial e autonómica (Greenberg 1994).

Para prevenir a degeneração irreversível das placas motoras terminais em lesões tipo IV e V é imprescindível realizar uma intervenção cirúrgica (Shenaq *et al.* 2006).

COMPLICAÇÕES DA LESÃO – NEUROMA

Uma das principais complicações que pode advir de uma lesão nervosa é a formação de **neuroma** no local (com conseqüente dor neuropática caracterizada por hiperalgesia e parestesia), resultante de uma lesão de estiramento ou secção, ou de uma prévia reparação cirúrgica (Shapiro & Angood 2006). O neuroma não é mais do que uma estrutura resultante da regeneração axonal aleatória, composta por tecido neuronal, cicatricial e fibrose, na qual porções nervosas apresentam-se funcionais, ao contrário de outras fibras críticas (Myckatyn & Mckinnon 2007; Luís 2008). A resolução deste problema implica uma segunda intervenção cirúrgica para a sua completa excisão e/ou recurso a terapêutica anti-inflamatória (Shapiro & Angood 2006). Numa abordagem cirúrgica à resolução do neuroma, os fascículos motores funcionais devem ser preservados, enquanto os fascículos proximais e distais não funcionantes devem ser reconstruídos com recurso a *bypass* de enxertos nervosos para manutenção de sensibilidade e/ou abolição de dor (Mckinnon & Nakao 1997; Myckatyn & Mckinnon 2007) (Figura II).



Figura II – Resolução cirúrgica de um neuroma em continuidade demonstrando a técnica de preservação da funcionalidade motora das fibras nervosas e reconstruindo os fascículos sensoriais com recurso a um enxerto de fibras do mesmo tipo (Adaptado de Myckatyn 2007 e Mackinnon 1997).

Se não estiver disponível um dador para realização do *bypass* (como é o caso de avulsão de raízes nervosas), então deverá ser realizada uma transferência de nervo adjacente para restaurar a enervação distal (Shenaq *et al.* 2006).

ANEXO II – TUBOS-GUIA

O conceito de tubulação envolve o uso de um canal oco tubiforme construído em material natural ou sintético, designado por tubo-guia, que é interposto nos segmentos lesionados. O desenvolvimento deste conceito foi determinado pela necessidade de colmatar algumas limitações presentes na lesão de neurotme. A utilização de tubos-guia permite: ultrapassar complicações associadas ao uso dos enxertos autólogos; diminuir a tensão no local de sutura; orientar o fenómeno regenerativo, que assim se vê condicionado pela estrutura física tubular destes biomateriais; impedir a formação de neuromas consequentes de uma má coaptação assim como a invasão local pelos fibroblastos e a dispersão dos factores neurotróficos e neurotrópicos (Luís, 2008).

As várias opções destes tubos-guia não incluem apenas materiais sintéticos como o polímero de caprolactona (Neurolac®), rede de ácido poli(láctico e glicólico) (PLGA), polietileno, polímeros de silicone (entre outros), mas também biológicos como colagénio, fibronectina, laminina, enxertos arteriais, venosos e musculares (Mackinnon & Nakao 1997; Johnson *et al.* 2008) (Figuras I e II).



Figura I – Reconstrução de nervo ciático com tubo de PLGA 90/10 (figura gentilmente cedida por Ana Colette Maurício, 2010).



Figura II – Reconstrução de nervo ciático com tubo de Neurolac® (figura gentilmente cedida por Ana Colette Maurício, 2010).

Devido às condições específicas requeridas para uma regeneração com sucesso, o tubo-guia deve reunir determinadas características: i) apresentar uma estrutura que permita uma regeneração axonal estável (se o material constituinte for demasiado maleável, não suportará a pressão dos tecidos circundantes e o colapso será inevitável; contrapondo, se for demasiado rígido, poderá danificar os topos nervosos e *vasa-nervorum*); ii) a semi-permeabilidade é essencial para permitir trocas entre o meio interno e externo ao canal; iii) é necessário que o tubo se degrade à medida que o nervo atinge uma reorganização e regeneração efectiva (Ichihara *et al.* 2008).

ANEXO III – CÉLULAS ESTAMINAIS (CÉLULAS-MÃE OU CÉLULAS-TRONCO)

Actualmente, a Medicina Regenerativa e a Engenharia de Tecidos são áreas promissoras da Medicina no tratamento de patologias que requerem a substituição de tecidos e órgãos irreversivelmente lesados que pelos tratamentos *standard* não regeneram. Implica a associação de sistemas celulares, autólogos (do próprio) ou alogénicos (de um dador compatível) com biomateriais. Nesse aspecto, as células estaminais de origem extra-fetal como as do sangue do cordão umbilical, da matriz do cordão umbilical e da placenta, apresentam grandes vantagens comparativamente àquelas obtidas da medula óssea e de embriões obtidos por transferência nuclear somática ou embriões excedentários de técnicas de reprodução assistida. São tecidos normalmente descartados, em que a sua utilização não implica problemas éticos, nem qualquer perigo para a mãe ou para o bebé. Quando usadas de forma alogénica, são células com elevada plasticidade e menor exigência em termos de histocompatibilidade, comparativamente à utilização de células estaminais da medula óssea ou recolhidas por aferése, o que permite abranger um número mais elevado de doentes. Actualmente, a utilização destas células de origem extra-fetal está perfeitamente estandardizada para transplante de medula óssea no caso de doenças hemato-oncológicas. O recurso a técnicas de engenharia de tecidos para tratamento de patologias de tecidos estruturais (tecido músculo-esquelético, ósseo e nervo periférico) como tratamento compassivo de doentes, é uma realidade em todo o mundo. Está neste momento em fase experimental (ensaios clínicos, experimentação animal ou com culturas celulares) a sua utilização em tecidos funcionais (como o miocárdio, o sistema nervoso central e o pâncreas). A capacidade de associar células estaminais do próprio (e por isso sem qualquer risco de rejeição ou de transmissão de doenças víricas e priónicas) com materiais biocompatíveis é o *gold standard* de tratamento de muitas patologias, sem solução com os tratamentos clássicos, para muitos doentes, nomeadamente os com lesões graves do nervo periférico (Fu *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2006; Baksk *et al.* 2007; Can & Karahuseyinoglu 2007; Yang *et al.* 2008).

As células estaminais são células com a capacidade de se auto-renovarem e diferenciarem em várias linhas celulares, regenerando tecidos estruturais e funcionais. Esta capacidade confere-lhes características únicas: são células indiferenciadas (e por isso não especializadas); renovam-se e dividem-se indefinidamente; e diferenciam-se em linhagens celulares distintas. São estas células que, no desenvolvimento embrionário, originam os diferentes tecidos do organismo animal adulto. O potencial de diferenciação é variável entre as várias categorias de células estaminais: as **totipotenciais** caracterizam-se pela diferenciação ilimitada; as **pluripotentes** têm como único factor limitante a diferenciação em células placentárias; e as

multipotentes podem “apenas” originar tecidos específicos (Fu *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2006; Baksk *et al.* 2007; Can & Karahuseyinoglu 2007; Yang *et al.* 2008).

De entre os vários tipos de células estaminais, parece-me relevante destacar as **células estaminais da matriz do cordão umbilical (ou geleia de Wharton)** pois foi este o tipo celular utilizado durante o protocolo realizado no Estudo 2 e no qual tive oportunidade de participar. As células estaminais são células com um elevado potencial, cujo destino ainda não está determinado. Teoricamente, as células estaminais têm a capacidade de substituir células doentes pelo que, se adequadamente utilizadas, poderão ser a solução clínica para muitos problemas graves da nossa sociedade. As células estaminais mesenquimais (MSCs) fazem parte de uma rara e valiosíssima população de células progenitoras multipotentes, capazes de suportarem a hematopoiese e a diferenciação em várias linhagens celulares. Devido a esta capacidade confirmada por resultados obtidos de experimentação *in vitro* e em modelos animais, as MSCs parecem ser uma arma atractiva no contexto da Medicina Regenerativa e das Terapias Celulares (Fu *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2006; Baksk *et al.* 2007; Can & Karahuseyinoglu 2007; Yang *et al.* 2008). O comité para as células e tecido estaminal da Sociedade Internacional de Terapia Celular, sugeriu três critérios para definir células mesenquimatosas do estroma: i) população celular *plastic-adherent*; ii) presença de marcadores de superfície específicos (ex: CD14-, CD34-, CD45-, HLA classe II negativas, CD73-, CD29-, CD105+); e iii) capacidade de auto-renovação e diferenciação *in vitro* em diversas linhagens celulares incluindo tecido ósseo, cartilágneo, adiposo. Correntemente, a medula óssea representa a principal fonte de MSCs, tanto para estudos experimentais como para aplicações clínicas. No entanto, o número de MSCs da medula óssea diminui significativamente com a idade, e a sua utilização alogénica é extremamente difícil devido ao reduzido número de dadores HLA compatíveis (Fu *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2006; Baksk *et al.* 2007; Can & Karahuseyinoglu 2007; Yang *et al.* 2008). Deste modo, as MSCs obtidas a partir do sangue e da geleia de Wharton do cordão umbilical são uma alternativa viável para utilização autóloga e alogénica. A geleia de Wharton é um tecido mucóide conjuntivo que envolve duas artérias e uma veia isolada do cordão umbilical. Desde a descoberta deste tipo de células mesenquimatosas, foi desenvolvido um número limitado de estudos acerca do isolamento e expansão destas células, as HUMSCs. Estas células têm ganho adeptos devido a vários factores: i) maior número de células estaminais por volume do que a medula óssea; ii) a taxa de rejeição é menor quando usadas em enxertos alogénicos; iii) não é necessária uma compatibilidade antigénica HLA tão exigente como para a medula óssea, alargando o número de dadores disponíveis; e iv) são mais fáceis de obter, processar e armazenar e a sua colheita é eticamente aprovada e legislada pelas leis nacionais e internacionais (Fu *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2006; Baksk *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008).

ANEXO IV – DISPOSITIVOS MECÂNICOS, COLAS E ADESIVOS ANASTOMÓTICOS

Têm sido estudadas alternativas às suturas vasculares clássicas, com o intuito de evitar as consequências no crescimento e distensão vascular após a anastomose. A causa para este déficit no crescimento ainda permanece desconhecida, embora o material de sutura bem como a técnica usada pareçam ser factores determinantes. Os materiais de sutura têm evoluído no sentido de fornecer maior compatibilidade biológica, e isso tem sido notório na menor reactividade do tecido vascular anastomosado. No entanto, os granulomas continuam ainda a ser uma consequência da reacção à sutura, bem como a hiperplasia do segmento vascular perfurado, que originam algumas complicações como a estenose trombótica, oclusão do segmento anastomosado e infecção crónica (Calles-Vázquez *et al.* 2005) (Figura I).

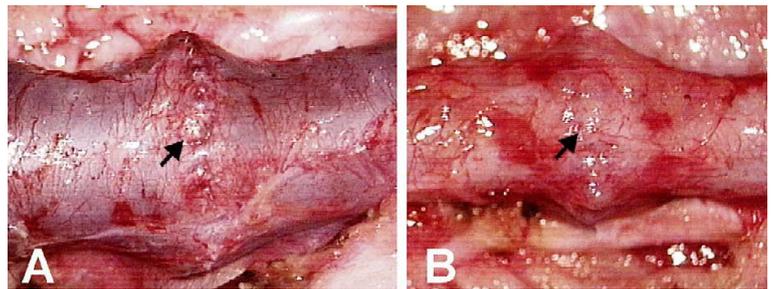


Figura I – Aspecto da veia (A) e artéria (B) seis meses após coaptação com sutura. Destaque (setas) para a fibrose da zona anastomosada com consequente aumento de diâmetro (Calles-Vázquez *et al.* 2005).

De uma maneira geral, o uso de dispositivos mecânicos para anastomose não tem muita receptividade em cirurgia. Em estudos laboratoriais revelaram-se rápidos na obtenção de uma anastomose de sucesso, mas o seu uso revelou-se tecnicamente difícil. Os **dispositivos acopladores** necessitam demasiado tecido vascular para uma boa eversão na anastomose. A sua selecção relativamente ao tamanho a utilizar é igualmente difícil. Este sistema pode ser adequado para anastomoses venosas topo-a-topo mas, para as anastomoses arteriais, revela-se pouco eficaz, já que a maior espessura da parede arterial e consequente dificuldade de eversão apresenta-se como a principal desvantagem ao seu uso (Figura II).

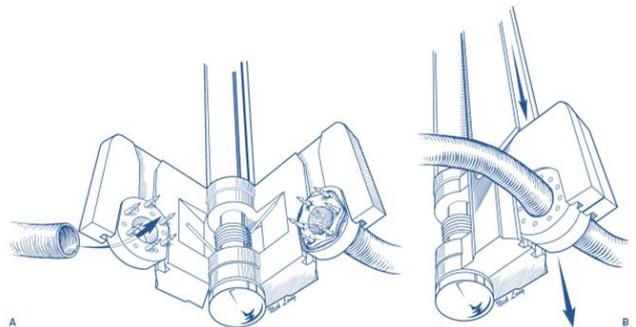


Figura II – Dispositivo acoplador mecânico: **A)** Introdução dos topos vasculares nos anéis e eversão para fixação aos mesmos; **B)** Depois da anastomose, os anéis são soltos no sentido da seta (Adaptado de Yap & Butler 2007).

De entre os dispositivos mecânicos, os **agrafadores vasculares** são os que melhor exequibilidade apresentam para substituição das clássicas suturas mas, só em vasos de maior calibre, pois não estão adaptados para pequenas artérias. Outras desvantagens ao seu uso prendem-se com a necessidade de vasos normais com segmentos livres relativamente longos para permitir a eversão dos topos vasculares e com o facto de serem demasiado largos para

anastomoses sob o microscópio (Denk 1995; Zhong *et al.* 2003; Mueller *et al.* 2006) (Figura III).

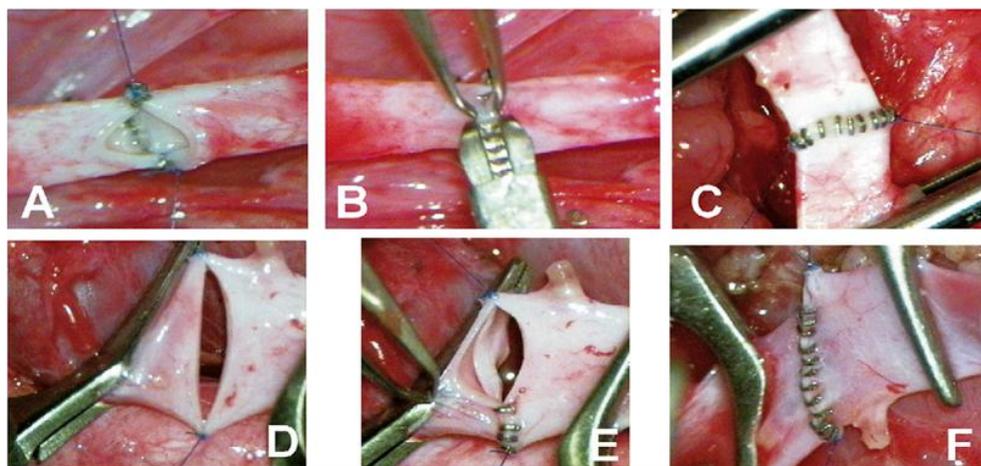


Figura III – Anastomose de artéria e veia com recurso a grafos: **A)** Colocação das suturas de referência na artéria a 180°; **B)** Colocação dos grafos na parede posterior da artéria; **C)** Aspecto final anastomose arterial; **D)** Ancoragem das suturas de referência nos topos venosos; **E)** Sutura da parede venosa anterior; **F)** Rotação dos *clamps* vasculares e sutura da porção venosa posterior (Calles-Vázquez *et al.* 2005).

Numa tentativa de minimizar os fenómenos trombóticos previamente descritos (com estreitamento anastomótico secundário à hiperplasia da íntima vascular), foram desenvolvidos **anéis vasculares** em titânio que são suturados em conjunto com os topos vasculares aumentando o seu lúmen entre 20% a 50% (Figura IV).



Figura IV – **A)** Anéis vasculares fabricados em titânio; **B)** O anel externo rígido aumenta o diâmetro dos topos vasculares facilitando a passagem das suturas (Adaptado de Karamursel *et al.* 2001).

Este tipo de procedimento tem similar uso em neurorrafias, mas sem os mesmos valores de incremento no diâmetro dos topos nervosos (com esta aplicação o aumento dos topos situa-se entre os 10% e 20%). Em estudos realizados com este tipo de técnica constatou-se uma taxa de patência de 100% às 12 semanas pós-anastomose (com a sutura convencional esta taxa é de cerca 75%). O exame histológico revelou uma espessura da íntima reduzida, em relação à sutura clássica e inferiu-se que a dilatação da anastomose T-T arteriovenosa através da interposição de um anel rígido previne o estreitamento do lúmen a longo prazo (Karamursel *et al.* 2001; Kayikçioğlu *et al.* 2004).

Uma gama diversificada de **colas e adesivos anastomóticos** está em investigação. Salientam-se os adesivos cianoacrílicos, resinas de poliuretano e adesivos de fibrinogénio. No entanto, o seu uso não reúne ainda consenso devido à exuberante reacção inflamatória e potencial relação com fibrossarcomas evidenciado em animais de laboratório (Sagi 2005).