

PEDRO HENRIQUE DE SOUZA SMANIOTTO

Efeito da utilização de células-tronco derivadas de adipócitos no conduto de veia jugular glicerinada na regeneração do nervo ciático: estudo experimental

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

Programa de Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Rolf Gemperli

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Smaniotto, Pedro Henrique de Souza
Efeito da utilização de células-tronco derivadas
de adipócitos no conduto de veia jugular glicerizada
na regeneração do nervo ciático : estudo
experimental / Pedro Henrique de Souza Smaniotto. --
São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.
Orientador: Rolf Gemperli.

Descritores: 1.Regeneração nervosa 2.Nervo
isquiático 3.Veias jugulares 4.Células-tronco
5.Microcirurgia 6.Cirurgia plástica

USP/FM/DBD-327/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais **Pedro** e **Delurma**, pelo amor, cuidado e pela atenção que sempre tiveram comigo. Misturando razão (pai) e emoção (mãe) esculpiram minha personalidade. Um eterno porto seguro tão firme quanto uma aroeira.

À minha esposa **Maria Gabriella**, pelo amor, companheirismo e pela paz que me transmite. Suporte dentro e fora de casa, fez brotar nossas duas maiores conquistas que são **Maria Antônia** e **Maria Eduarda**. Caminharmos juntos me faz muito bem, os sorrisos são mais fáceis e as lágrimas mais leves.

Ao **Prof. Dr. Rolf Gemperli** pelo incentivo e estímulo à pesquisa, sempre pujante em encaminhar nossa especialidade a um patamar acima do já existente. Transmitiu conhecimento e sabedoria durante meus anos de faculdade, residência e pós-graduação, enfatizando a importância do trabalho árduo e em equipe.

Agradecimentos

À Dra. Cristina Pires Camargo pela técnica e pelo ensino na produção de ciência com qualidade impecável e todo rigor necessário. Reiteradas análises, sugestões e revisões assertivas contribuíram muito para o aprimoramento científico e viabilização deste projeto na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. César Isaac pelo ótimo entrosamento e amizade desde a graduação durante a Liga de Cirurgia Plástica da FMUSP. Um dos assistentes que mais estimula a interface entre pesquisa (laboratório) e assistência (hospital). Conceito de grande importância pra o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Júlio de Moraes Besteiro, por ser um profundo conhecedor da cirurgia plástica e uma referência nacional em microcirurgia . Chefe do Laboratório de Microcirurgia Experimental (LIM 4) que forneceu suporte físico para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Henri Friedhoffer, pelo convívio e sábios ensinamentos durante a residência no Hospital das Clínicas da FMUSP.

Ao Prof. Dr. Dov Goldenberg, pelo compartilhamento, gentil, de tantas virtudes pessoais e profissionais. Sempre com ótimos ensinamentos e direcionamentos para exercer uma medicina ética e em altíssimo nível.

Ao Prof. Dr. Alexandre Munhoz, pelo exemplo de eficiência, profissionalismo e inovação. Um dos maiores líderes que conheci. Capacidade singular em enxergar e conectar com êxito macro ciências exatas, humanas e biológicas.

Ao Prof. Dr. Fábio Busnardo, que tanto me ensinou durante a residência e preceptoria. Repertório imensurável de soluções fantásticas na cirurgia plástica reparadora. Foi fundamental para eu concretizar minha vocação profissional e decidir priorizar as reconstruções plásticas. Um dos grandes influenciadores na escolha desta linha de pesquisa que foi desenvolvida durante o meu doutorado.

Ao Prof. Dr. José Carlos de Faria, pelo brilhantismo cirúrgico e talento na área de reconstruções complexas. Uma grande inspiração profissional em minha formação.

Ao Prof. Dr. Wilson Cintra Junior, pelos conselhos e ricos ensinamentos durante minha formação de cirurgião plástico. Grande habilidade em várias áreas de atuação.

Ao Prof. Alfredo Luiz Jacomo pelo seu conhecimento riquíssimo em anatomia que é alicerce fundamental para todo cirurgião, e que tão bem é transmitido a todos seus alunos durante a graduação e pós-graduação na Faculdade de Medicina da USP. Uma postura e trajetória acadêmica impecável.

Ao Dr. Paulo Tuma, pela ética, pela amizade e por todas as suas posturas e valores pessoais e profissionais.

Ao Dr. Luis Henrique Ishida, pelas inovações que consegue imprimir na especialidade. Pela facilidade em transmitir todo seu conhecimento e sua rica experiência pessoal e familiar. Pela ótima técnica cirúrgica. Ao Dr. Luiz Carlos Ishida, por toda sua dedicação e assiduidade junto às microcirurgias no Instituto Central e ao grupo do nariz no Hospital das Clínicas da FMUSP.

Aos Dr. Hugo Nakamoto e Dr. Dimas André Milcheski, pela paixão e competência que demonstram pela microcirurgia e pela cirurgia da mão ensinando tanto cirurgiões plásticos quanto ortopedistas do complexo do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Ao Dr. Marco Longo pela amizade e convívio. Pelos estudos realizados anteriormente nesta mesma linha de pesquisa que desenvolvi.

Aos amigos Dr. Hélio Alves, Dr. Dr. Guilherme Barreiro e Dr. Allysson Doi pela amizade, e demonstrações de conhecimentos e técnicas cirúrgicas avançadas nas cirurgias de reconstruções de cabeça e pescoço do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Aos amigos Dr. Eduardo Gustavo Arruda, Dr. Eduardo Montag, Dr. Alberto Okada, Dr. Alexandre Fonseca e Dr. Carlos Henrique Felício que me transmitiram uma gama grandiosa de arsenais terapêuticos nas cirurgias de reconstruções mamárias realizadas no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Aos amigos Dr. Marcelo Oliven, Dr. Pedro S. Coltro, Dr. Lincoln Saito e Dr. Victor Grillo, pela criatividade que possuem e pelo conhecimento que compartilharam comigo nas cirurgias de reconstruções pós tratamento de tumores cutâneos do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Ao Dr. Fábio Saito, pela sua coordenação no Hospital Estadual Sapopemba que contribuiu sobremaneira para formação e aprendizado em cirurgias do contorno corporal durante minha residência. Uma pessoa extremamente empreendedora e inteligente.

Ao Dr. Bruno Onishi Mizusaki, pela amizade e pelo exemplo de R+ que tive em minha residência de cirurgia plástica. Ótimo cirurgião plástico e ser humano.

Aos amigos residentes Caio Augusto de Araújo, Carlos Eduardo Benedette, Franklin Mônaco Filho, Thomaz Tourinho de Menezes, Walter Amorim de Oliveira, Alex Boso, Victor Almeida Peloso e Marcelo Portocarrero pela relação diária durante os anos de preceptoria e pós-graduação no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Enxergaram de perto o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos assistentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, pelos ensinamentos, importantes na minha formação de cirurgião plástico.

Às secretárias Edna e Silvana do Laboratório de Microcirurgia Experimental e Cirurgia Plástica (LIM-4), pela ajuda fundamental e auxílio constante durante a realização deste trabalho experimental.

Ao funcionário Bruno que tão bem cuidou dos animais desta pesquisa científica. Grande suporte no biotério. Atuação muito humana e com grande zelo pelos animais experimentais.

À secretária Eliane Monico Gazetto por toda ajuda que fornece nas mais diferentes funções que exerce. Competência em resolver, com ótimo humor, toda demanda que chega até sua mesa.

Aos meus irmãos, Luiz Eduardo e Geovanna, pelo amor, carinho e pela ajuda mútua durante toda a minha vida.

Ao meu avô paterno Domingos, que deixou seu legado valorizando a força de trabalho e a família. À minha avó paterna Lúcia, que transbordava esperteza e inteligência.

Ao meu avô materno João, por ter feito o meu destino ser sul-mato-grossense. À minha longeva avó materna Antônia, que desde os primórdios foi garantia de uma companhia alegre e divertida. Ótimos momentos na infância, adolescência e fase adulta.

Ao meu sogro Carlos e à minha sogra Maristela por me proporcionarem mais uma família.

Ao meu amigo Renato Tomioka que juntos percorremos o colégio Bandeirantes e a faculdade de medicina da USP. Amizade, convívio e muitas excelentes histórias. Ontem, hoje e amanhã.

Normatização

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 3^a 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 figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de siglas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão da literatura.....	3
1.1.1 Nervos periféricos – anatomia.....	3
1.1.2 Nervos periféricos – função.....	3
1.2 Lesão nervosa.....	4
1.3 Avaliação e classificação da gravidade da lesão nervosa.....	5
1.4 Reparação da lesão nervosa.....	8
1.5 Tubos-guia.....	10
1.6 Medidas adjuvantes.....	11
1.6.1 Células-tronco.....	11
1.6.2 Estimulação elétrica.....	13
1.6.3 Laser.....	14
1.6.4 Terapia genética.....	14
1.7 Modulação da resposta inflamatória.....	15
2 OBJETIVO.....	16
2.1 Desfecho primário.....	17
2.2 Desfechos secundários.....	17
3 MÉTODO.....	18
3.1 Amostra.....	19
3.2 Obtenção de células-tronco derivadas de adipócitos.....	19
3.3 Citometria de fluxo.....	21
3.4 Captação e preparo das veias.....	23

3.5	Procedimento cirúrgico de lesão nervosa e reparação cirúrgica.....	26
3.5.1	Grupo enxerto de nervo	27
3.5.2	Grupo veia invertida tratada em glicerol	28
3.5.3	Grupo veia invertida tratadas em glicerol com administração de células-tronco derivadas de adipócitos	28
3.6	Análise macroscópica	31
3.6.1	Avaliação funcional (método de “Walking Track Analysis”).....	31
3.6.2	Avaliação funcional com captação e peso dos músculos gastrocnêmios	33
3.6.3	Coleta dos nervos ciáticos	34
3.7	Eutanásia e descarte dos animais	34
3.8	Análise microscópica	35
3.8.1	Histomorfometria.....	35
3.9	Análise dos dados estatísticos.....	37
3.9.1	Cálculo do tamanho da amostra.....	37
3.9.2	Análise estatística dos dados	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Análise geral	39
4.2	Walking Track (WT)	39
4.3	Pesos dos músculos gastrocnêmios	41
4.4	Histomorfometria.....	42
4.5	Neuromas	46
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	54
	AXENOS.....	56
	Anexo A - Tabelas de peso dos músculos gastrocnêmios.....	57
	Anexo B - Tabela de desempenho dos IFC (s).....	58
	Anexo C - Histomorfometria.....	61
7	REFERÊNCIAS	66
8	APÊNDICES	
8.1	Apêndice – carta de liberação CEUA	

Listas

FIGURAS

- Figura 1 -** Ilustração da dissecação da Veia Jugular do lado direito (VJD) 24
- Figura 2 -** Esquema do processo de inversão das veias jugulares do lado direito. A – introdução das duas pás da pinça vascular angulada no lúmen cateterizando a veia jugular. B - pinçamento da extremidade distal da veia jugular direita. C – inversão do lúmen da veia jugular externa com o auxílio de pinça reta microcirúrgica (manobra). D – aspecto final da inversão da veia jugular externa, demonstrando a localização interna da adventícia da veia e a localização externa do endotélio 25
- Figura 3 -** Acesso cirúrgico e identificação do nervo ciático direito e secção de 5 mm do nervo (visão dorsal)..... 27
- Figura 4 -** Representação do grupo enxertia autógena de nervo. Grupo nervo 29
- Figura 5 -** Representação do grupo veia isógena invertida conservada em glicerol. Grupo veia invertida 29
- Figura 6 -** Representação do grupo veia isógena invertida conservada em glicerol adicionadas com células-tronco derivadas de tecido adiposo em sua luz. Grupo veia invertida e ADSC 30
- Figura 7 -** Ilustração da neurorafia (sutura) término-terminal entre nervo Ciático e enxerto de veia realizado nos grupos veias invertidas + glicerol e veias invertidas + glicerol + ADSC 30
- Figura 8 -** Descrição do teste “walking track” do animal de experimentação (rato). EP = extensão da pegada, LP = largura da pegada e DDI = distância entre os dedos intermediários. Impressão da pegada do animal..... 33

- Figura 9 -** Cortes transversais em cinco regiões (setas) do nervo ciático processado dos três grupos no lado direito (teste) e lado esquerdo (cont./controle): I) pré-neurorrafia proximal; II) região inter-neurorrafias 1; III) região inter-neurorrafias 2; IV) região inter-neurorrafias 3, e V) pós-neurorrafia distal. Nesses foram realizadas as análises histomorfométrica: número de axônios efetivos e diâmetro do nervo..... 36
- Figura 10 -** Lâmina (corte transversal) com coloração Tricromio de Masson, (400x) em microscópio Nikon E200®. Setas - axônios efetivos mielinizados com células de Schwann (núcleos) em sua periferia, demonstrando regeneração neuronal..... 44

TABELAS

Tabela 1 -	Fórmula para cálculo do Índice de Função Ciática (IFC).....	32
Tabela 2 -	Análise estatística dos valores médios do índice de função do nervo ciático nos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + ADSC nos períodos: pré-operatório, três semanas, seis semanas, nove semanas e doze semanas pós-intervenções cirúrgicas	40
Tabela 3 -	Análise estatística dos três grupos. Média do peso dos músculos gastrocnêmios nos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + ADSC em grama(g) com desvio padrão (DP)	41
Tabela 4 -	A média do número de axônio efetivos (núcleos de células de Schwann) em cada grupo. As aferições (lâminas) foram realizadas em cinco diferentes cortes ao longo do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré. (pré-neurorrafia proximal); inter. (inter-neurorrafias) 1; inter. (inter-neurorrafias) 2; inter. (inter-neurorrafias) 3; pós. (pós neurorrafia distal). Apresentado média (méd.) de cada um dos três grupos do estudo	43
Tabela 5 -	Axônios efetivos pós-neurorrafia distal do lado direito (teste) comparado ao lado esquerdo (controle).....	44
Tabela 6 -	Diâmetro médio do nervo em milímetro (mm) pós-regeneração (mielinização) neural após 12 semanas pós-operatória. As aferições foram realizadas em cinco diferentes cortes ao longo do comprimento do nervo ciático, dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré. (pré-neurorrafia proximal) (corte I), inter. (inter-neurorrafias); 1 (corte II), inter. (inter-neurorrafias); 2 (corte III), inter. (inter-neurorrafias); 3 (corte IV); e pós (pós-neurorrafia distal) (corte V)	45

Tabela 7 -	Diâmetro do nervo dos diferentes grupos do estudo na topografia pós-neurorrafia distal (corte V) do lado intervenção (direito) e comparação específica com lado esquerdo (controle) . Efeito de lado (p=0,002) e efeito de grupo (p=0,875)	46
Tabela 8 -	Pesos (g) dos músculos gastrocnêmios dos ratos dos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + células-tronco derivadas de adipócitos (ADSC)	57
Tabela 9 -	Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter calculado após teste de walking-track dos ratos do grupo autoenxerto de nervo no pré-operatório e nas terceira, sexta, nona e décima segunda semanas de pós-operatório.....	58
Tabela 10 -	Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter calculado após teste de walking-track dos ratos do grupo veia invertida + glicerol no pré-operatório e nas terceira, sexta, nona e décima segunda semanas de pós-operatório	59
Tabela 11 -	Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter calculado após teste de walking-track dos ratos do grupo veia invertida + glicerol + ADSC no pré-operatório e nas terceira, sexta, nona e décima segunda semanas de pós-operatório	60
Tabela 12 -	O número de axônios efetivos (núcleos de células de Schwann). As aferições (lâminas) foram realizadas em cinco diferentes localizações do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré (pré-neurorrafia proximal) – corte I, inter. (inter-neurorrafia 1) – corte II, inter. (inter-neurorrafia 2) – corte III, inter. (inter-neurorrafia 3) – corte IV e pós (pós-neurorrafia distal) – corte V. Apresentado valores mínimos (mín.), máximos (máx) e média (méd) de cada um dos três grupos do estudo	61
Tabela 13 -	Diâmetro do nervo em centímetros (cm) pós-regeneração (mielinização) neural de 12 semanas pós-operatório. As aferições (lâminas) corresponderam aos cortes realizados em cinco diferentes cortes do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré (pré-neurorrafia proximal) – corte I, inter. (inter-neurorrafias 1) – corte II, inter. (inter-neurorrafias 2) – corte III, inter. (inter-neurorrafias 3) – corte IV e pós (pós-neurorrafia distal) – corte V. Apresentado valores mínimos (mín.), máximos (máx.) e média (méd.) de cada um dos três	63

ABREVIATURAS

cent.	central
dir.	direito
dist.	distal
DP.	desvio padrão
Dr.	Doutor
ed.	edição
esq.	esquerdo
et al.	e outros
HE	hematoxilina eosina
Ltda.	limitada
M.	músculo
máx.	máximo
méd.	média
mín.	mínimo
Mm.	músculos
prof.	professor
prox.	proximal
rev.	revista
rpm.	rotação por minuto
v.	volume

SÍMBOLOS

>	maior
<	menor
=	igual
%	porcentagem
+	mais
-	menos
±	mais ou menos
°	grau
°C	grau Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
Kg	quilograma
mg	miligrama
mm	milímetro
μl	microlitro
®	marca registrada

SIGLAS

ADSC	células estromais derivadas de adipócitos
ADS	células-tronco derivadas de adipócitos
APG	ácido poliglicólico
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Califórnia
CEUA	Comissão Ética para Uso de Animais
CGF	fator de crescimento derivado de cérebro
CO ₂	dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDIE	distância entre os dedos intermediários experimental
DDIN	distância entre os dedos intermediários normal
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	solução balanceada com tripsina sem íons cálcio e magnésio c/ agente quelante
EPE	extensão da pegada experimental
EPN	extensão da pegada normal
EUA	Estados Unidos da América
FK566	tacrolimus
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GCGF	fator de crescimento derivado da célula da Glia
GGF	fator de crescimento da Glia
HC	Hospital das Clínicas

IFC	Índice de Função Ciático
LIM	laboratório de investigação médica
LNP	lesão de nervo periférico
LPE	largura da pegada experimental
LPN	largura da pegada normal
NGF	fator de crescimento neural
NJ	Nova Jersey
PBS	solução tampão fosfato
P/E	Penicilina G/ estreptomicina
PEG	polietileno glicol
PFA	paraformaldeído
SFB	soro fetal bovino
TB	tubo-guia
TM	marca registrada
TRMA	Tricrômico de Masson
WT	walking track

Resumo

Smaniotto PHS. *Efeito da utilização de células-tronco derivadas de adipócitos no conduto de veia jugular glicerina na reconstrução do nervo ciático: estudo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: O objetivo deste estudo foi analisar a utilização de células-tronco, derivadas de adipócitos, em conduto de veia conservada em glicerol na regeneração nervosa do nervo ciático em ratos durante o período de 12 semanas pós-operatório. **MÉTODO:** Foram analisados 30 ratos Wistar machos, peso variando entre 200 a 250 g. Todos os animais foram submetidos à exérese de cinco mm de extensão do nervo ciático. A seguir, os animais foram divididos em três grupos: enxertia de nervo autólogo, veia isógena invertida conservada no glicerol e veia isógena invertida conservada em glicerol + células-tronco derivadas de adipócitos. A análise funcional motora foi realizada através da análise das pegadas impressas pelas patas posteriores dos animais (“walking track analysis”) na 3^o, 6^o, 9^o e 12^o semana pós-operatória. Na 12^o semana, os animais foram eutanasiados e houve a coleta de amostras dos músculos gastrocnêmios do lado intervenção (direito) e do controle (lado esquerdo) para mensuração de peso; e amostras da enxertia do nervo ciático e do lado sem intervenção (controle) para análise microscópica. A análise histológica foi realizada pelo método de histomorfométrica por quantificação de números absolutos de células de Schwann e diâmetro dos nervos após o local da secção do nervo ciático pela coloração HE e tricrômico de Masson. Foram realizadas estatísticas entre grupos através da análise de Variância (ANOVA). Foram avaliadas presenças ou não de neuromas nos cotos proximais e distais do nervo ciático pós 12 semanas das neurorrafias microcirúrgicas. **RESULTADOS:** Os músculos gastrocnêmios no autoenxerto de nervo obtiveram peso médio de 2,46g ± 0,47 no lado controle e 1,35g ± 0,33 no lado intervenção. No grupo veia invertida, tratadas em glicerol, o lado do nervo ciático esquerdo pesou 2,41g ± 0,34, enquanto o lado seccionado pesou em média 1,61g ± 0,37. O grupo veia invertida tratada em glicerol + ADSC pesou 1,64g ± 0,39 no lado esquerdo e 1,11g ± 0,23 no lado intervenção. O pico de inoperância funcional do walking track ocorreu com 3 semanas de pós-operatória. Média do IFC de -86,778 (±19,78) no grupo autoenxerto de nervo, de -61,955 (±13,68) no grupo veia invertida + glicerol e de -89,56 (±7,5) no grupo veia invertida + glicerol + ADSC. O melhor desempenho funcional ocorreu com 12 semanas de pós-operatória, atingindo IFC -60,779|±21,28 (Grupo autoenxerto de nervo), -45,389|±12,96 (Grupo veia invertida + glicerol) e -58,02|±9,54 (Grupo veia invertida + glicerol + ADSC). A análise estatística demonstrou diferença entre os grupos. O grupo veia invertida + glicerol se diferencia dos demais grupos apresentando maiores valores (p=0,004). Foi observado a ausência de formação de neuromas em todos os animais do estudo. **CONCLUSÃO:** Não se observou que o uso de ADSC tenha gerado melhores resultados na regeneração de nervo periférico quando comparado aos outros dois grupos do estudo. A utilização de veias invertidas conservadas em glicerol, como tubos-guia, aumentou a regeneração do nervo ciático.

Lesões de nervos periféricos permaneceram apresentando, independentemente do método utilizado, resultados funcionais parciais.

Descritores: Regeneração nervosa; Nervo isquiático; Veias jugulares; Células-tronco; Microcirurgia; Cirurgia plástica.

Abstract

Smaniotto PHS. *Effect of the use of adipocyte derived stem cells in glycerinated jugular vein conduit in sciatic nerve reconstruction: an experimental study* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: The goal of this study was to analyze the stem cells in conserved vein conduit in glycerol on nerve regeneration of the sciatic nerve in rats during the 12-week postoperative period. **METHOD:** Thirty male Wistar rats weighing 200-250g were analyzed. All animals underwent five mm excision of the sciatic nerve extension. The animals were divided into three groups: nerve grafting, inside out isogeneic conserved vein in glycerol, inside out isogeneic vein conserved in glycerol + stem cells derived from adipocytes. The motor functional analysis was performed through the analysis of the footprints printed on the hind feet of the animals ("walking track analysis") at the 3rd, 6th, 9th and 12th postoperative weeks. At the 12th week, the animals were euthanized and samples of the gastrocnemius muscles were collected from the intervention (right) and control (left side) sides for weight measurement; and sciatic nerve graft and non-intervention (control) samples for microscopic analysis. The histological analysis was performed by histomorphometric of the absolute numbers of Schwann cells and nerve fibers diameters were quantified after the site of the sciatic nerve section through HE and Masson's trichrome staining. An analysis between groups was performed through ANOVA tests. The presence or absence of neuromas in the proximal and distal stumps of sciatic nerve after 12 weeks of microsurgical neurorrhaphy were evaluated. **RESULTS:** The gastrocnemius muscles in Group nerve grafting had an average weight of $2.46g \pm 0.47$ on the control side and $1.35g \pm 0.33$ on the intervention side. In group inverted vein + glycerol the left sciatic nerve side weighed $2.41g \pm 0.34$ while the sectioned side weighed on average $1.61g \pm 0.37$. Group inverted vein + glycerol + ADSC weighed $1.64g \pm 0.39$ left side and $1.108g \pm 0.23$ on the intervention side. The peak of functional nonoperability in the walking track analysis (WT) occurred at 3 weeks postoperatively. Mean of IFC was $-86.778 (\pm 19.78)$ in Group nerve grafting, $-61.955 (\pm 13.68)$ in Group inverted vein + glycerol and $-89.56 (\pm 7.5)$ in group inverted vein + glycerol + ADSC. The best performance of the footprints occurred with 12 post-operative weeks, reaching IFC $-60,779 | \pm 21,28$ (Group nerve grafting), $-45.389 | \pm 12.96$ (Group inside out vein + glycerol) and $-58.02 | \pm 9.54$ (Group inside out vein + glycerol + ADSC). Statistical analysis expressed difference between groups. Group inverted vein + glycerol differs from the other groups with higher values ($p=0,004$). No neuroma formation was observed in all study animals. **CONCLUSION:** Our results suggest that the use of ADSC did not generate better results in peripheral nerve regeneration compared to

the other study groups. The use of inside out veins conserved in glycerol, increased sciatic nerve regeneration. Regardless of the method peripheral nerve lesion maintains partial functional results.

Descriptors: Nerve regeneration; Ischiatic nerve; Jugular veins Stem-cells; Microsurgery; Plastic surgery.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Lesão de nervo periférico consiste em uma situação clínica devastadora para a vida do paciente.

A prevalência de lesão dos nervos periféricos causadas por trauma varia entre 2.8% a 5% na população americana (Menorca et al., 2013; Davis; Curtin, 2016). Asplund et al., descreveram uma incidência de 13,9 casos de LPN por 100.000 habitantes ao ano na Suécia entre 1998 e 2006 (Asplund et al., 2009). No Brasil, não dispomos de dados sobre a prevalência de LNP.

As LNP e lesões em plexos são frequentes, afetando 5% e 1% respectivamente dos pacientes traumatizados (Midha, 1997; Noble et al., 1998).

As causas das lesões nervosas por trauma mais frequente são: trauma aberto, tração, isquemia, compressão e queimadura elétrica (Grinsell, Keating, 2014). Martinez de Albornoz et al., relataram fraturas, trações, choques elétricos e lacerações por objetos cortantes ou pontiagudos como causas de LPN (Martinez de Albornoz et al., 2011).

As neuropatias periféricas englobam um conceito mais abrangente que podem ser traumáticas, tumorais, iatrogênicas-cirúrgicas, metabólicas (diabetes e hipotireoidismo), infecciosa (virais ou bacterianas), autoimunes, medicamentosas, alcoólicas e radioterápicas.

A LPN acomete mais a população jovem e a região mais acometida é o membro superior (Lundborg, 2003).

Grinsell e Keating relataram que o tratamento de LPN chegam nos Estados Unidos em um valor estimado em 150 bilhões de dólares por ano (Grinsell; Keating, 2014).

Muitos pacientes recuperam funções motora, sensitiva e autonômica apenas parcial. Além de uma parcela poder evoluir com quadro de neuropatia crônica resistente a tratamento medicamentoso (Birch et al., 2012).

A regeneração axonal periférica raramente é completa. A regeneração incompleta das funções neurais se deve a complexidade da estrutura nervosa, bem como da regeneração dos tecidos que circundam a LPN (Zochodne, 2012).

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Nervos periféricos - anatomia

Os nervos periféricos são compostos por neurônios sensitivos e motores. Cada axônio é envolto por tecido conectivo chamado de endoneuro. O endoneuro contém fina rede vascular que promove suporte de oxigênio e nutricional.

Esses axônios se estruturam em fascículos nervosos, envolto pelo perineuro que correspondem à camada interna da estrutura do nervo. Os fascículos são agrupados por tecido conectivo, denominado epineuro, que correspondem à camada externa do nervo (Komuro, 1990).

Todos os fascículos são agrupados pelo epineuro que contém rede vascular que nutre o nervo. O conhecimento e a identificação dessas estruturas na cirurgia de reparação de LPN são fundamentais para a cirurgia reparadora nervosa (Maldonado et al., 2017).

1.1.2 Nervos periféricos – função

Os nervos periféricos (nervos cranianos, nervos espinhais e plexos nervosos) exercem funções sensitivas, motoras e mistas.

A função do sistema nervoso periférico permite a interação do sistema nervoso central (SNC) com outras estruturas do corpo humano e com o meio externo. O citoplasma contido no corpo e o axônio da célula nervosa são mantidos em

homeostase pelo transporte axonal de estímulos nervosos, permeados pela troca de eletrólitos (sódio, cálcio e potássio). Quando a despolarização da membrana chega na porção terminal do axônio (botão sináptico), os canais de cálcio abrem-se, permitindo a entrada dos íons de cálcio que causam fusão das vesículas sinápticas à membrana celular e exocitose das vesículas que contém neurotransmissores para a fenda sináptica. Os neurotransmissores se difundem pela fenda sináptica e se conectam aos receptores associados a canais iônicos na membrana pós-sináptica (Gartner; Hiatt, 2007).

Qualquer alteração do transporte (anterógrado e/ou retrógrado) dos impulsos nervosos ocasionados por lesões da dupla camada lipídica da membrana do neurônio causam danos às funções neuronais e até a morte celular (Bittner et al., 2016).

1.2 LESÃO NERVOSA

A lesão nervosa, em maior ou menor grau causa degeneração axonal, proximal e distal, à região do trauma (Terenghi, 1999).

A degeneração proximal, que se estende até os nódulos de Ranvier, ocorre pelo processo de morte programada celular, denominada cromatólise. Já a degeneração distal à lesão axonal se estende até o receptor do axônio, sendo denominada de degeneração Walleriana. A degeneração Walleriana é caracterizada por degeneração axonal e da bainha de mielina. Esse processo degenerativo tem início entre 24 e 48 horas após o trauma neural (Siemionow; Brzezicki, 2009).

As células de Schwann fagocitam restos de axônios e de mielina causando o esvaziamento do conteúdo interno do tubo neural. Após esse processo de fagocitose, o tubo é ocupado por células de Schwann, que se estruturam em colunas ao longo do tubo (Bandas de Bungner). Outras células do sistema inflamatório, como macrófagos degranulam fatores de crescimento que agem como estímulo tanto às células de Schwann (reparação) quanto aos fibroblastos (fibrose) (Mackinnon; Dellon, 1994; Siemionow; Brzezicki, 2009).

A regeneração nervosa se inicia pelos nódulos de Ranvier, proximais à lesão. A extremidade proximal à lesão forma entre 50 a 100 brotamentos nervosos em forma de cones alongados, que se desenvolvem na direção a lesão distal, direcionado pelo neurotropismo (Mackinnon; Dellon, 1994).

Os brotamentos regeneram e caminham através dos tecidos, por meio de proteases, que abrem caminho na matriz extracelular e no tubo neural, até alcançarem o tubo distal da lesão. Ao alcançarem o tubo distal os brotamentos que não atingirem esse tubo se degenerarão. Porém, se os brotamentos não encontrarem o tubo distal, há crescimento desordenado dos brotamentos, formando assim neuromas. Quanto maior a gravidade da lesão nervosa maior será a chance de ocorrer crescimento desorganizado pelos brotamentos neurais (Siemionow; Brzezicki, 2009).

Ainda, a reação inflamatória causada pela lesão tissular libera substâncias pró e anti-inflamatórias que afetam diretamente na regeneração neural.

Após a LNP, o sistema imunológico libera substâncias que favorecem o crescimento neural (neurotróficos). Essas substâncias, como por exemplo, fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento da Glia (GGF), fator de crescimento derivado de células da glia (GCGF) e fator de crescimento derivado de cérebro (CGF), aumentam quando há lesão axonal (Siemionow; Brzezicki, 2009; Marconi et al., 2010; Konofaos; Ver Halen, 2013).

Como exemplo, o fator de crescimento neural (NGF) é liberado pela terminação nervosa e têm como função estimular crescimento e diferenciação nervosa. Outros fatores de crescimento já foram descritos na literatura, com resultados variáveis.

1.3 AVALIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA LESÃO NERVOSA

A classificação da gravidade da lesão nervosa logo após o trauma é limitada pela falta de um exame diagnóstico efetivo.

A utilização de exames como testes de condução nervosa e eletromiografia se baseiam na estimulação elétrica da pele ou diretamente no músculo inervado pelo suposto nervo lesionado. A partir desse estímulo, a resposta do potencial evocado é mensurada por eletrodos colocados acima do músculo (pesquisa de lesão motora) ou da pele (pesquisa de lesão sensitiva). Basicamente, o estímulo da condução nervosa avalia o bloqueio de condução, enquanto a eletromiografia avalia a magnitude do potencial de ação (parte motora). Esses estímulos são representativos somente após seis semanas da lesão, devido a presença de desfibrilação muscular denervada, característica da lesão nervosa. Antes disso, outros estímulos podem interferir na interpretação dos resultados desses dois exames, limitando a sua indicação logo após a LPN (Robinson, 2000).

Existem várias escalas de classificação de LNP. Seddon, em 1947, classificou a LNP em três categorias: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese. Neuropraxia corresponde à lesão apenas da bainha de mielina, poupando o axônio. Os sinais e sintomas de alteração da condução do estímulo nervoso se regeneram completamente em um período de 12 semanas. A axoniotmese geralmente é causada por lesão de tração e corresponde à lesão do tecido conectivo circunjacente ao axônio, sem a lesão dessa estrutura. A regeneração axonal do quadro de bloqueio nervoso ocorre a um mm/dia e geralmente se faz de maneira incompleta, causando alguma sequela motora ou sensitiva (Seddon, 1947).

Finalmente, a lesão do tipo neurotmese corresponde à lesão total do axônio e do tecido conjuntivo circunjacente, sendo que a regeneração nervosa só é possível através de tratamento cirúrgico (Goubier; Teboul, 2015).

Em 1951, Sunderland propôs outra classificação, expandindo os três níveis de lesão proposta por Seddon para cinco níveis (I a V). Essa classificação se caracteriza por melhor acurácia na evolução e prognóstico de lesões nervosas, tendo como base a associação de sintomas e sinais clínicos e anatomia patológica (Sunderland, 1978; Goubier; Teboul, 2015).

Assim, de acordo com a classificação de Sunderland, pacientes portadores de lesão neural grau I e II geralmente apresentam evolução favorável. Quando há a lesão de grau III, o prognóstico dessas lesão não é favorável, geralmente a

recuperação funcional é parcial. Lesões classificadas entre os graus IV e V, tem prognóstico pobre, pois correspondem às lesões que necessitam de tratamento cirúrgico para regenerar.

Ainda, comparando a classificação de Sunderland com a anterior (Seddon): LNP grau I corresponde à neuropraxia, enquanto a axoniotmese grau II corresponde à lesão do axônio com endoneuro intacto. As LNP graus III e IV correspondem às lesões axonais de gravidade crescente comprometendo a recuperação funcional. Já o grau V corresponde à neurotmease (Siemionow; Brzezicki, 2009).

Recentemente, Mackinnon e Dellon modificaram a classificação proposta por Sunderland acrescentando a lesão mista (grau VI). Esse tipo de lesão é a mais comumente encontrada na prática clínica, podendo coexistir diferentes graus de lesão num segmento de nervo (Mackinnon; Dellon, 1994).

Ao se diagnosticar o padrão da lesão, principalmente quanto há rotura da continuidade axonal do nervo motor ou misto, a reparação cirúrgica deve ser imediata. Porém, independente do tratamento cirúrgico imediato ou tardio, o crescimento axonal é lento (um a dois mm/dia). Clinicamente, após a cirurgia de reparo, há uma janela terapêutica entre 12 a 18 meses na qual outras terapias locais ou sistêmicas podem ser realizadas com o objetivo de reestabelecer e melhorar a função do nervo (motor). A partir desse período, salvo algumas exceções, a placa da junção neuromuscular se degenera, causando perda funcional permanente. Nos casos de LNP com função sensitiva, essa janela terapêutica para a regeneração nervosa é mais longa, podendo se estender por anos (Grinsell; Keating, 2014).

Apesar do tempo de reparação ser importante na regeneração da LNP, a recuperação funcional depende de múltiplos fatores, como a distância entre a lesão nervosa e o receptor alvo, seja ele sensitivo ou motor (Grinsell; Keating, 2014).

A ausência de estímulos nervosos nos receptores alvos causa atrofia muscular, devido a ausência de estímulos nervosos no músculo a longo prazo, causando a perda da capacidade de contração muscular. Ao final de 18 meses, o músculo costuma estar completamente substituído por tecido cicatricial, caracterizando atrofia muscular (Kline; Nulsen, 1982).

1.4 REPARAÇÃO DA LESÃO NERVOSA

Embora existam várias estratégias para o tratamento de LNP, os resultados funcionais são parciais e insatisfatórios. A neurorrafia é considerada o tratamento padrão, porém, devido a lenta velocidade de regeneração neural (1 mm/dia) os agrupamentos musculares distais às lesões atrofiam-se causando perda parcial ou total da função, seja sensitiva, motora ou mista (Navarro et al., 2007).

O tratamento de primeira escolha para as lesões de axoniotmese e neurotmeze é a reparação cirúrgica imediata dessa lesão (Salomon et al., 2016), através de técnica microcirúrgica com anastomose término-terminal da camada epineural. Dependendo da gravidade da lesão, a sutura deve alinhar os fascículos que compõem o nervo, assim é necessário dissecação desses fascículos para a perfeita coaptação das extremidades perineurais. Mas, essa dissecação pode causar aumento da reação inflamatória local, desvascularização dos tecidos adjacentes à lesão, aumento da fibrose dos axônios e dos receptores motores, prejudicando o processo de regeneração funcional. Como regra, a cada neurorrafia por coaptação, há a perda de 50% dos axônios contidos nessa neurorrafia (Grinsell; Keating, 2014).

A cola de fibrina mostrou resultados favoráveis em vários estudos em animais, culminando em uma revisão sistemática realizada por Sammen et al., que demonstrou superioridade na utilização de cola biológica de fibrina se comparada à sutura clássica de LNP (Sameem et al., 2011). A utilização de cola biológica deveria ser mais eficaz do que a sutura por diminuir o tempo de cirurgia, diminuir o trauma (menor manipulação dos tecidos lesados), ser técnica de fácil aplicação e não apresentar barreira à regeneração neural. Porém, estudos clínicos demonstraram que a força tensil da cola não é superior à microneurorrafia por meio de sutura (Temple et al., 2004).

Nos casos de perda da extensão do nervo periférico (> 2 – 3 cm) que impossibilita a sutura sem tensão dos cotos nervosos, a enxertia de nervo é o tratamento padronizado. Geralmente o enxerto de nervo deve permitir uma certa redundância na sua extensão, uma vez que o processo inflamatório e cicatricial pode causar o encurtamento do enxerto em até 15% de extensão. Os nervos autólogos que

podem ser empregados como fonte doadora para enxertia são: nervo sural (com extensão máxima de 30 a 40 cm), nervo cutâneo medial e lateral do antebraço (extensão de 10 cm) e ramo sensitivo superficial do nervo radial (15 cm) (Panagopoulos et al., 2017).

A enxertia autóloga de nervos também está indicada em casos de lesão proximal (nervos cranianos, espinhais ou plexos nervosos próximos ao SNC) e de nervos com função crítica (lesão neural de membros superiores e face). Entretanto, quanto maior o diâmetro do enxerto, pior será o prognóstico clínico devido a possibilidade de vascularização insuficiente das camadas mais internas do enxerto. Como alternativa, Millesi estudou a enxertia de múltiplos fascículos, nesse caso há necessidade de se dissecar os fascículos do nervo receptor para criar anastomoses diretas para cada fascículo do enxerto (Millesi, 1972).

Neurorrafia entre os cotos de uma LPN livres de tensão é a grande vantagem e indicação cirúrgica para o uso de enxertos autógenos de nervos. Existem evidências na literatura que correlacionam a tensão excessiva na sutura ao efeito deletério à regeneração axonal, com risco alto de insucesso ao tratamento (Millesi, 1990), em especial, quando há perda de tecidos nervosos (Nunley, 1991).

A desvantagem do autoenxerto se deve à agressão à área doadora dos autoenxertos, causando alterações sensitiva e motora (Matsuyama et al., 2000).

Taylor e Ham descreveram o enxerto de nervos vascularizado, no qual artéria e veia fazem parte das anastomoses. O objetivo desta técnica é evitar isquemia nos primeiros dias da enxertia, bem como promover nutrição à área de tecido adjacente com o objetivo de melhorar o microambiente local e, conseqüentemente, a regeneração tissular (Taylor; Ham, 1976). Como exemplo de enxerto vascularizado pode-se citar a utilização do retalho anterolateral da coxa transferido juntamente com um retalho fasciocutâneo ou retalho cutâneo combinado com enxerto de nervo femoral para reconstruções simultâneas de pele e nervo periférico (Groth et al., 2014).

Embora todas essas medidas visem à melhora da regeneração nervosa, a maioria dos enxertos irão se degenerar e servirão apenas como um tubo-guia para

direcionar a regeneração do coto no sentido proximal ao distal (Panagopoulos et al., 2017).

1.5 TUBOS-GUIA

Outra alternativa utilizada para a cirurgia de LNP é a utilização de tubo-guia (TG), também chamado de neurotubo. Essa estrutura, qualquer que seja a sua origem, promove um “caminho” físico pra guiar a regeneração nervosa, como também para criar um microambiente favorável a esse processo, por concentrar fatores neurotróficos necessários ao processo de regeneração neural (Konofaos; Ver Halen, 2013).

Os tubos-guias podem ser divididos quanto a sua composição em: sintéticos (absorvíveis e não absorvíveis) e biológicos (autólogos e alógenos) (Konofaos; Ver Halen, 2013; Pabari et al., 2014).

Os tubos-guias sintéticos absorvíveis são comumente compostos por ácido poliglicólico (APG) (Costa et al., 2006). Outro material disponível para tubos-guias absorvíveis é a policaprolactona (Zhang et al., 2005). Já os materiais inabsorvíveis sintéticos para confecção de TG, são encontrados os seguintes: silicones, polietilenos, polimetilmetacrilatos, entre outros (Midha et al., 2003; Kemp et al., 2007; Longo et al., 2016).

Os tubos-guias sintéticos, independente do material de fabricação, necessitam ser embebidos em solução heparinizada para se evitar a formação de trombos no lúmen do TG. Além disso, ao serem suturados os cotos da LPN, os mesmos devem ser posicionados para que ultrapassem dois - três mm, além da neurorafia para viabilizar a fixação epineural através de fio de mononylon 8-0 ou 9-0 (Kehoe et al., 2012; Konofaos; Ver Halen, 2013).

Os TGs de origem biológica autólogos, como nervos, tem a vantagem de melhor prognóstico na regeneração neural em relação a outros tipos de tubos. A desvantagem do uso de enxertos de nervos autólogos é a perda da função sensitiva da

área doadora, além da necessidade de tratamento coadjuvante de imunossupressores (Chiu; Strauch, 1990; Mackinnon; Dellon, 1994; Lemos et al., 2008).

Já os demais enxertos autólogos biológicos, embora demonstrem resultados animadores em estudos animais, os mesmos resultados não são observados quando aplicados à prática clínica (Panagopoulos et al., 2017).

Outra alternativa para a utilização de TG biológico é o uso de veias previamente conservado em glicerol. Esta estratégia terapêutica tem como objetivo diminuir o tempo operatório e a morbidade cirúrgica. As veias preservadas em glicerol passam por um processo de fixação por desidratação, que mantém a arquitetura da veia (Richters et al, 1996; Cunha et al., 2007).

Vários estudos demonstraram as vantagens da utilização de veias invertidas (adventícia localizada no lúmen e endotélio para face externa) sobre a utilização de veias não invertidas. A adventícia interna previne a dilatação aneurismática do enxerto, tem ação antitrombótica (Benito-Ruiz et al, 1994; Wang et al., 1995; Hill et al., 2005), evita o colapso da veia, o que beneficia sua utilização como tubo guia para conectar cotos proximais e distais do nervo periférico lesado (Chiu; Strauch, 1990; Tang et al., 1993; Benito-Ruiz, 1994; Wang et al., 1995).

1.6 MEDIDAS ADJUVANTES

1.6.1 Células-tronco

Recentemente, vários estudos analisaram a utilização de células-tronco para tratamento coadjuvante à regeneração neural.

O uso de células-tronco tem como objetivos aumentar o poder de regeneração nervosa pela diferenciação das células pluripotentes em células nervosas e em células gliais, além da ação anti-inflamatória, propiciando microambiente favorável à regeneração neural (Panagopoulos et al., 2017). Porém, ainda há controvérsias em

relação ao tipo de célula-tronco utilizada, quanto ao tecido de origem dessas células-tronco e quanto ao local de sua aplicação (Fairbairn et al., 2015).

Quanto a origem das célula-tronco, elas podem ser de origem embrionária, fetal ou adultas. Células derivadas do embrião, na fase de blastocisto, tem grande potencial pluripotentes, pois podem se diferenciar em quaisquer células que se formam das três camadas embrionárias (ectodérmica, mesodérmica e endodérmica). As desvantagens do seu uso são: questões éticas, potencial tumorigênico e a dificuldade de direcionar a diferenciação das células-tronco para células nervosas (Cui et al, 2008).

Células -tronco fetais derivadas de cordão umbilical (Craff et al., 2007), da placenta (Lee et al., 2012), e da gelatina de Wharton (Panagopoulos et al., 2017) podem ser obtidas com certa facilidade, pois esses tecidos estão disponíveis no parto. As desvantagens do uso de células-tronco fetais são o risco de rejeição pelo potencial imunogênico (alógeno), transmissão de agentes virais ou proteicos (prions) (Cui et al., 2008).

Células-tronco adultas podem ser obtidas de vários tecidos, como o tecido adiposo (Panagopoulos et al., 2017), a polpa dentária (Ullah et al., 2017), o folículo piloso (Wang et al., 2018) e a medula óssea (Ramli et al., 2019).

Embora todos os tecidos supracitados tenham comprovação científica quanto a regeneração neural, a grande limitação do uso de células-tronco derivadas de polpa dentária, folículo piloso e medula óssea é a restrição de obtenção de volume do tecido doador necessário para o cultivo destas células-tronco.

Já a obtenção de tecido adiposo é facilmente coletada por procedimentos pouco invasivos e sem grandes restrições de volume, já que há abundância desse tecido no ser humano (Lopatina et al., 2011; Kingham et al., 2014; Fairbairn et al., 2015; Panagopoulos et al., 2017).

A razão da quantidade de células tronco derivadas de tecido adiposo (Adipose-Derived Stem Cells - ADSC), encontradas nos tecidos adiposos varia de 1:100 a 1:1500 de ADSC por adipócitos (Izuno; Hyakusoku, 2005). Esse valor é considerado muito superior àquele descrito para as células, como, por exemplo, as provenientes da medula óssea (Im et al., 2005).

As ADSC são a fração não flutuante que resulta da digestão enzimática do tecido adiposo, podem ser obtidas a partir do produto de lipoaspiração ou de remoção cirúrgica pela diérese do tecido adiposo. Nessa fração não flutuante estão contidos diversos tipos celulares com as células-tronco do tecido adiposo (ADSC), as células endoteliais e musculares lisas com seus progenitores e os pré-adipócitos (Tanikawa, 2013).

A atividade parácrina das ADSC cria um microambiente favorável por conter fatores que desempenham tropismo estimulando a proliferação, sinalização e interação celular, além da modulação do sistema imune e angiogênese (Assoni, 2015).

Em relação ao efeito de ADSC sobre a regeneração neural, discute-se sobre o local da aplicação dessas células-tronco. Alguns autores preconizam a injeção de células-tronco ao redor da lesão, enquanto outros grupos preconizam a aplicação de ADSC sobre a neurografia ou enxertia, e ainda existe a indicação da aplicação de ADSC dentro do tubo guia (Fairbairn et al., 2015).

Reichenberger et al. (2016) demonstraram a eficácia do uso de células-tronco (células mesenquimais derivadas de células adiposas) associada a matriz de fibrina na regeneração nervosa (aumento de axônios, mielinização e ao peso muscular). Frente a LPN, o grupo controle desse trabalho contou com sutura microcirúrgica epineural mais adição de cola de fibrina pura, já o grupo teste era de sutura microcirúrgica epineural mais adição de cola de fibrina embebida em ADSC (Reichenberger et al., 2016).

O status de diferenciação, como as células-tronco se desenvolvem, tem íntima correlação ao local alvo onde serão entregues (Fairbairn et al., 2015).

1.6.2 Estimulação elétrica

A estimulação elétrica pode ser indicada como pós-operatório. Estudos em animais demonstraram retorno da função motora ao se estimular localmente no pós-operatório imediato à reconstrução neuronal, por um tempo de uma hora, por duas

semanas. O suposto mecanismo de ação seria o estímulo da produção de mielina, aumento da liberação do fator de crescimento neural e o fator neurotrófico derivado do cérebro (NGF e BDNF) (Gordon et al., 2008).

1.6.3 Laser

Laser é outra estratégia empregada como tratamento coadjuvante no período pós-operatório. Existem estudos que avaliaram o uso de lasers térmicos e não térmicos. A primeira modalidade apresenta resultados insatisfatórios, provavelmente pelo aumento do calor, causando maior reação inflamatória local e lesão celular sobre uma estrutura lesada (Tse; Ko, 2012).

Os lasers não térmicos ou de baixa voltagem são estudados *in vivo* e *in vitro*. A análise *in vitro* demonstrou aumento dos fatores neurotrópicos e neurotróficos (BDNF, NGF, neuropeptídeo Y), contribuindo para a regeneração axonal (Radtke et al., 2009).

Henry et al. avaliaram o uso do Dye- laser pulsado, esse estímulo causa pontes covalentes de carbono que propiciam a formação de colágeno, culminando em maior proteção à anastomose. Além disso, o uso de tal técnica propicia o aumento da produção de fatores neurotrópicos e neurotróficos (Henry et al., 2009).

1.6.4 Terapia genética

O objetivo da terapia genética é de transcodificar genes que modulam a produção de fatores neurotróficos, aumento da matriz extracelular e aumento dos fatores que causam adesão intercelular.

A alteração genética é possível pela utilização de um vetor que leve ao gene nucleotídeos necessários para inserir ou inativar partes do cromossoma e, em última análise, alterar a expressão gênica. Os vetores mais utilizados são vírus (adenovírus, lentivírus, herpes vírus) atenuados que perderam a capacidade de lesão celular,

porém mantiveram a capacidade de invasão celular. A capacidade de invasão é necessária para o transporte de carga genética necessária para a reprogramação gênica do hospedeiro. Essa terapia ainda está em nível experimental (Hastie; Samulski, 2015; Panagopoulos et al., 2017).

1.7 MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Imunomoduladores são substâncias que podem exacerbar ou reduzir resposta imune, de uso tópico e ou sistêmico, para tratamento de doenças causadas por hipersensibilidades ou imunodeficiências. Elas são divididas em dois grupos básicos: o dos imunoestimuladores, que aumentam a imunidade inata e adaptativa, e o dos imunossuppressores, que diminuem a atividade do sistema imune (Lima, 2004).

O imunomodulador mais estudado é o FK506 (tacrolimus), todavia sua grande quantidade de efeitos colaterais limitam sua indicação, sendo indicado apenas em situações críticas de aloenxertia, como transplante facial (Grinsell; Keating, 2014).

Em resumo, todas essas modalidades e tratamento apresentam resultados controversos na literatura médica.

Por este motivo, este estudo tem como objetivo comparar o efeito do uso de células-tronco derivadas de adipócitos associadas à veia isogênica invertida (tubo guia) na regeneração de lesão em nervo ciático de ratos após período de 12 semanas.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de células-tronco derivadas de adipócitos em tubos-guia (veias invertidas) na regeneração do nervo ciático em ratos 12 semanas.

2.1 DESFECHO PRIMÁRIO

O desfecho primário do estudo foi a análise funcional do nervo ciático do rato – análise do walking track (WT) no período de 12 semanas após o procedimento.

2.2 DESFECHOS SECUNDÁRIOS

Os desfechos secundários foram:

- Pesos dos músculos gastrocnêmios direito (membro inferior intervenção) e esquerdo (membro inferior controle);
- Análise histomorfométrica do nervo ciático após 12 semanas do procedimento cirúrgico, número de axônios efetivo (núcleos de células de Schwann) e espessura neural – no local da intervenção cirúrgica em que os nervos ciáticos foram seccionados (regeneração do nervo periférico);
- Presença ou ausência de neuromas nos cotos proximais e distais do nervo ciático pós 12 semanas das neurorrafias microcirúrgicas.

MÉTODO

3 MÉTODO

3.1 AMOSTRA

Foram analisados 35 ratos machos isogênicos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com idades ao redor de oito semanas e com peso variando entre 200-250 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente controlado e aquecido (temperatura 24°C), ciclo dia/noite, 12/12h, água e comida *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa número 039/15. O estudo seguiu princípios éticos de pesquisa em animal segundo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/2013) (Apêndice 8.1).

Cinco animais Wistar foram utilizados a parte com a finalidade de se obter tecido gorduroso, para realização de cultura de células-tronco.

Os 30 animais restantes do estudo foram divididos em três grupos (10 animais em cada):

- grupo autoenxerto;
- grupo com veia isógena invertida conservada em glicerol;
- grupo com veia isógena invertida conservada em glicerol preenchida com células-tronco derivadas de adipócitos.

3.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE ADIPÓCITOS

Cinco animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xylazina (10 mg/Kg) por injeção via intraperitoneal. O animal foi posicionado em decúbito dorsal horizontal e as patas foram fixadas com

uso de fita crepe em uma superfície lisa própria para esse uso. A seguir, a região inguinal foi tricotomizada por aparelho de tricotomia (Pro Professional GA.MA Italy - Professional Hair Clipper).

A antissepsia foi feita com uso e clorexidine tópico a 2% (Riohex[®], Rioquímica - Brasil). Foi demarcada uma incisão diagonal (60°) de 3 cm de extensão ao longo da região inguinal do animal. Após a incisão da pele com bisturi nº 15, dissecou-se o tecido adiposo da região inguinal através do uso de tesoura de íris e pinça de Adson, sob ambiente asséptico.

O tecido adiposo de cada lado da região inguinal do animal foi removido e transferido em tubos de 50 ml, contendo 25 ml de solução tampão fosfato (PBS) suplementado com 1% de Penicilina G/Estreptomicina (P/E).

Sob fluxo laminar, os tecidos foram transferidos para uma placa de Petri e fragmentados com o auxílio de pinça de Adson e tesoura de íris em ambiente asséptico até se obter estrutura amorfa.

Para a digestão enzimática, transferiu-se o material para tubo cônico contendo quatro ml de tripsina/ EDTA (solução balanceada com tripsina sem íons, cálcio e magnésio com um agente quelante) 0,25% e colocado em banho-maria a 37°C, sob agitação vigorosa a cada cinco minutos durante 20 minutos. A inativação da tripsina foi realizada com a adição de 10 ml de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos P/E.

O material digerido foi centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos a 4 °C para obtenção do *pellet* de células. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com pipeta Pasteur. Realizou-se lavagem com dois ml de DMEM. Posteriormente, realizou-se nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em dois ml de DMEM, onde 100 µl foram utilizados para avaliação da viabilidade das células, através de contagem em câmara de Neubauer com corante vital azul de Tripán 0,4%.

Completo-se o volume da suspensão de células para cinco ml e colocou-se em garrafa plástica de 25 cm² mantida em incubadora de cultura, sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. As células foram repicadas sempre que a

confluência observada era maior que 80%. Para o descolamento das células aderidas à garrafa de cultivo, utilizou-se o método de dissociação enzimática com tripsina 0,25% por dois minutos a 37°C.

As células foram expandidas até a passagem quatro e congeladas em nitrogênio líquido a -80°C. Para o congelamento das células, o meio de cultura foi retirado e fez-se a digestão enzimática com tripsina 0,25% por 2 minutos a 37°C.

A digestão foi finalizada com DMEM e a suspensão de células centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos. Foram realizadas duas lavagens com DMEM. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 2 ml de DMEM para a contagem das células em câmara de Neubauer e posterior cálculo, para a concentração de 1×10^6 células em cada tubo criogênico.

Utilizou-se o meio de criopreservação (90% SFB e 10% dimetilsulfóxido) para a ressuspensão do *pellet* de células. Distribuiu-se a suspensão (1×10^6 células) nos tubos, devidamente identificados, colocados em freezer -80°C *overnight* e, após este período, armazenados em container de nitrogênio líquido.

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram examinadas quanto à presença de marcadores de superfície para células mesenquimais (estromais – ADSC) e quanto à vitalidade dessas células.

Para o ensaio de imunofenotipagem, na citometria o meio de cultura foi retirado das garrafas de cultura e em seguida fez-se a digestão enzimática com tripsina/EDTA 0,25% por dois minutos a 37°C. A digestão foi finalizada com DMEM suplementado com 10% SFB e a suspensão de células centrifugada a 1800 rpm por cinco minutos. Foram realizadas duas lavagens com DMEM suplementado.

Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 2 ml de DMEM para a contagem das células, utilizando-se corante azul de Tripán 0,4% em câmara de

Neubauer, para o ajuste da concentração de 1×10^6 células/ml por poço de placa de cultura com fundo em “V”.

Após a distribuição das células nas placas de cultura, realizou-se uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foi realizada lavagem com 170 μ l de tampão MACs (PBS pH 7,2; EDTA 500 mM; 2,5g albumina sérica bovina) com nova centrifugação.

Para a marcação foi adicionado tampão MACS, descontando-se o volume de anticorpo monoclonal de superfície (5 μ l para cada anticorpo), totalizando volume de 100 μ l. Foram utilizados os seguintes anticorpos (*BD Horizon*TM e *BD Pharmingen*TM):

- V450 Hamster Anti-Rat CD29 (0,2 mg/ml), PE Mouse Anti-Rat CD31 (0,2mg/ml), FITC Mouse Anti-Rat (controle positivo);
- CD44H (0,5 mg/ml) e APC-CyTM 7 Mouse Anti-Rat (controle positivo);
- CD45 (0,2 mg/ml). No poço identificado como não marcado, adicionou-se 100 μ l de tampão MACS (controle negativo);
- CD 31 (0,2 mg/ml). No poço identificado como não marcado, adicionou-se 100 μ l de tampão MACS (controle negativo).

A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens com 150 μ l de tampão MACs e centrifugação a 1800 rpm à temperatura ambiente.

As células foram ressuspensas em 200 μ l de paraformaldeído 1% e transferidas para tubos específicos para a análise no citômetro. A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo LSR Fortessa utilizando-se o programa FACS-DivaTM v 6.13 (*BD Biosciences*TM).

Um total de 10.000 eventos foram realizados no citômetro de fluxo FACSCalibur. O software Cell Quest (BD Biosciences San Jose, CA) foi utilizado para a análise dos dados que serão mensurados.

O resultado foi biomarcadores CD 31 e CD 29 com controles negativos, enquanto CD 45 e CD44 controles positivos.

3.4 CAPTAÇÃO E PREPARO DAS VEIAS

Dos 30 animais alocados neste estudo, todos os 30 ratos foram submetidos a duas cirurgias no mesmo ato operatório: extração da veia jugular direita e a lesão de nervo ciático direito. Os dois grupos que receberam as veias invertidas tratadas por glicerol foram: grupo de veia invertidas (n=10) e grupo veia invertida +ADSC (n=10).

Ao término das cirurgias dos 30 ratos, 20 veias invertidas tratadas por glicerol foram utilizadas nos grupos [veia invertidas (n=10) e grupo veia invertida +ADSC (n=10)] e 10 veias invertidas tratadas em glicerol ficaram excedentes e não foram utilizadas.

Como forma tática e cronológica no planejamento e desenvolvimento do trabalho, os 10 primeiros animais a serem operados na extração da veia jugular direita e na lesão de nervo ciático direito foram os do grupo autoenxerto de nervo (n=10). Essas 10 veias doadoras, desses 10 primeiros animais isógenos, puderam receber todo o tratamento com glicerol no período estipulado, e se tornaram adequadas para utilização posterior nos grupos em que utilizaram-nas como método intervenção de enxerto de veias isógenas no reparo microcirúrgico do nervo ciático (lado direito).

Os animais foram anestesiados com administração de cloridrato de quetamina (100 mg/kg de peso) associada a cloridrato de xylazina (10 mg/Kg de peso) por via intraperitoneal, foi realizado tricotomia anterior na região cervical (ventral). O animal foi posicionado em decúbito dorsal, e as patas foram fixadas com o uso de fita crepe em uma superfície lisa, própria para esse uso. Antissepsia foi realizada através do uso de clorexidine tópico 2% (Riohex[®], Rioquímica - Brasil) e, posteriormente, com o uso de clorexidine aquosa 0,2% (Riohex[®], Rioquímica - Brasil).

Por meio de uma incisão paramediana direita de 2 cm na região cervical (face anterior), foi exposta a veia jugular externa direita que repousa anteriormente e medial ao músculo clavotrapezóide direito e anterior/lateral ao músculo esternocleidomastoideo direito. São veias provenientes da junção das veias facial

anterior e facial posterior na base do crânio. Foram ressecadas as veias com extensão de 1 cm. Os cotos foram suturados com fio monofilamentar de náilon preto 5.0 (Ethicom®, Johnson & Johnson, NJ, EUA), e após revisão hemostática, a sutura da pele foi realizada com chuleio contínuo em fio monofilamentar de náilon preto 5.0 (Ethicom®, Johnson & Johnson, NJ, EUA) (**Figura 1**).

Todas as veias jugulares foram acondicionadas em solução de glicerol 50% e resfriadas em temperatura de quatro °C por sete dias. Após este período, foram transportadas para um tubo individualizado de glicerol com concentração de 98%. Permaneceram nessa última solução até a data das cirurgias, quando foram utilizadas como enxerto de veia isógenas.

Imediatamente antes da abordagem cirúrgica de reparação da lesão do nervo ciático dos animais, as veias usadas como tubos-guias nos grupos veias invertidas e veias invertidas +ADSC foram mantidas em solução fisiológica 0,9% por 30 minutos e, então, invertidas para que a adventícia ficasse localizada no lúmen e endotélio para face externa (**Figura 2**).

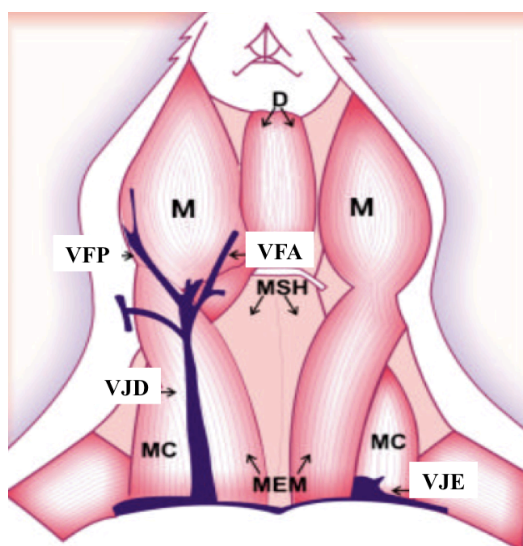


Figura 1 - Ilustração da dissecação da Veia Jugular do lado direito (VJD)

A inversão foi realizada manualmente sob magnificação pelo uso de microscópio cirúrgico (Karl Kaps D-35614 Asslar Europastrasse | made in Germany) com magnitude de 6x de ampliação. O lúmen da veia jugular direita foi cateterizado permitindo a introdução de pinça microcirúrgica angulada até a outra extremidade da veia. Na sequência, essa extremidade foi pinçada e, com auxílio de outra pinça reta microvascular foi realizado a inversão da veia jugular (Figura 3).

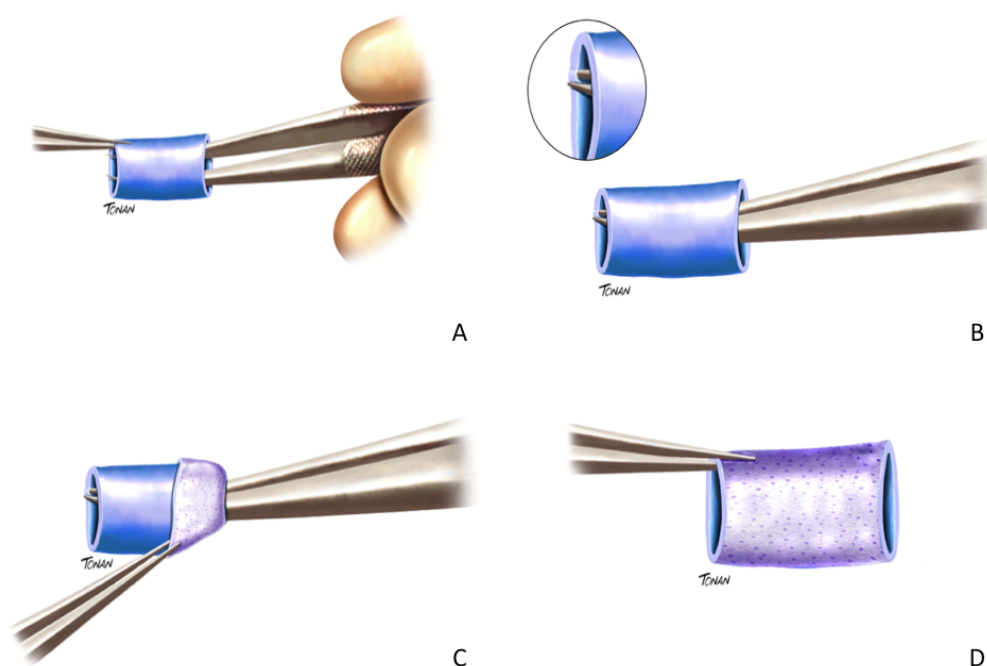


Figura 2 - Esquema do processo de inversão das veias jugulares do lado direito. **A** – introdução das duas pás da pinça vascular angulada no lúmen cateterizando a veia jugular. **B** - pinçamento da extremidade distal da veia jugular direita. **C** – inversão do lúmen da veia jugular externa com o auxílio de pinça reta microcirúrgica (manobra). **D** – aspecto final da inversão da veia jugular externa, demonstrando a localização interna da adventícia da veia e a localização externa do endotélio

3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE LESÃO NERVOSA E REPARAÇÃO CIRÚRGICA

Os procedimentos cirúrgicos com a lesão do nervo periférico e sua imediata reconstrução, bem como a avaliação clínica pós-operatória foram realizados pelo mesmo cirurgião.

Os animais foram anestesiados por administração de cloridrato de quetamina (100 mg/kg de peso) associada a cloridrato de xylazina (10 mg/Kg de peso) por via intraperitoneal.

Os ratos foram posicionados em decúbito ventral. Foi realizada tricotomia na região posterior da coxa do lado direito com uso de aparelho tricotomizador (Pro Professional GA.MA Italy - Professional Hair Clipper). A antisepsia foi realizada com o uso de clorexidine degermante 2% (Riohex[®], Rioquímica - Brasil) e, posteriormente clorexidine aquosa 0,2% (Riohex[®], Rioquímica - Brasil).

A incisão foi demarcada por uma linha transversa com extensão de três cm entre a borda lateral a medial da coxa, na altura da raiz da coxa. Foi realizada dissecação roma com tesoura de íris e os músculos glúteos e bíceps femoral foram expondo o nervo ciático.

Todos os animais foram submetidos à ressecção de cinco mm do nervo ciático, da coxa direita antes de sua bifurcação (**Figura 3**).

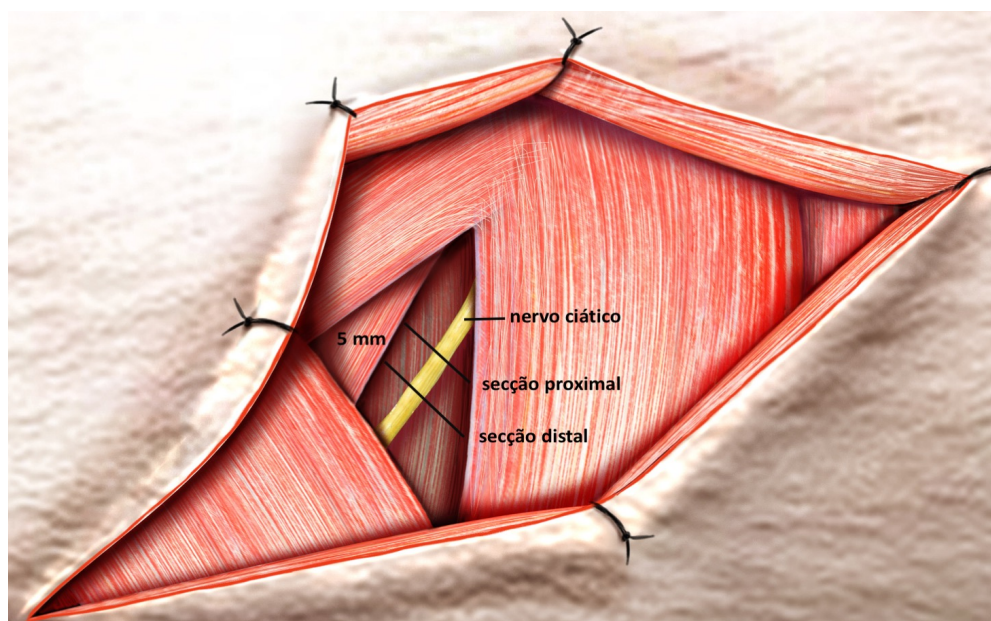


Figura 3 - Acesso cirúrgico e identificação do nervo ciático direito e secção de 5 mm do nervo (visão dorsal)

A partir dessa etapa os animais foram divididos em três grupos:

- grupo autoenxerto;
- grupo com veia isógena invertida conservada em glicerol;
- grupo com veia isógena invertida conservada em glicerol, com adição de células-tronco derivadas de adipócito.

3.5.1 Grupo enxerto de nervo

Neste grupo (n=10), os animais receberam enxerto ortotópico do mesmo segmento do nervo ciático ressecado (5 mm). Foi realizada neurorafia microcirúrgica (microscópio cirúrgico Karl Kaps D-35614 Asslar Europastrasse | made in Germany) término-terminal nos cotos proximais e distais do nervo ciático remanescente (Figura 5), com fio de náilon monofilamentado 10.0 (Ethicom[®] Johnson & Johnson, NJ, EUA), sob magnificação de seis vezes (Figura 4).

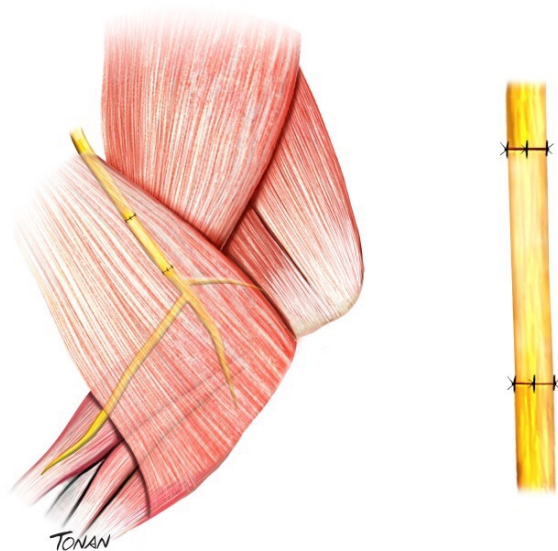
3.5.2 Grupo veia invertida tratada em glicerol

Os animais desse grupo (n=10) tiveram as veias isógenas invertidas tratadas em glicerol, interpostas entre os segmentos distal e proximal do defeito (5 mm) no nervo ciático da coxa direita | (**Figura 5**). Para a fixação desse tubo-guia nos cotos da LNP foi utilizada sutura microcirúrgicas término-terminal proximal e distal através de fio de náilon monofilamentado 10.0 (Ethicom[®] Johnson & Johnson, NJ, EUA), sob magnificação de seis vezes (**Figura 7**).

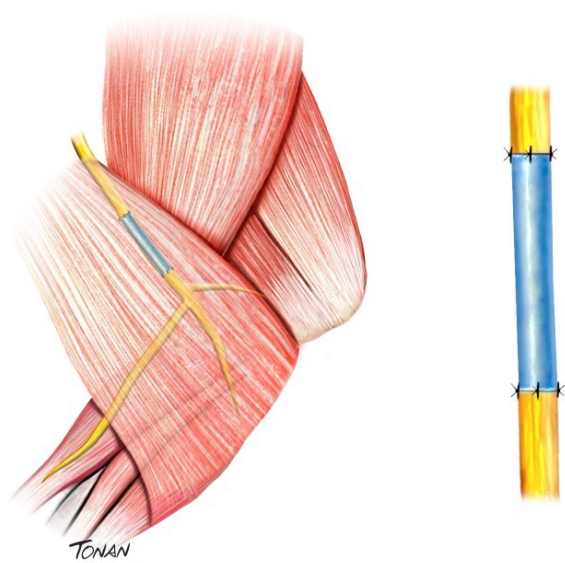
3.5.3 Grupo veia invertida tratadas em glicerol com administração de células-tronco derivadas de adipócitos

Além dos procedimentos cirúrgicos descritos anteriormente (sutura microcirúrgica do tubo-guia de veia nos cotos proximais e distais do nervo ciático), foram injetados 0,5 ml de solução contendo 10^6 de células tronco derivadas de adipócitos (ADSC) na luz das veias invertidas glicerinadas nos ratos deste grupo (n=10) (**Figuras 6 e 7**).

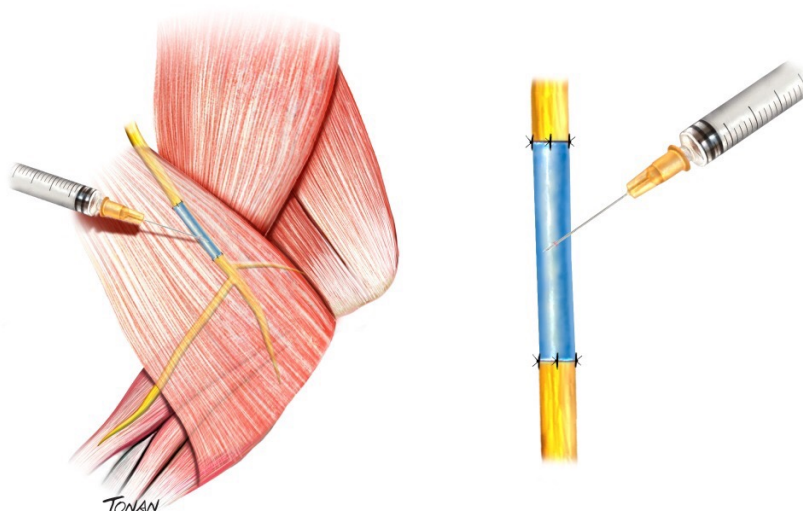
Após o término da cirurgia do nervo ciático, a incisão foi fechada com fio de náilon monofilamentado 5.0 (Ethicom[®] Johnson & Johnson, NJ, EUA) do plano muscular com pontos simples e nó invertido. A pele foi coaptada com sutura contínua ancorada de fio de náilon monofilamentado 5.0 (Ethicom[®] Johnson & Johnson, NJ, EUA).



Figuras 4 - Representação do grupo enxertia autógena de nervo. Grupo nervo



Figuras 5 - Representação do grupo veia invertida isógena conservada em glicerol. Grupo veia invertida



Figuras 6 - Representação do grupo veia invertida isógena conservada em glicerol, adicionadas com células-tronco derivadas de tecido adiposo em sua luz. Grupo veia invertida e ADSC

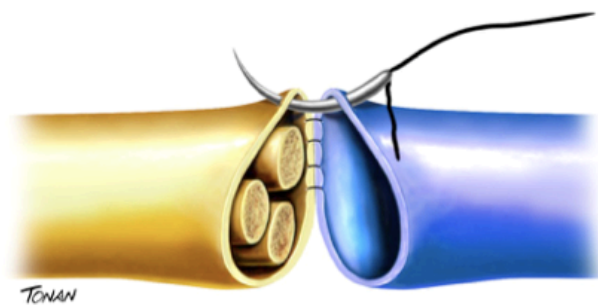


Figura 7 - Ilustração da neurografia (sutura) término-terminal entre nervo Ciático e enxerto de veia realizada nos grupos veias invertidas + glicerol e veias invertidas + glicerol + ADSC

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alocadas em ambiente aquecido (temperatura de 24°C), recebendo água e comida “*ad libitum*”. A analgesia foi realizada com injeção intramuscular de cloridrato de tramadol (10 mg/Kg de peso) a cada 12 horas, durante dois dias.

No biotério, como uma estratégia preventiva frente à situação de estresse e alteração hormonal dos animais durante o estudo experimental, foi aplicada rifocina spray (10 mg/ml) nos locais em que os roedores pudessem promover autoagressões no corpo.

3.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA

3.6.1 Avaliação funcional (método de “Walking Track Analysis”)

A avaliação funcional da regeneração do nervo ciático do rato foi realizada através do método “Walking Track” (WT), que avalia alterações de marcha, consequentes à lesão neural causadora de claudicação na pata operada.

Previamente a qualquer procedimento cirúrgico, os ratos foram treinados a andar no corredor do teste da marcha (WT) por cinco vezes (ida e volta) para que a marcha no corredor (equipamento feito de madeira) fosse algo a ser realizado facilmente pelos animais.

A marcha dos ratos foi avaliada nos seguintes tempos: pré-operatória e pós-operatória (terceira, sexta, nona e décima segunda semanas).

O equipamento de marcha foi confeccionado em madeira, medindo 13 cm de largura e 73 cm de extensão. Antes de colocar o animal em uma das extremidades, foi posicionado, no assoalho deste corredor, papel branco, nas dimensões descritas anteriormente.

Imediatamente, antes de realizar esse teste, os animais tiveram suas patas traseiras impregnadas com tinta nanquim preta e foram liberados para deambular sobre a folha de papel.

As aferições foram realizadas pelo mesmo examinador nos três grupos e nos diferentes tempos do estudo.

Foram mensuradas as seguintes medidas relativas as pegadas das patas traseiras dos animais: extensão da pegada (distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), largura da pegada (distância entre o 1º e 5º dedos) e distância entre os dedos intermediários (2º e 4º dedos) – (**Figura 8**).

Tal método permite o cálculo do Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter, tomando-se como base as seguintes variáveis: extensão da pegada largura da pegada e a distância entre os dedos intermediários (**Tabela 1**). Tendo sido realizado o WT pré-operatório em todos os animais dos grupos de estudo, foi possível obter valores para o cálculo destes basais do IFC, que serão comparados aos valores de três, seis, nove e doze semanas pós-operatório.

Tabela 1 - Fórmula para cálculo do Índice de Função Ciática (IFC)

$$\text{IFC} = -38,3 (\text{EPE}-\text{EPN}/\text{EPN}) + 109,5 (\text{LPE}-\text{LPN}/\text{LPN}) + 13,3 (\text{DDIE}-\text{DDIN}/\text{DDIN}) - 8,9$$

*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)

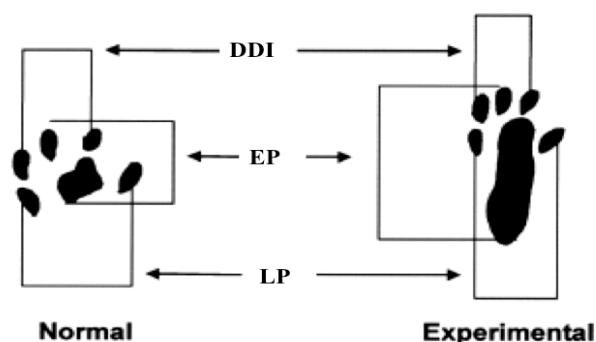


Figura 8 - Descrição do teste “walking track” do animal de experimentação (rato). EP = extensão da pegada, LP = largura da pegada e DDI = distância entre os dedos intermediários. Impressão da pegada do animal

Os valores obtidos pela fórmula (IFC) são considerados um indicativo da condição funcional do nervo ciático do rato, expresso em *déficit* funcional, sendo que zero representa a normalidade, -100 a perda total da função e variações de 0 ± 10 estão nos desvios da normalidade para a fórmula. Valores intermediários a esses indicam *déficits* parciais de função.

3.6.2 Avaliação funcional com captação e peso dos músculos gastrocnêmios

Após a 12ª semana de pós-operatório, posteriormente à realização do teste da marcha (WT) os animais foram eutanasiados. Na sequência, foram coletados os músculos gastrocnêmios do lado intervenção (direito) e do lado controle (contralateral).

O compartimento posterior da perna direita foi exposto e foram seccionado os músculos gastrocnêmios na sua inserção proximal (côndilos do fêmur) e também inserção distal (calcâneo). A seguir, os músculos (dir. e esq.) foram pesados em uma balança digital elétrica de alta precisão (Precision - PR -100 110/220 volts, Dourado Ltda).

3.6.3 Coleta dos nervos ciáticos

Na décima segunda semana de pós-operatório, após a eutanásia do animal, realizou-se incisão da região posterior da coxa direita do animal, seguindo os mesmos procedimentos realizados no ato da cirurgia de ressecção e reparação do nervo ciático. Foi realizado exérese de oito milímetros de nervo ciático, contendo as neurorrafias proximal e distal.

No lado contralateral (esquerdo), o mesmo procedimento foi realizado.

3.7 EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS

Os animais sofreram eutanásia através de superdosagem da associação dos seguintes anestésicos: cloridrato de lidocaína (150 mg/Kg de peso) e cloridrato de xylazina (10 mg/Kg de peso), por via intraperitoneal. Após alguns minutos da injeção intraperitoneal os animais foram colocados em câmara de CO₂. Após isso, as carcaças receberam as medidas necessárias para o seu descarte, conforme a cartilha de orientação de descarte de resíduo no sistema FMUSP-HC, que segue a Resolução n. 306, de 7 de dezembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, n. 358, de 29 de abril de 2005.

3.8 ANÁLISE MICROSCÓPICA

3.8.1 Histomorfometria

Nervos ciáticos foram coletados com amostra de 8 milímetros de extensão, incorporando suturas distal e proximal. No momento da coleta, a parte proximal da amostrado nervo ciático foi marcada com tinta nanquim. Os nervos foram fixados em formalina a 4% em um papel de filtro para se evitarem distorções no processamento dessas amostras.

Todo o material biológico captado foi encaminhado ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os nervos foram processados, cortados (microtomia), incluídos na parafina e, posteriormente, corados histoquimicamente por hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TRMA).

Após esse processamento histológico de inclusão, de corte e de coloração, realizado no Laboratório de Histopatologia - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as lâminas foram analisadas de maneira randomizada, pelo mesmo examinador externo ao complexo HC-FMUSP, mascarado quanto aos subgrupos.

A contagem histomorfométrica foi realizada com o uso de microscópio Nikon E200 (Nikon, EUA) e aumento 40x.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) o número de axônio efetivos (núcleos de células de Schwann);
- b) o diâmetro do nervo (mielinização) pós-regeneração neural de 12 semanas prospectivas.

Cada amostra do nervo ciático (**Figura 9**) foi avaliado pela análise de cinco cortes transversais do nervo:

- I) pré-neurorrafia proximal;
- II) inter-neurorrafias 1;

- III) inter-neurorrafias 2;
- IV) inter-neurorrafias 3;
- V) pós-neurorrafia distal.

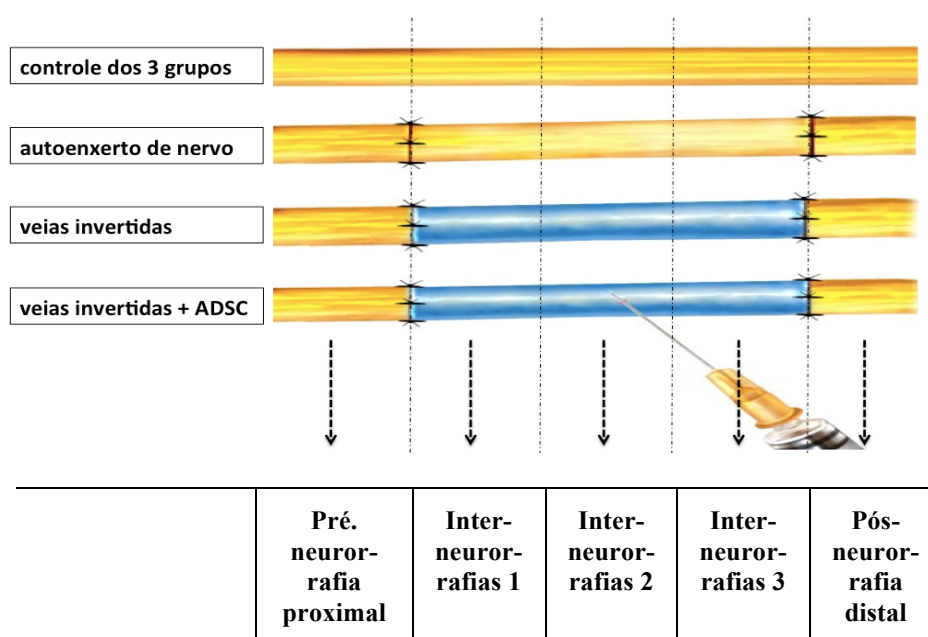


Figura 9 - Cortes transversais em cinco regiões (setas) do nervo ciático processado dos três grupos no lado direito (teste) e lado esquerdo (cont./controle): I) pré-neurorrafia proximal (corte I), II) região inter-neurorrafias 1 (corte II), III) região inter-neurorrafias 2 (corte III), IV) região inter-neurorrafias 3 (corte IV) e V) pós-neurorrafia distal (corte V). Nesses foram realizadas as análises histomorfométrica: número de axônios efetivos e diâmetro do nervo

Foram ainda estabelecidas razões entre os segmentos mais distais (pós-neurorrafia distal - cortes V) dos nervos ciáticos do lado direito (teste) com o lado contralateral dos animais (esquerdo) como um controle interno de cada grupo.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS ESTATÍSTICOS

3.9.1 Cálculo do tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra, considerando p de alfa 0.05, poder de estudo de 80%, e diferença clínica entre o grupo de controle e intervenção de 0.38 com desvio-padrão de 0.14, calcularam-se 10 animais por grupo (Erba et al., 2010).

3.9.2 Análise estatística dos dados

Os dados coletados foram descritos de acordo com a natureza e distribuição das variáveis. As variáveis numéricas foram tratadas quanto a normalidade de distribuição e variância dos dados.

As variáveis numéricas paramétricas foram descritas por meio de média e desvio padrão.

A análise inferencial foi realizada para as variáveis IFC, peso do músculo gastrocnêmio, o número de axônio efetivos (núcleos de células de Schwann) e o diâmetro do nervo (mielinização) pós-regeneração neural de 12 semanas prospectivas, e foi feita a comparação entre os grupos e entre os momentos pós-operatórios. Para realizar as comparações citadas foi utilizada a análise de variância (ANOVA), caso apresentasse significância ($p < 0,05$) foi utilizado o teste Post hoc de Bonferroni.

Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5% e o poder de estudo de 80%.

Foi utilizado um programa estatístico (SPSS versão 19.0.)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE GERAL

No período de 12 semanas em que o estudo experimental transcorreu, todos os animais se mantiveram em boas condições clínicas. Não se observou úlceras plantares neurodistróficas ou úlceras de pressão nas patas que foram submetidas ao tratamento da LNP.

Os ratos quatro e dez, do grupo autoenxerto de nervo, e os ratos um e oito, do grupo veia invertida tratada em glicerol, apresentaram comportamento de autofagia entre a terceira e a sexta semana do pós-operatório. As lesões foram em níveis superficiais, localizadas nos dedos e pés do lado operado (secção do nervo ciático). Após a observação das autoagressões, foi aplicado diariamente Rifocina spray (Rifampicina SV sódico 10 mg/ml - Aventis®) diretamente nos locais das lesões. Após alguns dias, essas lesões se repararam (quatro e dez grupo autoenxerto de nervo e um e oito grupo veia invertida + glicerol).

4.2 WALKING TRACK (WT)

No período pré-operatório, após o treinamento previsto das marchas no equipamento de madeira (corredor), o grupo autoenxerto do nervo ciático apresentou a média do IFC de $-1,619 \text{ dp} \pm 6,02$, já no grupo veia invertida glicerinada o valor médio foi de $0,035 \text{ dp} \pm 4,90$ enquanto o grupo veia invertida glicerinada + ADSC demonstrou média de $-0,098 \text{ dp} \pm 6,1$.

Os resultados dos três grupos do estudo nas semanas: três, seis, nove e doze estão demonstradas nas tabelas (**Tabelas 9, 10 e 11**).

Na **Tabela 2** foram agrupadas as médias dos IFC dos três grupos, durante as 12 semanas de seguimento prospectivo.

Com a análise estatística dos valores médios do índice de função do ciático nos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + ADSC durante 12 semanas pós-intervenções cirúrgicas, houve diferença entre os momentos, independente do grupo ($p < 0,001$) e houve diferença entre os grupos, independente do momento de avaliação ($p = 0,004$).

Pelos resultados das comparações múltiplas, nota-se que o grupo veia invertida glicerinada se diferencia dos demais grupos apresentando maiores valores do que as demais categorias. Pelo teste de Bonferroni (comparação múltipla dos grupos) se observou: dos grupos autoenxerto nervo vs veia invertida ($p 0,009$), grupos veia invertida vs veia invertida + ADSC ($p 0,012$) e autoenxerto nervo vs veia invertida + ADSC ($p > 0,999$).

Tabela 2 - Análise estatística dos valores médios do índice de função do nervo ciático nos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + ADSC nos períodos: pré-operatório, três semanas, seis semanas, nove semanas e doze semanas pós-intervenções cirúrgicas

Índice de Função Ciático	IFC pré. (média ± DP)	IFC 3 sem (média ± DP)	IFC 6 sem (média ± DP)	IFC 9 sem (média ± DP)	IFC 12 sem (média ± DP)
Autoenxerto	-1.62 ± 6.02	-86.78 ± 19.78	-74.48 ± 20.51	-64.21 ± 22.02	-60.78 ± 21.28
Veia	-0.035 ± 4.9	- 61.95 ± 13.68	-57.16 ± 17.89	-51.98 ± 17.23	-45.39 ± 12.96
Veia + ADSC	-0,098 ± 6.1	-89.08 ± 7.5	-72.14 ± 14.27	-65.69 ± 11.00	-58.03 ± 9.54

4.3 PESOS DOS MÚSCULOS GASTROCNÊMIOS

Durante o processo de coleta dos nervos ao término da décima segunda semana do estudo prospectivo, neuromas macroscópicos não foram observados no local das suturas microcirúrgicas. Os enxertos de nervos, as veias isógenas invertidas glicerinadas e as veias isógenas invertidas glicerinadas com adição de células tronco derivadas de adipócitos estavam íntegros, sem coleções ou qualquer outro indicativo de infecção loco-regional.

Os músculos do lado lesado mostraram-se mais atróficos quando comparados aos músculos gastrocnêmios do lado controle (esquerdo) ($p = 0,05$). Isso ocorreu tanto no grupo enxertia autóloga de nervo por neurografia término-terminal, quanto no grupo veia invertida conservada em glicerol com sutura microcirúrgica término-terminal entre os cotos proximal e distal do defeito, cinco mm de nervo ciático do lado direito) e também no grupo veia invertida conservada em glicerol com sutura microcirúrgica término-terminal entre os cotos proximal e distal do defeito e adição de células-tronco derivadas de adipócitos, cinco mm de nervo ciático do lado direito) (**Tabelas 3 e 8**).

Tabela 3 - Análise estatística dos três grupos. Média do peso dos músculos gastrocnêmios nos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + ADSC em grama (g) com desvio padrão (DP)

	intervenção (lado direito)	controle (lado esquerdo)
Autoenxerto	1,35 ± 0,33	2,46 ± 0,47
Veia	1,61 ± 0,37	2,41 ± 0,34
Veia + ADSC	1,11 ± 0,23	1,64 ± 0,39

Pelos resultados obtidos, nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os lados em todos os grupos, apontando maiores valores no lado esquerdo (controle) do animal ($p < 0,001$) ANOVA.

Já na comparação entre os três grupos no lado direito da intervenção no nervo ciático, não houve diferença entre os grupos. Comparação grupo autoenxerto de nervo vs veia invertida (p 0,598), grupo autoenxerto de nervo vs veia invertida +ADSC (p 0,306) e grupo veia invertida vs veia invertida + ADSC (p>0,999).

4.4 HISTOMORFOMETRIA

Na análise histomorfométrica foi quantificado por contagem manual por mesmo patologista o número de núcleos de células de Schwann (número de axônios efetivos) no lado teste (direito) e no lado controle (esquerdo). Das porções mais proximais para as mais distais, foram observadas nos três grupos do estudo reduções do número de axônios efetivos após o local da secção dos nervos ciáticos onde as neurorrafias foram realizadas. Os padrões de regeneração de nervo periférico nos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida glicerinada e veia invertida glicerinada + ADSC estão demonstrados abaixo (**Tabelas 4 e 12**).

Tabela 4 - A média do número de axônio efetivos (núcleos de células de Schwann) em cada grupo. As aferições (lâminas) foram realizadas em cinco diferentes cortes ao longo do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré. (pré-neurorrafia proximal), inter. (inter-neurorrafias) 1, inter. (inter-neurorrafias) 2, inter. (inter-neurorrafias) 3 e pós. (pós neurorrafia distal). Apresentado média (méd.) de cada um dos três grupos do estudo

Ratos (grupo)	Lado	Pré. (corte I)	Inter.1 (corte II)	Inter. 2 (corte III)	Inter. 3 (corte IV)	Pós. (corte V)
Nº. méd. controle autoenxerto	esq.	49	48	46	47	48
Nº. méd. grupo autoenxerto	dir.	164	167	160	162	143
Nº. méd. controle veia invertida	esq.	111	114	108	106	103
Nº. méd. grupo veia invertida	dir.	381	327	272	270	241
Nº. méd. controle veia invertida +ADSC	esq.	51	48	48	46	43
Nº. méd. grupo veia invertida + ADSC	dir.	153	141	135	120	111

Ao se analisar os resultados dos axônios efetivos pós-neurorrafias distais (corte V), houve diferença entre os grupos. Para estas situações foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos, apontando que o grupo veia invertida + glicerol se diferencia dos demais grupos. Comparação múltipla entre os grupos: autoenxerto de nervo vs veia invertida glicerinada ($p < 0,001$), autoenxerto de nervo vs veia invertida glicerinada + ADSC ($p = 0,725$) e veia invertida glicerinada vs veia invertida glicerinada + ADSC ($p < 0,001$).

Tabela 5 - Axônios efetivos pós-neurorrafia distal do lado direito (intervenção) comparado ao lado esquerdo (controle)

Grupos	Axônio efetivos Pós – dir.		Axônio efetivos Pós – esq.	
	média	DP	média	DP
Autoenxerto de nervo	143,80	56,21	47,80	6,32
Veia invertida +glicerol	241,00	94,84	102,90	20,51
Veia invertida + glicerol + ADSC	111,60	21,05	43,00	11,04

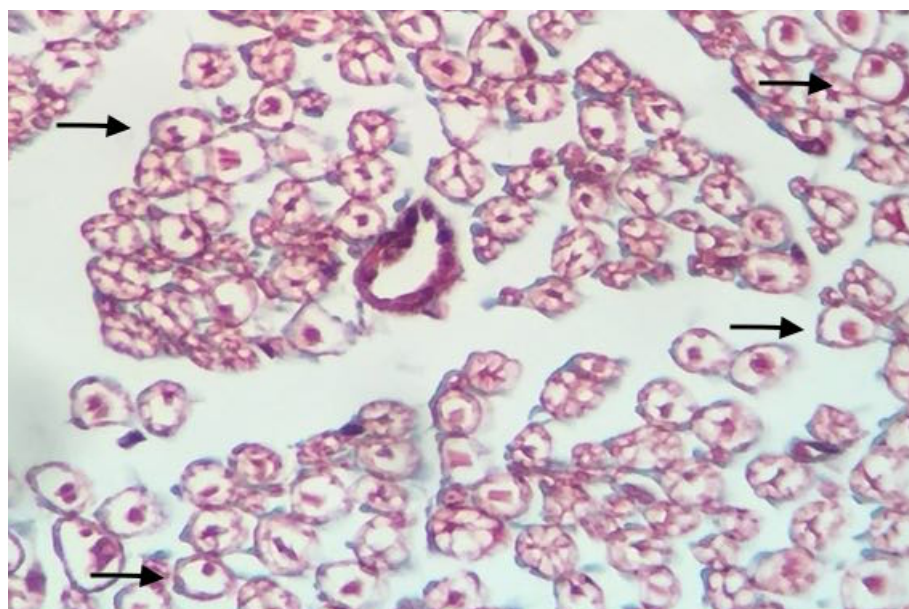


Figura 10 - Lâmina (corte transversal) com coloração Tricrômio de Masson, (400x) em microscópio Nikon E200®. Setas - axônios efetivos mielinizados com células de Schwann (núcleos) em sua periferia demonstrando regeneração neuronal

Outra variável analisada foi a espessura dos nervos em milímetros (mm) pós-regeneração neural de 12 semanas prospectivas. As aferições (lâminas histológicas) foram realizadas em cinco diferentes localizações em cortes transversais do nervo ciático dir. (direito – teste): pré (pré-neurorrafia proximal) (corte I), inter. (inter-neurorrafias) 1 (corte II), inter. (inter-neurorrafias) 2 (corte III), inter. (inter-neurorrafias) 3 (corte IV) e pós (pós-neurorrafia distal) (corte V). Foram realizadas também aferições correspondentes nos nervos do lado esquerdo (controle) de cada

animal. Nos três grupos, a análise da espessura neural foi maior nas porções proximais em comparação às porções distais. Os resultados estão demonstrados nas **Tabelas 6** (abaixo) e **13** (anexos).

Tabela 6 - Diâmetro médio do nervo em milímetro (mm) pós-regeneração (mielinização) neural após 12 semanas pós-operatória. As aferições foram realizadas em cinco diferentes cortes ao longo do comprimento do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré. (pré-neurorrafia proximal) (corte I), inter. 1 (inter-neurorrafias) 1 (corte II), inter. 2 (inter-neurorrafias) 2 (corte III), inter. 3 (inter-neurorrafias) 3 (corte IV) e pós (pós neurorrafia distal) (corte V)

Rato	Lado	Pré (corte I)	Inter. 1 (corte II)	Inter. 2 (corte III)	Inter. 3 (corte IV)	Pós (corte V)
Diâmetro méd. grupo autoenxerto de nervo	dir.	0,69	0,68	0,68	0,54	0,41
Diâmetro méd. controle autoenxerto de nervo	esq.	0,7	0,65	0,65	0,62	0,57
Diâmetro méd. grupo veia invertida + glicerol	dir.	0,61	0,61	0,61	0,44	0,46
Diâmetro méd. controle veia invertida + glicerol	esq.	0,58	0,5	0,5	0,49	0,47
Diâmetro méd. grupo veia invertida + glicerol + ADSC	dir.	0,6	0,52	0,5	0,45	0,41
Diâmetro méd. controle veia invertida + glicerol + ADSC	esq.	0,64	0,59	0,59	0,55	0,54

Na razão entre os valores dos diâmetros médios dos segmentos mais distais (cortes transversais – pós-neurorrafia distal cortes V) dos nervos ciáticos do lado direito (teste) com o lado controle dos animais (esquerdo), foram demonstrados os seguintes valores: grupo autoenxerto de nervo 0,41/0,57 (71%) de espessura do lado teste (direito) em relação ao lado controle (esquerdo) onde não ocorreram lesões no nervo ciático; grupo veia isógena invertida conservada em glicerol 0,46/0,47 (97%) e 0,41/0,54 (75%) no grupo veia invertida conservada em glicerol com adição de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

A análise do diâmetro do nervo demonstrou diferença entre os lados (esquerdo e direito), independente do grupo ($p=0,002$). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,875$) (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Diâmetro do nervo dos diferentes grupos do estudo na topografia pós-neurorrafia distal (corte V) do lado teste (direito) e comparação específica com lado esquerdo (controle). Efeito de lado ($p=0,002$) e efeito de grupo ($p=0,875$)

Grupo	Diâmetro do nervo Pós – Dir.		Diâmetro do nervo Pós – Esq.	
	média	DP	média	DP
Autoenxerto de nervo	0,041	0,014	0,057	0,014
Veia invertida + glicerol	0,047	0,011	0,047	0,007
Veia invertida + glicerol + ADSC	0,042	0,008	0,054	0,013

4.5 NEUROMAS

Foi observado no período da eutanásia (macroscópico) e análise microscópica durante a histomorfometria a ausência da formação de neuromas nos dez ratos de cada grupo do estudo.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Embora a utilização de enxerto de nervo (auto-enxertia) é considerada o padrão ouro para reparação de LNP (Kitahara et al., 2000; Colen et al., 2009), os resultados funcionais são insatisfatórios. Diante desse desafio, várias estratégias foram analisadas, como o uso de tubos-guia, células-tronco e enriquecimento do microambiente (Dahlin; Lundborg, 2001; Reid et al., 2011).

A regeneração neural depende de múltiplos fatores, como idade, comorbidades e tipo da lesão. Este estudo avaliou a regeneração do nervo ciático em ratos isogênicos após ressecção de cinco milímetros de extensão do nervo ciático, mimetizando quadro clínico de LPN no qual a sutura direta não pode ser realizada.

Optou-se pela utilização do modelo experimental (rato) pela validação deste modelo na literatura médica, pequeno porte, custos e reprodutibilidade dos dados.

Nosso grupo utilizou ratos isogênicos para minimizar a variabilidade dos dados, e diminuir qualquer efeito do sistema imunológico intraespécie.

A escolha de se utilizar lesão de nervo periférico grau V segundo classificação de Sunderland, teve como objetivo mimetizar casos graves (Sunderland, 1978) de neurotmesa de LNP.

De acordo com a revisão da literatura apresentada na introdução desta tese, nossa hipótese baseou-se no efeito da utilização de ADSC como fator benéfico à regeneração neural ao se comparar ao uso de tubos-guia vazios e tratamento padrão (neurorrafia com autoenxerto de nervo).

As ADSC possuem a capacidade de secretar fatores neurotróficos envolvidos no reparo dos tecidos nervosos. O fator de crescimento derivado de cérebro (CGF) e o fator de crescimento neural (NFG) são importantes na resposta imune e inflamatória para diferenciação em células de Schwann, reparo de nervos periféricos e alteração na densidade dos vasos sanguíneos (Trayhurn; Wood, 2004; Raimondo et al., 2011; Clauser et al., 2013).

A escolha do tubo-guia baseou-se na literatura. Alguns estudos avaliaram esse tratamento e demonstraram benefícios dos tubos-guia como fator de auxílio à regeneração da LNP. Dentre as várias possibilidades de tubos-guia, nosso grupo optou pelo uso de veia isógena invertida em glicerol. O uso de glicerol foi realizado para eliminação de proteínas imunogênicas. Com o processo químico de desidratação, há perda da parte celular das veias jugulares, porém preservação das características biomecânicas dos vasos, como a resistência e estrutura da matriz extracelular composta por colágeno e laminina (Fahner et al., 2004).

A inversão da veia jugular foi realizada como medida preventiva ao colapamento do tubo-guia, formação de trombos intra-luminais e potencialização de fatores neurotróficos do microambiente (Takahashi et al., 1988; Maldonado et al., 2017).

O desfecho primário foi a análise da função da unidade neuromuscular pelo teste de WT. Mesmo utilizando técnica não traumática, visando minimizar a perda de vascularização no local da lesão do nervo ciático, sua reparação imediata demonstrou resultado final de retorno parcial da função motora. Nunca alcançando regeneração neuronal total (Siemionow; Brzezicki, 2009; Birch et al., 2012; Goubier; Teboul, 2015; Hoyng et al., 2015).

O tempo de observação de 12 semanas foi considerado como o tempo ideal para a aferição da função da regeneração da LNP, diferente de muitos dos trabalhos que apresentam observações clínicas até a eutanásia dos animais, por um período de seis semanas (Scopel et al., 2007; Sarikcioglu et al., 2009; Costa et al., 2009; Hsueh et al., 2013). Além disso, a função neural foi seguida em intervalos de três semanas, que possibilitou observar a evolução do IFC durante esse período.

Este estudo não demonstrou aumento da função IFC do WT no grupo veia invertida glicerinada + ADSC. Porém, houve diferença significativa no grupo que utilizou como tratamento apenas a veia invertida ($p= 0,004$).

O resultado deste estudo foi similar ao apresentado por Chiu e Strauch, que demonstraram resultados funcionais com a utilização de autoenxerto de nervo, não sendo superiores aos dos tubos-guia autógenos (veias). Estudo esse que não utilizou adição de células-tronco. As maiores desvantagens das veias autógenas (não

invertidas) seriam colapamento do tubo-guia e a proliferação de tecido cicatricial na fase inflamatória dentro da luz do tubo-guia (Chiu; Strauch, 1990).

Outro desfecho analisado foi a atrofia do grupamento muscular do compartimento posterior do membro inferior do rato (músculo gastrocnêmio). Este estudo demonstrou perda ponderal no lado operado (direito) após doze semanas de cirurgia em todos os grupos do estudo: autoenxerto de nervo $1,35g \pm 0,33$, veia invertida $1,61 \pm 0,37$ e veia invertida com ADSC $1,11 \pm 0,23$. Aferindo o peso ao término das doze semanas, ficou marcante a diferença contralateral do membro inferior não operado (lado esquerdo): autoenxerto de nervo $2,46 \pm 0,57$, veia invertida $2,41 \pm 0,34$ e veia invertida com ADSC $1,64 \pm 0,39$. Diferença estatisticamente significativa entre os lados (direito/operado e esquerdo/controle) em todos os grupos, apontando maiores valores no lado esquerdo (controle) do animal ($p < 0,001$).

Para os pesos dos músculos gastrocnêmios, nos três grupos, comparativamente nenhum obteve superioridade ou inferioridade estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A análise microscópica realizada teve o objetivo de relacionar possíveis mecanismos de ação no processo regenerativo das intervenções.

Na análise macroscópica e histológica não foi observado a formação de neuromas. Provavelmente, este fato pode ser explicado pela técnica microcirúrgica pouco traumática no leito cirúrgico, mínima quantidade de corpos-estranhos e intervenção imediata à ocorrência da lesão (Seckel et al., 1986). Outro fator específico para os grupos TG (veia invertida e veia invertida + ADSC) seria a cobertura em alguns milímetros dos cotos proximais e distais no nervo ciático pela sutura do TG (Dubuisson et al., 1997).

A análise microscópica histológica utilizou a coloração por Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TRMA), que possibilitou contagem absoluta do número de axônios efetivos. Devido a localização mais central desses axônios, optou-se pela aferição de células de Schwann. Que circundam cada unidade de neurônio.

As células de Schwann, por ficarem ao redor de cada axônio, não sofrem o efeito do preparo. Portanto, para a escolha mais precisa da contagem de axônios efetivos foi optado pela aferição do número de células de Schwann (núcleos).

Nas análises dos resultados histomorfométricos do número de axônios efetivos pós-neurorrafia distal, houve diferenças entre os grupos. Os valores médios no grupo de veias invertidas glicerinadas foram $241 \pm 94,84$ (dp), enquanto no grupo autoenxerto de nervos foi $143,80 \pm 56,21$ (dp) e $111,60 \pm 21,05$ (dp) no grupo veia invertidas glicerinadas + ADSC. Comparação múltipla entre os grupos: autoenxerto de nervo vs veia invertida glicerinada ($p < 0,001$), autoenxerto de nervo vs veia invertida glicerinada + ADSC ($p = 0,725$) e veia invertida glicerinada vs veia invertida glicerinada + ADSC ($p < 0,001$).

Nessa análise (número de axônios efetivos pós neurorrafias), o método intervenção (veias invertidas tratadas com glicerol) quando comparado ao padrão-ouro de enxertias de nervos autógenos e também ao grupo de veia invertida + glicerol + ADSC apresentou superioridade na regeneração nas lesões de nervos periféricos que não podem ser suturadas primariamente.

Keskin et al., demonstraram a utilização dos tubos-guia de veias favorável à regeneração nervosa atuando como uma câmara biológica localizada entre os cotos proximais e distal da LPN (Wang et al., 1995; Keskin et al., 2004; Tos et al., 2012). A composição bioquímica do microambiente local é de fundamental importância para o processo de regeneração (Ayhan et al., 2000; Dahlin; Lundborg, 2001). O fluido citoplasmático (axoplasma) dos axônios seccionados contendo fatores neurotróficos é sintetizado e secretado a partir dos cotos do nervo lesado, e é preservado pelas paredes das veias que levam ao seu acúmulo no lúmen em altas concentrações (Demirkan et al., 1995; Meek; Coert, 2002). Por essas razões, acreditamos que a utilização dos TG de veias invertidas é superior em eficiência à utilização do autoenxerto de nervo para o tratamento de LNP.

Quanto a espessura do nervo ciático regenerado, houve diminuição progressiva nos três grupos do estudo no sentido proximal para o distal. Do sistema nervoso central (cérebro ou medula) em suas vias aferentes para as placas neuromusculares (motor) ou receptores sensitivos na pele (sensibilidade), os nervos

periféricos se apresentam dessa forma (Siemionow; Brzezicki, 2009; Mohammadi et al., 2011; Birch et al., 2012; Goubier; Teboul, 2015). Nenhum dos três grupos do estudo demonstraram diferenças estatísticas de superioridade ($p=0,875$).

Um diâmetro maior do nervo periférico, que é interpretado como mais mielinização e eficiência axonal superior na condução dos impulsos nervosos, pode ser apenas brotamento terminal nesse segmento regenerado. Portanto, muitas vezes há uma superestimação do número de fibras funcionais e grau de mielinização nas análises histológicas. Isso posto, as evidências histomorfométricas e eletrofisiológicas da regeneração do nervo periférico podem não se correlacionar com a recuperação funcional motora e ou sensitiva nos animais (Valero Cabré; Navarro, 2002; Nichols et al., 2005). Acreditamos que análises funcionais oferecem a maneira mais inequívoca de demonstração que um nervo periférico não apenas regenerou, mas também fez conexões úteis com os órgãos terminais.

Análises macro (WT) e microscópicas (número de axônios efetivos pós neurografia distal) demonstraram aumento da função motora e da regeneração neural no grupo submetido a inclusão do tubo-guia (veias invertidas glicerinadas) após 12 semanas da cirurgia.

Embora alguns autores (Ning et al., 2006; Wei et al., 2009) demonstraram bons resultados para diferenciar em neurônios na regeneração neural quando a LNP foi tratada com célula tronco (ADSC), este estudo não demonstrou tais resultados. Como hipótese, a baixa regeneração neural do grupo tratado com a injeção de ADSC foi baseada no estudo de Papalia et al. Segundo Papalia et al., a injeção de ADSC dentro do lumen do tubo-guia pode causar oclusão intraluminal consumindo nutriente e oxigênios e, conseqüentemente, prejudicando a regeneração neural (Papalia et al., 2013).

Ainda não há um consenso sobre o efeito da terapia de células tronco, no caso ADSC, sobre a regeneração e diferenciação dos tecidos nervosos (Santiago et al., 2009; Tomita et al., 2013).

O entendimento total dos mecanismos de direcionamento da diferenciação das células nervosas, frente a utilização de células-tronco (Cui et al., 2008) não foi elucidado.

Existem limitações neste estudo. Técnicas mais precisas para medir a função motora, como a eletromiografia, enriqueceriam os achados do trabalho experimental. Próximas investigações devem incorporar testes eletromiográficos. O uso de biomarcadores para células neurais (neurônios) regeneradas que possuem a mais alta acurácia diagnóstica imuno-histoquímica também deve ser inserido em futuras pesquisas.

O estudo não atingiu resultados motores funcionais totais. Para os resultados que foram demonstrados nos três grupos testes propostos, as LPN(s) permaneceram apresentando resultados funcionais parciais. O crescimento neuronal pós-lesional ideal deve ser observado com perfeita justaposição axonal entre porções proximais e distais (Valero-Cabré; Navarro, 2001; Navarro; Foxe., 2016) e um orquestramento quimiotáxico e neurotróficos, provavelmente imuno-modulado (Fairbairn et al., 2015) que, na atualidade, ainda não é reproduzível na medicina.

No trabalho experimental, a utilização de veia invertida glicerinada é sugerida como opção que pode substituir os enxertos de nervos autógenos. Resultados funcionais e histomorfométricos melhores, somados a vantagem de não causar déficit sensitivos e ou motores nas áreas doadoras, sustentam essa afirmação. Como etapas futuras à linha de pesquisa atual, um ensaio clínico deve ser desenvolvido.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Esse estudo sugeriu que o uso de ADSC não gerou melhores resultados na regeneração de nervo periférico quando comparado aos outros dois grupos do estudo (enxerto de nervo autógeno e veias invertidas isógenas tratadas em glicerol sem ADSC).

As utilizações de veias invertidas, conservadas em glicerol, como tubos-guia, podem servir como substitutos dos enxertos de nervos autógenos. Apresentam resultados funcionais e histomorfométricos melhores, somados a vantagem de não causar déficit sensitivos e ou motores nas áreas doadoras.

Lesões de nervos periféricos permaneceram apresentando resultados funcionais parciais aos métodos de intervenções propostos no trabalho.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Tabela de peso dos músculos gastrocnêmios

Tabela 8 - Pesos (g) dos músculos gastrocnêmios dos ratos dos grupos autoenxerto de nervo, veia invertida + glicerol e veia invertida + glicerol + células-tronco derivadas de adipócitos (ADSC)

	gastrocnêmio dir.	gastrocnêmio esq.
rato 1 autoenxerto nervo	1.04	2.36
rato 2 autoenxerto nervo	0.8	1.9
rato 3 autoenxerto nervo	1.26	2.76
rato 4 autoenxerto nervo	1.5	2.4
rato 5 autoenxerto nervo	1.6	2.9
rato 6 autoenxerto nervo	1.23	2.4
rato 7 autoenxerto nervo	1.5	2.79
rato 8 autoenxerto nervo	1.9	3.05
rato 9 autoenxerto nervo	1.59	2.56
rato 10 autoenxerto nervo	1.04	1.5
máx. (autoenxerto nervo)	1.9	3.05
min. (autoenxerto nervo)	0.8	1.5
média (autoenxerto nervo)	1.36	2.462
rato 1 veia invertida	1.53	3.19
rato 2 veia invertida	1.72	2.79
rato 3 veia invertida	1.04	2.2
rato 4 veia invertida	0.7	2.2
rato 5 veia invertida	1.03	2.45
rato 6 veia invertida	1.41	2.22
rato 7 veia invertida	0.91	2.37
rato 8 veia invertida	1.2	2.41
rato 9 veia invertida	1.46	2.27
rato 10 veia invertida	0.61	2.05
máx. (veia invertida)	1.72	3.19
min. (veia invertida)	0.61	2.05
média (veia invertida)	1.61	2.415
rato 1 veia invertida + ADSC	1.36	2.17
rato 2 veia invertida + ADSC	0.88	1.58
rato 3 veia invertida + ADSC	0.74	1.08
rato 4 veia invertida + ADSC	0.9	1.08
rato 5 veia invertida + ADSC	1.23	1.47
rato 6 veia invertida + ADSC	1.33	1.95
rato 7 veia invertida + ADSC	1.23	1.9
rato 8 veia invertida + ADSC	0.99	1.35
rato 9 veia invertida + ADSC	1.39	1.73
rato 10 veia invertida + ADSC	1.03	2.05
máx. (veia invertida + ADSC)	1.39	2.17
min. (veia invertida + ADSC)	0.74	1.08
média (veia invertida + ADSC)	1.108	1.636

Anexo B – Tabela de desempenho dos IFC(s)**Tabela 9 -** Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter calculado após teste de walking-track dos ratos do grupo autoenxerto nervo no pré-operatório e nas três, seis, nove e doze semanas de pós-operatória

Grupo autoenxerto (IFC)	pré.	3 sem.	6 sem.	9 sem.	12 sem.
rato 1 autoenxerto nervo	-1,48	-63,51	-63,51	-71,8	-67,97
rato 2 autoenxerto nervo	-8,6	-46,23	-93,86	-88,7	-61,64
rato 3 autoenxerto nervo	-1,48	-96,36	-77,21	-68,76	-75,88
rato 4 autoenxerto nervo	6,72	-70,25	-91,36	-77,15	-45,78
rato 5 autoenxerto nervo	-9,93	-97,69	-43,03	-46,86	-53,98
rato 6 autoenxerto nervo	-0,94	-101,52	-39,11	-14,5	-9,39
rato 7 autoenxerto nervo	8,68	-100,19	-72,21	-66,26	-77,21
rato 8 autoenxerto nervo	-0,94	-105,35	-92,53	-48,57	-60,85
rato 9 autoenxerto nervo	-7,27	-89,78	-95,03	-82,75	-82,75
rato 10 autoenxerto nervo	-0,94	-96,9	-76,96	-76,17	-72,34
mín.(grupo autoenxerto nervo)	-9,93	-105,35	-95,03	-88,7	-82,75
máx.(grupo autoenxerto nervo)	8,68	-46,23	-39,11	-14,5	-9,39
méd.(grupo autoenxerto nervo)	-1,618	-86,778	-74,481	-64,152	-60,779

Tabela 10 - Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter calculado após teste de walking-track dos ratos do grupo veia invertida + glicerol no pré-operatório e nas três, seis, nove e doze semana de pós-operatória.

Grupo veia invertida (IFC)	pré.	3 sem.	6 sem.	9 sem.	12 sem.
rato 1 veia invertida	5,93	-52,02	-51,23	-51,3	-48,57
rato 2 veia invertida	-5,56	-73,92	-61,64	-49,9	-48,57
rato 3 veia invertida	-4,23	-57,02	-67,97	-57,02	-54,52
rato 4 veia invertida	6,72	-47,24	-47,24	-48,57	-43,41
rato 5 veia invertida	-2,27	-48,57	-55,69	-55,69	-55,69
rato 6 veia invertida	2,89	-62,18	-17,05	-15,72	-14,39
rato 7 veia invertida	6,18	-62,18	-60,85	-44,74	-39,58
rato 8 veia invertida	-2,27	-75	-62,18	-51,86	-40,91
rato 9 veia invertida	-0,94	-52,02	-59,68	-58,35	-46,07
rato 10 veia invertida	-6,1	-89,4	-88,07	-86,74	-62,18
min.(grupo veia invertida)	-6,1	-89,4	-88,07	-86,74	-62,18
máx.(grupo veia invertida)	6,72	-47,24	-17,05	-15,72	-14,39
média (grupo veia invertida)	0,035	-61,955	-57,16	-51,989	-45,389

Tabela 11 - Índice de Função Ciática (IFC) de Bain-Mackinnon-Hunter calculado após teste de walking-track dos ratos do grupo veia invertida + glicerol + ADSC no pré-operatório e nas três, seis, nove e doze semana de pós-operatória

Grupo veia invertida +ADSC (IFC)	pré.	3 sem.	6 sem.	9 sem.	12 sem.
rato 1 veia invertida +ADSC	-2,27	-84,08	-76,42	-64,03	-56,48
rato 2 veia invertida +ADSC	5,39	-96,36	-56,64	-54,41	-44,36
rato 3 veia invertida +ADSC	-2,27	-99,02	-81,49	-74,89	-52,56
rato 4 veia invertida +ADSC	-4,23	-76,96	-74,46	-61,53	-58,35
rato 5 veia invertida +ADSC	-8,06	-81,42	-49,9	-49	-49,9
rato 6 veia invertida +ADSC	9,22	-91,11	-89,24	-73,56	-73,13
rato 7 veia invertida +ADSC	6,72	-91,9	-51,23	-53,62	-49,9
rato 8 veia invertida +ADSC	-6,1	-98,48	-79,87	-70,52	-70,09
rato 9 veia invertida +ADSC	-4,77	-86,74	-85,41	-83,18	-67,43
rato 10 veia invertida +ADSC	5,39	-84,78	-75,76	-72,23	-60,85
min. (grupo veia invertida +ADSC)	-8,06	-99,02	-89,24	-83,18	-73,13
máx.(grupo veia invertida +ADSC)	9,22	-76,96	-49,9	-49	-44,36
média (grupo veia invertida +ADSC)	-0,098	-89,56	-71,62	-64,97	-58,02

Anexo C – Histomorfometria

Tabela 12 - O número de axônio efetivos (núcleos de células de Schwann). As aferições (lâminas) foram realizadas em cinco diferentes localizações do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré (pré-neurorrafia proximal) – corte I, inter. (inter-neurorrafias 1) – corte II, T.G. inter. (inter-neurorrafias 2) – corte III, inter. (inter-neurorrafias 3) – corte IV e pós (pós-neurorrafia distal) – corte V. Apresentado valores mínimos (mín.), máximos (máx) e média (méd) de cada um dos três grupos do estudo

Rato	Pré. (neurorrafia proximal) – corte I						inter. (neurorrafias 1) – corte II						inter. (neurorrafias 1) – corte III						inter. (neurorrafias 1) – corte IV						Pós. (neurorrafia distal) – corte V					
	Lado	Pré. (neurorrafia proximal) – corte I	inter. (neurorrafias 1) – corte II	inter. (neurorrafias 1) – corte III	inter. (neurorrafias 1) – corte IV	Pós. (neurorrafia distal) – corte V	Lado	Pré. - corte I	Inter. - corte II	Inter. - corte III	Inter. - corte IV	Pós. - corte V	Lado	Pré. - corte I	Inter. - corte II	Inter. - corte III	Inter. - corte IV	Pós. - corte V	Lado	Pré. - corte I	Inter. - corte II	Inter. - corte III	Inter. - corte IV	Pós. - corte V						
1 autoenxerto nervo	dir.	107	161	191	207	212	esq.	53	51	55	58	61	dir.	107	161	191	207	212	esq.	53	51	55	58	61						
2 autoenxerto nervo	dir.	212	256	242	117	112	esq.	67	60	56	48	51	dir.	212	256	242	117	112	esq.	67	60	56	48	51						
3 autoenxerto nervo	dir.	250	245	207	222	240	esq.	42	55	56	51	48	dir.	250	245	207	222	240	esq.	42	55	56	51	48						
4 autoenxerto nervo	dir.	129	117	113	127	71	esq.	42	47	36	38	41	dir.	129	117	113	127	71	esq.	42	47	36	38	41						
5 autoenxerto nervo	dir.	139	141	138	134	122	esq.	48	45	48	49	45	dir.	139	141	138	134	122	esq.	48	45	48	49	45						
6 autoenxerto nervo	dir.	152	121	117	147	97	esq.	51	45	37	41	43	dir.	152	121	117	147	97	esq.	51	45	37	41	43						
7 autoenxerto nervo	dir.	116	128	97	120	113	esq.	44	50	56	51	48	dir.	116	128	97	120	113	esq.	44	50	56	51	48						
8 autoenxerto nervo	dir.	226	220	213	242	206	esq.	42	56	46	48	43	dir.	226	220	213	242	206	esq.	42	56	46	48	43						
9 autoenxerto nervo	dir.	143	122	136	157	148	esq.	45	39	51	48	43	dir.	143	122	136	157	148	esq.	45	39	51	48	43						
10 autoenxerto nervo	dir.	148	120	135	122	117	esq.	46	38	32	41	55	dir.	148	120	135	122	117	esq.	46	38	32	41	55						
máx autoenxerto nervo	dir.	250	256	242	242	240	esq.	67	60	56	58	61	dir.	250	256	242	242	240	esq.	67	60	56	58	61						
mín autoenxerto nervo	dir.	107	117	97	117	71	esq.	42	38	32	38	41	dir.	107	117	97	117	71	esq.	42	38	32	38	41						
méd autoenxerto nervo	dir.	164	167	160	162	145	esq.	49	48	46	47	48	dir.	164	167	160	162	145	esq.	49	48	46	47	48						
1 veia invertida	dir.	480	380	325	271	340	esq.	170	180	125	145	150	dir.	480	380	325	271	340	esq.	170	180	125	145	150						
2 veia invertida	dir.	420	350	340	221	232	esq.	155	118	137	87	111	dir.	420	350	340	221	232	esq.	155	118	137	87	111						
3 veia invertida	dir.	402	367	360	340	320	esq.	130	114	107	110	95	dir.	402	367	360	340	320	esq.	130	114	107	110	95						
4 veia invertida	dir.	451	364	372	463	392	esq.	86	97	89	113	90	dir.	451	364	372	463	392	esq.	86	97	89	113	90						
5 veia invertida	dir.	341	327	147	273	270	esq.	115	117	120	108	101	dir.	341	327	147	273	270	esq.	115	117	120	108	101						
6 veia invertida	dir.	350	320	242	237	230	esq.	140	135	140	127	120	dir.	350	320	242	237	230	esq.	140	135	140	127	120						
7 veia invertida	dir.	310	213	134	104	91	esq.	78	84	77	81	97	dir.	310	213	134	104	91	esq.	78	84	77	81	97						
8 veia invertida	dir.	415	400	320	325	202	esq.	86	90	90	78	85	dir.	415	400	320	325	202	esq.	86	90	90	78	85						
9 veia invertida	dir.	301	280	207	135	112	esq.	78	96	117	98	102	dir.	301	280	207	135	112	esq.	78	96	117	98	102						
10 veia invertida	dir.	323	317	322	309	221	esq.	65	81	79	83	78	dir.	323	317	322	309	221	esq.	65	81	79	83	78						
máx veia invertida	dir.	480	400	372	463	392	esq.	170	180	140	145	150	dir.	480	400	372	463	392	esq.	170	180	140	145	150						
mín veia invertida	dir.	301	213	134	104	91	esq.	65	81	77	78	78	dir.	301	213	134	104	91	esq.	65	81	77	78	78						
méd veia invertida	dir.	381	327	272	270	241	esq.	111	114	108	106	104	dir.	381	327	272	270	241	esq.	111	114	108	106	104						

continua

Tabela 12 O número de axônio efetivos (núcleos de células de Schwann). As aferições (lâminas) foram realizadas em cinco diferentes localizações do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré (pré-neurorrafia proximal) – corte I, inter. (inter-neurorrafias 1) – corte II, T.G. inter. (inter-neurorrafias 2) – corte III, inter. (inter-neurorrafias 3) – corte IV e pós (pós-neurorrafia distal) – corte V. Apresentado valores mínimos (mín.), máximos (máx) e média (méd) de cada um dos três grupos do estudo (conclusão)

Rato	Lado	Pré. (neurorrafia proximal) – corte I	T.G. inter. (neurorrafias 1) – corte II	T.G. inter. (neurorrafias 1) – corte III	T.G. inter. (neurorrafias 1) – corte IV	Pós. (neurorrafia distal) – corte V	Lado	Pré. - corte I	Inter. - corte II	Inter. - corte III	Inter. - corte IV	Pós. - corte V
1 veia invertida +ADSC	dir.	210	200	179	111	105	esq.	53	51	50	57	48
2 veia invertida +ADSC	dir.	213	158	150	148	143	esq.	42	52	48	61	57
3 veia invertida +ADSC	dir.	138	121	118	107	97	esq.	48	46	50	53	47
4 veia invertida +ADSC	dir.	136	139	114	110	111	esq.	32	41	37	48	62
5 veia invertida +ADSC	dir.	131	129	126	132	64	esq.	66	78	65	42	41
6 veia invertida +ADSC	dir.	129	121	118	116	119	esq.	60	55	51	42	38
7 veia invertida +ADSC	dir.	141	128	137	112	129	esq.	48	53	32	48	29
8 veia invertida +ADSC	dir.	121	117	122	107	110	esq.	45	20	45	28	27
9 veia invertida +ADSC	dir.	138	128	147	131	121	esq.	69	45	67	40	39
10 veia invertida +ADSC	dir.	156	138	121	114	117	esq.	48	46	32	54	42
máx veia invertida +ADSC	dir.	213	200	179	148	143	esq.	66	78	67	61	62
mín veia invertida +ADSC	dir.	121	117	114	107	64	esq.	32	20	32	28	27
méd veia invertida +ADSC	dir.	153	141	135	120	110	esq.	51	48	48	46	43

Tabela 13 - Diâmetro do nervo em centímetros (cm) pós-regeneração (mielinização) neural de 12 semanas pós-operatório. As aferições (lâminas) corresponderam aos cortes realizados em cinco diferentes localizações do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré (pré-neurorrafia proximal) – corte I, inter. (inter-neurorrafias 1) – corte II, inter (inter-neurorrafias 2) – corte III, inter. (inter-neurorrafias 3) – corte IV e pós (pós- neurorrafia distal) – corte V. Apresentado valores mínimos (mín.), máximos (máx.) e média (méd.) de cada um dos três grupos

Rato	Lado	Pré. (neurorrafia proximal) – corte I	Inter. (neurorrafias 1) – corte II	Inter. (neurorrafias 1) – corte III	Inter. (neurorrafias 1) – corte IV	Pós. (neurorrafia distal) – corte V	Lado	Pré. - corte I	Inter. - corte II	Inter. - corte III	Inter. - corte IV	Pós. - corte V
1 autoenxerto nervo	dir	0,05	0,05	0,05	0,03	0,03	esq	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06
2 autoenxerto nervo	dir	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	esq	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
3 autoenxerto nervo	dir	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	esq	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07
4 autoenxerto nervo	dir	0,07	0,07	0,07	0,06	0,04	esq	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06
5 autoenxerto nervo	dir	0,09	0,08	0,08	0,06	0,05	esq	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06
6 autoenxerto nervo	dir	0,07	0,07	0,07	0,05	0,05	esq	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04
7 autoenxerto nervo	dir	0,07	0,08	0,08	0,03	0,03	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
8 autoenxerto nervo	dir	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	esq	0,06	0,04	0,04	0,05	0,05
9 autoenxerto nervo	dir	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03	esq	0,1	0,1	0,1	0,1	0,07
10 autoenxerto nervo	dir	0,1	0,1	0,1	0,08	0,06	esq	0,1	0,1	0,1	0,1	0,08
máx. autoenxerto nervo	dir	0,1	0,1	0,1	0,1	0,06	esq	0,1	0,1	0,1	0,1	0,08
mín. autoenxerto nervo	dir	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	esq	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
méd. autoenxerto nervo	dir	0,06	0,06	0,06	0,05	0,04	esq	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05
1 veia invertida	dir	0,07	0,08	0,08	0,05	0,06	esq	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05
2 veia invertida	dir	0,05	0,05	0,05	0,03	0,05	esq	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05
3 veia invertida	dir	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
4 veia invertida	dir	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	esq	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
5 veia invertida	dir	0,06	0,06	0,06	0,04	0,04	esq	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04
6 veia invertida	dir	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	esq	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04
7 veia invertida	dir	0,07	0,07	0,07	0,05	0,05	esq	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
8 veia invertida	dir	0,07	0,06	0,06	0,05	0,04	esq	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04
9 veia invertida	dir	0,06	0,06	0,06	0,03	0,03	esq	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
10 veia invertida	dir	0,05	0,06	0,06	0,04	0,04	esq	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
máx. veia invertida	dir	0,07	0,08	0,08	0,06	0,06	esq	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
mín. veia invertida	dir	0,05	0,05	0,05	0,03	0,03	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
méd. veia invertida	dir	0,06	0,06	0,06	0,04	0,04	esq	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04

continua

Tabela 13 - Diâmetro do nervo em centímetros (cm) pós-regeneração (mielinização) neural de 12 semanas pós-operatório. As aferições (lâminas) corresponderam aos cortes realizados em cinco diferentes localizações do nervo ciático dir. (direito – teste) e esq. (esquerdo – controle): pré (pré-neurorrafia proximal) – corte I, inter. (inter-neurorrafias 1) – corte II, inter (inter-neurorrafias 2) – corte III, inter. (inter-neurorrafias 3) – corte IV e pós (pós- neurorrafia distal) – corte V. Apresentado valores mínimos (mín.), máximos (máx.) e média (méd.) de cada um dos três grupos (conclusão)

Rato	Lado	Pré. (neurorrafia proximal) –	Inter. (neurorrafias 1) –	Inter. (neurorrafias 1) –	Inter. (neurorrafias 1) –	Pós. (neurorrafia distal) –	Lado	Pré. - corte I	Inter. - corte II	Inter. - corte III	Inter. - corte IV	Pós. - corte V
		corte I	corte II	corte III	corte IV	corte V						
1 veia invertida +ADSC	dir	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
2 veia invertida +ADSC	dir	0,06	0,04	0,04	0,04	0,05	esq	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
3 veia invertida +ADSC	dir	0,06	0,05	0,05	0,02	0,04	esq	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
4 veia invertida +ADSC	dir	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
5 veia invertida +ADSC	dir	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
6 veia invertida +ADSC	dir	0,06	0,06	0,06	0,05	0,04	esq	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04
7 veia invertida +ADSC	dir	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	esq	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
8 veia invertida +ADSC	dir	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	esq	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07
9 veia invertida +ADSC	dir	0,08	0,07	0,06	0,06	0,05	esq	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06
10 veia invertida +ADSC	dir	0,08	0,06	0,06	0,06	0,04	esq	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07
máx. veia invertida +ADSC	dir	0,08	0,07	0,06	0,06	0,05	esq	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07
mín. veia invertida +ADSC	dir	0,05	0,04	0,04	0,02	0,03	esq	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
méd. veia invertida +ADSC	dir	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	esq	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, Von Holst H. Incidence of Traumatic Peripheral Nerve Injuries and Amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology*. 2009;32:217-28.

Assoni AF. *Characterization of the secretome of multipotent mesenchymal stromal cells from various tissue*. São Paulo: Faculdade de Biologia, Universidade de São Paulo; 2015.

Ayhan S, Yavuzer R, Latifoglu O, Atabey K. Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Reconstr Microsurg*. 2000;16:371.

Benito-Ruiz J, Navarro-Monzonis A, Piqueras A, Baena-Montilla P. Invaginated vein graft as nerve conduit: an experimental study. *Microsurg*. 1994;15(2):105-15.

Birch R, Misra P, Stewart MP. Nerve injuries sustained during warfare: part I. Epidemiology. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(4):523-8.

Bittner GD, Sengelaub DR, Trevino RC, Peduzzi JD, Mikesch M, Ghergherehchi CL, Schallert T, Thayer WP. The curious ability of polyethylene glycol fusion technologies to restore lost behaviours after nerve severance. *J Neurosci Res*. 2016;94(3):207-30.

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.

Clauser L, Tieghi R, Palmieri A, Carinci F. Adipose-derived stem cells secrete neurotrophic factors. *Ann Oral Maxillofac Surg*. 2013;1(2):12.

Colen KL, Choi M, Chiu DT. Nerve grafts and conduits. *Plast Reconstr Surg.* 2009; 124(6):386-94.

Costa MP, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras.* 2006;14:25-9.

Costa MP, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP, Costa HJZR, Ferreira MC. Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervo periférico. *Acta Ortop Bras.* 2009;17(5):286-90.

Craff MN, Zeballos JL, Johnson TS. Embryonic stem cell-derived motor neurons preserve muscle after peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(1):235-45.

Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, Yu SP. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve re- pair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells.* 2008;26(5):1356-65.

Cunha AS, Lemos SPS, Silva CFD, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. The use of glycerol -treated venous graft in damaged nerves repair: an experimental study in rats. *Acta Ortop Bras.* 2007;15(4):210-3.

Davis G, Curtin CM. Management of pain in complex nerve injuries. *Hand Clin.* 2016;32(2):257-62.

Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin North Am.* 2001;12:341.

Demirkan F, Snyder CC, Latifoglu O, Siemionow M. A method of enhancing regeneration of conventionally repaired peripheral nerves. *Ann Plast Surg.* 1995;34:67.

Dubuisson AS, Foidart-Dessalle M, Reznik M, Grosdent JC, Stevenaert A. Pre degenerated nerve allografts versus fresh nerve allografts in nerve repair. *Exp Neurol*. 1997;148(1):378-87.

Erba P, Mantovani C, Kalbermatten DF, Pierer G, Terenghi G, Kingham PJ. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010; 63(12):811-7.

Fahner PJ, Idu MM, Legemate DA. Morphological and functional alterations in glycerol preserved rat aortic allografts. *Int j Artif Organs*. 2004;27:979-89.

Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Winograd JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: a review of current opinion. *World J Stem Cells*. 2015;7(1):11-26.

Gartner LP, Hiatt JL. Tratado de Histologia em cores. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 205-8.

Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int*. 2014;1-13.

Gordon T, Brushart TM, Chan KM. Augmenting nerve regeneration with electrical stimulation. *Neurol Res*. 2008;30(10):1012-22.

Goubier JN, Teboul F. Grading of nerve injury. *Academis Pres*. 2015;2(38):603-10.

Groth AK, Silva ABD, Maluf Junior I, Ono MCC, Faris NA, Chociai AN. A versalidade do retalho anterolateral da coxa em reconstruções oncológicas: série de casos do serviço de cirurgia plástica reconstrutora e microcirúrgica do Hospital Erasto Gaertnera. *Rev Bras Cir Plást*. 2014;29(1):176-8.

Hastie E, Samulski RJ. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success. A personal perspective. *Hum Gene Ther.* 2015;26(5):257-65.

Henry FP, Goyal NA, David WS. Improving electrophysiologic and histologic outcomes by photochemically sealing amnion to the peripheral nerve repair site. *Surgery.* 2009;145(3):313-21.

Hill BB, Farugi RM, Arko FR, Zarins CK, Fogarty TJ. "Over-the-wire" inversion saphenectomy: a simple, minimally invasive vein harvesting technique for arterial bypass. *J Endovasc Ther.* 2005;12(3):394-400

Hoyng SA, Winter F, Tannemaat MR, Blits B, Malessy MJA, Verhaagen J. Gene therapy and peripheral nerve repair: a perspective. *Front Mol Neurosci.* 2015;15(8):32.

Hsueh YY, Chang YJ, Lee JW, Wu CC, Lin SC. Use of induced neural precursor cells from adipose-derived stem cells with chitosan conduit to repair peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(4S-1):53.

Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(10):845-53.

Izuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch.* 2005;70(4):300-6.

Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury.* 2012;43(5):553-72.

- Kemp SW, Walsh SK, Zochodne DW, Midha R. A novel method for establishing daily in vivo concentration gradients of soluble nerve growth factor (NGF). *J Neurosci Methods*. 2007;165:83-8.
- Keskin M, Akbas H, Uysal OA, Canan S, Ayyildiz M, Agar E, Kaplan S. Enhancement of nerve regeneration and orientation across a gap with a nerve graft within a vein conduit graft: a functional, stereological, and electrophysiological study. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113(5):1372-79.
- Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*. 2014;23:741-54.
- Kitahara AK, Nishimura Y, Shimizu Y, Endo K. Facial nerve repair accomplished by interposition of collagen nerve guide. *J Neurosurg*. 2000;93:113-20.
- Kline DG, Nulsen FE. The neuroma in continuity. Its preoperative and operative management. *Surg Clin North Am*. 1982;52(5):1189-209.
- Komuro T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol (Berl)*. 1990;182(2):103-12.
- Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg*. 2013;29(3):149-64.
- Lee EJ, Xu L, Kim GH. Regeneration of peripheral nerves by transplanted sphere of human mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2012;33(29):7039-46.
- Lemos SPS, Hayashi I, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa MP, Marcus Castro FE. Nervo alógeno conservado em glicerol: estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras*. 2008;16(3):133-7.

- Lima HC. Imunologia clínica dos imunomoduladores. In: Lima HC, ed. *Tópicos em Imunodermatologia Clínica*. São Paulo; Segmento Farma; 2004. p.121-32.
- Longo MVL, Faria JCM, Isaac C, Nepomuceno AC, Teixeira NH, Gemperli R. Comparison 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.
- Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, Pavlova G, Parfyonova Y, Tkachuk V. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One*. 2011;6:178-99.
- Lundborg G. Nerve injury and repair: a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst*. 2003;8(4):209-26.
- Mackinnon SE, Dellon AL. Nerve reconstruction with glycerol-preserved allogenic grafts in the rat. *Microsurgery*. 1994;15(6):446-7.
- Maldonado AA, Bishop A, Spinner RJ, Shin AY. Five operations that give the best results after brachial plexus injury. *Plast Reconstr Surg*. 2017;140(3):545-56.
- Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, Constantin G, Bedogni G, Bedogni A, Bonetti B. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(11-12):1264-72.
- Martinez de Albornoz P, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N. Non-surgical therapies for peripheral nerve injury. *Br Med Bull*. 2011;100:73-100.
- Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol Med Chir*. 2000;40:187-99.

Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2002;18:97.

Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*. 2013;29:317-30 .

Midha R. Epidemiology of brachial plexus injuries in a multitrauma population. *Neurosurgery*. 1997;40:1182-9.

Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg*. 2003;99:555-65.

Milesi H. The operative repair of transected peripheral nerves. *Langenbecks Arch Surg*. 1972;332:347-54.

Millesi H. Progress in peripheral nerve reconstruction. *World J Surg*. 1990;14(6):733-47.

Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini, K. Functional recovery of sciatic nerve through inside-out vein graft in rats. *Chin J Traumatol*. 2011;14(1):46-52.

Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007;82(4):163-201.

Navarro X, Foxe J. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *Eur J Neurosci*. 2016;43(3):271-87.

Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res*. 2005;163:143-58.

Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation*. 2006;74:510-8.

Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*. 1998;45(1):116-22.

Nunley JA. Donor nerves for grafting. In: Gelberman RH. *Operative nerve repair and reconstruction*. Philadelphia: JB Lippincott; 1991. p. 545-52.

Pabari A, Lloyd-Hughes H, Seifalian AM, Mosahebi A. Nerve conduits for peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(6):1420-30.

Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. The present and future for peripheral nerve regeneration. *Orthopedics*. 2017;40(1):141-56.

Papalia I, Raimondo S, Ronchi G, Magaouda L, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Repairing nerve gaps by vein conduits filled with lipoaspirate-derived entire adipose tissue hinders nerve regeneration. *Ann Anat*. 2013;153(3):225-30.

Radtke C, Kocsis JD, Vogt PM. Transplantation of olfactory ensheathing cells for peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:405-15.

Raimondo S, Fornaro M, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. *Ann Anat*. 2011;193:334-40.

Ramli K, Aminath Gasim I, Ahmad AA, Hassan S, Law ZK, Tan GC, Baharuddin A, Naicker AS, Htwe O, Mohammed Haflash NH, Idrus R, Abdullah S, Ng MH. Human bone marrow-derived MSCs spontaneously express specific Schwann cell markers. *Cell Bio Int*. 2019;43(3):233-52.

Reichenberger MA, Mueller W, Hartmann J, Diehm Y, Lass U, Koellensperger E, Leimer U, Germann G, Fischer S. ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model. *Microsurgery*. 2016;36(6):491-500.

Reid AJ, Sun M, Wiberg M, Downes S, Terenghi G, Kingham PJ. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience*. 2011;199:515-22.

Richters CD, Hoekstra MJ, van Barre J, du Pont JS, Kamperdijk EW. Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. *Burns*. 1996;22:113-6.

Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000;23(6):863-73.

Salomon D, Miloro M, Kolokythas A. Outcomes of immediate allograft reconstruction of long-span defects of the inferior alveolar nerve. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;74:2507-14.

Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2381-90.

Santiago LY, Clavijo-Alvarez J, Brayfield C, Rubin JP, Marra KG. Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair. *Cell Transplant*. 2009;18:145-58.

Sarikcioglu L, Demirel MB, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol*. 2009;68(1):1-7.

Scopel GP, Faria JCM, Busnardo FF, Alves HRN, Orpheu SC, Ferreira MC. Hematoma intraneural experimental em ratos: avaliação da recuperação funcional e histomorfometria neural. *Acta Ortop Bras*. 2007;15(4):222-6.

Seckel BR, Ryan SE, Gagne RG. Target- specific nerve regeneration through a nerve guide in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1986;78:793.

Seddon HJ. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg*. 1947;35(138):151-67.

Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:141-72.

Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*. New York: Churchill Livingstone; 1978.

Takahashi M, Statou T, Hashimoto S. Experimental in vivo regeneration of peripheral nerve axons and perineurium guided by resorbable film. *Acta Patol Jpn*. 1988;38:1489-502.

Tang JB, Gu YG, Song YS. Repair of digital nerve defect, with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2. *J Hand Surg*. 1993;18:449-53.

Tanikawa DXS. Ensaio clínico randomizado sobre o uso de enxerto autógeno de gordura suplementado com células estromais derivadas do tecido adiposo para a reconstrução de partes moles faciais em pacientes portadores de microssomia craniofacial [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg*. 1976;57(4):413-25.

Temple CLF, Ross DC, Dunning CE, Johnson JA. Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: an in vitro biomechanical assessment of techniques. *J Reconstr Microsurg*. 2004;20(8):645-50.

- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194(1):1-14.
- Tos P, Battiston B, Ciclamini D, Geuna S, Artiaco S. Primary repair of crush nerve injuries by means of biological tubulization with muscle vein combined grafts. *Microsurgery.* 2012;32:358-63.
- Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K. Differentiated adipose-derived stem cells promote cutaneous nerve regeneration in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(2):501-2.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004;92(3):347-55.
- Tse R, Ko JH. Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin.* 2012;28(4):529-40.
- Ullah I, Park JM, Kang YH, Byun JH, Kim DG, Kim JH, Kang DH, Rho GJ, Park BW. Transplantation of human dental pulp-derived stem cells or differentiated neural cells from human dental pulp-derived stem cells identically enhances regeneration of the injured peripheral nerve. *Stem Cells Dev.* 2017;26(17):1247-57.
- Valero Cabré A, Navarro X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res.* 2001;919:302-12.
- Valero Cabré A, Navarro X. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *J Neurotrauma.* 2002;19:1475-85.
- Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1995;16(2):65-70.

Wang Y, Pan J, Wang D, Liu J. The use of stem cells in neural regeneration: a review of current opinion. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):608-17.

Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, Tan J, Lee WH, Hampel H, Dodel R, Johnstone BH, March KL, Farlow MR, Du Y. The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem Cells*. 2009;27:478-88.

Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;72:156-65.

Zochodne DW. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17(1):1-18.

APÊNDICES

8 APÊNDICE

8.1 Apêndice - Carta de liberação - CEUA



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº **039/15** intitulado: **"Efeito da adição de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo em conduto de veia na reconstrução do nervo ciático: estudo experimental"** que utilizará **40** animais da espécie **rato**, apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: **Rolf Gemperli**

Pesquisador (a) Executante: **Pedro Smaniotto**

CEUA-FMUSP, 25 de Março de 2015

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