

**JOÃO CARLOS NAKAMOTO**

**Avaliação da utilização do aloenxerto acelular na regeneração  
nervosa: estudo experimental em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Marques de Faria

**SÃO PAULO**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nakamoto, João Carlos  
Avaliação da utilização do aloenxerto acelular na  
regeneração nervosa : estudo experimental em ratos /  
João Carlos Nakamoto. -- São Paulo, 2020.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Clínica Cirúrgica.  
Orientador: José Carlos Marques de Faria.

Descritores: 1.Aloenxertos 2.Regeneração nervosa  
3.Modelos animais 4.Ratos 5.Nervo isquiático

USP/FM/DBD-014/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, **Shugoro e Iracema**, fontes de inspiração e modelos de integridade,  
dedicação e perseverança.

Aos meus irmãos, **Hugo e Márcio**, companheiros de uma vida e motivos de muito  
orgulho.

À minha esposa **Leila** e minha filha **Lisa**, razões da minha incansável busca pela  
constante evolução.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **José Carlos Marques de Faria**, pela orientação, confiança e oportunidade dada na confecção desta tese.

Ao Professor Doutor **Maurício Etchebehere** pela amizade, incentivo e apoio à minha vida acadêmica.

Ao médico veterinário **Gustavo Bispo dos Santos** pelo apoio nas análises funcionais da marcha e auxílio no manuseio dos animais.

À bióloga **Simone Kneip Cavalheiro**, pela dedicação e apoio na obtenção das medidas e análises histomorfológicas.

A **Henry Dan Kiyomoto**, que forneceu competente auxílio nas análises estatísticas.

À secretária da Pós-Graduação do Programa de Clínica Cirúrgica **Eliane Falconi Monico Gazetto**, pela colaboração sempre solícita e eficiente.

Ao Dr. **Luciano Ruiz Torres**, grande amigo, que muito contribuiu em minha formação como cirurgião da Mão.

Ao Dr. **Hugo Alberto Nakamoto**, modelo de conduta ética e profissional. É um enorme privilégio tê-lo como irmão mais velho, com todas as associações que esse fato traz, além de grande companheiro de profissão.

Ao Dr. **Marcos Felipe Marcatto de Abreu**, pela convivência e troca de experiências no Grupo de Cirurgia da Mão dos Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Aos meus colegas do Grupo de Cirurgia da Mão do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Aos amigos médicos, professores, funcionários e todos que, de alguma forma, contribuíram para concretização deste ideal.

## EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

**Isaac Newton**

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica: Terminologia Anatômica Internacional, Editora Manole, 1a ed. São Paulo, 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

**Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3 MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Amostra.....	15
3.2 Normatizações e ética.....	17
3.3 Protocolo de anestesia.....	18
3.4 Pós-operatório.....	18
3.5 Formação dos grupos e ato operatório.....	19
3.6 Métodos de preservação.....	24
3.6.1 Conservação a frio.....	24
3.6.2 Glicerol.....	25
3.6.3 Processamento com detergentes.....	26
3.7 Aferições.....	27
3.7.1 Teste da marcha.....	27
3.7.2 Análise histomorfométrica.....	29
3.8 Eutanásia.....	31

3.9	Forma de análise de resultados.....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	Resultados das análises funcionais.....	35
4.2	Resultados das análises histomorfométricas dos grupos operados.....	46
4.3	Resultados das análises histomorfométricas dos grupos não operados (somente tratados).....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

**ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS**

<b>US\$</b>	Dólares americanos
<b>%</b>	por cento
<b>®</b>	Marca registrada
<b>µm<sup>2</sup></b>	Micrômetro quadrado
<b>ABTO</b>	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>ARRIVE</b>	<i>Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments</i>
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>CEUA</b>	Comissão de ética no uso de animais
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>cm</b>	centímetro
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
<b>DDIE</b>	Distância entre os dedos intermediários experimental
<b>DDIN</b>	Distância entre os dedos intermediários normal
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EPE</b>	Extensão da pegada experimental
<b>EPN</b>	Extensão da pegada normal
<b>FCF</b>	Faculdade de Ciências Farmacêuticas

<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>g</b>	grama
<b>GDNF</b>	Fator neutrófico derivado da glia
<b>HCV</b>	Vírus da hepatite C
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HTLV-1</b>	Vírus T-Linfotrópico Humano do Tipo 1
<b>HTLV-2</b>	Vírus linfotrópico das células T humana tipo 2
<b>ICAM-1</b>	Moléculas de adesão intercelular do tipo 1
<b>IFC</b>	Índice de função ciática
<b>IL6</b>	Interleucina 6
<b>INC.</b>	Incorporated
<b>IQ</b>	Instituto de Química
<b>kg</b>	quilograma
<b>l</b>	litro
<b>LIM</b>	Laboratório de Investigação Médica
<b>LPE</b>	Largura da pegada experimental
<b>LPN</b>	Largura da pegada normal
<b>MAC</b>	Macintosh
<b>mg</b>	miligrama
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimol
<b>mm</b>	milímetro
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>

<b>Nº</b>	Número
<b>NT-3</b>	Neurotrofina-3
<b>°C</b>	Graus celsius
<b>OP</b>	Operados
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer solution</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SB</b>	Sulfobetaina
<b>TGF</b>	<i>Transforming growing factor</i>
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>UW</b>	Universidade de Wisconsin

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1 -</b>	Desenho esquemático da via de acesso ao nervo ciático.....	20
<b>Figura 2 -</b>	Foto da via de acesso ao nervo ciático.....	20
<b>Figura 3 -</b>	Foto do nervo ciático dissecado.....	21
<b>Figura 4 -</b>	Foto do nervo ciático com régua milimetrada para a medição da lesão nervosa.....	21
<b>Figura 5 -</b>	Foto da lesão nervosa segmentar.....	22
<b>Figura 6 -</b>	Foto da neurografia do enxerto .....	22
<b>Figura 7 -</b>	Frascos de preservação dos aloenxertos.....	25
<b>Figura 8 -</b>	Pista para análise das pegadas impressas pelas patas posteriores dos animais.....	28
<b>Figura 9 -</b>	Marca da pata posterior impressa em papel. As linhas representam as distâncias mensuradas para o cálculo do IFC.....	29
<b>Figura 10 -</b>	Etapas do método nos grupos operados.....	32
<b>Figura 11 -</b>	Etapas do método nos grupos somente tratados.....	32
<b>Figura 12 -</b>	A) Imagem histológica de um autoenxerto não operado, B) Autoenxerto após sua reinervação com 14 semanas (Grupo 0).....	57

- Figura 13** - A) Enxerto somente tratado (Grupo A) por resfriamento em solução Celsior®, B) Aspecto do nervo reinervado com Aloenxerto preservado por resfriamento (Grupo 1) ..... 57
- Figura 14** - A) Enxerto somente tratado (Grupo B) com Glicerol, B) Aspecto do nervo reinervado com aloenxerto preservado em Glicerol (Grupo 2) 58
- Figura 15** - A) Enxerto somente tratado (Grupo C) em solução de detergentes, B) Aspecto do nervo reinervado com aloenxerto preservado em solução de detergentes..... 58

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 -</b>	Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 0 – Grupo Controle.....	35
<b>Tabela 2 -</b>	Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 1 – Grupo preservado por resfriamento (solução Celsior®).....	36
<b>Tabela 3 -</b>	Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 2 – Grupo preservado em Glicerol.....	37
<b>Tabela 4 -</b>	Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 3 – Grupo preservado em Solução de Detergentes.....	38
<b>Tabela 5 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 0 – Grupo Controle.....	46
<b>Tabela 6 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 1 – Grupo preservado por resfriamento (solução Celsior®).....	47
<b>Tabela 7 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 2 – Grupo preservado em glicerol.....	48
<b>Tabela 8 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 3 – Grupo preservado em solução de detergentes.....	49
<b>Tabela 9 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo A – Grupo preservado por resfriamento (solução Celsior®).....	52

<b>Tabela 10 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo B –	
	Grupo preservado em glicerol.....	53
<b>Tabela 11 -</b>	Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo C –	
	Grupo preservado em solução de detergentes.....	54

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão).....	39
<b>Gráfico 2 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 0 e 1 (média e desvio padrão).....	40
<b>Gráfico 3 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 0 e 2 (média e desvio padrão).....	41
<b>Gráfico 4 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 0 e 3 (média e desvio padrão).....	42
<b>Gráfico 5 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 1 e 2 (média e desvio padrão).....	43
<b>Gráfico 6 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 1 e 3 (média e desvio padrão) .....	44
<b>Gráfico 7 -</b>	Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 2 e 3 (média e desvio padrão) .....	45
<b>Gráfico 8 -</b>	Diâmetro dos axônios nos grupos operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos 0, 1, 2 e 3.....	50
<b>Gráfico 9 -</b>	Número de axônios nos grupos operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos 0,1,2 e 3.....	51

- Gráfico 10** - Diâmetro dos axônios nos grupos não operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos A, B e C..... 55
- Gráfico 11** - Número de axônios nos grupos operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos A, B e C..... 56

## RESUMO

Nakamoto JC. *Avaliação da utilização do aloenxerto acelular na regeneração nervosa: estudo experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2020.

Estudo sobre a regeneração do nervo ciático em ratos com a utilização de aloenxerto acelular. Foram comparadas três diferentes técnicas de preservação do aloenxerto na reparação da lesão completa do nervo ciático em 40 ratos. Entre elas estão a preservação por resfriamento (grupo 1), a preservação com glicerol (grupo 2) e a preservação com detergentes (grupo 3). O grupo 0 foi composto por um grupo controle constituído por ratos em que a reconstrução do nervo ciático foi realizada por auto enxerto. A avaliação funcional foi feita através da análise dos padrões das pegadas das patas posteriores dos ratos ("*Walking Track Analysis*"), nos períodos: pré-operatório, pós-operatório imediato, na terceira, sexta, décima segunda e décima quarta semanas. Também foram realizadas análises histomorfométricas. Isso permitiu avaliar a estrutura do aloenxerto, estimar o a eficácia de regeneração nervosa através da contagem do número de axônios mielinizados e seus diâmetros. Adicionalmente, comparamos os enxertos após os seus respectivos tratamentos, permitindo assim avaliar a eficácia de cada um deles na preservação da manutenção da matriz extracelular e diminuição de debris celulares, fatores que contribuem na regeneração nervosa e diminuem a resposta imunológica do aloenxerto.

**Descritores:** Lesões nervosas; Regeneração nervosa; Aloenxerto; Enxerto de nervo acelular.

**ABSTRACT**

Nakamoto JC. *Nerve regeneration through decellularized allograft use: an experimental study in rat models* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Study about the use of decellularized nerve allografts to regenerate the sciatic nerve in rat models. Forty rats were submitted to the repair of complete sciatic nerve injury with nerve allografts. Three allograft preservation techniques were compared. The allograft was preserved with either cold preservation technique (group 1), with glycerol (group 2) or with detergents solution (group 3). A control group included nerve repair using an autograft (group 0). The functional evaluation included walking track analysis during preoperative, immediate post-operative and after 3, 6, 12 and 14 weeks of surgery. Hystomorfometric analysis were also performed, to evaluate the allograft structure, and estimate nervous repair efficacy throughout the myelinated axon count and diameter. The extracellular matrix integrity preservation and cellular debris reduction contribute to nerve regeneration and reduce allograft immunogenicity. These factors were also used to compare the efficacy of the grafts submitted to each preservation technique.

**Keywords:** Nerve injury; Nerve regeneration; Allograft; Descellularized nerve graft.

# ***1. INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

Os nervos periféricos, como extensões do sistema nervoso central, são responsáveis pela integração das atividades sensitivas e motoras do aparelho locomotor e suas lesões são extremamente frequentes.

As lesões dos nervos periféricos ocorrem em 3 a 5% das lesões traumáticas de membros<sup>1,2</sup>. Embora mais comumente associados a trauma direto, também ocorrem, ocasionalmente, como sequelas de cirurgia, invasões tumorais e impõem custos ao sistema de saúde americano de cerca de US\$ 150 bilhões anualmente<sup>3-4</sup>. Há evidência de que, das lesões musculoesqueléticas mais comuns relacionadas ao esporte, as lesões de nervo periférico são também numerosas<sup>5</sup>.

Quando ocorrem, nos deparamos com diversas situações clínicas, incluindo déficits motores e sensitivos limitantes às atividades de um indivíduo.

Até o século XIX sabia-se que, após a reparação de um nervo periférico, poder-se-ia obter a recuperação funcional das estruturas por ele inervadas, mas desconhecia-se o mecanismo pelo qual isso ocorria. Em 1850, **Waller**<sup>6</sup> apresenta seu clássico trabalho sobre degeneração nervosa após uma lesão. A sua importância é expressa através do conjunto de fenômenos que ocorrem no axônio distal após uma lesão, denominada degeneração walleriana em sua homenagem.

Em seus trabalhos publicados em 1914 e 1928, **Ramón y Cajal**<sup>a</sup> citado por **Barbara e Clarac**<sup>7</sup> (2011) demonstram, definitivamente, que fibras nervosas viáveis, em um nervo periférico degenerado, originam-se e crescem a partir do coto proximal, e não

---

<sup>a</sup> Ramón y Cajal S. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. London: Oxford University Press, Humphrey Milford, 1928.

através de autorregeneração da porção distal degenerada. Esse estudo deu início à era moderna nas pesquisas sobre regeneração nervosa.

Após a lesão nervosa, inicia-se uma série de eventos que culminarão em sua regeneração. Essa resposta biológica acontece quando o epineuro do nervo periférico se mantém íntegro e existe apenas a lesão dos axônios dentro das fibras nervosas. Horas depois da perda de continuidade da fibra nervosa, ocorrem alterações na estrutura celular e as extremidades dos axônios são seladas.

No corpo celular, ocorre a cromatólise, onde há um ingurgitamento e arredondamento celular, degeneração dos corpúsculos de Nissl e migração do núcleo para a periferia. Aumenta-se a produção de Rna com uma maior síntese de componentes proteicos do citoesqueleto, como tubulina, actina e neurofilamentos, necessários na regeneração axonal<sup>8</sup>.

No segmento distal do axônio, ocorre a degeneração Walleriana, que consiste na desintegração dos axônios distais à lesão pelas células de Schwann, que se proliferam e formam linhas longitudinais dentro dos tubos endoneurais (bandas de Bungner) e preparam a estrutura histológica do nervo distal para o crescimento e passagem de novos cotos axonais<sup>9</sup>.

No coto proximal à lesão, ocorre uma degeneração semelhante à degeneração Walleriana e estende-se até o nódulo de Ranvier mais próximo. Macrófagos e células de Schwann fagocitam debris celulares e mielina. Macrófagos também secretam mediadores inflamatórios como a IL6 e a ApoE, além de fatores de crescimento, como o TGF, que sinalizam a proliferação de células de Schwann<sup>10</sup>. Essas células em proliferação liberam fatores neurotróficos como o fator de crescimento de nervo (NGF) e o fator neutrófico derivado da glia (GDNF), formando as condições para o crescimento dos brotos de crescimento do axônio<sup>11</sup>.

Na porção distal de cada broto, formam-se projeções de membrana plasmática do axônio, constituindo o cone de crescimento que são atraídos por sinalizadores celulares (NGF, BDNF e NT-3) e por componentes da matriz extracelular como a laminina e a fibronectina, produzidas pelas células de Schwann<sup>12-14</sup>.

O transporte axoplasmático anterógrado continua no coto proximal e o transporte retrógrado persiste por vários dias no coto distal. Como consequência, as extremidades axonais seladas “incham” ao se preencherem de organelas, que são incapazes de avançar além do local da lesão. Peptídeos vasoativos potentes, como o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), acumulam-se nos bulbos axonais no coto proximal e, provavelmente, contribuem para a hiperemia em torno do local da lesão<sup>15</sup>. Uma protéase é produzida pelo cone de crescimento na tentativa de dissolver o tecido que bloqueia seu caminho, mas quando há um grande defeito entre os cotos da lesão, os tecidos cicatriciais tornam-se uma barreira intransponível para o axônio em regeneração<sup>16</sup>.

As fibras nervosas, através de seus brotos de crescimento, que atingirem os seus cotos distais e estabelecerem conexões com o órgão alvo, por meio de um fluxo neural, receberão, gradativamente, camadas de mielina e poderão retornar a um tamanho próximo ao diâmetro antes da lesão<sup>17</sup>.

Os brotos que não reestabelecerem fluxo neural irão desaparecer ou formarão um neuroma<sup>18</sup>.

Para que a regeneração aconteça, é importante a presença de um microambiente propício composto de substrato neural formado pelas células de Schwann, fatores neurotróficos (NGF, BDNF, IL6) e componentes da matriz extracelular como a laminina, a fibronectina e moléculas de adesão<sup>19-21</sup>.

Em pequenos roedores laboratoriais, a perda do citoesqueleto axoplasmático

começa um a dois dias após a lesão. Em humanos, cerca de sete dias. As diferentes latências são diretamente proporcionais ao tamanho do animal<sup>15</sup>.

As lesões dos nervos periféricos podem ocorrer por diversos mecanismos, como secção e esmagamento, em um ou diversos pontos do nervo. **Seddon<sup>22</sup> (1972)** classifica as lesões em três tipos. A neuropraxia, a forma mais branda, ocorre quando há uma interrupção da condução do nervo sem a perda da continuidade do axônio e a recuperação se dá sem degeneração Walleriana. Na axoniotmese, ocorre degeneração axonal, com perda da relativa continuidade do axônio e sua cobertura de mielina, mas há a preservação da estrutura do tecido conectivo do nervo. Já na neurotmese, que é a forma mais grave de lesão, o nervo é completamente interrompido, com desorganização do axônio causada por uma fibrose tecidual com conseqüente interrupção do crescimento axonal e a recuperação espontânea é pobre sem intervenção cirúrgica<sup>22</sup>.

**Sunderland<sup>23</sup> (1978)** refinou a classificação de Seddon dividindo-a em cinco tipos ou graus. A neuropraxia foi classificada como tipo I; já a axonotmese foi dividida em três tipos, que variam de acordo com o grau da lesão, enquanto a neurotmese foi classificada como tipo V. É raramente possível, através da classificação de Sunderland, classificar com exatidão uma lesão axonotmética com base em dados clínicos e eletromiográficos. O subtipo é geralmente discriminável pelo exame histológico da lesão do nervo<sup>23</sup>.

Quando a lesão do nervo acomete o axônio, o endoneuro e o perineuro é classificada como axoniotmese, segundo **Seddon<sup>22</sup> (1972)**, ou como grau IV, segundo **Sunderland<sup>23</sup> (1978)**. Quando além das estruturas citadas, também acometer o epineuro será classificada como neurotmese, segundo Seddon, ou como grau V, segundo Sunderland. Nesses casos, o tratamento é cirúrgico. Quanto mais precocemente houver a reconstrução do nervo, melhor será o prognóstico. O reparo primário, de cinco a sete dias da lesão, é indicado quando: a lesão do nervo é limpa, incisa, sem componentes de esmagamento;

não há lesão associada, a cobertura cutânea é adequada; e a equipe e o material cirúrgico são adequados<sup>6</sup>.

As reconstruções podem ser realizadas através de suturas perineurais, epiperineurais e epineurais internas e externas<sup>6</sup>.

O reparo ideal do nervo é a neurorrafia primária sem tensão. Segundo **Millesi et al.**<sup>24,25</sup>, a coaptação de nervos sem tensão resulta em boa regeneração axonal e retorno da função, especialmente se o tempo de denervação for inferior a 6 meses e a idade do paciente for inferior a 50 anos. Quando existem perdas inferiores a 1 cm, o reparo sem tensão pode ser alcançado pela mobilização e transposição dos nervos e um melhor posicionamento articular.

No entanto, o aumento da tensão no local do reparo afeta negativamente os axônios em regeneração e resulta em má função, dor e formação de neuroma. Portanto, a neurorrafia primária terminoterminal não deve ser usada em espaços maiores que 1 cm<sup>24-26</sup>.

Quando existe a perda de substância do nervo e não existe a possibilidade da sutura primária, sem tensão, a técnica cirúrgica de escolha é a autoenxertia de nervo. Essa técnica baseia-se na utilização de um segmento de nervo doador do próprio indivíduo, que é interposto entre os cotos proximal e distal do nervo lesado e tem como objetivo o preenchimento de espaço entre os cotos, promovendo a diminuição da tensão nas linhas de sutura e a orientação para o avanço dos cones de crescimento neurais<sup>24,27</sup>. O enxerto autólogo possui suas próprias células de Schwann que auxiliam as células do nervo lesado na produção de fatores de crescimento e de sinalizadores celulares. A presença de uma matriz extracelular natural do tecido nervoso também proporciona um arcabouço de sustentação para o crescimento dos brotos neurais<sup>28,29</sup>.

Habitualmente, os nervos sensitivos cutâneos como o nervo sural, cutâneo medial do antebraço, cutâneo anterolateral do antebraço e o safeno são os escolhidos como fontes doadoras<sup>30</sup>.

Apesar do autoenxerto ser a técnica de escolha nas lesões com perda de substância, a necessidade do sacrifício de um nervo saudável de outra região do corpo está correlacionada a inúmeras desvantagens. Infecções na área doadora (10%), cicatrização retardada (12%), dor crônica (5%)<sup>31</sup> são possíveis complicações do enxerto autólogo. Perda de sensibilidade nas porções laterais do pé e tornozelo (44%), parestesia (42%) e persistência de dor na panturrilha (16%) são consequências nos pacientes que tiveram o nervo sural retirado<sup>32</sup>. Outras desvantagens são a limitação do número ou porções de nervo a serem reconstruídas e a incompatibilidade do diâmetro entre o nervo lesado e o nervo doador.

Para evitar as complicações do autoenxerto, foram propostas inúmeras alternativas de condutos foram propostas. Condutos biológicos como veia e artéria não mostraram qualquer benefício comparado ao enxerto autólogo e ainda apresentam o mesmo problema de morbidade na área doadora<sup>33,34</sup>.

Tubos de materiais aloplásticos não absorvíveis como silicone mostraram-se eficientes somente em lesões nervosas com um intervalo de 1cm. Outros materiais como condutos bioabsorvíveis de ácido poliglicólico mostraram-se eficientes em lesões de até 3 cm. Porém, nenhum deles foi eficiente em lesões maiores<sup>35</sup>.

Uma das mais promissoras alternativas ao uso do enxerto autólogo no tratamento das lesões periféricas é o aloenxerto. O entusiasmo inicial com o uso de aloenxerto diminuiu após estudos clínicos e experimentais demonstrarem que o aloenxerto é invadido por linfócitos do hospedeiro, proporcionando uma regeneração nervosa menor do que o autoenxerto<sup>36</sup>.

Com uma maior compreensão da aloimunidade, o interesse voltou a crescer e foram iniciados experimentos para modificar o enxerto doador ou modificar a resposta imune do hospedeiro<sup>37</sup>.

Os enxertos alógenos de cadáver estão disponíveis em abundância e apresentam o potencial de tamanho e comprimento, além da especificidade motora e sensitiva. Eles apresentam células de Schwann e microestrutura endoneural que permitem o mesmo potencial de regeneração dos autoenxertos<sup>38-42</sup>. Infelizmente, a utilização de enxertos frescos de cadáver pede uma imunossupressão sistêmica, o que predispõe a infecções oportunistas, neoplasias e toxicidade<sup>43,44</sup>.

Enxertos alógenos processados para remover os componentes celulares oferecem uma interessante alternativa aos problemas da imunossupressão. Apesar das diferenças de cada processo, todas elas têm como objetivos diminuir a imunogenicidade eliminando os constituintes celulares e manter a capacidade regenerativa preservando a matriz extracelular nativa<sup>45</sup>.

Existem muitos métodos de preparo do enxerto de nervo acelular, incluindo a liofilização, preservação a frio, uso de detergentes e irradiação<sup>46-49</sup>. Existe pouco consenso a respeito de qual técnica de processamento do aloenxerto preserva melhor a capacidade regenerativa com a manutenção da matriz extracelular, menor imunogenicidade do tecido e a máxima recuperação funcional *in vivo*.

A preservação a frio por tempo prolongado é o método mais estudado. Foi criado através das técnicas de transplante de órgãos. O nervo permanece por sete semanas em uma solução criada na Universidade de Wisconsin (UW) a 4°C o que é suficiente para completa supressão da produção interferon gama em linfócitos circulantes após os transplantes. Ocorre também a diminuição do potencial antigênico dos dois tipos de células que desempenham o início da resposta imunológica ao enxerto: moléculas de

adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1) e antígenos da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibility complex- MHC), composto de células que incluem macrófagos, células dendríticas e células tipo B. **Atchabahian et al.**<sup>50</sup>, em 1999, preservam aloenxertos de nervo ciático de ratos a 5°C em solução de Wisconsin®, por 2 e 7 semanas. Após a realização de testes de imunidade, concluem que a antigenicidade das células ICAM- 1 é significativamente diminuída com 7 semanas em comparação com o grupo de 2 semanas. Relatam também que a antigenicidade das células classe II do complexo MHC é diminuída significativamente com a preservação tanto por 2 quanto 7 semanas quando comparados a enxertos frescos. O método ainda é eficaz na preservação da lâmina basal das células de Schwann e da matriz extracelular do nervo<sup>50-52</sup>. Porém, o tempo de processamento é extenso, limitando o uso do método como ferramenta de estudo.

O processamento com detergentes foi inicialmente desenvolvido na tentativa de remover os remanescentes celulares do nervo doador e evitar os efeitos destrutivos na ultraestrutura do nervo causados pelo congelamento do nervo<sup>48,49</sup>. Enquanto os primeiros protocolos utilizavam desoxicolato de sódio, Triton X-100, e água destilada para descellularizar os enxertos de nervo, recentes estudos têm otimizado o tratamento com agentes químicos menos agressivos<sup>45</sup>. **Hudson et al.**<sup>45</sup> (2004) demonstram que os aloenxertos expostos repetitivamente a soluções de água destilada, sulfobetaine-10 e Triton X-200/sulfobetaine pelo período de 4 dias demonstram uma preservação superior da matriz extracelular e níveis de descellularização semelhantes aos processos químicos anteriormente utilizados. Posteriormente, os aloenxertos processados com essa técnica, mostram uma maior densidade de regeneração axonal do nervo ciático em ratos do que a preservação térmica e processos com detergentes antes utilizados<sup>51,53</sup>. Apesar de apresentar benefícios adicionais em relação às técnicas de preservação a frio, os estudos

*in vivo* ainda não conseguiram elucidar se o modesto aumento da capacidade regenerativa facilitada pelo processamento de detergentes se traduz em melhorias na regeneração e recuperação funcional do nervo após o transplante.

O uso do glicerol de maior expressão ocorre na preservação de pele homogênea cadavérica para o uso de enxertos temporários no tratamento de queimaduras, por meio da organização e manutenção de bancos de pele e tecidos<sup>54-59</sup>.

A metodologia estabelecida pelo Banco de Pele Europeu (*Euro Skin Bank*) é extensivamente utilizada por essa instituição há vários anos<sup>60-64</sup>. Nesse protocolo, o material passa primeiro por uma imersão em solução de glicerol a 50% por quatro horas na temperatura ambiente, depois passa a outra solução de glicerol, a 70% por três horas a 33°C e, finalmente, numa solução de glicerol a 85% por outras três horas a 33°C. Após os três estágios, o material é estocado a 4°C.

O glicerol é capaz de desidratar o tecido, removendo a maior parte da água intracelular sem, contudo, alterar a concentração iônica das células, sendo um eficiente fixador e protetor da matriz tecidual, pois inviabiliza as células locais, mantendo a arquitetura local<sup>65</sup>.

A ausência de reações inflamatórias agudas dos implantes indica a baixa antigenicidade do transplante obtido por esse meio de conservação<sup>65,66</sup>. A preservação com glicerol também possui propriedades antibactericida e antiviral<sup>67-69</sup>, inclusive para a eliminação do vírus HIV<sup>70</sup>.

Na literatura são escassas as referências da preservação de aloenxertos de nervo em glicerol.

**Wolff et al.**<sup>71</sup>, em 1993, armazenam nervos femorais de ratos Fischer durante um mínimo de 100 dias em 98% de glicerol a 4°C, enxertando-os em lesões de nervos femorais de ratos Lewis e em animais - controles singênicos. Após três meses, análises

histológicas, eletrofisiológicas e morfométricas mostram resposta regenerativa menor do que nos nervos enxertados nos controles singênicos. As diferenças desaparecem a partir de seis meses. A avaliação imunohistoquímica demonstra uma resposta imune modesta aos 3 meses, que cede em torno de 6 meses. Essas descobertas são descritas como encorajadoras para o desenvolvimento de um banco de enxerto de nervos preservados em glicerol.

**Souza Lemos et al., em 2008**, comparam o enxerto autógeno com o aloenxerto e tubo de veia, ambos preservados em glicerol a 98% por sete dias consecutivos a 4°C, no reparo do nervo fibular em ratos<sup>72</sup>. O estudo demonstrou resultados semelhantes nos três grupos, sugerindo que o glicerol é um método eficaz na manutenção da matriz extracelular e possui potencial de regeneração nervosa nos aloenxertos nele preservados.

Neste estudo, três modelos de enxerto de nervo acelular foram avaliados para comparar se as diferenças na técnica de processamento modulam a eficácia do enxerto do nervo. Os aloenxertos de nervo preservados a frio, processados com detergente e os enxertos preservados em glicerol foram comparados com autoenxertos de nervo padrão. O tamanho do defeito, o diâmetro e comprimento foram padronizados e foram avaliadas suas capacidades de reparar funcionalmente um defeito de nervo periférico em animais de laboratório. A eficácia do enxerto, definida como a capacidade de facilitar a regeneração funcional do nervo e a recuperação motora, foi avaliada através da análise histomorfométrica do nervo regenerado e da avaliação funcional de marcha (*walking track*). A imunogenicidade dos aloenxertos de nervos tratados com detergente<sup>53</sup>, preservados a frio<sup>73</sup> e em glicerol<sup>61,74</sup>, já foram estudados anteriormente. As três técnicas de processamento demonstraram reduzir a resposta imune do hospedeiro dos aloenxertos. Este estudo não avalia o efeito da resposta imune de cada enxerto na regeneração nervosa. Porém faremos uma análise histomorfométrica de enxertos tratados pelos três métodos

para avaliar a efetiva diminuição da celularidade em cada um deles.

O uso do aloenxerto preservado em glicerol pode trazer vantagens aos pacientes, à equipe médica e às instituições de saúde, por se tratar de um método de preservação mais barato, que pode ser utilizado em grande escala e já é extremamente adotado na preservação de outros tecidos, como pele.

## **2. OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

Comparar a eficiência na regeneração axonal do nervo ciático em ratos do aloenxerto conservado em glicerol com a enxertia de nervo autógeno, enxertos criopreservados e processados com detergentes. Secundariamente, avaliar a eficácia de cada método de preservação em manter a matriz extracelular sem componentes celulares.

### **3. MÉTODOS**

### 3 MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, longitudinal, prospectivo, não randomizado controlado, não cego. O projeto foi devidamente aprovado pela Comissão Científica do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Anexo A**). O projeto também foi aprovado pelo Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP sob o número 001/16 e desenvolvido no Laboratório de Microcirurgia Experimental do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (**Anexo B**).

Foram utilizados ratos fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), criados de acordo com as normas de manejo ético dos animais e liberados pelo biotério para o experimento (**Anexo C**).

Seguiu-se o protocolo ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*), protocolo criado e aceito por periódicos para a publicação de artigos de experimentação animal<sup>75</sup>. Por se tratar de uma tese de doutorado, esse protocolo foi expandido para incluir todas as informações.

#### 3.1 Amostra

A amostra foi composta de 40 ratos machos, isogênicos da linhagem Wistar, com idade entre 120 e 140 dias e peso entre 250 e 330g oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. No momento da recepção, todos

os ratos foram avaliados quanto às condições gerais e à motricidade e identificados por marcação de número na cauda.

Foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada. Acondicionamos até 2 ratos de uma mesma ninhada por gaiola (49 x 34 x 16 cm). Mantiveram-se as gaiolas em ambiente climatizado, sob condições de higiene, alimentação e hidratação adequadas no interior do Laboratório de Microcirurgia Experimental do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Após o término da pesquisa, os animais foram submetidos à morte indolor induzida por uma dose letal de pentobarbital sódico injetado intraperitonealmente, de acordo com os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Medicina Veterinária em 2001 e aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados com os animais em 2002, sem reaproveitamento dos mesmos para outros experimentos. O descarte dos animais aconteceu em caixas de material biológico, seguindo os procedimentos recomendados pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os critérios de inclusão foram:

- a) Ratos da raça Wistar;
- b) Machos adultos jovens (120 a 140 dias de vida inclusive);
- c) Peso entre 250 e 330 gramas, inclusive;
- d) Condição geral (pelagem e estado clínico) e motricidade normal;
- e) Função motora normal das patas observada no pré-operatório na análise dos padrões das pegadas das patas posteriores dos ratos (*Walking Track Analysis*).

Os critérios de exclusão foram:

- a) Óbito após lesão;
- b) Autofagia;
- c) Impossibilidade de reverter Infecção.

A escolha do tamanho da amostra foi fundamentada em estudos prévios que demonstraram que um número de cinco a dez animais é representativo na observação das mudanças ocorridas na estrutura e função de aloenxertos de nervos<sup>50,72,76-78</sup>.

Em nosso estudo, por realizarmos um trabalho inovador, não havia dados para o exato cálculo da amostra, motivo pelo qual partimos de um pressuposto no qual foi adotado um número de animais compatível com experimentos já existentes com enxertos de nervos alógenos, respeitando-se os princípios da ética em animais.

### **3.2 Normatizações e ética**

Todas as fases do trabalho seguiram os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e cujos artigos englobam três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência.

Os animais seguiram o protocolo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*<sup>79</sup> e o “Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP”<sup>80</sup>.

Foram seguidas também as determinações da Lei Federal no. 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece normas para prática didático-científica da vivisseção de animais,

e o projeto de lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### **3.3 Protocolo de anestesia**

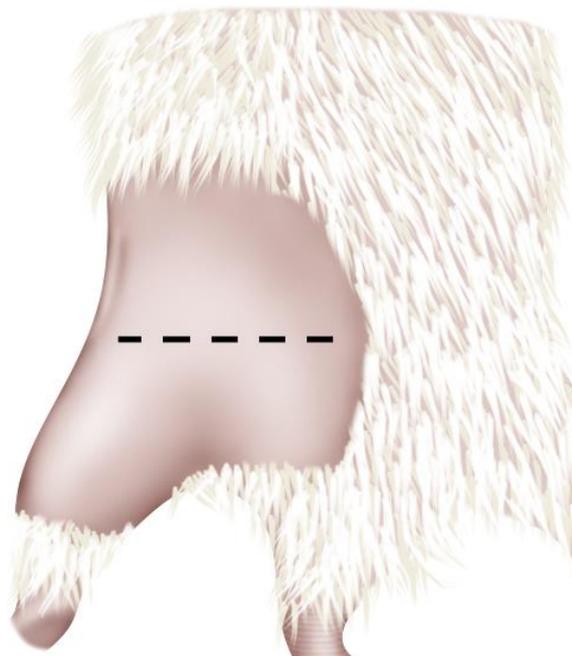
Os animais foram anestesiados com xilazina 10mg/kg + cetamina 100 mg/kg por via intraperitoneal e, para anestesia local, foi utilizado o cloridrato de lidocaína com epinefrina. O plano anestésico profundo foi confirmado pela ausência dos reflexos da córnea e pela ausência de reação à compressão da cauda e patas traseiras. Quando necessário realizou-se um terço da dose anestésica inicial como reforço<sup>81</sup>.

### **3.4 Pós-operatório**

Após a limpeza da cicatriz cirúrgica, foi aplicada uma camada de spray de rifampicina. Após a cirurgia, ministrou-se meloxicam 2 mg/kg uma vez ao dia por 7 dias e cloridrato de tramadol 5 mg/100 gramas por via intramuscular por 5 dias a cada 24 horas. Ração e água foram oferecidas logo que o animal se mostrou totalmente acordado. Os ratos foram transferidos para câmaras com temperatura controlada de 25 a 28 °C, durante 30 minutos, para controle de provável hipotermia pós-operatória<sup>82</sup>.

### **3.5 Formação dos grupos e ato operatório**

Formamos quatro grupos de ratos devidamente identificados por números. Grupo 0 (1 ao 10), grupo 1 (11 a 20), grupo 2 (21 a 30), grupo 3 (31 a 40). Cada grupo teve um tipo de tratamento para a lesão do nervo ciático previamente seccionado. Após a anestesia, posicionamos o rato em decúbito dorsal em uma bancada de madeira com aparato de imobilização de membros torácicos e pélvicos. Realizamos a tricotomia da pata traseira direita e em seguida, realizamos a degermação com polivinilpirrolidona-iodo (Povidine®). Por meio de uma incisão na face posterior da pata direita (**Figura 1**), afastou-se a musculatura até se obter a exposição do nervo ciático em sua porção média até a porção distal de seus ramos: nervo fibular, sural e tibial (**Figuras 2 e 3**). Foram realizados defeitos de cinco milímetros de extensão no nervo ciático, medidos com uma régua milimetrada (**Figura 4**). O nervo foi seccionado transversalmente com microtesoura, cinco milímetros proximalmente a sua divisão (**Figura 5**). A reparação do nervo foi realizada imediatamente após a lesão, sempre pelo mesmo cirurgião. Realizamos técnicas de reparação utilizando neurorrafia terminoterminal (**Figura 6**).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 1** – Desenho esquemático da via de acesso ao nervo ciático



Fonte: Acervo pessoal do autor.

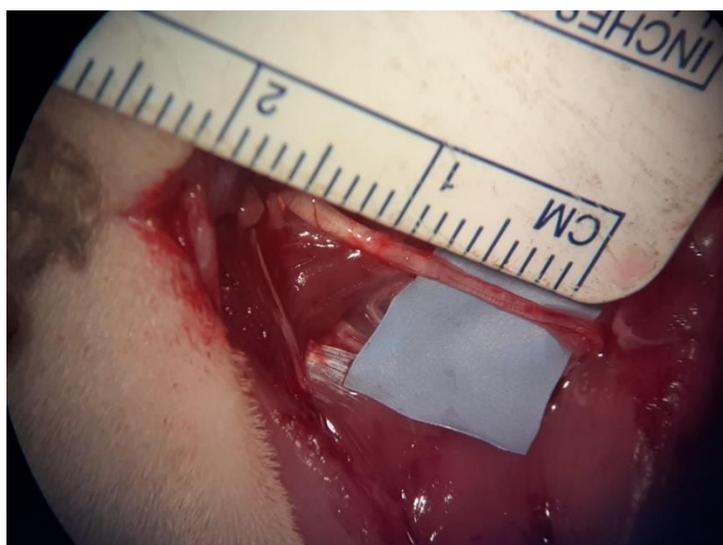
**Figura 2** – Foto da via de acesso ao nervo ciático



Fonte: Acervo pessoal do autor.

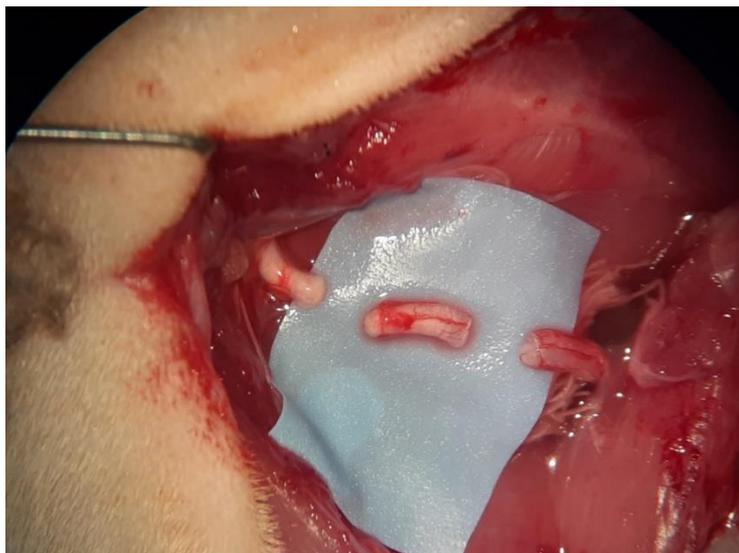
**Figura 3** – Foto do nervo ciático dissecado

No grupo 0 (grupo controle), com total de 10 ratos, o segmento ressecado foi ressuturado em sua posição (funcionando como enxerto autógeno) com quatro pontos epineurais simples e equidistantes com fio de mononylon dez zeros (Ethicon®) sob magnificação de 12 vezes em microscópio óptico para microcirurgia.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 4** – Foto do nervo ciático com régua milimetrada para a medição da lesão nervosa



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 5** – Foto da lesão nervosa segmentar



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 6** – Foto da neurorrafia do enxerto

No grupo 1 (aloenxertos preservados por resfriamento), com total de 10 ratos, foram realizadas neurorrafias com a interposição do enxerto de nervo alógeno simplesmente resfriados a 4°C por catorze dias consecutivos.

No grupo 2 (aloenxerto preservados em glicerol), com total de 10 ratos, foram realizadas neurorrafias com a interposição do enxerto de nervo alógeno previamente preservados em glicerol a 98% por sete dias consecutivos a 4°C.

O grupo 3 (aloenxerto preservados com detergente), com total de 10 ratos, foi submetido ao mesmo procedimento realizado com o grupo 1 e 2. Porém, os enxertos alógenos foram aloenxertos expostos repetitivamente a soluções de água destilada, solução tamponada de sódio-fosfato, sulfobetaina-10, Triton X-200 e sulfobetaina -16 pelo período de 4 dias.

Em todos os grupos, a neurorafia foi feita com quatro pontos epineurais simples equidistantes com fio de mononylon dez zeros (Ethicon®), após a hidratação dos enxertos por trinta minutos em temperatura ambiente. Após o reparo do nervo, a ferida cirúrgica foi suturada com fio mononylon 3.0.

Adicionalmente, formamos mais três grupos denominados A, B e C. Esses três grupos foram constituídos de nervos ciáticos retirados da pata traseira de ratos Wistar e submetidos a tratamentos de preservação por resfriamento, em glicerol e solução de detergentes, respectivamente. Após o tratamento, esses nervos foram submetidos à análise histomorfométrica de suas características como manutenção da matriz extracelular e ausência de células.

### **3.6 Métodos de preservação**

#### **3.6.1 Conservação a frio**

O grupo denominado 1 foi constituído por 10 ratos com os aloenxertos previamente conservados a frio. Os aloenxertos foram colocados em tubos plásticos identificados (tipo Eppendorf) contendo solução Celsior® e encaminhados para o Banco de Tecidos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo, onde foram preservados por 14 dias resfriados a 4°C armazenados em solução Celsior® em refrigerador com sistema de monitoramento e controle contínuo de temperatura (**Figura 7**).

A Solução Celsior® trata-se de uma solução própria para conservação de tecidos a frio composta de glutathione (0,921 g/l), manitol (10,930 g/l), ácido lactobiónico (28,664 g/l), ácido glutâmico (2,942 g/l), hidróxido de sódio (4,000 g/l), cloreto de cálcio (0,037 g/l), cloreto de potássio (1,118 g/l), cloreto de magnésio (2,642 g/l), histidina (4,650 g/l) e adjuvantes, aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob o Registro No 80185570001, Processo 25351.329058/2006-87, fabricada em Bensheim, Hessen, Alemanha pelo Laboratório Dr. Franz Kohler Chemie Gmbh e comercializada no Brasil pela empresa Contatti Comércio e Representações Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil, sob autorização número 8018557.

O mesmo procedimento foi realizado no grupo A (10 nervos somente tratados).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 7** – Frascos de preservação dos aloenxertos

### 3.6.2 Glicerol

O grupo denominado 2 foi constituído por 10 ratos com os enxertos alógenos conservados em glicerol. Os aloenxertos foram colocados em tubos plásticos identificados (tipo Eppendorf) com solução de glicerol a 98% por sete dias consecutivos a 4°C em refrigerador com sistema de monitoramento e controle contínuo de temperatura. O mesmo processo foi repetido no grupo B (10 nervos somente tratados).

### 3.6.3 Processamento com detergentes

O grupo denominado 3 foi constituído por 10 ratos com os enxertos alógenos previamente expostos a soluções de detergentes. A preparação seguiu o protocolo descrito por **Hudson et al.**<sup>45</sup> (2004). Os aloenxertos foram colocados em tubos plásticos identificados (tipo Eppendorf) contendo 7ml de água destilada e agitados em temperatura ambiente por 7 horas. A solução foi substituída por uma solução tamponada de sódio - fosfato 10 mM (PBS- phosphate-buffered sodium solution) contendo sulfobetaína-10 (SB-10) 125 mM e os nervos foram agitados por 15 horas. Os nervos foram então lavados com PBS por 15 minutos, transferidos para uma solução de PBS contendo 0,6 mM de sulfobetaína-16 (SB-16) e 014% de Triton X-200 e agitados por 24 horas. Os nervos foram lavados mais 3 vezes em PBS por um período de 5 min, colocados em solução de PBS contendo SB-10 e agitados por 7 horas. Os nervos então foram lavados novamente em PBS e transferidos para a solução contendo SB-16 e Triton X-200 e agitados por 15 horas. Finalmente, os nervos foram lavados com PBS por 15 minutos e armazenados a 4°C em refrigerador com sistema de monitoramento e controle contínuo de temperatura.

O mesmo processo foi repetido no grupo C (10 nervos somente tratados).

### 3.7 Aferições

#### 3.7.1 Teste da Marcha

O grau de recuperação funcional associado à regeneração neural obtida foi avaliado pelo estudo dos padrões de deambulação em ratos no pré-operatório e no pós-operatório (imediate, três semanas, seis semanas, doze semanas e no momento do sacrifício – catorze semanas), por meio da análise das pegadas impressas pelas patas posteriores dos animais (*walking track analysis*), de acordo com método previamente descrito por **de Medinaceli et al.**<sup>82</sup> (1982) e modificado por **Bain et al.**<sup>38</sup> (1988). Em todos os grupos operados (grupos 0, 1, 2 e 3), os animais tiveram suas patas traseiras mergulhadas em tinta azul, sendo então colocados para andarem em um corredor sobre papel branco, de modo a deixarem suas pegadas impressas (**Figura 8**). Foram medidas as seguintes variáveis: extensão da pegada (distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), largura da pegada (distância das impressões entre o 1º e 5º dedos) e a distância entre os dedos intermediários (2º e 4º dedos) (**Figura 9**). Esses dados foram usados para o cálculo do índice de função ciática (IFC) de cada animal, utilizando a fórmula proposta por Bain-Mackinnon-Hunter<sup>83-88</sup>.

$$\text{IFC} = 38,3 \times (\text{EPE-EPN/EPN}) + 109,5 \times (\text{LPE-LPN/LPN}) + 13,3 \times (\text{DDIE-DDIN/DDIN}) - 8,8$$

Sendo:

IFC = índice de função ciática

EPE/EPN = extensão da pegada experimental (EPE) e normal (EPN)

LPE/LPN = largura da pegada experimental (LPE) e normal (LPN)

DDIE/DDIN = distância entre os dedos intermediários experimental (DDIE) e normal (DDIN)

Obs: os valores 38,3; 109,5; 13,3 e -8,8 são constantes na fórmula

Sendo:

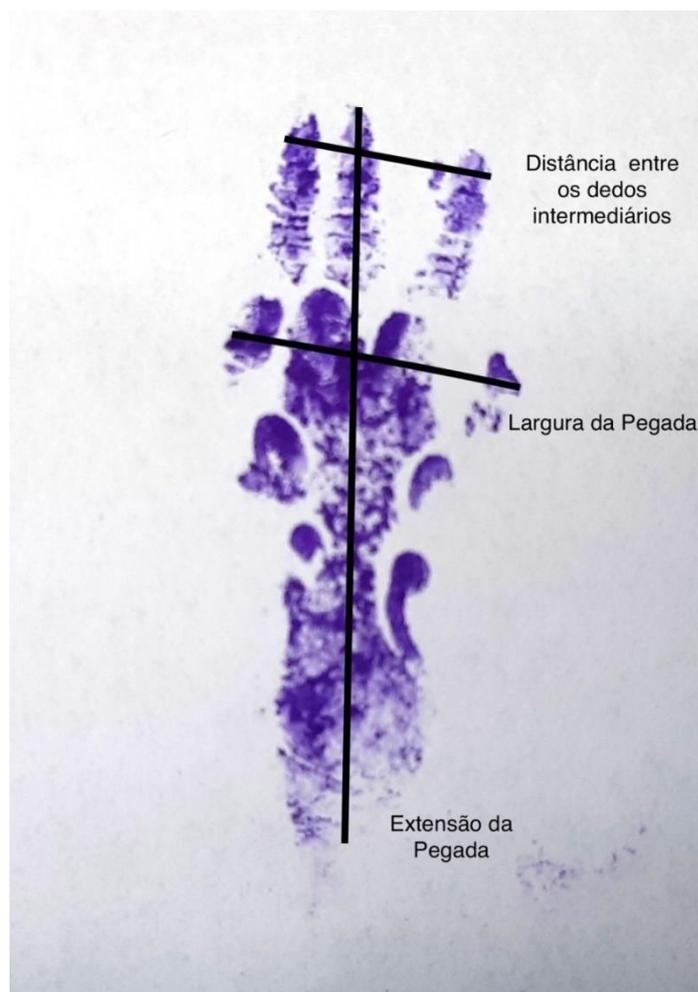
IFC = próximo a zero +/- 10 (função motora normal do nervo ciático)

IFC = próximo a -100 +/- 10 (completa disfunção)



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 8** – Pista para análise das pegadas impressas pelas patas posteriores dos animais



Fonte: Acervo pessoal do autor.

**Figura 9** – Marca da pata posterior impressa em papel. As linhas representam as distâncias medidas para o cálculo do IFC

### 3.7.2 Análise histomorfométrica

A coleta de material para exame histomorfométrico nos grupos operados (0,1, 2 e 3) foi feita na décima quarta semana de pós-operatório das enxertias, antes da eutanásia dos animais. Foi retirada uma amostra de 2mm de espessura do nervo ciático de cada rato

3mm distalmente ao local da sutura distal do reparo, evitando-se áreas de sutura com possíveis fibroses e outras reações teciduais.

Nos grupos de aloenxerto somente tratados e não operados (A, B e C), foi retirada uma amostra de 2mm de espessura do nervo e feita a análise histomorfométrica.

Os materiais coletados foram mergulhados em solução de glutaraldeído e encaminhados para análise.

A avaliação foi realizada pelo Setor de Anatomia Patológica do Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético (LIM-41) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O processamento dos nervos se deu pela técnica de inclusão para microscopia eletrônica de transmissão. Após esse processo foram realizados cortes semifinos com navalha de vidro, na espessura de 0,5 a 1 micrometro. Então, uma solução de azul de metileno previamente preparada (dissolvendo-se 1 g de borato em água morna e adicionando 1g de azul de metileno) foi usada para corar a lâmina.

O material foi analisado ao microscópio ótico marca Carl Zeiss modelo Axiolabe e fotografias digitais de todas as lâminas foram feitas com uma objetiva de imersão (X100) e câmera acoplada. A câmera utilizada foi a JVC TK-1270 Color Vídeo.

As fotografias foram transferidas ao computador através de um sistema de captura de imagens denominado “EasyCap®”, do fabricante Feasso, São Paulo, SP, Brasil. O processamento e a análise das imagens foram feitos pelo programa KS300® 3.0 da Zeiss.

Foram avaliadas as características da arquitetura geral do nervos regenerados (Grupos 0,1, 2 e 3) e tratados (Grupos A, B e C) como padrão geral de organização do tecido neural dentro dos tubos, reorganização axonal em fascículos e do tecido conjuntivo epiperineurais, presença de escape de fibras axonais para fora dos limites do epineuro e dos fascículos (**Figuras 10 e 11**).

A partir dos dados obtidos, foi contado o número total de fibras mielínicas reinervadas em uma área padronizada de 10.995  $\mu\text{m}^2$ .

Após a contagem das fibras mielínicas reinervadas, foi então realizada a contagem das áreas das secções transversas (menor diâmetro) das fibras nervosas e calculada a média dessas áreas, somando-se o total das áreas medidas e dividindo-se pelo número de fibras contadas no campo padronizado (Grupos 0,1, 2, 3, A, B e C).

### **3.8 Eutanásia**

Ao final do período de experimentação, todos os ratos foram submetidos à eutanásia conforme legislação em vigor e seguindo os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA (1999).

Os animais foram submetidos à morte indolor induzida por uma dose letal de pentobarbital sódico injetado intraperitonealmente, de acordo com os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Medicina Veterinária em 2001 e aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados com os animais em 2002.

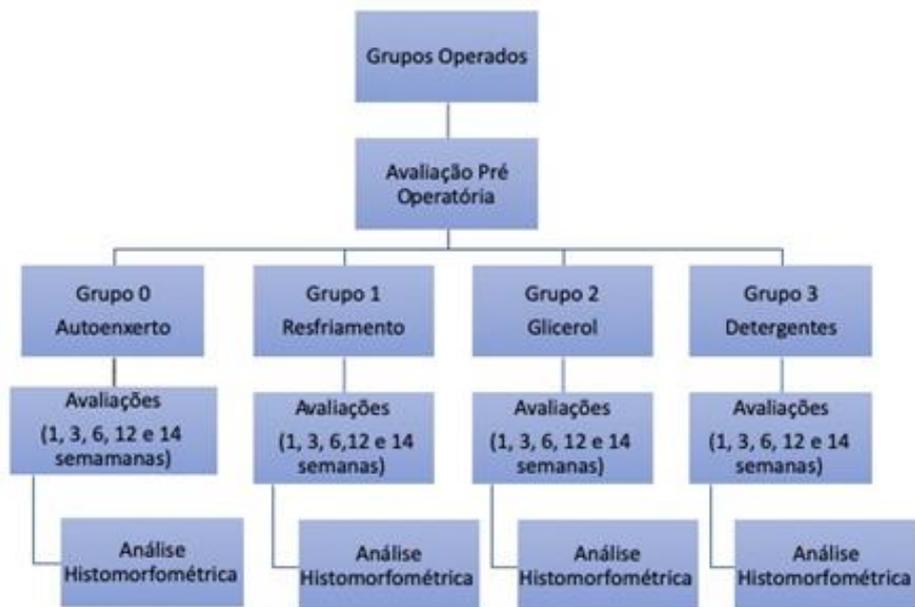


Figura 10 - Etapas do método nos grupos operados



Figura 11 - Etapas do método nos grupos somente tratados

### **3.9 Forma de análise de resultados**

Os dados contínuos, contagem e diâmetro dos axônios e a avaliação funcional realizada pelo *walking track analysis* foram submetidos ao teste de distribuição (Shapiro-Wilk) e ao teste de homogeneidade, para a escolha dos testes paramétricos ou não paramétricos adequados que permitiram comparar os quatro grupos operados (0,1, 2 e 3). No caso de distribuições paramétricas, as diferenças entre os 4 grupos foram avaliadas pela Análise de Variância (ANOVA) e caso fosse significativa seria discriminada pelo teste estatístico post-hoc de Tukey. No caso de distribuições consideradas não paramétricas, utilizaríamos a prova de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas com correção de Bonferroni, respectivamente. Além disso, a análise estatística dos dados referentes ao IFC, no pré-operatório e no pós-operatório (imediate, 3, 6,12 e 14 semanas), foi realizada por análise de medidas repetidas. Os resultados foram apresentados em tabelas estatísticas das grandezas segundo os grupos, relatando as medidas de tendência central e de dispersão e em gráficos. Consideramos significativos valores de p menores que 0,05.

A análise também possibilitou avaliar o resultado dos diferentes tipos de tratamento (Grupos A, B e C) com relação à presença de debris celulares junto à matriz extra celular, mostrando se realmente haveria somente a matriz extracelular no enxerto após o tratamento. Para realização das análises, os dados armazenados em Excel, foram exportados para o software SPSS 25 for MAC.

## ***4. RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados das análises funcionais (Tabelas 1 a 4) (Gráficos 1 a 7)

**Tabela 1** – Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 0 – Grupo Controle

Ratos	Grupo	IFC_Pré	IFC_Pós1	IFC_Pós3	IFC_Pós6	IFC_Pós12	IFC_Pós14
1	0	-15,369	-169,900	-161,140	-169,900	-112,126	-84,796
2	0	-1,844	-169,900	-140,031	-166,771	-113,214	-85,281
3	0	-2,662	-169,900	-150,859	-167,513	-103,405	-89,984
4	0	-8,588	-169,900	-139,495	-167,683	-102,327	-67,545
5	0	-9,982	-169,900	-157,057	-166,100	-108,620	-46,413
6	0	0,444	-169,900	-137,963	-169,900	-117,443	-78,647
7	0	-11,121	-169,900	-159,687	-166,353	-91,034	-76,674
8	0	-9,337	-169,900	-169,900	-169,900	-87,927	-82,876
9	0	-12,782	-169,900	-158,425	-166,575	-74,897	-77,676
10	0	-8,800	-169,900	-158,957	-166,100	-105,887	-68,105
média		-9,069	-169,900	-157,741	-167,142	-104,646	-78,161
dp		5,070	0,000	10,842	1,620	13,248	12,585
erro padrão		1,603	0,000	3,429	0,512	4,190	3,980

**Tabela 2** – Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 1 – Grupo preservado por resfriamento (solução Celsior®)

<b>Ratos</b>	<b>Grupo</b>	<b>IFC_Pré</b>	<b>IFC_Pós1</b>	<b>IFC_Pós3</b>	<b>IFC_Pós6</b>	<b>IFC_Pós12</b>	<b>IFC_Pós14</b>
1	1	-7,197	-169,900	-169,900	-169,900	-86,056	-54,485
2	1	12,003	-169,900	-160,378	-169,900	-87,624	-72,628
3	1	5,893	-169,900	-157,470	-166,353	-70,606	-44,739
4	1	-30,824	-169,900	-162,453	-167,314	-76,076	-66,305
5	1	0,329	-169,900	-157,344	-166,379	-86,453	-63,688
6	1	-3,734	-169,900	-166,418	-168,691	-77,924	-88,857
7	1	-18,640	-169,900	-151,650	-169,900	-85,080	-63,454
8	1	-16,496	-169,900	-165,113	-168,238	-75,001	-71,615
9	1	-2,717	-169,900	-169,900	-169,900	-82,072	-62,549
10	1	-10,950	-169,900	-159,366	-168,053	-65,826	-50,165
média		-5,465	-169,900	-161,416	-168,464	-79,998	-63,001
dp		12,554	0,000	5,898	1,439	7,417	186,883
erro padrão		3,970	0,000	1,865	0,455	2,345	59,097

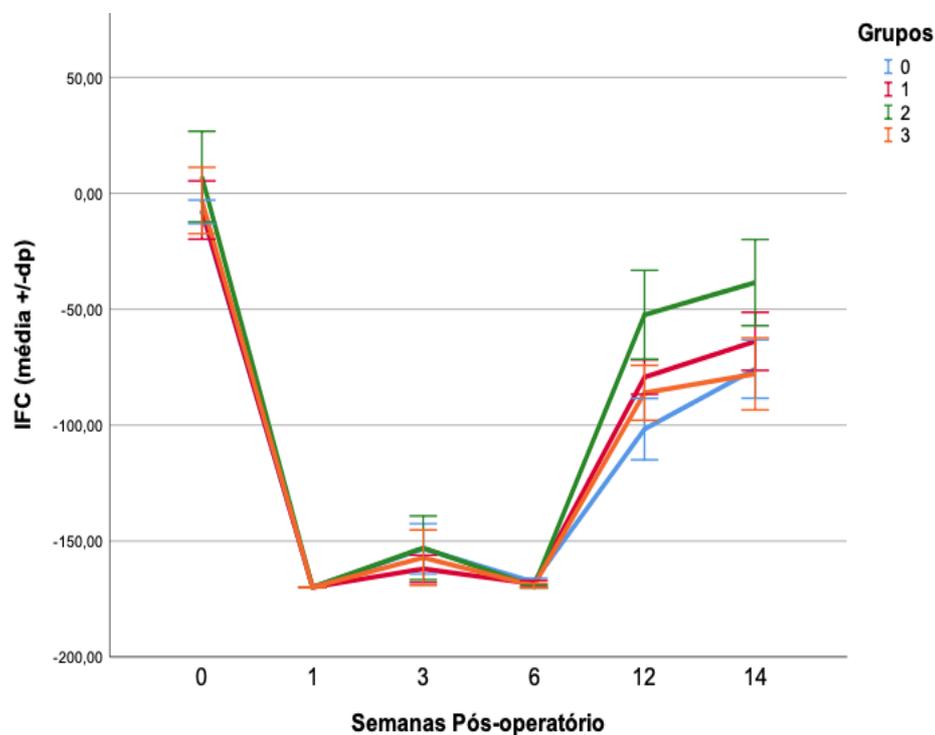
**Tabela 3** – Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 2 – Grupo preservado em Glicerol

<b>Ratos</b>	<b>Grupo</b>	<b>IFC_Pré</b>	<b>IFC_Pós1</b>	<b>IFC_Pós3</b>	<b>IFC_Pós6</b>	<b>IFC_Pós12</b>	<b>IFC_Pós14</b>
1	2	21,289	-169,900	-141,335	-169,900	-68,236	-46,677
2	2	22,587	-169,900	-125,105	-169,900	-37,254	-10,273
3	2	24,770	-169,900	-153,475	-169,900	-45,961	-43,163
4	2	29,821	-169,900	-169,900	-169,900	-66,027	-49,436
5	2	-15,637	-169,900	-163,334	-167,620	-71,095	-53,824
6	2	12,203	-169,900	-149,991	-169,900	-54,989	-45,736
7	2	-28,871	-169,900	-155,617	-169,900	-78,684	-67,318
8	2	-8,456	-169,900	-169,900	-169,900	-49,128	-28,453
9	2	0,616	-169,900	-156,761	-169,140	-16,913	-30,250
10	2	14,081	-169,900	-143,829	-169,900	-35,528	-9,911
média		13,142	-169,900	-154,546	-169,900	-52,058	-44,449
dp		19,548	0,000	13,770	0,734	19,175	18,586
erro padrão		6,182	0,000	4,355	0,232	6,064	5,877

**Tabela 4** – Resultados dos valores de IFC- Índice de Função Ciática do Grupo 3 – Grupo preservado em Solução de Detergentes

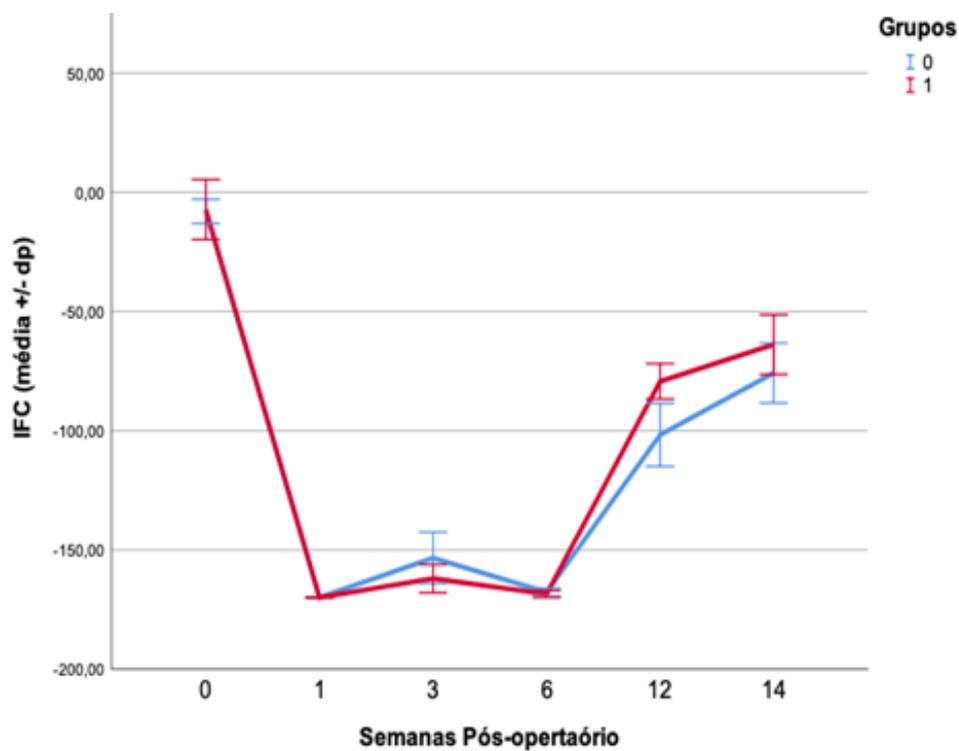
<b>Ratos</b>	<b>Grupo</b>	<b>IFC_Pré</b>	<b>IFC_Pós1</b>	<b>IFC_Pós3</b>	<b>IFC_Pós6</b>	<b>IFC_Pós12</b>	<b>IFC_Pós14</b>
1	3	9,983	-169,900	-162,719	-167,406	-68,192	-58,858
2	3	-16,325	-169,900	-169,900	-169,900	-93,522	-64,877
3	3	6,741	-169,900	-165,113	-168,238	-85,773	-73,877
4	3	25,507	-169,900	-148,000	-169,900	-81,298	-83,382
5	3	-15,355	-169,900	-141,335	-169,900	-102,524	-98,735
6	3	-0,317	-169,900	-169,900	-169,900	-85,034	-94,947
7	3	-20,591	-169,900	-136,574	-169,900	-86,389	-68,788
8	3	-12,736	-169,900	-166,070	-168,570	-67,134	-58,719
9	3	-7,234	-169,900	-159,945	-169,900	-89,710	-78,585
10	3	-0,449	-169,900	-151,835	-168,380	-100,917	-98,141
média		-3,841	-169,900	-161,332	-169,900	-86,081	-76,231
dp		14,306	0,000	11,983	0,952	11,842	15,507
erro padrão		4,524	0,000	3,789	0,301	3,745	4,904

**Gráfico 1 -** Índice de Função Ciática por avaliação realizada - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão)



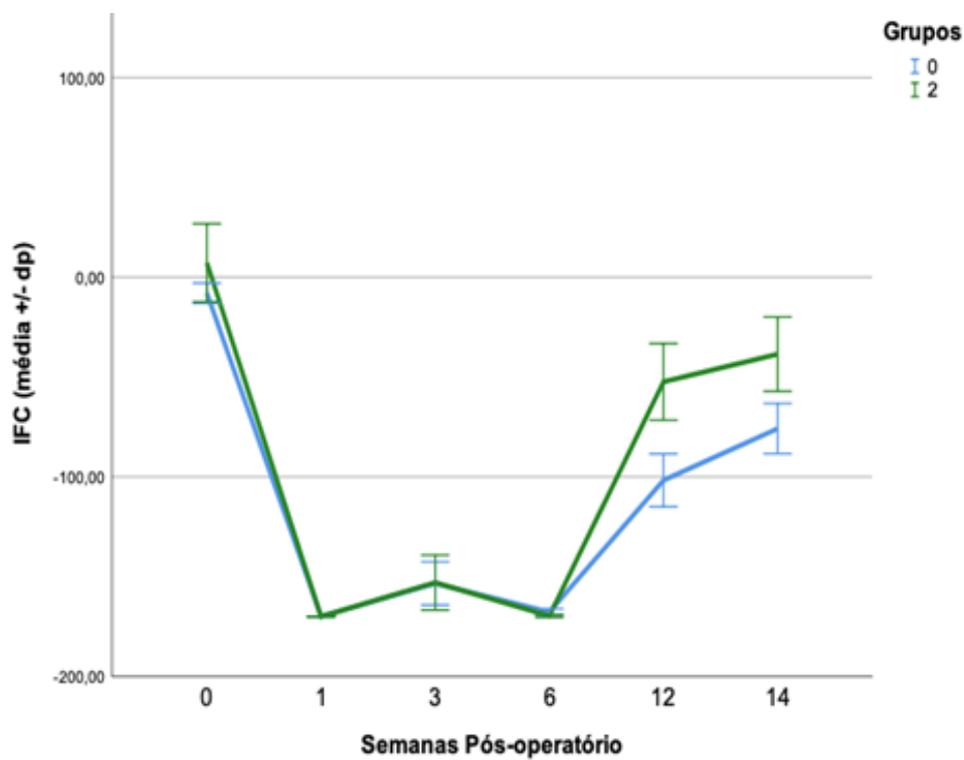
Todos os grupos modificaram seus resultados ao longo de cada momento do tempo que foram avaliados, o resultado foi apresentado em todas as comparações ( $p < 0,05$ ). Os grupos se mostram semelhantes em sua avaliação pré-operatória ( $p = 0,07$ ) e assim se mantiveram no pós-operatório imediato ( $p = 1,00$ ) e avaliação com 3 semanas ( $p = 0,241$ ). Já na sexta semana, houve diferença entre os grupos ( $p = 0,023$ ), que se manteve na décima segunda semana ( $p < 0,001$ ). Na décima quarta semana, os grupos tornam-se equivalentes ( $p = 0,265$ ).

**Gráfico 2** - Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 0 e 1 (média e desvio padrão)



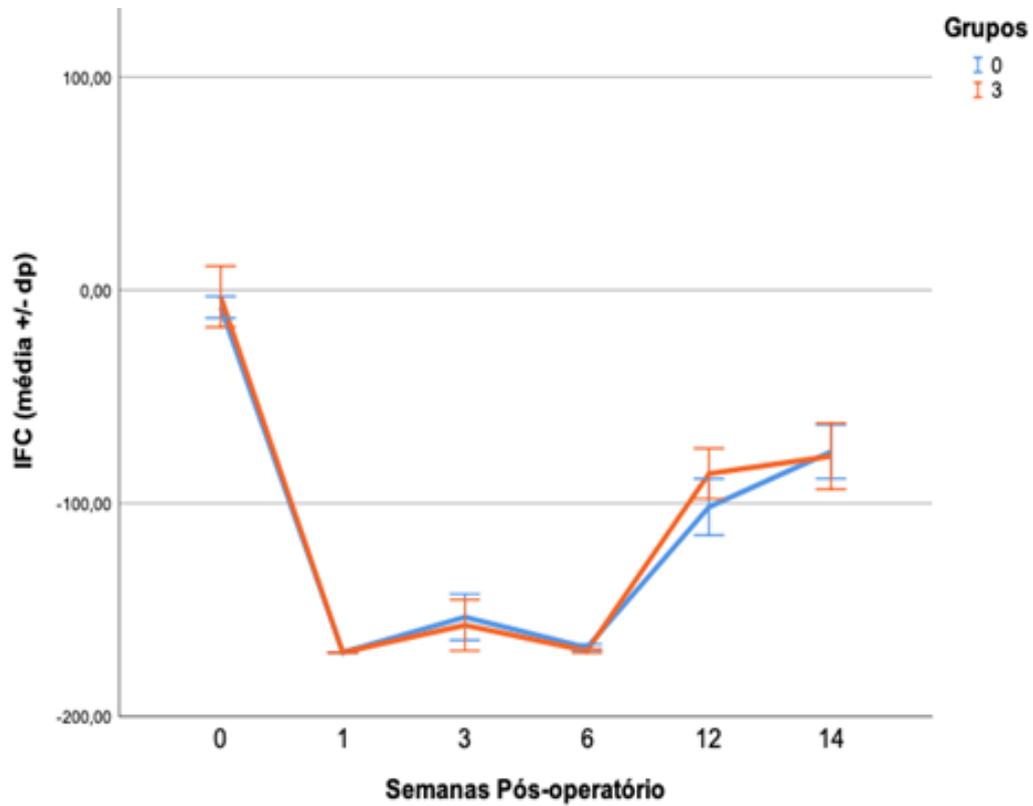
Na comparação entre o Grupo 0 (controle) e Grupo 1 (Celsior®) houve diferença na sexta semana ( $p=0,032$ ), mas não na décima segunda ( $p=0,086$ ).

**Gráfico 3** - Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 0 e 2 (média e desvio padrão)



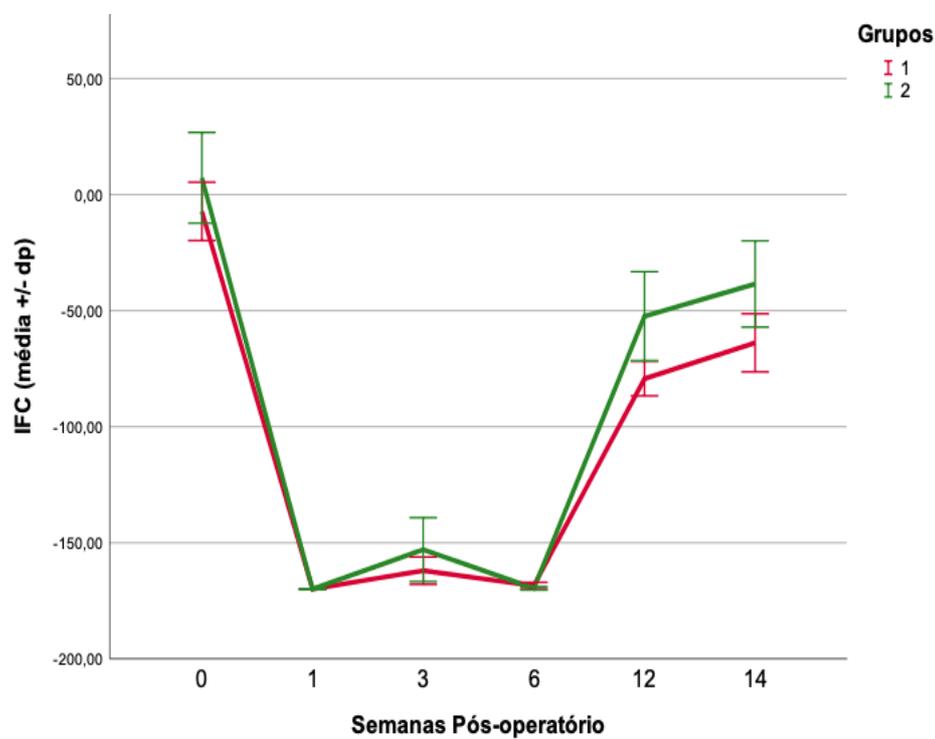
Na comparação entre o Grupo 0 (controle) e Grupo 2 (Glicerol) não houve diferença na sexta semana ( $p=0,231$ ), mas houve diferença na décima segunda ( $p=0,004$ ).

**Gráfico 4 -** Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 0 e 3 (média e desvio padrão)



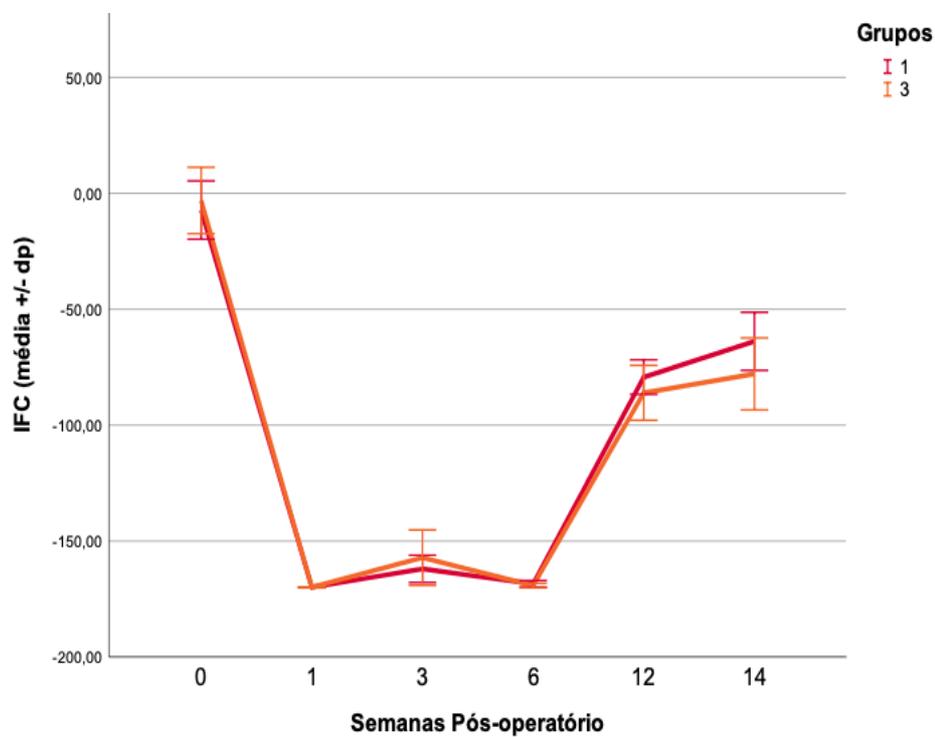
Na comparação entre o Grupo 0 (controle) e Grupo 3 (Detergentes) houve diferença na sexta semana ( $p=0,01$ ) e houve diferença na décima segunda ( $p=0,001$ ).

**Gráfico 5 -** Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 1 e 2 (média e desvio padrão)



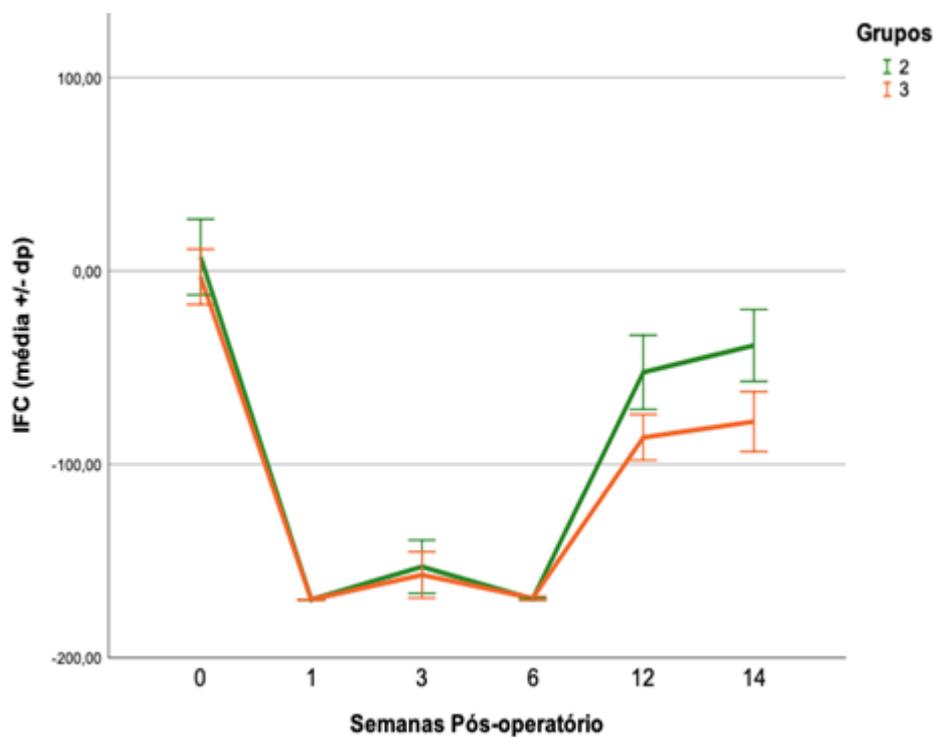
Na comparação entre o Grupo 1 (Celsior) e Grupo 2 (Glicerol) não houve diferença na sexta semana ( $p=0,05$ ) e não houve diferença na décima segunda ( $p=1,00$ ).

**Gráfico 6 -** Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 1 e 3 (média e desvio padrão)



Na comparação entre o Grupo 1 (Celsior) e Grupo 3 (Detergentes) não houve diferença na sexta semana ( $p=0,305$ ), mas houve diferença na décima segunda ( $p<0,001$ ).

**Gráfico 7** - Índice de Função Ciática por avaliação realizada nos grupos 2 e 3 (média e desvio padrão)



Na comparação entre o Grupo 2 (Glicerol) e Grupo 3 (Detergentes) não houve diferença na sexta semana ( $p=0,05$ ) e houve diferença na décima segunda ( $p=0,001$ ).

**4.2 Resultados das análises histomorfométricas dos grupos operados (Tabelas 5 a 8)**  
**(Gráficos 8 e 9)**

**Tabela 5 –** Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 0 – Grupo Controle

<b>Rato</b>	<b>Grupos_op</b>	<b>Diâmetro_op</b>	<b>Axônios_op</b>
1	Grupo Controle	10,673	103,000
2	Grupo Controle	13,950	84,000
3	Grupo Controle	7,929	101,000
4	Grupo Controle	9,264	123,000
5	Grupo Controle	9,977	106,000
6	Grupo Controle	10,362	125,000
7	Grupo Controle	9,425	104,000
8	Grupo Controle	9,983	106,000
9	Grupo Controle	7,439	104,000
10	Grupo Controle	9,896	118,000
média		9,936	105,000
dp		1,757	12,020
erro padrão		0,556	3,801

**Tabela 6** – Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 1 – Grupo preservado por resfriamento (solução Celsior®)

<b>Rato</b>	<b>Grupos_op</b>	<b>Diâmetro_op</b>	<b>Axônios_op</b>
1	Grupo Celsior® - OP	10,517	100,000
2	Grupo Celsior® - OP	13,643	98,000
3	Grupo Celsior® - OP	16,670	87,000
4	Grupo Celsior® - OP	13,260	95,000
5	Grupo Celsior® - OP	10,435	119,000
6	Grupo Celsior® - OP	9,969	98,000
7	Grupo Celsior® - OP	7,697	139,000
8	Grupo Celsior® - OP	8,638	129,000
9	Grupo Celsior® - OP	8,006	86,000
10	Grupo Celsior® - OP	13,517	89,000
média		10,476	98,000
dp		2,927	18,505
erro padrão		0,926	5,852

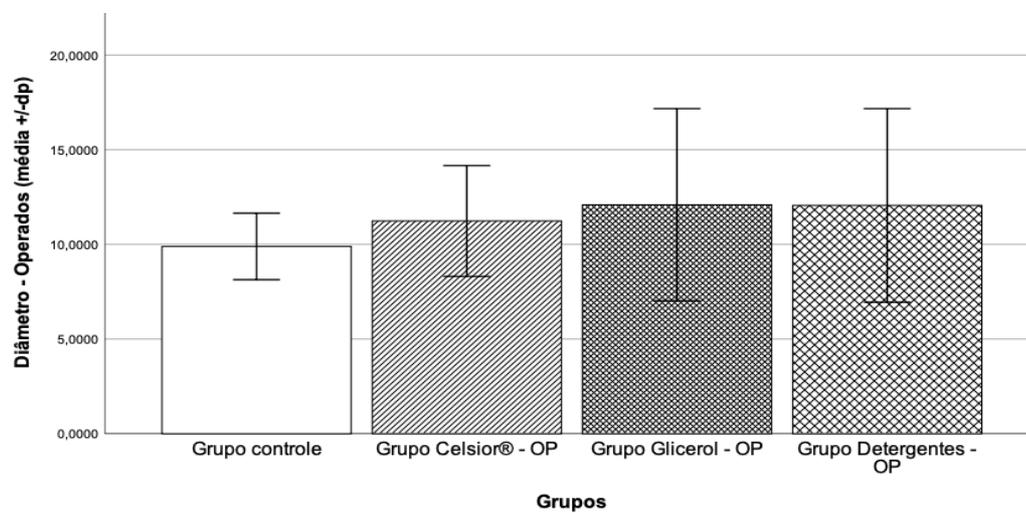
**Tabela 7** – Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 2 – Grupo preservado em glicerol

<b>Rato</b>	<b>Grupos_op</b>	<b>Diâmetro_op</b>	<b>Axônios_op</b>
1	Grupo Glicerol - OP	14,806	67,000
2	Grupo Glicerol - OP	7,383	138,000
3	Grupo Glicerol - OP	7,186	108,000
4	Grupo Glicerol - OP	8,197	124,000
5	Grupo Glicerol - OP	20,422	74,000
6	Grupo Glicerol - OP	18,947	83,000
7	Grupo Glicerol - OP	7,366	94,000
8	Grupo Glicerol - OP	10,703	105,000
9	Grupo Glicerol - OP	9,688	90,000
10	Grupo Glicerol - OP	16,210	113,000
média		10,196	99,500
dp		5,079	22,277
erro padrão		1,606	7,045

**Tabela 8** – Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo 3 – Grupo preservado em solução de detergentes

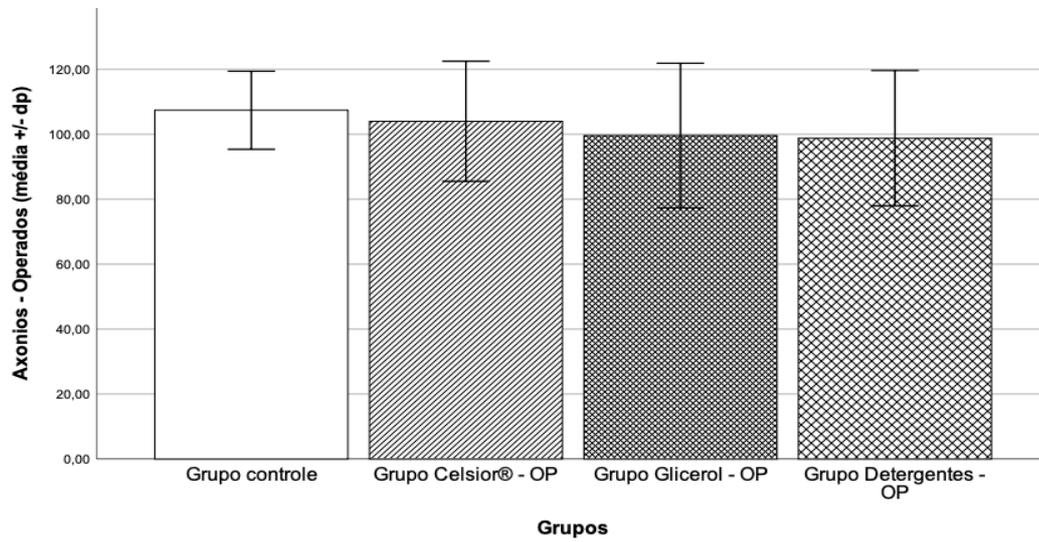
<b>Rato</b>	<b>Grupos_op</b>	<b>Diâmetro_op</b>	<b>Axônios_op</b>
1	Grupo Detergentes - OP	14,806	67,000
2	Grupo Detergentes - OP	7,057	130,000
3	Grupo Detergentes - OP	7,186	108,000
4	Grupo Detergentes - OP	8,197	74,000
5	Grupo Detergentes - OP	20,422	124,000
6	Grupo Detergentes - OP	18,947	83,000
7	Grupo Detergentes - OP	7,366	94,000
8	Grupo Detergentes - OP	10,703	105,000
9	Grupo Detergentes - OP	9,688	113,000
10	Grupo Detergentes - OP	16,210	90,000
média		10,196	99,500
dp		5,113	20,842
erro padrão		1,617	6,591

**Gráfico 8** – Diâmetro dos axônios nos grupos operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos 0, 1, 2 e 3



A avaliação do diâmetro dos axônios nos grupos operados mostra que não houve diferença entre os grupos ( $p=0,577$ ).

**Gráfico 9** – Número de axônios nos grupos operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos 0,1,2 e 3



A avaliação do número de axônios nos grupos operados mostra que não houve diferença entre os grupos ( $p=0,716$ ).

### 4.3 Resultados das análises histomorfométricas dos grupos não operados (somente tratados) (Tabela 9 a 11) (Gráficos 10 e 11)

**Tabela 9 –** Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo A – Grupo preservado por resfriamento (solução Celsior®)

<b>Enxerto</b>	<b>Grupos_tratados</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Axônios</b>
1	Grupo Celsior ®	14,120	62,000
2	Grupo Celsior ®	10,309	68,000
3	Grupo Celsior®	10,227	59,000
4	Grupo Celsior ®	11,439	73,000
5	Grupo Celsior ®	9,190	62,000
6	Grupo Celsior ®	25,653	46,000
7	Grupo Celsior ®	40,464	35,000
8	Grupo Celsior®	10,950	66,000
9	Grupo Celsior ®	12,053	76,000
10	Grupo Celsior ®	11,189	75,000
média		11,314	64,000
dp		9,947	13,045
erro padrão		3,145	4,125

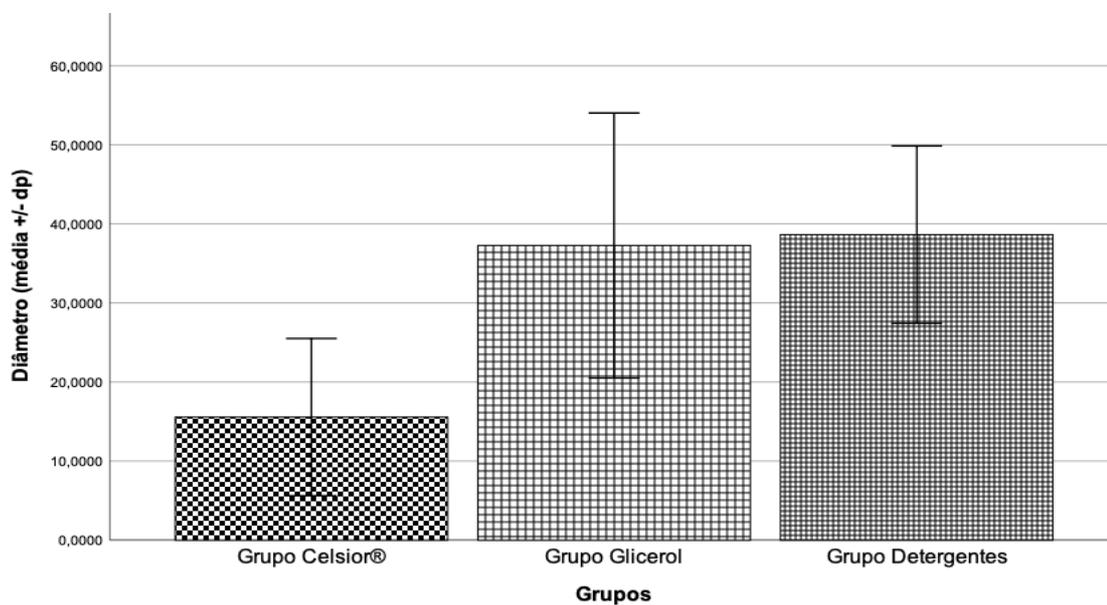
**Tabela 10** – Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo B – Grupo preservado em glicerol

<b>Enxerto</b>	<b>Grupos_tratados</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Axônios</b>
1	Grupo Glicerol	62,044	32,000
2	Grupo Glicerol	56,822	35,000
3	Grupo Glicerol	62,697	29,000
4	Grupo Glicerol	34,502	51,000
5	Grupo Glicerol	30,199	51,000
6	Grupo Glicerol	27,227	48,000
7	Grupo Glicerol	32,826	45,000
8	Grupo Glicerol	23,126	58,000
9	Grupo Glicerol	18,925	63,000
10	Grupo Glicerol	24,235	46,000
média		31,512	47,000
dp		16,758	11,023
erro padrão		5,299	3,486

**Tabela 11** – Resultados dos valores do número de axônios e diâmetro Grupo C – Grupo preservado em solução de detergentes

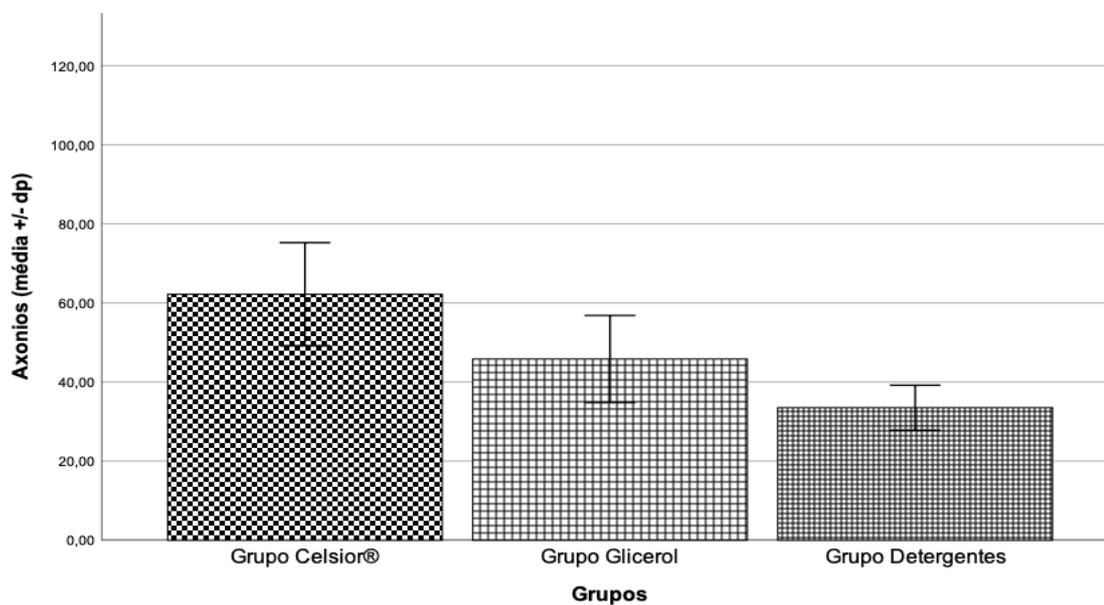
<b>Enxerto</b>	<b>Grupos_tratados</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Axônios</b>
1	Grupo Detergentes	44,110	36,000
2	Grupo Detergentes	43,312	35,000
3	Grupo Detergentes	44,135	27,000
4	Grupo Detergentes	39,966	31,000
5	Grupo Detergentes	40,485	36,000
6	Grupo Detergentes	31,023	32,000
7	Grupo Detergentes	46,511	30,000
8	Grupo Detergentes	15,328	39,000
9	Grupo Detergentes	27,093	44,000
10	Grupo Detergentes	54,425	25,000
média		41,899	33,500
dp		11,220	5,681
erro padrão		3,548	1,797

**Gráfico 10** – Diâmetro dos axônios nos grupos não operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos A, B e C



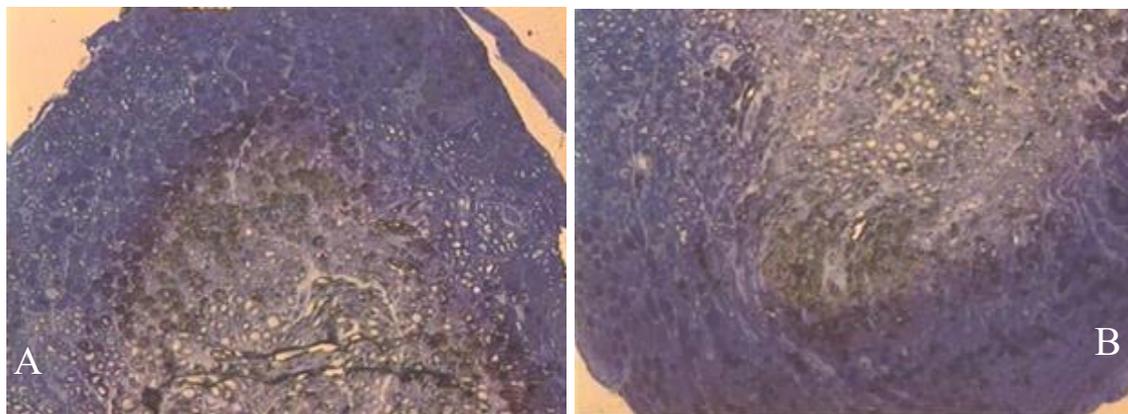
A avaliação do diâmetro dos axônios mostra que houve diferença entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Ao compararmos os grupos, existe diferença entre os grupos A e B ( $p = 0,002$ ). Existe diferença entre os grupos A e C ( $p = 0,001$ ). Porém, não há diferença entre os grupos B e C ( $p = 0,597$ ).

**Gráfico 11** – Número de axônios nos grupos operados - visão geral em todos os grupos (média e desvio padrão) – Grupos A, B e C

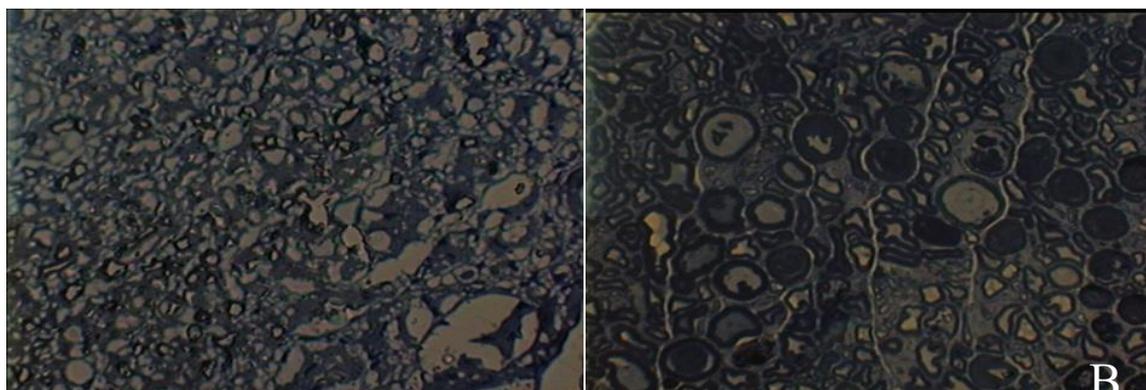


A avaliação do número de axônios mostra que houve diferença entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). Ao compararmos os grupos, existe diferença entre os grupos A e B ( $p = 0,01$ ). Existe diferença entre os grupos A e C ( $p < 0,001$ ). Porém, não há diferença entre os grupos B e C ( $p = 0,93$ ).

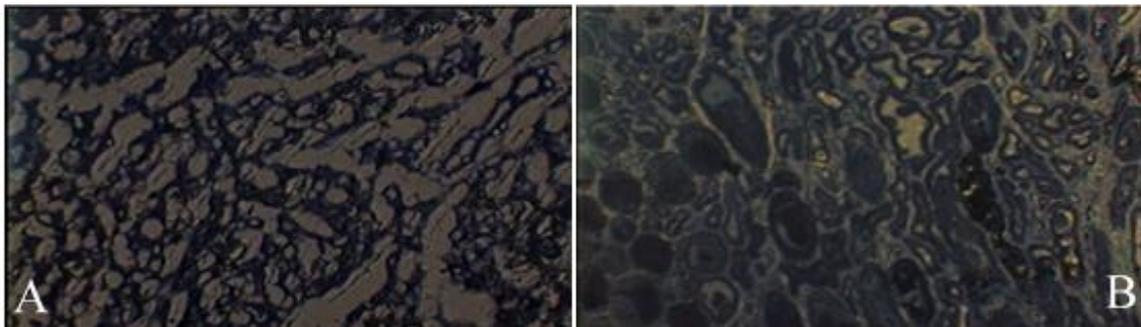
#### 4.4 Imagens representativas das análises histológicas



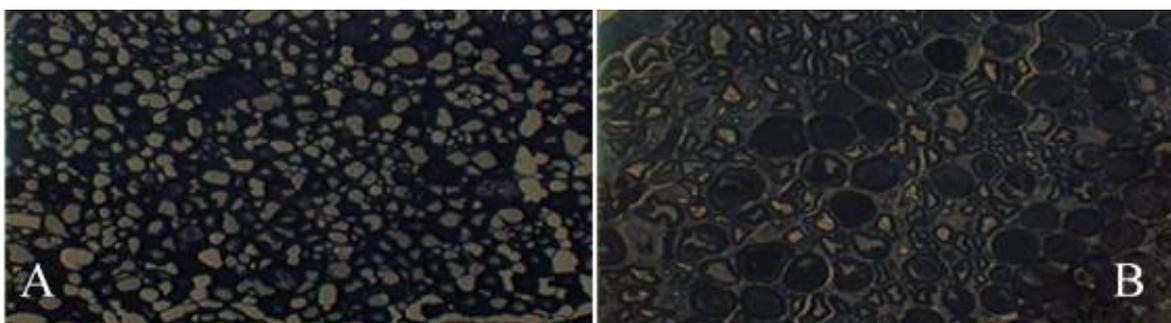
**Figura 12 -** A) Imagem histológica de um autoenxerto não operado, B) Autoenxerto após sua reinervação com 14 semanas (Grupo 0)



**Figura 13 -** A) Enxerto somente tratado (Grupo A) por resfriamento em solução Celsior®, B) Aspecto do nervo reinervado com aloenxerto preservado por resfriamento (Grupo 1)



**Figura 14 -** A) Enxerto somente tratado (Grupo B) com glicerol, B) Aspecto do nervo reinervado com aloenxerto preservado em glicerol (Grupo 2)



**Figura 15 -** A) Enxerto somente tratado (Grupo C) em solução de detergentes, B) Aspecto do nervo reinervado com aloenxerto preservado em solução de detergentes

## ***5. DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

É antigo e longo o interesse nos estudos da regeneração nervosa. Talvez por se tratar de uma lesão frequente e de resultados extremamente variáveis e ainda insatisfatórios, pois sua recuperação depende de inúmeros fatores.

Ainda hoje prevalecem os conceitos estabelecidos por Millesi que determinam a sutura primária e sem tensão como o tratamento de escolha. Mas uma sutura primária e sem tensão não é possível nas lesões segmentares.

Apesar da evolução das técnicas e dos inúmeros estudos experimentais e clínicos nas lesões com perdas mais extensas, nenhum tratamento conseguiu alcançar resultados plenamente satisfatórios. Mesmo a enxertia autóloga, que na perda segmentar é o tratamento de escolha, apresenta desvantagens próprias. Isso estimula a execução de pesquisas como esta, com o intuito de obter avanços em direção às melhores alternativas de preservação de aloenxertos de nervo. Inicialmente, de forma experimental, podendo abrir caminho para o posterior uso clínico.

As reconstruções com aloenxertos de nervo teriam a vantagem de minimizar sequelas de possíveis áreas doadoras, além da possibilidade de obter enxertos dos mais diversos calibres e comprimentos.

Os aloenxertos processados não devem induzir a resposta imune. A redução da imunogenicidade pode ser atingida eliminando os constituintes celulares levando a uma baixa ou ausência de reação<sup>49</sup>. A permanência de debris celulares também reduzem ou inibem a capacidade de regeneração nervosa por promoverem uma barreira cicatricial intraluminal.

O aprimoramento adicional da capacidade regenerativa do enxerto será obtido também pela preservação da matriz extracelular nativa. Sendo assim, o objetivo geral da

descelularização nervosa é remover todos os elementos celulares, exceto a lâmina basal, excluindo assim, qualquer imunogenicidade do tecido. Processos mais agressivos diminuirão a imunogenicidade, mas também alterarão as propriedades estruturais com a agressão à matriz extracelular.

O enxerto ideal será aquele que apresenta o equilíbrio entre a remoção dos restos celulares e a manutenção das propriedades estruturais<sup>89</sup>. Existem vários métodos para preparar enxertos de nervos acelulares a partir de tecido alogênico de nervo de doador, incluindo liofilização, preservação a frio, congelamento-descongelamento, processamento de detergentes e irradiação.

O presente estudo buscou comparar dois dos métodos mais populares no preparo do enxerto acelular, que são o resfriamento e o processamento com detergentes<sup>78</sup> e a preservação do enxerto com glicerol. O glicerol é o método de preservação de pele para uso de enxertos temporários no tratamento de queimaduras<sup>54-59</sup> amplamente usado em banco de tecidos.

O rato foi o animal escolhido como modelo experimental, por ser um animal de grande facilidade de obtenção, manipulação e manutenção, o que favorece estudos de longa duração<sup>90</sup>. Os ratos possuem também uma estrutura anatômica bastante favorável para estudos sobre regeneração nervosa<sup>83,91-94</sup>.

Muitos dos estudos realizados de regeneração nervosa e validação de métodos consagrados de avaliação como o *walking track* foram desenvolvidos em ratos<sup>95,82</sup>.

A linhagem Wistar é a espécie mais citada na literatura e utilizamos no número de 40 ratos por ser a quantidade mínima necessária para a obtenção de resultados válidos<sup>96</sup>.

O nervo ciático foi escolhido para o experimento em virtude de suas vantagens. É um nervo de fácil acesso, tem anatomia constante e de grande calibre, o que facilita a padronização do estudo e diminui a possibilidade de interferência nos resultados por conta

de fatores técnicos na neurografia. Além disso, o padrão de recuperação funcional da musculatura inervada pode ser avaliado de modo objetivo por meio de testes específicos e consagrados, como o índice de função ciática (IFC). Também foi considerado que a maioria dos trabalhos de regeneração nervosa em ratos, foi feita utilizando-se o nervo ciático<sup>91-93, 83,84</sup>.

Optamos pelo acompanhamento por 14 semanas seguindo a tendência dos trabalhos mais recentes<sup>97</sup>. Esse aumento no tempo de observação deve-se ao fato de que, nas fases iniciais da regeneração, são gerados muitos brotos, mas somente permanecerão viáveis as fibras axonais que efetivamente reinervarem o órgão alvo; já as fibras que falharam na reinervação tendem a desaparecer<sup>17,19</sup>. Sendo assim, com 14 semanas, podemos ter uma avaliação funcional mais tardia e consolidada.

O tempo de 14 semanas de observação pós-operatória para avaliação histológica do fragmento distal de nervo ciático também se mostra mais adequado. **Ahmed et al.**<sup>98</sup> (2015) relatam que, após 6 semanas, havia poucas fibras nervosas regeneradas no coto distal do nervo ciático em ratos em modelo de 10 mm de lesão e que, após 12 semanas, sua presença era facilmente verificada. Nesse estudo, **Ahmed et al.**<sup>98</sup> usaram uma veia como conduto.

Na análise histomorfométrica optamos pela contagem do número total de fibras axonais nos cortes transversos distais à sutura, além da medida do diâmetro das fibras mielinizadas seguindo autores como **Hayashi et al.**<sup>99</sup> (2004) e **Salles et al.**<sup>94</sup> (2013).

Em relação aos métodos de preparo dos aloenxertos, no protocolo de resfriamento, a solução Celsior® foi escolhida como conservante. Esta é a solução recomendada pela Associação Brasileira de Transplantes de órgãos - ABTO em suas Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos (2009) como meio de preservação de

tecidos inervados como o miocárdio ou em procedimentos de retirada de múltiplos órgãos.

A solução Celsior® foi desenvolvida com o intuito de combinar os princípios gerais da preservação de tecidos a frio com os princípios específicos do metabolismo de tecidos ricamente inervados, como o miocárdio, sendo capaz de limitar o edema que se desenvolve após a isquemia a frio, graças às suas propriedades físicas (pressão osmótica), e capaz de evitar lesão tecidual mediada por radicais livres, graças à sua composição química. Contém em sua fórmula muitos componentes com função de proteção celular como o ácido lactobiônico, que tem ação protetora contra radicais livres produzidos pelas células, a glutadiona, que protege a viabilidade celular ao participar de várias reações intracelulares, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo do peróxido de hidrogênio e os lipoperóxidos, o íon potássio, que apresenta ação osmótica e reduz o edema tissular, e o íon magnésio, que age como inibidor de enzimas líticas e protege a membrana basal nas células<sup>100,101</sup>.

Pesquisas utilizando fórmulas contendo algumas substâncias similares às do referido produto atestaram a eficácia de seus componentes químicos na preservação de enxertos de nervos a frio<sup>77,102</sup>. Estudos comparando a solução Celsior® com as soluções de Collins® e de Wisconsin® comprovaram a superioridade da primeira sobre as demais<sup>101,103</sup>. Por tais motivos, considerou-se a solução Celsior® como a mais adequada para utilização nesta pesquisa.

Escolheu-se 14 dias como duração da conservação a frio do enxerto neste estudo por ser este o tempo mínimo necessário, em possíveis situações clínicas, para realização de testes sorológicos (HIV, Hepatites A, B e C, HTLV-1 e 2, Sífilis, Chagas, Toxoplasmose e Citomegalovírus além dos testes de evidênciação de ácido desoxiribonucleico para HIV e HCV) e microbiológicos (incluindo culturas para

microrganismos, bactérias e fungos) do doador do enxerto<sup>104</sup>. Além disso, em **2017**, **Mesquita** compara a preservação do aloenxerto conservado a frio por 14 dias e por 50 dias, não mostrando diferença nos dois grupos<sup>105</sup>.

No tratamento com detergentes escolheu-se o protocolo idealizado por **Hudson et al.**<sup>53</sup> (**2004**) por ter-se mostrado eficiente na preservação da matriz extracelular e de níveis equivalentes de descclularização em comparação com técnicas previamente descritas de processamento químico<sup>45,53</sup>. O processo de descclularização mostra-se eficaz inclusive quando comparado ao Avance® (AxoGen, Inc., Alachua, Florida), único aloenxerto de nervo processado liberado para uso clínico no mercado americano.

Neste estudo comparamos a regeneração dos aloenxertos de nervo preservados em detergentes e resfriados aos aloenxertos preservados em glicerol.

O glicerol se apresentaria como um método de preservação mais barato que as soluções utilizadas na preservação a frio e detergentes e mais simples no seu manejo, já que não seriam necessários mais do que 7 dias de preservação e nem manejos complementares<sup>71,72</sup>.

Comparou-se também a eficácia dos métodos de preservação em criar um ambiente sem debris celulares e com a manutenção da matriz extracelular. A presença de debris celulares, além de estimular reações autoimunes, também inibem a capacidade regenerativa do nervo, pois formaria um bloqueio oclusivo intraluminal<sup>89</sup>.

As avaliações funcionais foram feitas através da análise das pegadas impressas pelas patas posteriores dos animais (*walking track analysis*) e posterior cálculo do índice de função ciática. Ao avaliarmos individualmente os valores do IFC de cada grupo operado (Grupo 0 a 3) durante as semanas de avaliação, observamos que todos os grupos modificaram seus resultados ao longo de cada momento do tempo que foram avaliados em todas as comparações (**Tabelas 1 a 4**), ou seja, a avaliação no pós-operatório foi

diferente em relação à avaliação pré-operatória, a avaliação com três semanas foi diferente em relação ao pós-operatório e assim por diante até a última avaliação com 14 semanas ( $p < 0,05$ ).

Ao compararmos os grupos operados ao longo das semanas, na avaliação pré-operatória não houve diferença entre os grupos ( $p=0,07$ ), mostrando assim uma homogeneidade entre os grupos. Na primeira avaliação após a cirurgia, observamos que em todos os grupos, índices de função ciática amplamente negativos, mostrando uma completa disfunção e nenhuma diferença entre eles ( $p=1,00$ ), comprovando assim a denervação efetiva em todos os grupos.

Na avaliação após três semanas de pós-operatório, observamos uma manutenção da semelhança entre os grupos ( $p=0,241$ ), mostrando ainda uma ausência de regeneração nervosa em todos eles. Já na sexta semana, as avaliações mostram diferenças entre os grupos ( $p=0,023$ ). Quando foi feita a comparação entre os pares de grupos, observamos uma diferença entre o grupo controle e detergentes ( $p=0,01$ ) e o grupo controle e resfriamento ( $p=0,032$ ) e uma pior resposta do IFC no grupo controle (enxerto autólogo) em relação a esses dois grupos. Não houve diferença entre o controle e o grupo glicerol ( $p=0,231$ ). Talvez isso possa ser explicado pela maior presença de remanescentes celulares no enxerto autólogo que devem ser reabsorvidos antes do processo de regeneração. Na avaliação com doze semanas, quando comparados, o grupo controle ainda se mantém diferente dos demais. Quando comparados os grupos em pares, o grupo glicerol já se mostra semelhante ao grupo resfriamento ( $p=1,00$ ), porém ainda diferente do grupo detergentes ( $p=0,001$ ). Apesar disso, após a décima quarta semana os quatro grupos já se equilibram e tornam-se semelhantes ( $p=0,265$ ), nesse momento todos os quatro grupos mostram-se com IFC próximos a zero, confirmando assim a eficiência em promover a regeneração nervosa.

Em relação às análises histomorfométricas, buscamos demonstrar a reinervação em cada grupo na última avaliação feita nos animais, na décima quarta semana. Para tanto, determinamos a quantidade de axônios mielinizados existentes em um corte a 3mm distal ao local da neurografia, evitando assim, possíveis áreas de fibrose da região da sutura. Essa avaliação mostraria a viabilidade e função celulares e representaria a capacidade de regeneração daquele nervo.

Avaliamos também o diâmetro das fibras nervosas para analisar as alterações estruturais ocorridas no axônio, incluindo a espessura da bainha e a quantidade de colágeno e mielina intracelulares, já que os brotos neurais que conseguem reinervar o órgão alvo e, conseqüentemente, voltam a conduzir impulsos nervosos vão recebendo camadas de mielina depositadas pelas células de Schwann e gradativamente vão aumentando e restaurando o diâmetro das fibras<sup>18,36</sup>. Assim, a avaliação do diâmetro das fibras também é justificada e se torna um fator importante de avaliação histológica.

Nas avaliações histomorfométricas, tanto na contagem de fibras mielinizadas (**Gráfico 9**) quanto o diâmetro de suas fibras (**Gráfico 8**), os quatro grupos foram equivalentes, mostrando uma eficácia similar na regeneração nervosa ( $p=0,716$  e  $p=0,577$ , respectivamente).

Um objetivo secundário de nosso trabalho foi, além de comparar a eficácia da regeneração nervosa dos três tratamentos, avaliar se esses tratamentos são efetivos em retirar todos os debrís celulares, mantendo assim somente a matriz extracelular e tornando o enxerto verdadeiramente acelular.

Para isso foram retirados enxertos de nervos e preservados nos três métodos aqui estudados: resfriamento, glicerol e solução de detergentes, respectivamente denominados de Grupos A, B e C.

Foi feita a mesma avaliação histomorfométrica dos grupos operados. O objetivo era avaliar a estrutura microscópica dos nervos e se os meios de preservação realmente eliminavam os debrís celulares e, conseqüentemente, favoreceriam uma regeneração mais efetiva com uma menor resposta imunológica.

O método de avaliação não tinha o objetivo de qualificar células ou proteínas, já que para isso seriam necessários avaliações imuno-histoquímicas, a quantificação de DNA, ensaios de hidroxiprolina, eletroforese de proteínas em 2 dimensões entre outras<sup>106</sup>.

Ao compararmos os grupos, todos mostraram redução no número de axônios e também em seus diâmetros, porém nenhum deles efetivamente eliminou todos os debrís celulares (**Tabelas 9, 10 e 11**). Quando comparados os grupos entre si, os grupos preservados em glicerol e em solução de detergentes foram similares entre si e ambos melhores que o grupo resfriado (**Gráficos 10 e 11**).

Ao analisarmos os resultados obtidos neste estudo e compará-los, quando possível, com a literatura indexada, acreditamos que a preservação em glicerol do aloenxerto de nervo pode ser uma ferramenta útil nos possíveis tratamentos de lesões segmentares, já que apresenta resultados similares aos dois métodos de preservação mais estudados na análise funcional e possivelmente um melhor resultado na diminuição de debrís celulares que o grupo preservado a frio.

Nosso estudo pode receber críticas especialmente por ser um estudo experimental em ratos.

Apesar de quase a totalidade dos estudos na academia serem feitos em ratos, este é um modelo particularmente ruim para a reparação de defeitos humanos críticos, devido ao seu pequeno tamanho e ao seu perfil regenerativo neurobiológico específico da espécie. A transferência dos modelos experimentais para a prática clínica em humanos mostrou-se pouco confiável para a regeneração nervosa, como em muitas outras

aplicações. Por último, como a maioria dos dados de regeneração nervosa que são gerados em modelos experimentais, isso distorce os resultados do tratamento e leva a uma avaliação inadequada dos riscos e benefícios na prática clínica<sup>107</sup>.

Outra crítica seria em relação ao método de avaliação funcional. Apesar da análise das pegadas impressas pelas patas posteriores (*walking track analysis*) ser extremamente empregada, é uma avaliação bastante trabalhosa. Como o método de obtenção dos parâmetros das impressões das pegadas é manual, estas podem sofrer algum borramento, dependendo assim da subjetividade do avaliador.

Os métodos histomorfométricos que avaliam a quantidade de axônios regenerados e a área e diâmetro das fibras também são passíveis de crítica já que são pontuais tanto no tempo do processo regenerativo, quanto no segmento de nervo analisado e podem não expressar a real regeneração nervosa, já que as fibras regeneradas podem não apresentar resultados funcionais adequados. São inúmeras as possibilidades de caminho da fibra nervosa, os axônios podem seguir caminhos impróprios, podem ocorrer reinervação muscular aberrante, presença de fibras musculares polineuronamente inervadas, músculos antagonistas mais intensamente reinervados ou aferentes sensoriais que eventualmente alcançaram territórios inadequados, entre outras possibilidades.

Portanto, para decisão correta sobre o método adequado de avaliação em determinado estudo, é fundamental que se considere qual o estágio da regeneração do nervo deverá ser analisado e por isso é válida a avaliação funcional concomitante.

Apesar das possíveis críticas, ficou evidente a evolução satisfatória na regeneração nervosa dos aloenxertos preservados em glicerol. Talvez a combinação desse método de preservação a outros possa, no futuro, melhorar a qualidade desses enxertos na busca de uma maior diminuição de debris celulares e uma maior segurança na prática clínica.

## ***6. CONCLUSÕES***

## **6 CONCLUSÕES**

A preservação do enxerto de nervo em glicerol permitiu resultados funcionais e uma regeneração nervosa com número de fibras nervosas e diâmetros das fibras mielinizadas similares ao autoenxerto e aos enxertos preservados em solução de detergentes e por resfriamento.

Quando avaliada a presença de debris celulares após o tratamento com glicerol, ele foi similar ao tratamento com detergentes e significativamente melhor ao preservado por resfriamento.

## **7. ANEXOS**

## 7 ANEXOS

**Anexo A** – Documento de aprovação do projeto na Comissão Científica do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

12/01/2016

PROTÓCOLO PARA INSCRIÇÃO NA CEUA

**CEUA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais

**MEDICINA**  
USP

PROTÓCOLO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO E / OU PESQUISA

**FINALIDADE:** Pesquisa      **Início:** 25-01-2016      **Término:** 17-12-2018

**TÍTULO DO PROJETO / AULA PRÁTICA / TREINAMENTO**  
Avaliação da utilização do aloenxerto acellular na regeneração nervosa: estudo experimental em ratos

**PESQUISADOR EXECUTANTE**  
**Nome:** João Carlos Nakamoto  
**Email:** joao@institutovita.com.br    **Fone:** 26616909  
**Instituição:** FMUSP  
**Unidade:** Cirurgia Plástica  
**Departamento/Disciplina:** 2

**TERMO DE RESPONSABILIDADE (LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)**

Eu, **João Carlos Nakamoto**, autor do projeto, certifico que:

A. Li o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;

B. Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;

C. Não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

**TERMO DE ACEITAÇÃO**

**Pesquisador Executante**

*João Carlos Nakamoto*  
Assinatura: João Carlos Nakamoto  
São Paulo, 12 de Janeiro de 2016

**Pesquisador Responsável / Orientador**

Prof. Dr. José Carlos M. Faria  
CRM 65.475  
Cirurgia Plástica / Microcirurgia  
Assinatura: José Carlos Marques de Faria

**Conselho do Departamento**  
FMUSP  
Cirurgia Plástica  
2

Aprovado "Ad referendum" do Conselho do Departamento de Cirurgia em  
*Miguel Srouf*  
Prof. Miguel Srouf  
Chefe do Departamento de Cirurgia

Prof. Dr. Miguel Srouf  
Assinatura e carimbo da chefia  
Data: 12/01/2016

**Comissão Científica**

Assinatura e carimbo da chefia  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Recebido por: *Vania*  
Em: 20/01/16  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Faculdade de Medicina USP

**IMPORTANTE**

- Recolha as assinaturas, carimbos e encaminhe 1 via para a Administração da CEUA.
- A critério da CEUA, poderá ser solicitado o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses.
- Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

[http://bioterio.fm.usp.br/nd\\_concea.php?mod=proto&id\\_con=570](http://bioterio.fm.usp.br/nd_concea.php?mod=proto&id_con=570)

1

## Anexo B – Documento de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da utilização do aloenxerto acelar na regeneração nervosa: estudo experimental em ratos**”, protocolo nº **001/16** sob a responsabilidade de **José Carlos Marques de Faria** e **João Carlos Nakamoto**, apresentado pelo Departamento de Cirurgia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado “Ad Referendum” pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 20.01.2016

Vigência do Projeto	Janeiro/2017
Espécie/linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	<b>40</b>
Peso/Idade	5 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 20 de Janeiro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP  
e-mail: [ceua.fm@usp.br](mailto:ceua.fm@usp.br)

**Anexo C** – Documento de aprovação do Fornecimento de animais da Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CENTRO DE BIOTERISMO FMUSP - CEP-FMUSP

<http://www.biot.fm.usp.br/balcao/impr.php?id=1284>

**DIRETORIA TÉCNICA**  
DE APOIO AO ENSINO E PESQUISA  
**CENTRO DE BIOTERISMO**



**SOLICITAÇÃO PARA FORNECIMENTO DE ANIMAIS**  
Consulta para avaliação e aprovação

A DTAEP – Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, AVALIOU e APROVOU na data de 21-01-2016 o pedido para fornecimento dos animais solicitados pelo pesquisador conforme informações apresentadas como segue:

Título do projeto: **Avaliação da utilização do aloenxerto celular na regeneração nervosa: e estudo experimental em ratos**

Responsável: **José Carlos Marques de Faria**

Executante: **JOÃO CARLOS NAKAMOTO**

Modelo Biológico: **RATO**

Linhagem: **RDE - Webster**

Sexo: **Macho**

Peso: **-**

Idade: **5 semanas**

Quantidade de animais: **10**

Frequência de retirada: **a cada 7 dias**

Total de animais: **40**

Cabe ao pesquisador apresentar ao Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP solicitação de aprovação para este projeto.

Após aprovação do CEP FMUSP o fornecimento dos animais referente a esta consulta poderá ser realizado conforme os critérios formais apresentados pela DTAEP.

São Paulo, 22 de Janeiro de 2016

Documento aprovado. Não requer assinatura.

DTAEP FMUSP

**Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa**  
Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455 – Cerqueira César – São Paulo – SP  
Fone: 3061-7196

## **8. REFERÊNCIAS**

**8 REFERÊNCIAS**

1. Isaacs J, Browne T. Overcoming short gaps in peripheral nerve repair: conduits and human acellular nerve allograft. *Hand (NY)*. 2014;9(2):131-7.
2. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008;87(5):381-5.
3. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83:160-7.
4. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(23):2144-51.
5. Toth C. Peripheral nerve injuries attributable to sport and recreation. *Neurol Clin*. 2008;26(1):89-113.
6. Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos Trans R Soc London*. 1850;140:423-9.
7. Barbara JG, Clarac F. Historical concepts on the relations between nerves and muscles. *Brain Res*. 2011;1409:3-22.

8. Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 1988;82(5):849-56.
9. Wong BJ, Crumley RL. Nerve wound healing: an overview. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995;28(5):881-95.
10. Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(10):1309-19.
11. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998;18(7):397-405.
12. Zhou FQ, Walzer M, Wu YH, Zhou J, Dedhar S, Snider WD. Neurotrophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 13):2787-96.
13. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:209-33.
14. Bunge MB, Bunge RP, Kleitman N, Dean AC. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev Neurosci.* 1989;11(4-5):348-60.
15. Glass JD, Culver DG, Levey AI, Nash NR. Very early activation of m-calpain in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J Neurol Sci.* 2002;196(1-2):9-20.

16. Krystosek A, Seeds NW. Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science*. 1981;213(4515):1532-4.
17. Cragg BG, Thomas PK. The conduction velocity of regenerated peripheral nerve fibres. *J Physiol*. 1964;171:164-75.
18. Lundborg G. Nerve regeneration and repair: a review. *Acta Orthop Scand*. 1987;58(2):145-69.
19. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 1990;13:43-60.
20. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*. 1996;25(2):101-21.
21. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol*. 2003;27(3):277-324.
22. Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1972.
23. Sunderland S. *Nerve and nerve injuries*. 2a ed. New york: Churchill Livingstone; 1978.

24. Millesi H, Meissl G. Consequences of tension at the suture site. In: Gorio A, Millesi H, Mingrino S, eds. *Post-traumatic peripheral nerve regeneration*. New York: Raven Press; 1981:277.
25. Millesi H. Forty-two years of peripheral nerve surgery. *Microsurgery*. 1993;14(4):228-33.
26. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg*. 1975;56(2):166-70.
27. Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery*. 1994;15(3):176-8.
28. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2000;25(3):391-414.
29. Streppel M, Azzolin N, Dohm S, Guntinas-Lichius O, Haas C, Grothe C, Wevers A, Neiss WF, Angelov DN. Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factors reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion. *Eur J Neurosci*. 2002;15(8):1327-42.
30. Jewett DLH, McCarrol R. *Nerve regeneration and repair. Its clinical and experimental basis*. St Louis: Mosby Company; 1980.

31. Staniforth P, Fisher TR. *The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting*. *Hand*. 1978;10(2):187-90.
32. Rappaport WD, Valente J, Hunter GC, Rance NE, Lick S, Lewis T, Neal D. *Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy*. *Am J Surg*. 1993;166(3):252-6.
33. Colen KL, Choi M, Chiu DT. *Nerve grafts and conduits*. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(6 Suppl):e386-94.
34. Chiu DT, Strauch B. *A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less*. *Plast Reconstr Surg*. 1990;86(5):928-34.
35. Mackinnon SE. *Surgical management of the peripheral nerve gap*. *Clin Plast Surg*. 1989;16(3):587-603.
36. Sanders FK, Young JZ. *The degeneration and re-innervation of grafted nerves*. *J Anat*. 1942;76(Pt 2):143-166.
37. Evans PJ, Midha R, Mackinnon SE. *The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology*. *Prog Neurobiol*. 1994;43(3):187-233.
38. Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JA, Hunter DA. *The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A*. *Plast Reconstr Surg*. 1988;82(6):1052-66.

39. Strasberg SR, Hertl MC, Mackinnon SE, Lee CK, Watanabe O, Tarasidis G, Hunter DA, Wong PY. Peripheral nerve allograft preservation improves regeneration and decreases systemic cyclosporin A requirements. *Exp Neurol*. 1996;139(2):306-16.
40. Midha R, Mackinnon SE, Evans PJ, Best TJ, Hare GM, Hunter DA, Falk-Wade JA. Comparison of regeneration across nerve allografts with temporary or continuous cyclosporin A immunosuppression. *J Neurosurg*. 1993;78(1):90-100.
41. Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung TH, Mendez AB, Hunter DA, Mackinnon SE. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery*. 2008;28(4):265-72.
42. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107(6):1419-29.
43. Mackinnon SE, Novak CB. Nerve transfers. New options for reconstruction following nerve injury. *Hand Clin*. 1999 Nov;15(4):643-66.
44. Porayko MK, Textor SC, Krom RA, Hay JE, Gores GJ, Richards TM, Crotty PH, Beaver SJ, Steers JL, Wiesner RH. Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK-506 and cyclosporine regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Proc*. 1994;69(2):105-11.
45. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*. 2004;10(9-10):1346-58.

46. Myckatyn TM, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res.* 2004;26(2):124-38.
47. Hiles RW. Freeze dried irradiated nerve homograft: a preliminary report. *Hand.* 1972;4(1):79-84.
48. Johnson PC, Duhamel RC, Meezan E, Brendel K. Preparation of cell-free extracellular matrix from human peripheral nerve. *Muscle Nerve.* 1982;5(4):335-44.
49. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res.* 1998;795(1-2):44-54.
50. Atchabahian A, Mackinnon SE, Hunter DA. Cold preservation of nerve grafts decreases expression of ICAM-1 and class II MHC antigens. *J Reconstr Microsurg.* 1999;15(4):307-11.
51. Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, Hunter DA, Midha R. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve.* 1995;18(10):1128-38.
52. Evans PJ, Mackinnon SE, Levi AD, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, Midha R. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve.* 1998;21(11):1507-22.

53. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, Schmidt CE. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10(11-12):1641-51.
54. Granger HJ. Physicochemical properties of the extracellular matrix. In: Hargens A.R. (ed.), *Tissue Fluid Pressure and Composition*, Williams & Wilkins Waverly Press Inc., Baltimore, 43–61, 1981.
55. Friedmann P.S. The skin as a permeability barrier. In: Thody A.J, Friedmann P.S. (eds). *Scientific basis of Dermatology*. New York: Churchill Livingstone; 1986.
56. Doughty MJ, Aakre BM, Patel S. Hydration (water binding) of the mammalian corneal stroma ex vivo and vitro: sample mass and error considerations. *Optom Vis Sci.* 1996;73(10):666-75.
57. Hansbrough JD. *Wound coverage with biologic dressings and cultured skin substitutes*. Austin: R.G. Landes Company, 1992; p. 1-8.
58. Ghosh MM, Boyce S, Layton C, Freedlander E, Mac Neil S. A comparison of methodologies for the preparation of human epidermal-dermal composites. *Ann Plast Surg.* 1997;39(4):390-404.

59. Farrington M, Wreghitt T, Matthews I, Scarr D, Sutehall G, Hunt CJ, Santiago T, Gruys E, Voorhout W, Ramos T, Pegg DE. Processing of cardiac valve allografts: 2. Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties. *Cell Tissue Bank*. 2002;3(2):91-103.
60. Meek CP. Extensive severe burn treated with enzymatic debridement and microdermagrafting: case report. *Am Surg*. 1963;29:61-4.
61. Hermans MH. Clinical experience with glycerol-preserved donor skin treatment in partial thickness burns. *Burns Incl Therm Inj*. 1989;15(1):57-9.
62. Kreis RW, Vloemans AF, Hoekstra MJ, Mackie DP, Hermans RP. The use of non-viable glycerol-preserved cadaver skin combined with widely expanded autografts in the treatment of extensive third-degree burns. *J Trauma*. 1989;29(1):51-4.
63. Kreis RW, Mackie DP, Vloemans AW, Hermans RP, Hoekstra MJ. Widely expanded postage stamp skin grafts using a modified Meek technique in combination with an allograft overlay. *Burns*. 1993;19(2):142-5.
64. Schiozer WA, Hartinger A, von Donnersmarck GH, Mühlbauer W. Composite grafts of autogenic cultured epidermis and glycerol-preserved allogeneic dermis for definitive coverage of full thickness burn wounds: case reports. *Burns*. 1994;20(6):503-7.

65. Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EW. Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. *Burns*. 1996;22(2):113-6.
66. Richters CD, Mayen I, Havenith CE, Beelen RH, Kamperdijk EW. Rat monocyte-derived dendritic cells function and migrate in the same way as isolated tissue dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2002;71(4):582-7.
67. van Baare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, du Pont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns*. 1994;20 Suppl 1:S77-80.
68. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995;21(5):356-61.
69. van Baare J, Ligtvoet EE, Middelkoop E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation*. 1998;65(7):966-70.
70. Cameron PU, Pagnon JC, van Baare J, Reece JC, Vardaxis NJ, Crowe SM. Efficacy and kinetics of glycerol inactivation of HIV-1 in split skin grafts. *J Med Virol*. 2000;60(2):182-8.
71. Wolff KD, Walter G, Zimmer C. Nerve reconstruction with glycerol-preserved allogenic grafts in the rat. *Microsurgery*. 1993;14(5):315-22.

72. Souza Lemos SP, Hayashi I, Cunha AS, Fereira da Silva C, Barros Filho TE, Costa MP, Ferreira MC. Nervo alógeno conservado em glicerol. Estudo experimental em ratos. *Acta Bras Ortop.* 2008;16(3):133-7.
73. Fox IK, Schwetye KE, Keune JD, Brenner MJ, Yu JW, Hunter DA, Wood PM, Mackinnon SE. Schwann-cell injection of cold-preserved nerve allografts. *Microsurgery.* 2005;25(6):502-7.
74. Herson MR. *Survey of clinical use of glycerol preserved skin in several European burn centers.* Beverwijk: Dutch Burns Association Internal Report; 1986.
75. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Gene Med.* 2010;12(7):561-3.
76. Hirasé Y, Kojima T, Uchida M, Takeishi M. Cryopreserved allogeneic vessel and nerve grafts: hind-limb replantation model in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 1992;8(6):437-43.
77. Scabora JE, Carone AL, Figueiredo JF, Esquisatto MAM, Langonde F. Viability of nerve grafts preserved in different storage medium: ultrastructural features. *Braz J Morphol Sci.* 2009;26(2):97-103

78. Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve*. 2011;44(2):221-34.
79. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington: National Academies Press; 2011
80. Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP*. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.
81. Wixson SK, White WJ, Hughes HC Jr, Marshall WK, Lang CM. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on noxious stimulus perception in adult male rats. *Lab Anim Sci*. 1987;37(6):731-5.
82. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77(3):634-43.
83. Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989;10(3):220-5.

84. Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GM. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. *Microsurgery*. 1989;10(3):226-35.
85. Brown CJ, Evans PJ, Mackinnon SE, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare G. Inter- and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery*. 1991;12(2):76-9.
86. Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(2):251-8.
87. Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Midha R, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: utilization of individual footprint parameters. *Ann Plast Surg*. 1993;30(2):147-53.
88. Dash H, Kononov A, Prayson RA, Petras S, Browne EZ. Evaluation of nerve recovery from minimal-duration crush injury. *Ann Plast Surg*. 1996;37(5):526-31.
89. Hundepool CA, Nijhuis TH, Kotsougiani D, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *Neurosurg Focus*. 2017;42(3):E4.
90. Ellis JC, McCaffrey TV. Animal model for peripheral nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1984;92(5):546-50.

91. Tuma Júnior P, Ferreira MC, Nakamoto HA, Milcheski DA, Cheroto Filho A. Influence of immunosuppression on nerve regeneration using allografts: an experimental study on rats. *Acta Ortop Bras.* 2008;16(1):41-4.
92. Costa MP, Teixeira NH, Longo MV, Gemperli R, Costa HJ. Combined polyglycolic acid tube and autografting versus autografting or polyglycolic acid tube alone. A comparative study of peripheral nerve regeneration in rats. *Acta Cir Bras.* 2015;30(1):46-53.
93. Longo MV, Marques de Faria JC, Isaac C, Nepomuceno AC, Teixeira NH, Gemperli R. Comparisons of the results of peripheral nerve defect repair with fibrin conduit and autologous nerve graft: an experimental study in rats. *Microsurgery.* 2016;36(1):59-65.
94. Salles Júnior GS, Faria JCM, Busnardo FF, Gemperli R, Ferreira MC. Evaluation of nerve regeneration in diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(7):509-17.
95. de Medinaceli L. Use of sciatic function index and walking track assessment. *Microsurgery.* 1990;11(2):191-2.
96. Pereira CEM, da Silva JDM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. *Acta Cir Bras.* 1998;13(2):123-8.

97. Longo MV. *Influência da adição de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo associadas a conduto de fibrina na regeneração de nervo periférico em modelo experimental de ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.
98. Ahmed FJ, Junior GM, Shinohara AL, De Souza Melo CG, Buchaim RL, Andreo JC, De Castro Rodrigues A. Comparison of results obtained with standard and inside out vein graft techniques and their implication on neurotrophin expression in repair of nerve defect: an experimental study. *Microsurgery*. 2015;35(3):227-34.
99. Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neuroorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(1):129-37.
100. Menasché P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, Weiss M, Piwnica A, Bloch G. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1994;8(4):207-13.
101. Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation*. 1999 Jan;67(1):152-5.

102. Carone AL, Scabora JE, Barros BR, Esquisatto MAM, Figueiredo JF, Langone F. Viability of nerve grafts preserved in different storage medium. *Braz J of Morphol Sci.* 2007;24(1):39-46.
103. Mohara J, Morishita Y, Takahashi T, Oshima K, Yamagishi T, Takeyoshi I, Matsumoto K. A comparative study of Celsior and University of Wisconsin solutions based on 12-hr preservation followed by transplantation in canine models. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18(12):1202-10.
104. Tírico LEP. *Protocolo de captação, processamento e transplante de enxertos osteocondrais homólogos a fresco na articulação do joelho* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.
105. Mesquita IV. *Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional e enxerto de nervo preservado a frio* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.
106. Hrebikova H, Diaz D, Mokry J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(1):12-7.
107. Kaplan HM, Mishra P, Kohn J. The overwhelming use of rat models in nerve regeneration research may compromise designs of nerve guidance conduits for humans. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(8):226.