



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicabrasileira@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e
Traumatologia
Brasil

Costa, Márcio Paulino; Santos Cunha, Armando dos; Ferreira da Silva, Ciro; Pessoa de Barros Filho, Tarcísio Eloy; Costa, Heloisa Juliana Zabeu Rossi; Castro Ferreira, Marcus
Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos
Acta Ortopédica Brasileira, vol. 17, núm. 5, 2009, pp. 286-290
Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65713433007>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

TUBO DE ÁCIDO POLIGLICÓLICO E GM1 NA REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS

POLYGLYCOLIC ACID TUBE ASSOCIATED WITH GM1 IN REGENERATION OF PERIPHERAL NERVES

MÁRCIO PAULINO COSTA¹, ARMANDO DOS SANTOS CUNHA¹, CIRO FERREIRA DA SILVA², TARCÍSIO ELOY PESSOA DE BARROS FILHO¹, HELOISA JULIANA ZABEU ROSSI COSTA¹, MARCUS CASTRO FERREIRA¹

RESUMO

Introdução: A auto-enxertia de nervo é considerada tratamento de escolha nas grandes perdas de tecido neural que não permitam a reparação através de anastomose primária. Nesses casos, o tubo sintético à base de ácido poliglicólico é uma alternativa para enxertia de nervo. Por outro lado, muitos estudos têm enfatizado a importância dos fatores neurotróficos na regeneração neural: o monossialotetraesilglicosídeo (GM1), um dos principais glicosídeos do tecido nervoso de mamíferos, é tido como potencializador dos efeitos desses fatores. **Objetivo:** Comparar, em ratos, o grau de regeneração neural, utilizando análise histológica, contagem do número de axônios mielinizados regenerados e análise funcional com a utilização do neurotubo e do GM1. **Métodos:** Essa avaliação foi obtida com a interposição de enxerto autólogo (grupo A), tubo de ácido poliglicólico (grupo B) e da associação do tubo de ácido poliglicólico à administração de GM1 (grupo C) em defeitos de 5 mm no nervo ciático. **Resultados:** Foi observada formação de neuroma apenas no grupo A. Os grupos A e C apresentaram padrões histológicos semelhantes, exceto que os axônios regenerados do grupo C apresentavam-se mais organizados e mielinizados que o grupo A. **Conclusão:** Na recuperação funcional, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, a despeito das diferenças histológicas qualitativas e quantitativas verificadas.

Descritores: Nervos periféricos/cirurgia. Regeneração nervosa. Ácido poliglicólico/ uso terapêutico. Imunossuppressores/uso terapêutico.

ABSTRACT

Introduction: Nerve allografting is regarded as a treatment of choice in large neural tissue losses preventing repair by primary anastomosis. In these cases, a synthetic polyglycolic acid tube is an alternative for nerve grafting. On the other hand, several studies have emphasized the importance of neurotrophic factors on neural regeneration, including substances with potential to optimize neural regeneration, especially the GM1, an neurotrophic enhancer factor. **Objective:** to compare, in rats, the neural regeneration degree using histological analysis, regenerated myelinated axons count, and functional analysis with the use of neurotube and GM1. **Methods:** This assessment was performed by interposing allograft (group A), polyglycolic acid tube (group B) and polyglycolic acid tube associated to GM1 (group C) on 5-mm sciatic nerve defects. **Results:** Neuroma formation was found only on group A. Groups A and C showed similar histological patterns, except for the regenerated axons on group C, which were shown to be better organized and myelinated than in group A. **Conclusion:** on functional recovery, no statistically significant difference was found for the three groups, despite of qualitative and quantitative histological differences found.

Keywords: Peripheral nerves/surgery. Nerve regeneration. Polyglycolic acid/therapeutic use. Immunosuppressive agents/therapeutic use.

Citação: Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa HJZR, Ferreira MC. Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):286-90. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa HJZR, Ferreira MC. Polyglycolic acid tube associated with GM1 in regeneration of peripheral nerves. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):286-90. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Traumas e ressecções tumorais resultam frequentemente em grandes perdas de tecido neural periférico, impedindo a reparação através de anastomose primária. Nesses casos, a auto-enxertia de nervo tem sido o método de reparo mais empregado e, a despeito de um tratamento cirúrgico adequado, déficits funcionais são observados.¹ A interposição de condutores tubulares como ponte entre os cotos do nervo seccionado apresenta-se como uma técnica alternativa que oferece vantagens: proporciona melhor confinamento das fibras em regeneração, redução da reação inflamatória e da formação de tecido cicatricial no local de reparo; além disso, evita as sequelas associadas à utilização de material autólogo.¹ Estudos recentes estabeleceram o tubo sintético à base de ácido

poliglicólico (tAPG), como opção para enxertia de nervo. Por outro lado, muitos estudos têm enfatizado a importância dos fatores neurotróficos na regeneração neural: o monossialotetraesilglicosídeo (GM1), um dos principais glicosídeos do tecido nervoso de mamíferos, é tido como potencializador dos efeitos desses fatores.² No entanto, pouco tem sido estudado sobre os efeitos da administração local de GM1 na regeneração de nervos periféricos, nem tampouco existe relato da utilização dessa substância associada à prótese neural absorvível na literatura. O objetivo deste trabalho é, através de análise histológica e funcional, comparar o grau de regeneração neural obtido com a interposição de enxerto autólogo, de tAPG e de tAPG com GM1, para a correção de defeitos em nervos ciáticos de ratos.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1 – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
2 – ICB- Instituto de Ciências Básicas da Universidade de São Paulo

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Endereço de correspondência: Rua Gabriel dos Santos, 759 12 andar- Santa Cecília- CEP: 01231-011. São Paulo, SP, Brasil. E-mail: marciopaulino@bol.com.br

Trabalho recebido em 21/05/09 aprovado em 25/07/09

MATERIAL E MÉTODO

Quinze ratos isogênicos da raça Lewis com 8 semanas, peso entre 200g e 300g foram utilizados. Com técnica microcirúrgica, foram criados defeitos de 5mm de extensão em nervo ciático da pata direita. Os animais foram divididos em 3 grupos de cinco animais de acordo com o tratamento empregado.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (5m/kg) injetados intra-peritonealmente. Através de acesso dorsal da pata direita, o nervo ciático foi dissecado e 5mm de segmento de nervo removido. (Figura 1)

No grupo A, o segmento removido foi suturado em sua posição normal com 4 pontos epineurais separados de mononylon 10.0. (Figura 2)

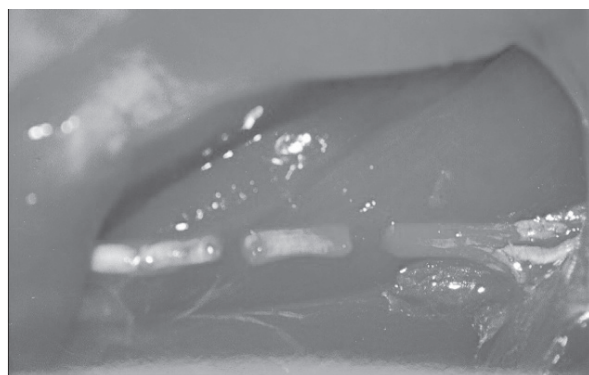


Figura 1 - Ressecção do nervo ciático

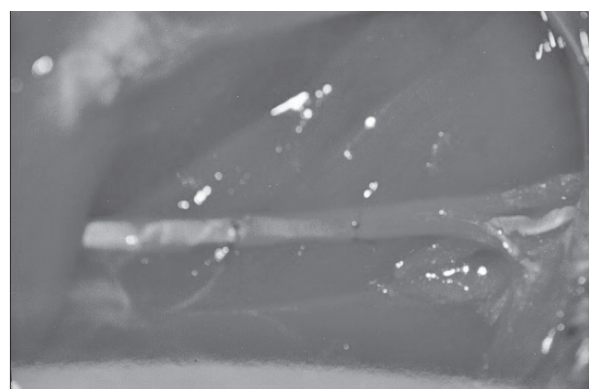


Figura 2 - Grupo A: auto-enxerto

No grupo B, o tubo foi ancorado em sua posição através de 1 ponto em "U", passado em cada extremidade da seguinte maneira: de fora para dentro no tubo, atravessando o epineuro no coto do nervo e voltando ao tubo de dentro para fora, de modo a se deixar cerca de 2,5 mm de extensão do coto inserido. (Figuras 5, 6, 7 e 8) Após uma das extremidades do tubo ser fixada com o ponto, o tubo foi preenchido com solução salina heparinizada (10 unidades por cc). A segunda extremidade foi fixada com a mesma técnica e novamente preenchida com a solução heparinizada (10 unidades por cc). (Figuras 3 e 4)

No grupo C, foi interposto um segmento de tubo com as mesmas características associadas a uma solução de GM1 (Sygen*, distribuído pela TRB PARMA- BRASIL) a uma concentração final de 100 mg/ml por tubo injetadas no interior do tubo e vedadas com gel de vaselina. (Figuras 5 e 6)

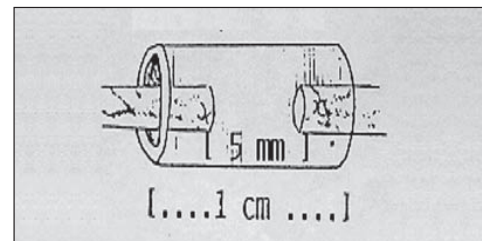


Figura 3 - Grupo B: desenho esquemático tAPG

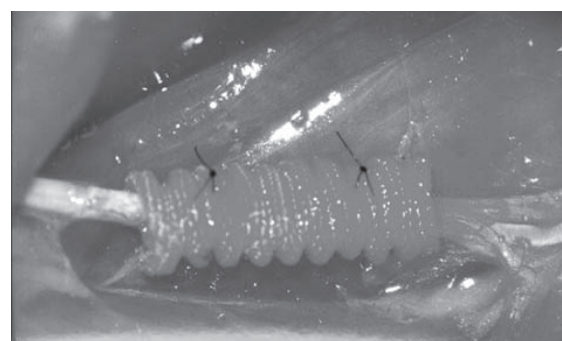


Figura 4 - Grupo B: tAPG



Figura 5 - Grupo C: tAPG + GM1

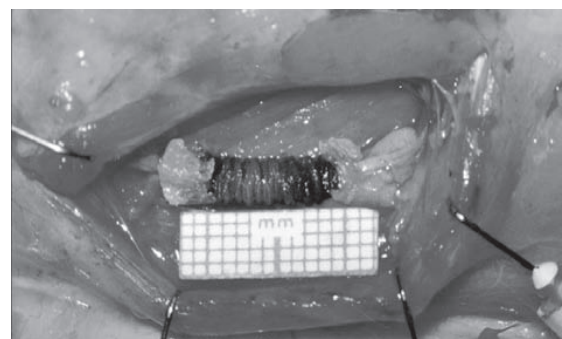


Figura 6 - Grupo C: vedação com gel de vaselina

Os animais receberam água e comida *ad libitum* e sacrificados 6 semanas após a cirurgia para realizar análise histológica e contagem do número de axônios mielinizados regenerados. A avaliação da recuperação funcional foi realizada através da técnica que analisa a impressão das patas posteriores durante uma caminhada ("walking track analysis") no pré e pós-operatório, na terceira semana e no momento do sacrifício (6 semanas).

RESULTADOS

Durante as seis semanas do estudo, todos os animais mantiveram-se saudáveis, não sendo observadas infecção da ferida cirúrgica, nem úlceras plantares neuro-distróficas.

No momento do sacrifício, o Grupo A (auto-enxerto), sob análise macroscópica, demonstrava que os enxertos examinados estavam intactos, com pequenos neuromas ao nível das linhas de sutura.

Nos Grupos B (tAPG) e C (tAPG + GM1), observou-se a presença de uma fina camada de tecido fibroso envolvendo externamente os tubos, que se mostraram praticamente intactos, ainda numa fase inicial do processo de reabsorção. Não foram observados neuromas nestes grupos.

HISTOLOGIA QUALITATIVA

Grupo A (controle, auto-enxerto): a análise microscópica das lâminas mostrou a presença de grande quantidade de fibras com diâmetros variáveis, razoavelmente mielinizadas, dispersas por todo estroma neural, por vezes agrupadas em pequenos fascículos. A reação tecidual em volta do enxerto foi maior se comparada com a dos demais grupos. Foi detectado escape de fibras regeneradas para fora dos limites do epineuro em 3 animais. (Figuras 7 e 8)

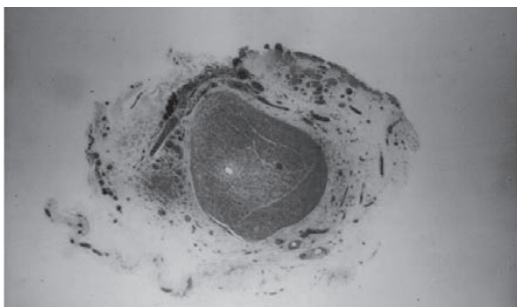


Figura 7 - Grupo A: auto enxerto – reação Tecidual fora do enxerto (40X)

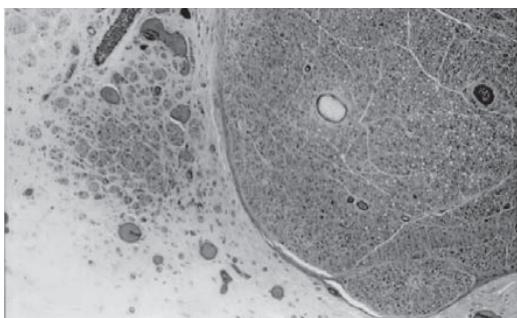


Figura 8 - Grupo A: auto-enxerto- escape (100X)

Grupo B (tAPG): presença de delgado cordão de tecido conjuntivo frouxo, com padrão de estroma neural, com neoangiogênese satisfatória, porém, com menor número de fibras dispersas e pouco mielinizadas de diâmetro menor. (Figuras 9 e 10) Foi detectada a presença de várias células gigantes multinucleadas, com pedaços de tubo no citoplasma indicando início do processo de reabsorção. A reação de fibrose ao redor dos tubos foi claramente menor se comparada com a do Grupo A (auto-enxerto). Não foram observados escapes.

Grupo C (tAPG + GM1): no interior dos tubos, fibroblastos dispostos concentricamente na periferia delimitavam uma área de tecido conjuntivo frouxo tomando quase todo o espaço intra-luminal, com o processo de neoangiogênese mais intenso que nos grupos anteriores. Numa porção mais central desse estroma néo-formado, notava-se a concentração de um bom número de fibras nervosas de médio cali-

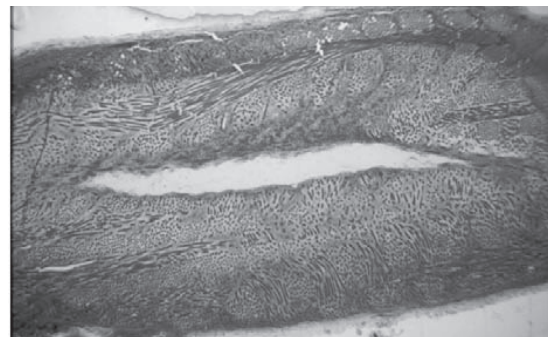


Figura 9 - Grupo B: tAPG NO interior

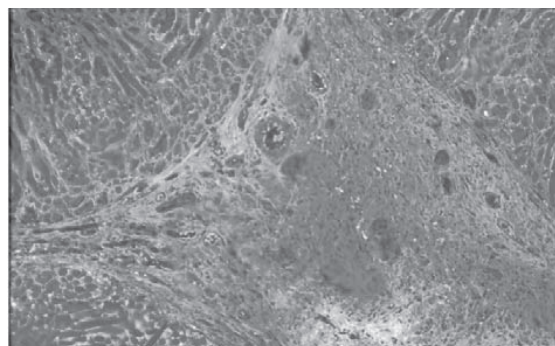


Figura 10 - Grupo B: fibras mielinizadas do tubo de diâmetro menor (100X)

bre, medianamente mielinizadas, arranjadas em um padrão fascicular. De um modo geral, a área ocupada pelas fibras regeneradas nesse grupo foi menor que aquela visualizada no grupo controle, maior que no grupo B (tAPG), porém, com maior concentração de fibras no espaço e maior grau de mielinização. (Figuras 11 e 12) Foi observada

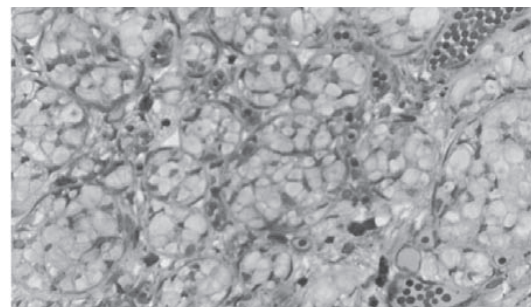


Figura 11 - Grupo C: tAPG+ GM1: padrão faz-quantidade ciclar (400X)

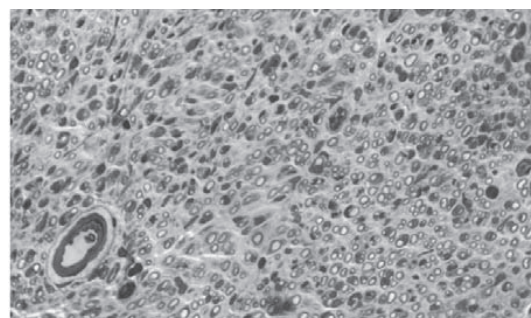


Figura 12 - Grupo C: tAPG + GM1: maior de fibras mielinizadas (400X)

uma delgada camada de tecido fibroso envolvendo os tubos, menor se comparada a do grupo A (auto-enxerto) e semelhante ao grupo B. Não foram observados escapes de fibras para fora do tubo.

ESTUDOS FUNCIONAIS

A figura 13 mostra o aspecto das pegadas dos ratos no pré e pós-operatório dos 3 grupos.

Os valores médios dos IFC (índice de função ciática) calculados para cada grupo estão na Figura 14.

O valor médio do índice de função ciática para cada grupo no pré-

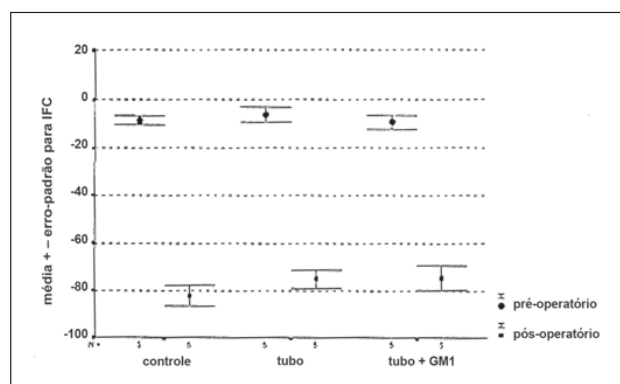


Figura 14 - IFC médio calculado para cada grupo

operatório foi: Grupo A (auto-enxerto) -8.4 ± 4.38 , Grupo B (tAPG) 6.34 ± 7 e Grupo C (tAPG+GM1) -9.47 ± 6.34 . Não se observou diferença significativa entre os grupos.

Em relação ao valor médio do índice de função ciática para cada grupo no pós-operatório, detectou-se: Grupo A (auto-enxerto) -82.12 ± 9.77 , Grupo B (tAPG) -75.19 ± 8.07 e Grupo C (tAPG+GM1) -74.71 ± 11.19 .

As médias da variação do índice de função ciática após 6 semanas da cirurgia estão sumarizadas na Figura 15.

Na análise estatística (Teste de Kruskal- Wallis, com $p < 0,05$), em média, não foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os 3 grupos em relação aos valores de IFC apresentados no pós-operatório, se comparados aos valores basais normais do pré-operatório. (Figura 15)

DISCUSSÃO

Nos casos de lesões de nervos periféricos com perda de substância, onde a extensão do defeito impede a reaproximação direta dos cotos, o melhor método de reparo parece ser a auto-enxertia.¹

No entanto, existem fatores que nos levam a procurar um novo tipo de condutor para o crescimento axonal: 1. a retirada de material autólogo para enxertia sempre produz morbidade da área doadora;

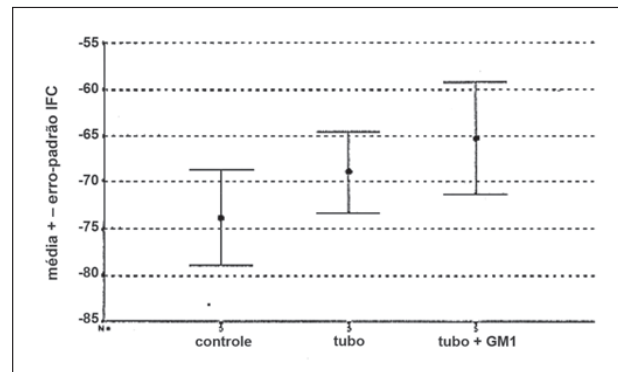


Figura 15 - Médias da variação do IFC após 6 semanas

2. grandes defeitos demandam a retirada de extensas porções de tecido autólogo; 3. a utilização de materiais artificiais poupa o tempo da retirada de material autólogo.^{1,3}

A interposição de condutores tubulares como ponte entre os cotos do nervo seccionado, tem apresentado resultados experimentais e clínicos animadores. Na correção de pequenos defeitos, onde a distância entre os cotos não é grande o suficiente a ponto de atrapalhar a atração quimiotática e quimiotrófica exercida pelo coto distal sobre o cone de crescimento axonal, os resultados são comparáveis aos obtidos com autoenxertos.¹⁻⁷

A técnica de tubulização oferece ainda vantagens teóricas adicionais sobre os métodos tradicionais de enxertia: proporciona boa coaptação dos dois cotos, com menor trauma de manipulação; possibilita melhor confinamento das fibras em crescimento dentro do tubo, isolando o local de reparo da reação inflamatória circundante; orienta o crescimento das fibras em direção ao coto distal, possibilitando a concentração de fatores neurotróficos locais; reduz a formação de neuromas e o escape de fibras para fora do condutor; permite a veiculação de substâncias potencializadoras da regeneração.^{5,6} Muitos materiais têm sido utilizados para elaboração dos tubos podendo ser absorvíveis⁸ ou não absorvíveis.¹

Vários estudos recentes estabeleceram o ácido poliglicólico (APG) na qualidade de material artificial absorvível de uso clínico, como alternativa para enxertia de nervo.⁷ Os tubos sintéticos compostos de materiais absorvíveis têm mostrado melhores resultados funcionais tardios, quando em comparação aos tubos de material não absorvível.¹ Uma vez que são bio-toleráveis, despertam menor reação de fibrose e, após sua reabsorção, não impedem que o nervo em regeneração cresça em diâmetro¹, ao contrário do que ocorre com os condutores não-absorvíveis.

O sucesso do processo de reparação de um nervo periférico seccionado também depende da existência de um "micro-ambiente" propício à regeneração.⁹ Esse substrato neural fundamental está presente localmente no momento da lesão do nervo e é composto

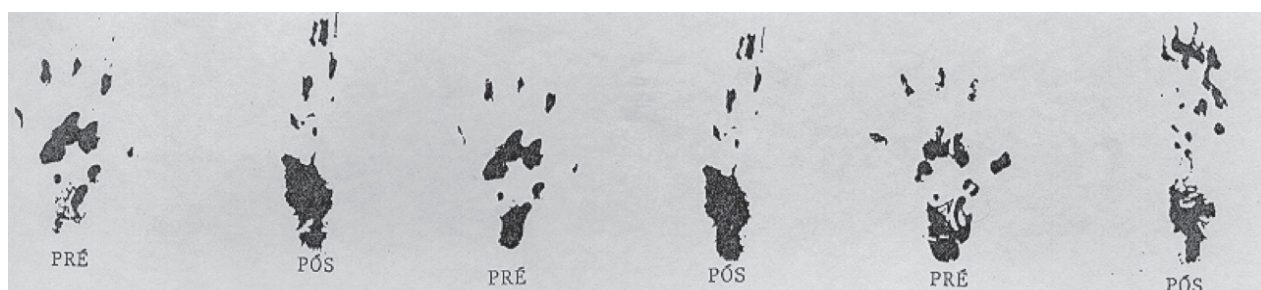


Figura 13 - Aspecto das pegadas dos ratos no pré e pós-operatório dos 3 grupos.

de fatores tais como células de Schwann, fibroblastos perineurais¹⁰, componentes da matriz extra-celular (laminina, fibronectina, moléculas de adesão)^{1,11} e moléculas produzidas pelas extremidades do nervo seccionado estimuladoras da regeneração¹², os chamados fatores neurotróficos.

O monossialogangliosídeo GM1 é um dos principais glicoesfingolípides do tecido nervoso de mamíferos, constituindo a maior subclasse de gangliosídeos cerebrais com efeitos sobre os processos de diferenciação e reparo neural, atuando sobre o brotamento e crescimento de neuritos *in vivo* e *in vitro*.¹³⁻¹⁸

O GM1 administrado exogenamente é incorporado às membranas neuronais e teria uma ação potencializadora sobre os fatores neurotróficos.¹³⁻¹⁸ Estudos recentes têm demonstrado sua eficácia no auxílio da recuperação funcional em casos de neuropatia periférica diabética, AVC e trauma raquimedular agudo em homens e animais.¹³⁻¹⁸

Estudos anteriores mostraram evidências de que a administração local de gangliosídeos no local de reparo da lesão de nervo periférico produz um aumento do número de fibras mielinizadas regeneradas.¹³⁻¹⁸ Sua ação se daria preferencialmente sobre a regeneração de fibras motoras, uma vez que tem sido demonstrado que o GM1 responde por cerca de 15% de todos os gangliosídeos na mielina de nervo motor, em contraste com responder por menos de 5% da mielina em nervos sensitivos.¹³⁻¹⁸

O rato, como animal do modelo experimental, é frequentemente utilizado na literatura^{1,19}, sendo considerado clássico no estudo de nervos periféricos. Além deste fato, permite a análise da recuperação funcional de nervo ciático lesado, realizada através do "walking track", metodologia estabelecida por De Medinacelli e modificada por Bain et al.¹⁹, através do padrão da impressão das pegadas destes animais.

O nervo ciático foi utilizado para se criar o modelo de lesão de nervo periférico uma vez que pode ser analisado seu padrão de recuperação funcional¹⁹, fato este importante para se comparar a melhor técnica quando se repara defeito de tecido neural.

A técnica cirúrgica utilizada para a abordagem do nervo ciático, auto-enxertia e colocação do tubo de ácido poliglicólico é a mesma utilizada por diversos autores na literatura^{3,9}, assim como o padrão do tamanho do "gap" utilizado.³

A técnica de preparo dos cortes histológicos que utiliza fixação com tetróxido de ósmio e coloração com azul de toluidina é a que melhor preserva a bainha de mielina, sendo de uso consagrado para estudo dos nervos periféricos.^{1,20}

Em termos macroscópicos, a formação de neuroma foi observada apenas nos ratos submetidos a auto-enxertia. Este dado também foi observado em estudo anterior na literatura.²⁰

REFERÊNCIAS

- Costa MP, Cunha AS, Da Silva CF, Barros Filho TE, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras*. 2006;14:25-9.
- Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Masinger D. Gangliosides potentiate *in vivo* and *in vitro* effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2056-60.
- Keeley RD, Nguyen KD, Stephanides MJ, Padilla J, Rosen JM. The artificial nerve graft: a comparison of blended elastomer-hydrogel with polyglycolic acid conduits. *J Reconstr Microsurg*. 1991;7:93-100.
- Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC, Abraham G. A comparison of suture and tubulization nerve repair technique in a primate. *J Hand Surg Am*. 1991;16:251-61.
- Millesi H, Berger A, Meissl G. Experimentelle Untersuchungen zur heilung durchtrennter peripherer nerven. *Eur J Plastic Surg*. 1972;1:174-206.
- Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM. Comparison of nerve repair techniques: suture vs avitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg*. 1991;7:31-6.
- Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg*. 1988;82:849.
- Madison R, Da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin containing gel. *Exp Neurol*. 1985;76:767-72.
- Fields RD, Lebeau JM, Longo FM, Ellisman HH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol*. 1989;33:87-134.
- Politis MJ, Eckerle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration *in vivo*, attraction

A análise das lâminas demonstrou que a regeneração neural apresentou padrões diferentes entre os grupos. Com relação à organização fascicular, os axônios do grupo C (tAPG+GM1), encontrados em menor número, porém, mais calibrosos, mostraram-se uniformemente mais agrupados que os do grupo A (auto-enxerto). Foi observado também um maior grau de mielinização das fibras do grupo C. Esta tendência de maior agrupamento das fibras dentro de tubos de APG com GM1 também foi observada no trabalho de Keeley et al.³, no entanto, nesse estudo os tubos eram preenchidos apenas com plasma.

A reação tecidual e a deposição de tecido fibroso observadas no grupo com auto-enxerto foi considerada maior nos outros grupos. Na literatura não se encontram dados comparando a reação tecidual associada a tubos de APG e auto-enxertos.

Nos auto-enxertos foram visualizadas a presença de fibras fora dos limites do epineuro e a formação de neuromas nas linhas de sutura. Essas alterações são relatadas em outros estudos.²⁰ Não foram observados escapes de fibras nos grupos com tubos.

Em relação à avaliação da recuperação funcional, realizada através da técnica de análise dos "walking track", não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Teste de Kruskal-Wallis) com $p < 0,05$ entre os resultados obtidos nos 3 grupos. Atualmente, muitos autores têm destacado a maior importância da precisão das conexões restabelecidas pelos axônios regenerados no órgão-alvo se comparada ao número total de fibras em relação à recuperação funcional.¹⁹ Desta forma, as características histológicas proporcionam um quadro confiável das condições tróficas do nervo regenerado, mas não se correlacionam com o grau de recuperação funcional.¹⁹ Em concordância, o grau de recuperação funcional obtido com os tAPG e os tAPG com GM1 não foi significativamente diferente do obtido com auto-enxerto, a despeito dos diferentes padrões histológicos verificados nos 3 grupos.

CONCLUSÕES

- Os grupos apresentaram padrões histológicos diferentes. O que utilizou a auto-enxertia (controle) apresentou uma maior reação tecidual se comparada aos demais, além da presença de escapes de fibras, fenômeno não observado nos outros grupos. A área ocupada pelas fibras regeneradas do grupo C (tAPG+GM1) foi menor que a do controle, maior que a do grupo B (tAPG), porém com uma maior concentração de fibras no espaço e maior grau de mielinização.
- Os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto à recuperação funcional.

of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stump of transected peripheral nerves. *Brain Res*. 1982;253:1-12.

- Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 1989;2:1525-34.
- Lundborg G, Longo FM, Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors *in vivo*. *Brain Res*. 1982;232:157.
- Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal cord injury-a randomized, placebo-controlled trial with GM1 ganglioside. *N Engl J Med*. 1991;324:1829-38.
- Lainetti RD, Da Silva CF. Local addition of monossialogangliosídeo GM1 stimulates peripheral axon regeneration *in vivo*. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26:841-5.
- Carvalho MO, Barros Filho TE, Tebet MA. Effects of methylprednisolone and ganglioside GM-1 on a spinal lesion: a functional analysis. *Clinics*. 2008;63:375-80.
- Bharucha VA, Wakade CG, Mahadik ST, Karpiak SE. Brief communication- GM1 ganglioside treatment reduces functional deficits associated with cortical focal ischemia. *Exp Neurol*. 1991;114:136-9.
- Liniger C, Pernet A, Moody JF, Assal J. Effect of gangliosides on diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 1989;7:251-8.
- Mahadik SP, Karpiak SK. Gangliosides in treatment of neural injury and diseases. *Drug Dev Res*. 1988;15:337-60.
- De Medinaceli L. Interpreting nerve morphology data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995;58:29-37.
- Bora FW Jr, Bednar JM, Osterman AL, Brown MJ, Sumner AJ. Prosthetic nerve grafts: a resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. *J Hand Surg Am*. 1987;12:685-92.