

**Isanio Vasconcelos Mesquita**

**Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional  
e enxerto de nervo preservado a frio**

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

**Programa de Ortopedia e Traumatologia  
Orientador: Prof. Dr. Rames Mattar Júnior**

**São Paulo**

**2017**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mesquita, Isanio Vasconcelos

Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional e enxerto de nervo preservado a frio / Isanio Vasconcelos Mesquita -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Rames Mattar Junior.

Descritores: 1.Nervo ciático/transplante 2.Ratos Wistar 3.Transplante autólogo/métodos 4.Transferência de nervo/métodos 5.Degeneração neural/fisiopatologia 6.Regeneração nervosa/fisiologia 7.Sobrevivência de enxerto 8.Criopreservação

USP/FM/DBD-262/17

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Aldenora e Isanio, que sempre entregaram toda sua vida, seu amor e seus esforços aos filhos, pais maravilhosos, fontes de inspiração e exemplos de afeto, integridade, força e perseverança, os verdadeiros responsáveis por esta tese.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Rames Mattar Júnior, pela amizade, orientação, ensinamentos, confiança e pelo exemplo de profissional e ser humano muito acima da média, alguém que nos faz crescer e crer em um mundo melhor, e que sempre acreditou que este sonho poderia ser realizado.

Aos Professores Doutores Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, Olavo Pires de Camargo e Gilberto Luís Camanho, Titulares do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, grandes incentivadores da formação acadêmica e sua disseminação em todo o país, pela oportunidade e apoio.

Ao Professor Doutor Marcelo Rosa de Rezende, exemplo de caráter, integridade e dedicação profissional, pelos ensinamentos desde o início de minha formação profissional em Cirurgia de Mão, e pela grande contribuição a este trabalho, atuando como um co-orientador, com total disponibilidade e empenho.

Aos Professores Doutores Nougá Cardoso Batista e Bárbara Olímpia Ramos de Melo, respectivamente Reitor e Vice-reitora da Universidade Estadual do Piauí, pelo integral apoio à qualificação dos seus docentes, possibilitando a concretização de tantos ideais, entre os quais este, e ampliando assim os horizontes da pesquisa científica em toda região de abrangência da referida Instituição de Ensino Superior.

Ao Professor Doutor Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Diretor do Instituto de Biologia e Chefe do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual de Campinas, exemplo de dedicação à ciência, educação e apoio aos aprimorandos, por ter contribuído com valiosas orientações e por ter aberto todas as portas do Laboratório de Regeneração Nervosa, autorizando a utilização da aparelhagem do Catwalk®, sem a qual este trabalho não poderia ter sido viabilizado, agradecimento extensivo a toda a equipe daquele laboratório.

Ao Professor Doutor Gustavo Ferreira Simões, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela amizade e pelo apoio fundamental nas avaliações funcionais, com integral dedicação, auxiliando gentilmente as classificações das marchas, interpretações dos dados, e elaboração dos gráficos dos dados do sistema Catwalk® e transmitindo seus conhecimentos de forma generosa, em uma contribuição de extrema importância para esta tese.

Ao Dr. Ricardo Ferreira, médico anestesista do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela prestativa colaboração na realização dos potenciais evocados.

À Professora Doutora Consuelo Junqueira Rodrigues, do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações das análises histomorfométricas e pela captação das imagens de microscopia.

À doutora Noemi Nosomi Taniwaki, Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz, pelas orientações e colaboração no preparo do material histológico.

À bióloga Simone Kneip Cavalheiro, do Setor de Anatomia Patológica (Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético – LIM 41) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela dedicação e apoio na obtenção das medidas e análises histomorfológicas.

Ao Professor Doutor Raul Bolliger Neto, médico do Grupo de Ombro e do Laboratório de Biomecânica (Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético – LIM 41) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas valiosas orientações nas análises estatísticas, recebendo-nos sempre com muita prestatividade e competência.

A César Augusto Martins Pereira, Tecnólogo do Laboratório de Biomecânica (Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético – LIM 41) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo imprescindível e eficiente apoio na tabulação de dados, nas análises estatísticas e interpretação dos resultados, com disponibilidade, solicitude e empenho.

A Luiz Augusto Ubirajara Santos, Responsável Técnico pelo Banco de Tecidos do Sistema Músculo-Esquelético do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações sobre a criopreservação de tecidos.

A Rodrigo Tonan, ilustrador da área médica, pela competência e sensibilidade para reproduzir adequadamente, através de desenhos manuais, a técnica operatória utilizada nesta pesquisa.

A Tomaz Puga Leivas, Engenheiro Chefe do Laboratório de Biomecânica (Laboratório de Investigação Médica do Sistema Músculo-Esquelético LIM-41) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo suporte técnico na elaboração e execução desta tese.

A Henry Dan Kiyomoto, que forneceu competente auxílio no cálculo amostral e análises estatísticas.

Ao médico veterinário Gustavo Bispo dos Santos, vice-diretor do Laboratório de Microcirurgia Experimental do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio nas viagens a Campinas para análises funcionais da marcha e auxílio no manuseio dos animais.

A todos os funcionários do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho, em especial às funcionárias Tânia Borges, Rosana Costa, Andressa da Costa Santos Souza, Maria do Carmo e Jane Donini.

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

“A maior virtude é reconhecer o valor dos pequenos gestos e das pessoas que estão ao nosso lado no dia a dia, que sabem demonstrar verdade nas atitudes, perdoar os erros, prevenir as quedas, secar as lágrimas, incentivar as realizações, multiplicar os sorrisos e compartilhar os momentos”.

Arthur Conan Doyle



## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou 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. 3ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Nomes das estruturas anatômicas baseados na *Nomina Anatômica*, 5ed. Rio de Janeiro, 1984.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5ed., 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº6583/2008.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Lista de figuras	
Listas de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	8
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Degeneração/regeneração axonal e evolução dos métodos utilizados na reparação nervosa periférica .....	11
3.2 Conservação a frio e criopreservação de enxertos.....	21
3.3 Métodos de avaliação da regeneração nervosa periférica.....	30
4 MÉTODOS.....	39
4.1 Casuística e cálculo da amostra.....	40
4.2 Técnica cirúrgica.....	43
4.3 Análises funcionais.....	54
4.4 Análises eletrofisiológicas.....	60
4.5 Análises histomorfométricas.....	63
4.6 Análises estatísticas.....	68
5 RESULTADOS.....	71
5.1 Resultados das análises funcionais.....	71
5.1.1 Tabelas das análises funcionais.....	71

5.1.2 Gráficos das análises funcionais.....	76
5.2 Resultados das análises eletrofisiológicas.....	81
5.2.1 Tabelas das análises eletrofisiológicas.....	81
5.2.2 Gráficos das análises eletrofisiológicas.....	83
5.3 Resultados das análises histomorfométricas.....	90
5.3.1 Tabelas das análises histomorfométricas.....	90
5.3.2 Gráficos das análises histomorfométricas.....	92
5.3.3 Imagens representativas das análises histomorfométricas.....	95
5.4. Complicações.....	97
6 DISCUSSÃO.....	99
7 CONCLUSÕES.....	126
8 ANEXOS.....	128
9 REFERÊNCIAS.....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	marca registrada
%	porcentagem
° C	graus Celsius
µm	micrômetro
µm <sup>2</sup>	micrômetro ao quadrado
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro ao quadrado
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNTF	fator neurotrófico ciliar
et al.	e outros
GDNF	fator neurotrófico derivado de células gliais
HCV	vírus da hepatite C
HE	hematoxilina-eosina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HTLV	vírus T-linfotrófico humano

Hz	hertz
IB-UNICAMP	Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular do tipo 1
Inc	Incorporation
IOT-HC-FMUSP	Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
kg	quilograma
KHz	quilohertz
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Ltda	limitada
m	músculo
M	mol
mA	miliAmpere
MAD	membro anterior direito
MAE	membro anterior esquerdo
mg	miligrama
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibility complex)
mm	milímetros
mM	milimol
MPD	membro posterior direito
MPE	membro posterior esquerdo
ms	milissegundos

m/s	metros por segundo
mv	microvolts
NA	número de axônios
NGF	fator de crescimento neural
NT-3	neurotrofina 3
NT-4	neurotrofina 4
PCL	policaprolactona
pH	potencial Hidrogeniônico
pós-op	pós-operatório
pré-op	pré-operatório
S.A.	Sociedade Anônima
U.S.A.	United States of America

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscópio e Laboratório de Microcirurgia utilizados nos procedimentos....	43
Figura 2 - Desenho esquemático do acesso cirúrgico para o nervo ciático direito de ratos (A) e exposição do nervo ciático proximalmente à sua trifurcação (B).....	44
Figura 3 - Nervo ciático dissecado (A) e medida dos níveis de neurotomia (B).....	45
Figura 4 - Desenho esquemático da localização da secção proximal do nervo ciático.....	45
Figura 5 - Desenho esquemático da ancoragem dos cotos proximal e distal em plano submuscular.....	46
Figura 6 - Desenho esquemático da localização das secções proximal e distal para retirada do enxerto.....	47
Figura 7 - Enxerto colhido (grupo 2) (A), marcado em seu coto proximal com um ponto epineural (B).....	48
Figura 8 - Desenho esquemático mostrando a retirada do enxerto nos grupos 2 e 4, marcação no coto proximal e encaminhamento para conservação a frio.....	49
Figura 9 - Solução Celsior® e tubo plástico para colocação do enxerto.....	50

Figura 10 - Desenho esquemático da secção distal, inversão e sutura do enxerto convencional (grupos 1 e 3).....	51
Figura 11 - Dissecção dos cotos seccionados na cirurgia anterior, aguardando regularização das bordas e enxertia (grupo 2).....	52
Figura 12 - Nervo pós-resfriamento de 50 dias, notar coloração mais clara (A), reexertado no animal do grupo 4 de onde foi retirado (B).....	52
Figura 13 - Enxertia pós-resfriamento do nervo (grupo 2).....	53
Figura 14 - Desenho esquemático mostrando a enxertia invertida pós resfriamento (grupos 2 e 4).....	53
Figura 15 - Fase 1 do treinamento funcional: esteira com velocidade controlada.....	55
Figura 16 - Fase 2 do treinamento funcional: maquete para marcha livre.....	55
Figura 17 - Sistema catWalk® XT versão 9,1 (A), que fornece parâmetros dinâmicos da marcha do animal (B).....	57
Figura 18 - Calibração da aparelhagem conforme padrões orientados pelo sistema catWalk®.....	58



Figura 19 - Rato posicionado no sistema catWalk®. Observar marcação do animal na cauda.....	59
Figura 20 - Marcha classificada, com tabela final dos parâmetros (A) e imagens das pegadas do MAD (não operado) e do MPD (operado) (B).....	60
Figura 21 - Eletromiógrafo de quatro canais utilizado na obtenção do potencial evocado.....	61
Figura 22 - Animal preparado para obtenção do potencial evocado motor (A), mostrando no detalhe eletrodos inseridos na musculatura de um membro.....	62
Figura 23 - Registro do potencial evocado em valores e gráficos pelo eletromiógrafo (grupo 1- rato 5).....	63
Figura 24 - Procedimento para coleta de material 60 dias pós-enxertia (grupo 4). Notar bom aspecto do nervo regenerado (seta).....	64
Figura 25 - Axônios corados com azul de metileno após regeneração em objetiva de imersão (X100).....	66
Figura 26 - Uma das interfaces do programa KS300 3.0 da Zeiss utilizado para contagem e medida de área dos axônios corados com azul de metileno. Aumento: 100X, unidade: micrometro ( $\mu\text{m}$ ), distância X: 50 $\mu\text{m}$ , distância Y: 40 $\mu\text{m}$ , escala X: 0.0957854 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , escala Y: 0.0956938 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e proporção: 1.00096. Área total da foto: 3.123,7 $\mu\text{m}^2$ .....	67

Figura 27 - Axônios do grupo 1, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 1, campos 5 e 1, respectivamente).....	95
Figura 28 - Axônios do grupo 2, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 3, campos 5 e 2, respectivamente).....	96
Figura 29 - Axônios do grupo 3, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 4, campos 3 e 3).....	96
Figura 30 - Axônios do grupo 4, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 3, campos 1 e 1).....	96
Figura 31 - Dois casos de autofagia.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 1: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)..... 71

Tabela 2 - Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 2: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)..... 72

Tabela 3 - Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 3: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)..... 72

Tabela 4 - Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 4: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)..... 73

Tabela 5 - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 1: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema)..... 73

Tabela 6 - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 2: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema).....74

Tabela 7 - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 3: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema).....74

Tabela 8 - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 4: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema).....75

Tabela 9 - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 1 aos 60 dias após a enxertia.....81

Tabela 10 - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 2 aos 60 dias após a enxertia.....82

Tabela 11 - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 3 aos 60 dias após a enxertia.....82

Tabela 12 - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 4 aos 60 dias após a enxertia.....83

Tabela 13 - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 1 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina).....90

Tabela 14 - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 2 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina).....90

Tabela 15 - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 3 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina).....91

Tabela 16 - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 4 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina).....91

Tabela 17 - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do coto proximal do enxerto pré-resfriamento e pós-resfriamento no grupo 2 (soma de 5 campos aleatórios por lâmina).....92

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 2 (média e erro padrão).....	76
Gráfico 2 - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 3 (média e erro padrão).....	76
Gráfico 3 - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 2 e 4 (média e erro padrão).....	77
Gráfico 4 - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 3 e 4 (média e erro padrão).....	77
Gráfico 5 - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada - visão geral em todos os grupos (média e erro padrão).....	78
Gráfico 6 - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 2 (média e erro padrão).....	78
Gráfico 7 - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 3 (média e erro padrão).....	79

Gráfico 8 - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 2 e 4 (média e erro padrão).....	79
Gráfico 9 - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 3 e 4 (média e erro padrão).....	80
Gráfico 10 - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada em todos os grupos (média e erro padrão).....	80
Gráfico 11 - Latência do músculo tibial anterior esquerdo por grupos (média e erro padrão).....	83
Gráfico 12 - Amplitude do músculo tibial anterior esquerdo por grupos (média e erro padrão).....	84
Gráfico 13 - Latência do músculo gastrocnêmio esquerdo por grupos (média e erro padrão).....	84
Gráfico 14 - Amplitude do músculo gastrocnêmio esquerdo por grupos (média e erro padrão).....	85
Gráfico 15 - Latência do músculo tibial anterior direito por grupos (média e erro padrão).....	85

Gráfico 16 - Amplitude do músculo tibial anterior direito por grupos (média e erro padrão).....	86
Gráfico 17 - Latência do músculo gastrocnêmio direito por grupos (média e erro padrão).....	86
Gráfico 18 - Amplitude do músculo gastrocnêmio direito por grupos (média e erro padrão).....	87
Gráfico 19 - Latência do músculo tibial anterior dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão).....	87
Gráfico 20 - Amplitude do músculo tibial anterior dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão).....	88
Gráfico 21 - Latência do músculo gastrocnêmio dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão).....	88
Gráfico 22 - Amplitude do músculo gastrocnêmio dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão).....	89
Gráfico 23 - Soma das amplitudes dos músculos tibial anterior e gastrocnêmio dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão).....	89



Gráfico 24 - Número de axônios proximais e distais por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão).....92

Gráfico 25 - Área proximal e distal dos axônios mielinizados por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão).....93

Gráfico 26 - Índice de regeneração por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão).....93

Gráfico 27 - Índice de mudança de área por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão).....94

Gráfico 28 - Área dos axônios mielinizados do enxerto pré e pós-resfriamento de 14 dias - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão).....94

Gráfico 29 - Área dos axônios mielinizados do enxerto pré e pós-resfriamento de 14 dias - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão).....95

## RESUMO

Mesquita IV. Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional e enxerto de nervo preservado a frio [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

**INTRODUÇÃO:** A reparação das lesões de nervos periféricos com perda extensa de substância, onde a sutura direta não é viável, ainda apresenta nos dias atuais resultados variáveis e dependentes de diversos fatores. O tratamento mais comumente utilizado nestes casos é a auto-enxertia de nervos, com sacrifício de um nervo de outra região do corpo, procedimento que, entretanto, pode trazer algumas dificuldades e consequências. Desta forma, a busca por novas técnicas, como a possibilidade de utilização de nervos preservados em baixas temperaturas, representa um avanço inestimável no campo da reparação de lesões nervosas. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi realizar avaliações funcionais, eletrofisiológicas e histomorfométricas que permitam comparar a regeneração nervosa autógena em enxerto convencional versus enxerto preservado a frio, em modelo experimental de ratos, após denervação a fresco ou conservação de um segmento do nervo em baixa temperatura por 14 dias e por 50 dias. **MÉTODOS:** Foram utilizados 20 ratos Wistar de peso e idades aproximadamente iguais, divididos em quatro grupos de cinco animais. Os grupos 1 e 3 serviram de controle respectivamente para os grupos 2 e 4, utilizando enxertia de nervo convencional por 14 dias (grupo 1) e por 50 dias (grupo 3). O grupo 2 utilizou enxertia de nervo preservado a 4 graus Celsius em solução Celsior® por 14 dias, enquanto o grupo 4 foi submetido à preservação a frio na mesma solução por 50 dias. Foram realizadas análises funcionais da marcha, análises de potenciais evocados e análises histomorfométricas dos animais em diversos momentos. As análises funcionais utilizaram uma aparelhagem própria para estudo da marcha em pequenos animais de experimentação, denominada catWalk®, que fornece medidas estáticas e dinâmicas da marcha, com parâmetros como a pressão em relação à pata contralateral e a área máxima da impressão plantar do animal, tendo sido captados os dados antes do procedimento de retirada do enxerto e após a realização da enxertia, neste último caso com avaliações quinzenais até que tenham sido completados 60 dias de pós-

operatório. As análises de potenciais evocados motores analisaram a latência e a amplitude dos estímulos nervosos e foram realizadas 60 dias após os procedimentos de enxertia. As análises microscópicas observaram a contagem de axônios mielinizados e a área destas fibras nervosas nas regiões proximal e distal aos reparos, aos 60 dias após os procedimentos, comparando também as relações entre a região distal e proximal de cada um destes parâmetros através dos índices de regeneração e mudança de área.

**RESULTADOS:** A enxertia com nervo preservado a frio por 14 dias apresentou resultado funcional semelhante ao seu grupo controle na análise da área máxima de contato e da pressão máxima de contato da pata operada em todas as avaliações. Já a conservação do enxerto a frio por 50 dias resultou em superioridade funcional em todas as avaliações em relação a seu grupo controle. Os estudos eletrofisiológicos mostraram cada grupo de enxertia preservada a frio com resultados similares a seu grupo controle, tanto em relação à latência, quanto à amplitude nos dois músculos avaliados. As análises histomorfométricas resultaram em índices de regeneração e de mudança de área semelhantes na comparação entre os grupos 60 dias após os procedimentos de enxertia.

**CONCLUSÕES:** A conservação a frio do enxerto de nervo durante 14 dias e durante 50 dias apresentou resultados funcionais da regeneração iguais ou superiores aos enxertos convencionais e resultados eletrofisiológicos e histológicos semelhantes aos respectivos grupos controle de enxertos convencionais, demonstrando um futuro promissor para a utilização clínica de enxertos preservados a frio em um “banco de nervos”.

**Descritores:** Nervo ciático/transplante; Ratos Wistar; Transplante autólogo/métodos; Transferência de nervo/métodos; Degeneração neural/fisiopatologia; Regeneração nervosa/fisiologia; Sobrevivência de enxerto; Criopreservação.

## ABSTRACT

Mesquita IV. Experimental comparative study between conventional nerve graft and cold preserved nerve graft [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

**INTRODUCTION:** The repair of peripheral nerve injuries with extensive loss of substance, where direct suture is not feasible, at the present time still has variable results and dependence on many factors. The treatment most commonly used in these cases is the nerve autograft, with sacrifice of a nerve from another region of the body. This procedure, however, can sometimes lead to some difficulties and consequences. Therefore, the search for new techniques such as the possibility of using cold preserved nerves, is a great advancement in the field of repairing nerve damage. **OBJECTIVE:** The purpose of this study was to perform functional, electrophysiological and histomorphometric evaluations to compare conventional autografts versus cold-preserved autografts of the sciatic nerves of rats, after fresh denervation or conservation of a nerve segment at low temperature for 14 days and 50 days. **METHODS:** 20 Wistar rats of approximately equal ages and weight were divided into 4 groups of 5 animals. Groups 1 and 3 were treated with a conventional nerve graft after denervation for 14 days and 50 days, respectively; they served as controls for groups 2 and 4, which were treated with cold-preserved nerve grafts immersed in a Celsior® solution at 4 degrees Celsius for 14 and 50 days, respectively. Functional gait analysis, evoked potential analysis and histomorphometric analysis of the animals were performed at different times. Functional analysis used equipment for gait study in small animal experiments, called catWalk®, which provides static and dynamic measurements, with parameters such as pressure relative to contralateral paw and the maximum area of the footprint of the animal, and these data were captured before the graft withdrawal procedure and after grafting, in this latter case the functional analysis was made every 15 days until they had been completed 60 days after surgery. The motor evoked potential analysis examined the latency and amplitude of nerve stimuli and was made 60 days after the grafting procedures. The microscopic analysis measured myelinated axons and the area of these nerve fibers in the

proximal and distal regions to the repair sites at the end of 60 days after the procedures, also comparing the relationship between the distal and proximal regions of each of these parameters through the regeneration and area change rates. **RESULTS:** Cold preservation of nerve graft for 14 days showed functional results similar to those of its control group for the maximum contact area and for the maximum pressure intensity of the operated paw in all evaluations. Cold preservation of nerve graft for 50 days resulted in functional superiority in all assessments compared with its control group. Cold preservation of nerve graft for 14 days and 50 days showed electrophysiological results similar to those of their respective control groups, both in terms of latency, as to the amplitude in the two muscles evaluated. Histomorphometric analysis showed similar regeneration and area change rates for all the groups 60 days after the grafting procedures. **CONCLUSIONS:** The cold preservation of nerve grafts for 14 days and 50 days showed similar or superior functional results and similar electrophysiological and histological results compared with their respective conventional graft control groups, indicating a promising future for the clinical utilization of cold preserved grafts in a “nerve bank”.

**Descriptors:** Sciatic nerve/ transplantation; Rats, Wistar; Transplantation, Autologous/methods; Nerve transfer/methods; Nerve degeneration /physiopathology; Nerve regeneration/ /physiology; Graft survival; Cryopreservation.

# ***1. INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

A reparação de nervos periféricos tem feito muitos avanços nas últimas décadas: técnicas microcirúrgicas foram introduzidas, técnicas de sutura menos agressivas foram criadas, enxertos de nervos autógenos se tornaram populares.

A busca por melhores resultados funcionais nas perdas de substância neural vem promovendo o surgimento de novas técnicas que visam melhorar a qualidade do resultado final dos enxertos de nervos, sobretudo nas perdas mais extensas, onde os resultados dependem de diversas variáveis.

Atualmente, o tratamento cirúrgico mais comumente utilizado para a reparação das lesões de nervos periféricos com perda de substância, é a auto-enxertia de nervo, ou seja, a utilização de um segmento de nervo doador do próprio indivíduo, que é interposto entre os cotos proximal e distal do nervo lesado, tendo como objetivo preencher o espaço entre tais cotos, diminuindo a tensão nas linhas de sutura e orientando o avanço dos cones de crescimento neurais (Lemos et al., 2008).

Apesar de todos os progressos, ainda não se consegue resultados de excelência em algumas situações nas quais não é possível o reparo dos cotos por afrontamento direto, especialmente nos casos onde existe uma grande diferença entre os calibres do nervo a ser reparado e do nervo a ser utilizado para enxertia (Palhares et al., 2009).

Os nervos sensitivos cutâneos são, na maioria das vezes, escolhidos como doadores, destacando-se os nervos sural, cutâneo medial do antebraço, cutâneo ântero-lateral do antebraço e safeno (Jewett e McCarroll, 1980).

Entretanto, o sacrifício de um nervo de outra região do corpo sempre traz algumas consequências que precisam ser consideradas, tais como a possibilidade de infecção da

área doadora (10%), cicatrização retardada (12%), dor crônica local (5%), perda de sensibilidade na região (44%), parestesia (42%), entre outras menos frequentes (Staniforth e Fisher, 1978; Rappaport et al., 1993; Lemos et al., 2008). Estudos clínicos de auto-enxertos de nervos demonstram que, na maioria das vezes, os pacientes apresentam recuperação funcional incompleta, ao redor de 80% (Frykman e Cally, 1988). Outra desvantagem é a limitação da quantidade ou porções de nervos com potencial de reconstrução, em decorrência da insuficiência de material doador, assim como de uma relativa incompatibilidade entre os diâmetros do nervo lesado e do nervo doador, que pode tornar necessária a realização de rafias entre fascículos do nervo lesado e múltiplos segmentos de nervo doador, aumentando o número de suturas locais e, conseqüentemente, aumentando o processo inflamatório perineural (Ijpma et al., 2006).

A melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos da degeneração e da regeneração nervosa possibilita novos métodos de abordagem e melhores perspectivas de recuperação funcional das lesões nervosas.

Após a perda de continuidade em um nervo, a região distal do mesmo sofre um processo conhecido como degeneração walleriana, onde a bainha de mielina e os axônios lesados degeneram-se e são fagocitados por macrófagos e células de Schwann, resultando em um tubo endoneural vazio, que está pronto para receber o axoplasma regenerado produzido no corpo celular do neurônio em processo de cromatólise (Sunderland, 1978). Os macrófagos e as células de Schwann, por sua vez, também sintetizam substâncias fundamentais para a regeneração, entre elas interleucinas e fatores neurotróficos (Bruck e Bruck, 1995). Neste processo, verificam-se os fenômenos de brotamento axonal e orientação das fibras em crescimento, sob regulação de fatores quimiotáticos, e, por fim, as fibras, após regeneradas, promovem a reinervação dos órgãos-alvo. Para que esta



sucessão de eventos ocorra, é necessário a continuidade de um tubo adequado, a presença de fatores neurotróficos e um leito bem vascularizado (Schmidhammer et al., 2004).

Um fator essencial para o sucesso de um enxerto de nervo é garantir adequada circulação sanguínea ao mesmo. Sabe-se que enxertos de nervos convencionais são capazes de passar por um processo de neovascularização rápido o bastante para evitar danos isquêmicos graves ou definitivos, porém antes sofrem um período de isquemia que pode produzir alguma necrose e morte de células de Schwann, acarretando fibrose intraneural. No caso do enxerto de nervo convencional, uma das formas de se evitar isto é através de uma adequação do calibre do nervo doador à vascularização do leito receptor. À medida que o calibre do nervo doador aumenta, a capacidade para neovascularização alcançar o centro diminui. Evidências clínicas e experimentais têm confirmado que existe um diâmetro crítico além do qual necrose central será o resultado. Surgiu então o conceito de que a necrose central pode ser evitada em leitos receptores pobres utilizando-se nervos cutâneos de diâmetro pequeno que, após colhidos, podem ser depositados em múltiplos filamentos. A procura por novas técnicas que possam fornecer enxertos de variados calibres, para minimizar estas dificuldades de vascularização, vêm sendo objeto de pesquisas (Best e Mackinnon, 1994).

Considerando que um leito receptor bem vascularizado é fator essencial para o sucesso do enxerto e que, em um leito fibrótico, a neovascularização de enxertos de diâmetro maior pode ser incompleta, Taylor e Ham, em 1976, introduziram o uso de enxertos de nervos vascularizados em leitos receptores cicatriciais, um procedimento, entretanto, mais complexo e de execução mais trabalhosa que a enxertia convencional. Ao tempo em que estudos experimentais e clínicos demonstram que os enxertos de nervos vascularizados são superiores aos enxertos de nervos convencionais quando colocados sobre um leito receptor pobre (Breidenbach e Terzis, 1987; Shibata et al., 1988), outros,

ao contrário, concluem que o fluxo sanguíneo final nos enxertos convencionais foi significativamente maior do que o fluxo final nos enxertos vascularizados (Settergren e Wood, 1984).

Da mesma forma que nas enxertias convencionais, também nas vascularizadas, além das dificuldades técnicas para colheita do enxerto e do prolongamento do tempo cirúrgico, permanecem as desvantagens de déficits funcionais residuais na região doadora e a recuperação funcional incompleta em diferentes graus na área receptora (Luchetti et al., 1990).

Na tentativa de corrigir os fatores que podem levar a maus resultados, diversas técnicas e materiais têm sido testados na reparação nervosa periférica, tendo surgido pesquisas sobre o uso de enxertos arteriais ou venosos, neurotubos e outros materiais, orgânicos ou sintéticos, biodegradáveis ou não, que possam substituir o enxerto neural autólogo com resultados compensadores para o paciente (Frykman e Cally, 1988; Lundborg et al., 1997). Contudo, estas alternativas têm se mostrado ineficientes na promoção de um ambiente químico adequado ao reparo de nervos periféricos (Scabora et al., 2009).

Estudos mostrando que dentro de culturas de tecidos os axônios crescem particularmente bem quando os substratos contêm componentes da membrana basal, especialmente laminina e fibronectina, deram suporte à utilização de enxertos de músculo esquelético na reparação nervosa periférica, considerando que o tecido muscular possui uma membrana basal com características químicas e composição molecular semelhantes às das células de Schwann, servindo bem como guia mecânico para o crescimento das fibras nervosas (Fawcett e Keynes, 1986; Norris et al., 1988; Mattar Júnior et al., 1990). No entanto, para aplicação desta técnica, há necessidade de uma preparação prévia do enxerto muscular, seja por compressão mecânica, métodos químicos, térmicos ou

osmóticos, a fim de eliminar o conteúdo sarcoplasmático e, conseqüentemente, criar tubos vazios de membrana basal muscular capazes de receber os axônios em regeneração, num processo trabalhoso e, por vezes, não completamente eficiente (Mattar Júnior et al.; Glasby, 1990; Santo Neto et al., 1998).

Paralelamente às pesquisas sobre novos tipos de enxertos, desenvolvem-se os princípios da conservação de tecidos pela hipotermia, que reduz a taxa metabólica e a atividade de enzimas e previne o acúmulo de produtos tóxicos resultantes do metabolismo anaeróbico (Wang et al., 2014). Desde 1949, quando o biólogo britânico Christopher Polge descobriu que o espermatozóide tratado com glicerol pode sobreviver após ser congelado a baixa temperatura, a criopreservação tem sido amplamente estudada na conservação de tecidos, com a intenção de colocá-los num estado em que processos biológicos são suspensos e, após descongelamento, reativados em sua funcionalidade. Tal método é mais estudado em populações homogêneas de células ou para tecidos de camada única de células, visto que os parâmetros ótimos para este procedimento (meio de conservação, temperatura, tempo de preservação) variam para os diferentes tipos de tecidos. Nos últimos anos, avanços estão sendo feitos na criopreservação de enxertos de nervos autólogos e heterólogos (Hare et al., 1993; Evans et al., 1998; Atchabahian et al., 1999; Pegg, 2015) e até de membros inteiros (Wang et al., 2014).

Várias pesquisas comprovam a viabilidade das células de Schwann em longo prazo nos enxertos nervosos preservados em baixas temperaturas (Zalewski et al., 1993; Lemos et al., 2008; Scabora et al., 2009), algumas das quais inclusive demonstrando que o infiltrado linfocitário e a antigenicidade de tais enxertos diminui com maior tempo de congelamento (Gutmann e Sanders, 1943; Tohyama et al., 1990; Atchabahian et al., 1999; Kohama et al., 2001).

Existem também estudos sobre o uso de enxerto criopreservado de músculo esquelético na reparação de nervos periféricos de animais mostrando que a criopreservação é um recurso potencialmente útil, visto que não alterou a regeneração axonal quando comparado ao enxerto convencional (Lenihan et al., 1998; Sabha Júnior, 2002).

Apesar de uma grande variedade de técnicas e materiais já terem sido avaliados como potenciais enxertos de nervos, até a presente data nenhum demonstrou ser consistentemente igual no que diz respeito ao resultado funcional quando comparado a enxertos de nervos autólogos, que, entretanto, apresentam sempre um certo grau de morbidade no sítio doador. Em decorrência disto, mais recentemente vêm aumentando os estudos que buscam os melhores parâmetros em termos de formulação de soluções de armazenamento, temperatura ideal e tempo ótimo de preservação, que permitam a criação de bancos de nervos para transplante heterólogo.

Por tais motivos, a possibilidade de utilização de enxertos de nervos preservados em baixas temperaturas representa um avanço inestimável no campo da reparação de lesões nervosas, justificando-se a necessidade de estudos experimentais detalhados com avaliações funcionais, histomorfológicas e eletrofisiológicas em um seguimento de tempo suficiente, que possam comparar o resultado de tais enxertos conservados a frio com o resultado de enxertos convencionais e fornecer maiores subsídios sobre a viabilidade deste procedimento, de modo a criar-se novas perspectivas em direção ao armazenamento de aloenxertos de nervos humanos disponíveis para utilização clínica.

## 2. **OBJETIVO**

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é comparar a regeneração nervosa em enxerto autólogo convencional com a regeneração nervosa em enxerto autólogo preservado a frio, em modelo experimental de ratos, através de avaliações funcionais, eletrofisiológicas e histomorfométricas.

### ***3. REVISÃO DE LITERATURA***

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Degeneração/regeneração axonal e evolução dos métodos utilizados na reparação nervosa periférica**

Waller, em 1850, é o primeiro a relatar a capacidade de regeneração das fibras do sistema nervoso periférico, descrevendo uma ação coordenada neuronal que ocorre após lesões, com vistas a restaurar o equilíbrio e a função do mesmo, induzindo alterações nos mecanismos intracelulares, caracterizados por modificações na morfologia dos constituintes nervosos, tanto proximais quanto distais.

Bunuel e Boyes, em 1939, estudam a reparação e enxertia nervosa, descrevendo técnica que envolve enxerto de membrana cartilágnea e verificando que a regeneração é maior na área periférica dos enxertos. Realizam ainda uma série de 32 enxertos nervosos autólogos, com os quais conseguem obter o retorno de algumas funções, em vários casos alcançando recuperação de grau considerável.

Enquanto as várias tentativas de reparações diretas e enxertos de nervos convencionais datam de épocas distantes, somente na década de 1970 uma maior preocupação com os resultados funcionais vem à tona, trazendo novas técnicas para a enxertia nervosa periférica, momento em que os enxertos de nervos vascularizados começam a ser propostos.

Taylor e Ham, em 1976, relatam o primeiro uso clínico de enxerto de nervo vascularizado: um segmento de 24 centímetros do nervo radial superficial, baseado na artéria radial, usado para reconstruir um nervo mediano em um caso de contratura isquêmica de Volkmann. Realizam experimentos mais detalhados sobre o tema e,



aprofundando-se na avaliação do resultado funcional de enxertos de nervos vascularizados colocados sobre leitos fibróticos, concluem serem os mesmos a melhor opção em leitos receptores ruins.

Gordon et al., em 1979, realizam estudo experimental em ratos, avaliando enxertos de nervos pré-degenerados, que são enxertos nos quais já se completou o processo de degeneração walleriana, resultando em tubos biológicos vazios que, teoricamente, facilitam o crescimento axonal. Comparam a utilização de auto-enxertos de nervos frescos e pré-degenerados em lesões agudas e crônicas, concluindo serem os primeiros mais apropriados para lesões agudas, enquanto os pré-degenerados mostram-se superiores nas lesões crônicas.

Koshima et al., em 1983, tentam reproduzir um leito cicatricial utilizando um modelo de ferida por queimadura em ratos, com nervos enxertados dentro de tubos de silicone. Eles demonstram um maior aumento no tamanho e densidade de axônios mielinizados e uma mais precoce regeneração de fibras nervosas nos enxertos de nervos vascularizados quando comparados à enxertia nervosa convencional.

McCullough et al., em 1984, estudam, através de microangiografia e análises histológicas, o efeito da vascularização na regeneração axonal em enxertos de nervos ciáticos de ratos. Demonstram que enxertos de nervos nos quais os pedículos vasculares são deixados intactos mantêm um padrão vascular normal, que não é afetado adversamente por envolver-se o enxerto em luva de polietileno. Enxertos convencionais não vascularizados iniciam um processo de revascularização após três dias, que se completa em nove dias. Entretanto, se estes são envolvidos em luva de polietileno, a revascularização é impedida e, dezoito dias após, o segmento médio do enxerto está avascular e necrosado. A taxa de regeneração axonal é medida eletrofisiologicamente nos grupos descritos, mostrando uma relação linear entre a mesma e o tempo pós-enxertia,

com o processo de crescimento axonal numa taxa média de 1,15 milímetros por dia, após um retardo inicial médio de 4,85 dias. Não há diferença significativa na taxa de regeneração axonal nos grupos estudados.

Restrepo et al., em 1985, em estudo experimental utilizando nervos ciáticos de coelhos, comparam enxertos de nervos vascularizados com enxertos de nervos convencionais, realizando análises histológicas e quantificando a espessura da bainha de mielina por um programa de computador, correlacionando-a ao grau de regeneração nervosa. Os resultados demonstram uma regeneração mais favorável quando os enxertos vascularizados foram utilizados.

Seckel et al., em 1986, não encontram nenhuma diferença entre enxertos de nervos vascularizados e enxertos de nervos convencionais. Seus estudos utilizam alguns parâmetros eletrofisiológicos e métodos de contagem de axônios, porém, como boa parte das pesquisas anteriores, não avaliam o resultado final das funções sensitiva e motora.

Zumiotti, em 1987, aplica modelo experimental em 14 coelhos, avaliando a utilização de auto-enxertos longos de nervo fibular através de método microcirúrgico. Compara os resultados da sutura convencional em tempo único (suturas proximal e distal no mesmo ato cirúrgico) com os da sutura convencional em dois tempos (sutura distal 60 dias após a proximal). Não encontra diferença estatística no número de fibras mielinizadas, nos segmentos examinados, em ambos os grupos. Conclui que as lesões nervosas podem ser tratadas com auto-enxertos e sutura primária dos cotos.

Lux et al., em 1988, demonstram que nos enxertos de nervos convencionais o período isquêmico de aproximadamente 72 horas antes do início de uma neovascularização é significativa e também que o fluxo sanguíneo no primeiro dia de pós-operatório de um enxerto de nervo vascularizado é ainda maior do que o fluxo sanguíneo no mesmo nervo em seu local de origem no pré-operatório.

Shibata et al., em 1988, comparam os resultados funcionais de enxertos de nervos convencionais com enxertos de nervos vascularizados em um leito receptor normal em dois grupos de 20 coelhos cada, com avaliação pós-operatória após 10 e 24 semanas. Velocidade de condução nervosa, área de potencial de ação, diâmetro axonal e peso muscular não demonstram diferenças significantes, mas a contagem de axônios e a força muscular mostram-se superiores nos enxertos de nervos vascularizados na avaliação de 24 semanas.

Mattar Júnior, em 1989, realiza estudo experimental comparativo entre sutura epineural e reparo de adesivo de fibrina humana. Utiliza nervos ciáticos de ratos da linhagem Wistar, comparando os grupos por análise histomorfométrica e por testes de resistência à tração, concluindo que ambas as técnicas resultam em semelhante número de fibras mielinizadas, porém o adesivo de fibrina apresenta menor resistência à tração. Ressalta que esta última técnica simplifica o procedimento de reconstrução de nervos periféricos.

Mattar Júnior et al., em 1990, demonstram a capacidade de regeneração nervosa através de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada, analisando em microscopia de luz fragmentos intermediários e distais de nervos ciáticos de ratos colhidos 60 dias após a realização deste procedimento nos animais.

Mackinnon et al., em 1991, avaliam as mudanças no número de fibras distais ao reparo de nervo ciático de ratos da linhagem Sprague-Dawley por um período de 1 a 24 meses. Citam como conceito padrão até aquele momento os ensinamentos de que aproximadamente um terço das fibras nervosas proximais a um reparo de nervo não se regenera através daquele reparo em direção distal, implicando em perda de um significativo número de fibras nervosas na linha de sutura. Referem ser a base para esta afirmação os estudos de Davenport e Chor (1937) e Gutmann e Sanders (1943), nos quais

20 a 40% das fibras nervosas observadas proximalmente ao reparo do nervo não são encontradas distalmente ao mesmo em períodos de tempo entre 3 a 6 meses após o reparo. Relatam ainda que tal observação é novamente enfatizada no estudo de Almquist et al. (1984), no qual 29% das fibras nervosas proximais não foram encontradas distalmente ao sítio do reparo. Analisam outro conceito clássico justaposto ao primeiro, segundo o qual o nervo periférico seccionado regenera-se com múltiplos brotamentos axonais a partir de cada fibra nervosa, e que existem brotamentos que crescem dentro do segmento distal como unidades em regeneração. Relatam estudos de microscopia eletrônica e estudos feitos por Jenq e Coggeshall (1985) que demonstram que o número total de fibras mielinizadas aumenta na região distal à transecção do nervo. Analisam que estes conceitos podem não ser opostos, mas apenas ocorrerem em diferentes fases da evolução do processo regenerativo, considerando que, se existe brotamento axonal, o número de fibras distais ao sítio da lesão encontra-se aumentado, mesmo que algumas fibras nervosas sejam perdidas no neuroma da linha de sutura, mas, caso não façam adequadas conexões terminais, ocorre diminuição das fibras distais ao reparo após certo tempo. Sua investigação é feita realizando secção e reparo microscópico imediato dos nervos ciáticos de 48 ratos para avaliação histomorfométrica após 1, 3, 6, 9, 12 e 24 meses. Demonstram o aumento da quantidade de fibras nervosas na porção distal já um mês após o reparo, sendo este número maior aos três meses e mantendo-se elevado nos primeiros 6 meses após o procedimento, ocorrendo decréscimo até serem atingidos os valores normais ao redor de 2 anos. Sugerem que este aumento seja consequência do brotamento de múltiplos axônios e que a diminuição resulte da degeneração e dissolução lenta dos axônios que não conseguiram estabelecer conexões apropriadas com receptores sensitivos ou motores distais. Descrevem durante o processo regenerativo as fases de brotamento, regeneração

distal, reinervação dos receptores distais, amadurecimento e reabsorção das fibras que não atingiram os órgãos alvo.

Kanaya et al., em 1992, utilizam 75 ratos para comparar enxerto de nervo vascularizado, enxerto de nervo convencional e reparo direto em um leito normal, avaliando os três grupos de 25 animais a cada quatro semanas, até a 36ª semana. Enxerto de nervo vascularizado e reparo direto mostram recuperação significativamente melhor que enxerto de nervo convencional na 4ª semana após a cirurgia, padrão que continua por todo o experimento. Enxerto de nervo vascularizado e reparo direto não mostram diferenças significantes entre si. Na 12ª semana de pós-operatório, avaliações morfológicas e eletrofisiológicas demonstram que o grupo de enxerto de nervo vascularizado foi superior ao grupo de enxerto de nervo convencional em todas as medidas, exceto peso muscular e contagem axonal.

Mattar Júnior et al., em 1992, realizam estudo experimental em lesões de nervos tibiais de ratos comparando enxertos convencionais com enxertos de nervo sural vascularizado. Concluem que a regeneração nervosa é superior no último grupo, que apresenta maior número de fibras mielinizadas tanto no enxerto quanto nos segmentos distais ao mesmo.

Ozcan et al., em 1993, comparam a utilização de enxertos de nervos convencionais e vascularizados em modelos de coelhos com uma lesão criada no nervo intratemporal facial, concluindo, através de estudos eletrofisiológicos e morfométricos, pela superioridade de enxertos vascularizados quando colocados sobre um leito ósseo.

Ochi et al., em 1994, estudam a regeneração nervosa em enxertos de nervos pré-degenerados. Nervos tibiais de ratos Lewis são submetidos ao processo de pré-degeneração por zero dias (enxertos frescos, grupo controle), 3 dias, 1 semana, 4 semanas e 8 semanas, através do método de congelamento seguido de descongelamento. Concluem

que a pré-degeneração facilita a capacidade de crescimento axonal nas primeiras quatro semanas, sendo que após oito semanas a regeneração se torna precária, supondo que este fato está relacionado a mudanças estruturais do enxerto.

Bain, em 2000, relata o uso clínico de enxertos alógenos frescos em sete pacientes submetidos a grandes reconstruções nervosas, com a utilização temporária de drogas imunossupressoras. Descreve bons resultados na recuperação da sensibilidade em quase todos os pacientes, havendo ausência de morbidades decorrentes dos imunossupressores. Conclui que pesquisas futuras poderão ser importantes para melhores resultados em enxertias alógenas.

Nakamura et al., em 2004, relatam a utilização de tubo bioabsorvível de ácido poliglicólico preenchido com colágeno em lesões de nervos fibulares de cães, demonstrando, após seis meses, por parâmetros histomorfométricos e eletrofisiológicos, recuperação superior a de auto-enxertos convencionais.

Chaves Neto, em 2006, estuda as possíveis vantagens de auto-enxertos de nervos pré-degenerados. Utiliza nervos ciáticos de ratos Wistar que são seccionados, sepultando-se seu coto distal na musculatura da coxa de cada animal e retirando-se posteriormente um segmento para ser utilizado como enxerto pré-degenerado. Divide o estudo em quatro grupos, que são submetidos a diferentes intervalos de pré-degeneração (1, 2, 4 e 8 semanas), seguindo-se a transferência dos enxertos, já pré-degenerados, para o sítio receptor na pata contralateral. Compara os resultados de análises histomorfométricas com um grupo controle de enxerto convencional, a fresco, concluindo que a pré-degeneração de nervos permite o brotamento de axônios viáveis em regeneração, no entanto, a partir de quatro semanas, não ocorre o avanço satisfatório dos axônios devido ao possível colapso estrutural do tubo neural. Relata que o momento mais adequado para sua

utilização situa-se entre duas e quatro semanas de pré-degeneração na comparação com a enxertia convencional.

Kingham e Terenghi, em 2006, revisam os trabalhos sobre regeneração de nervos e reinervação muscular. Consideram que, muitas vezes, a regeneração muscular abaixo do esperado é responsável por resultados funcionais ruins. Relatam que os tubos artificiais têm tornado-se uma ferramenta de grande utilidade para a condução de fatores neurotróficos como agentes terapêuticos no tratamento de lesões de nervos com perda de substância. Revisam os principais fatores neurotróficos da atualidade, dentre eles o NGF (fator de crescimento neural), BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), NT-3 e NT-4 (neurotrofinas 3 e 4), CNTF (fator neurotrófico ciliar), GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) e as neuregulinas. Concluem que os resultados obtidos até o momento são promissores, sendo ainda necessárias pesquisas mais consistentes sobre o papel dos fatores neurotróficos.

Lemos et al., em 2008, realizam análises histológicas e funcionais de enxerto de nervo autógeno, tubo de veia e enxerto de nervo alógeno conservados em glicerol a 98% por 7 dias a 4° C, concluindo que os grupos de veia autógena e nervo alógeno mostraram melhores resultados histológicos, mas não houve diferença entre os 3 grupos quanto à avaliação funcional pelo método de marcação e coleta manual das impressões plantares dos animais (método chamado de *walking track*).

Palhares et al., em 2009, avaliam a aplicabilidade do uso de músculo autógeno, tratado de diversas maneiras, em substituição aos enxertos de nervo. Utilizam 120 ratos divididos em sete grupos que recebem, como tratamento a uma lesão nervosa padronizada, os seguintes tipos de enxertos: músculo fresco, músculo fixado com formol a 10%, músculo congelado em freezer, músculo congelado em refrigerador, músculo denervado, nervo periférico e um grupo sem qualquer tratamento. Avaliam o aspecto

histológico das fibras nervosas no segmento reparado, demonstrando crescimento de fibras nervosas em todos os grupos que utilizam enxerto, porém a metodologia empregada não permite caracterizar adequadamente as diferenças entre os grupos.

Pereira, em 2009, estuda a influência do número de pontos na regeneração axonal e produção de matriz extracelular na sutura epineural término-terminal do nervo ciático de rato, utilizando 30 ratos Wistar divididos em 3 grupos: sutura epineural com fio de náilon 10-0 com três pontos, com seis pontos e grupo controle. Através de análises eletrofisiológicas, conclui que uma maior quantidade de suturas correlaciona-se com uma diminuição da velocidade de condução do potencial do nervo. Microscopicamente, encontra maior quantidade de colágeno dos tipos I e III no perineuro do grupo com seis pontos quando comparado aos demais grupos. O cálculo dos índices de regeneração demonstra que o maior número de reparos correlaciona-se também com um menor índice de regeneração axonal. A análise do índice de alteração do diâmetro das fibras mielinizadas dos três grupos mostra diferença quando se compara os grupos experimentais com o controle, porém não mostra diferença significativa entre aqueles. Alerta para a necessidade de cautela na interpretação destes índices, ressaltando que a ocorrência de brotamento axonal justifica a existência de um maior número de axônios no segmento distal em relação ao proximal.

Ikeda e Oka, em 2012, fazem ensaio experimental em 30 ratos da linhagem Sprague-Dawley divididos em 5 grupos, sendo um grupo controle com ratos normais e quatro grupos onde analisam parâmetros eletrofisiológicos e histomorfométricos aos 50, 100, 150 e 200 dias após uma lesão do nervo ciático. Detalham as relações entre a velocidade de condução e a morfologia do nervo durante o processo de regeneração nervosa periférica. Concluem que a média da velocidade de condução motora aumentou com o tempo entre 50 e 200 dias depois da transecção, sendo aos 200 dias



significativamente maior que aos 50 dias. Referem que nos ratos normais a velocidade de condução é proporcional ao comprimento interno da fibra e ao seu diâmetro, existindo uma razão ótima entre a espessura da mielina e o diâmetro da fibra para obtenção da máxima velocidade de condução. No entanto, essa relação deixa de existir durante o processo de regeneração porque os comprimentos internodais permanecem anormalmente curtos e sem um padrão definido de redução da distância internodal, em contraste com uma recuperação mais completa do diâmetro da fibra e da espessura da mielina.

Assaf, em 2015, estuda a regeneração nervosa de nervos isquiáticos de ratos Lewis tubulizados com combinações de três diferentes materiais que apresentam características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e tempo adequado de degradação: a policaprolactona (PCL), nanotubos de carbono e o grafeno. Conduitos com PCL, PCL com nanotubos de carbono, PCL com óxido de grafeno, e PCL com ambas as estruturas são testados. Na contagem de fibras nervosas e na comparação das áreas dos nervos, a mistura dos três materiais mostra-se superior. Porém, nas demais análises morfométricas não são observadas diferenças entre os grupos. A avaliação funcional dos animais não mostra uma recuperação significativa da marcha, mas a análise histológica dos músculos sóleo e tibial anterior indica reinervação bem sucedida, sugerindo a possibilidade de utilização de tubos feitos com estes materiais para orientar e proteger o nervo durante a regeneração.

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm se empenhado em avaliar os efeitos do resfriamento e da criopreservação de enxertos de nervos, tanto autólogos quanto heterólogos, em diversas soluções conservantes, utilizando diferentes métodos de resfriamento, em variadas temperaturas de conservação e por diferentes durações de tempo, sendo que, no caso dos enxertos heterólogos, têm-se também avaliado o uso de drogas imunossupressoras, suas possíveis dosagens e seu tempo de uso, ou grupos sem a

utilização dessas drogas, de modo que atualmente atingiu-se um patamar de conhecimentos e de indicativos promissores, que ensejam um futuro bastante animador em termos de resultados funcionais de todos os tipos de lesões nervosas e mesmo da possível criação de um banco de nervos.

### **3.2 Conservação a frio e criopreservação de enxertos**

Gutmann e Sanders, em 1943, realizam pioneiros estudos controlados em ratos e outros animais de laboratório, publicando as primeiras tentativas de criopreservação de enxertos nervosos. Aloenxertos de nervos são estocados por 1, 2 e 3 semanas na temperatura de 2° C antes de implantá-los. O procedimento resulta em menor infiltrado linfocitário e melhor regeneração axonal quando comparado ao aloenxerto fresco, sendo que histologicamente e funcionalmente estes resultados não diferem daqueles obtidos com autoenxertos. Nestes mesmos estudos, Gutmann e Sanders determinam ainda a taxa de regeneração nervosa em ratos, atribuindo-lhe um valor de crescimento axonal entre 3,5 a 4,5 mm/dia.

Sanders e Young, em 1954, em estudos experimentais sobre a influência das conexões periféricas no diâmetro da fibra nervosa em regeneração, dedicam-se a estudar vários fatores capazes de alterar o crescimento axonal, demonstrando que o congelamento de aloenxerto de nervo fresco diminui o infiltrado linfocitário.

Tohyama et al., em 1990, examinam se tubos alógenos de lâmina basal de células de Schwann retirados de nervo safeno de coelhos servem como canais para regeneração de axônios após pré-denervação e pré-tratamento por congelamento. Os animais são sacrificados 1, 2, 6, 8 e 14 semanas após o procedimento cirúrgico e a citologia da porção

média dos enxertos é examinada por microscopia eletrônica. A porção distal do nervo safeno receptor é examinada 14 semanas após a enxertia. Axônios em regeneração são encontrados a partir de 2 semanas pós-enxertia e gradualmente aumentam em número. Células de Schwann do receptor acompanham os axônios em regeneração, ocorrendo a formação de finas bainhas de mielina em torno de 6 semanas após a enxertia. Vasos sanguíneos neoformados são encontrados em torno do compartimento na oitava semana após o procedimento. A quantidade de fibras mielinizadas dentro dos nervos em regeneração é de aproximadamente 10% do normal na 8ª semana e 30% na 14ª semana após a enxertia. O diâmetro dos axônios em regeneração, tanto mielinizados quanto não mielinizados, mostra-se menor que o diâmetro de axônios normais em qualquer das fases examinadas. Numerosos axônios em regeneração, alguns dos quais totalmente mielinizados, são encontrados no local 10 mm distais à extremidade distal do enxerto, 14 semanas após a enxertia. Comparando o grupo dos tubos de lâminas basais de células de Schwann pré-denervados com o grupo pré-tratado por congelamento, os autores sugerem que a estocagem de enxertos nervosos a frio acarreta menor resposta imune do receptor.

Hirasé et al., em 1992, retiram 2 cm de comprimento de artéria e veia femoral e 1,5 cm de nervo ciático de 6 ratos Lewis, submetendo estas estruturas à criopreservação por mais de 3 semanas para diminuir a antigenicidade. Realizam a amputação completa do membro posterior de 6 ratos da linhagem Brown Norway na metade de seu comprimento e reimplantam os membros, interpondo a artéria, veia e nervo criopreservados através de anastomose na artéria, veia e nervo ciático do membro amputado. Drogas imunossupressoras não são utilizadas. A largura dos dedos e a análise da marcha revelam bons resultados aos 3 meses de pós-operatório. Excelente regeneração axonal é observada no exame histológico do nervo ciático 1 cm distal à transferência. O relato aumenta as possibilidades futuras para o uso clínico de vasos e nervos criopreservados.

Zalewski et al., em 1993, realizam uma tentativa de conservação de enxertos de nervos, através da criopreservação de isoenxertos e aloenxertos de nervos peroneais utilizados em ratos normais e em ratos imunossuprimidos por ciclosporina A. Após retirados, os enxertos são colocados em uma mistura de sulfóxido de dimetilo e formamida à temperatura ambiente, sendo depois resfriados a uma taxa de 1-1,5 ° C/minuto até - 40° C, quando os frascos são mergulhados em nitrogênio líquido a -196° C. Após 5 semanas de armazenamento, os nervos são descongelados e a solução de sulfóxido de dimetilo e formamida é removida. É feita a reparação no coto proximal do nervo receptor e verifica-se, após 5 semanas, que os elementos celulares dos aloenxertos estão presentes em ratos tratados com ciclosporina A, porém ratos não-imunossuprimidos rejeitam os nervos. Observam que todos os enxertos que sobrevivem passam por degeneração Walleriana e consistem de colunas de células de Schwann, que, na sua porção proximal, são associadas com axônios em regeneração. Examinam os isoenxertos somente após 20 semanas de pós-operatório. Todos os componentes do tecido normal sobrevivem nesses enxertos e contêm mielina regenerada e axônios ao longo de seus 4 centímetros de comprimento. Concluem que os elementos celulares do nervo podem ser criopreservados, e após o transplante, sobreviver e manter sua função. Considerando que os nervos sobrevivem após a criopreservação prolongada, afirmam que mostra-se viável estabelecer um banco de nervos. No entanto, ressaltam que os nervos criopreservados utilizados como aloenxertos permanecem imunogênicos e requerem imunossupressão para a sua sobrevivência.

Wolff et al., em 1993, armazenam a frio nervos femorais de ratos Fischer durante um mínimo de 100 dias, em 98% de glicerol a 4° C, enxertando-os em espaços de nervos femorais de ratos Lewis e em animais-controles singênicos. Após três meses, análises histológicas, eletrofisiológicas e morfométricas (diâmetros do axônios) revelam resposta

regenerativa dos ratos Lewis menor do que nos nervos enxertados nos controles singênicos. As diferenças desaparecem a partir dos 6 meses, embora nenhum dos enxertos tenha recuperação comparável a nervos não operados. A avaliação imunohistoquímica demonstra uma resposta imune modesta aos 3 meses, que cede em torno de 6 meses. Estas descobertas são descritas como encorajadoras para o desenvolvimento de um banco de enxerto de nervos glicerol-preservados.

Levi et al., em 1994, avaliam o efeito de conservação a frio sobre a viabilidade e função celular antes da implantação dos enxertos. Os autores afirmam que a quantidade de células viáveis diminuiu significativamente após 1 semana de armazenamento de frio. Relatam terem encontrado poucas células de Schwann viáveis e fibroblastos dentro dos enxertos nervosos após 3 semanas de armazenamento a frio.

Menasché et al., em 1994, estudam a conservação a frio de corações de ratos e coelhos, em dois modelos experimentais, visando comprovar as propriedades de uma nova solução de armazenamento denominada solução Celsior®. Em experiências em corações isolados, os órgãos foram parados e armazenados em solução Celsior® durante 5 horas a 4° C e subsequentemente reperfundidos durante 1 hora. Um protocolo semelhante foi utilizado nas experiências de transplantes, exceto que o tempo de isquemia total foi cerca de 6 horas e meia. Concluem que este meio de armazenamento é capaz de combinar os princípios gerais de preservação hipotérmica de órgãos com aqueles específicos para conservação a frio de tecidos ricamente inervados, como o miocárdio.

Evans et al., em 1998, demonstram que a preservação de aloenxerto nervoso em baixas temperaturas não compromete estruturas importantes para a regeneração axonal, contudo a viabilidade das células do aloenxerto diminui à medida em que se aumenta o tempo de estocagem. Segmentos de enxertos de nervos ciáticos de ratos são colhidos e pré-tratados, tanto pela colocação em solução de armazenamento a frio produzida pela

Universidade de Wisconsin (solução de Wisconsin®) a 5° C e estocagem de 1 a 26 semanas, quanto pelo método de repetidos congelamentos (-40° C) e descongelamentos (20° C). A seguir ao pré-tratamento, os enxertos são transplantados tanto como enxertos de nervos singênicos como alogênicos. Nem estocagem a frio nem congelamento-descongelamento afetam lâmina basal das células de Schwann, distribuição de laminina ou perineuro. O aumento do tempo de armazenamento leva à diminuição da resposta imune e da rejeição do enxerto e melhora a regeneração nervosa nos enxertos singênicos. Aloenxertos de nervos estocados a frio por 26 semanas são não imunogênicos e a rejeição não é vista, mas a regeneração é retardada quando comparada aos autoenxertos.

Lenihan et al., em 1998, comparam enxertos musculares desnaturados em microondas com enxertos musculares preparados através de congelamento na reparação de defeitos de 1 cm em nervo fibular de coelhos. Avaliam a recuperação da função após 6 meses através de exames histológicos e eletrofisiológicos do nervo fibular e dos músculos por ele inervados. Demonstram a dificuldade no preparo de enxertos desnaturados em microondas e a superioridade dos enxertos pré-congelados.

Atchabahian et al., em 1999, demonstram, através de estudos experimentais, a diminuição da antigenicidade de aloenxertos criopreservados, com a manutenção das células de Schwann viáveis. Seus experimentos comprovam que, após preservação do enxerto a frio, ocorre a diminuição do potencial antigênico dos dois tipos de células que desempenham o principal papel para iniciar a rejeição do enxerto: moléculas de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) e antígenos da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*- MHC), composto de células que incluem macrófagos, células dendríticas e células do tipo B. A pesquisa é desenvolvida cortando-se nervos ciáticos de ratos em três segmentos, um dos quais é analisado imediatamente, enquanto os outros dois são preservados em solução de Wisconsin®, a 5°

C, por 2 e 7 semanas respectivamente, antes de serem enxertados. Testes de imunidade são realizados em cada amostra, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos e fosfatase alcalina, analisados por densitometria computadorizada. Concluem que a antigenicidade das células ICAM-1 é significativamente diminuída com 7 semanas, em comparação com o grupo controle e com o grupo de 2 semanas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes últimos grupos. Relatam ainda que a antigenicidade das células classe II do complexo MHC é significativamente diminuída nos grupos de 2 e de 7 semanas, em comparação com os nervos frescos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos preservados a frio. A diminuição da antigenicidade de aloenxertos nervosos preservados a frio parece, então, ser provocada por uma regulação negativa da expressão de ICAM-1 e expressão das células da classe II do complexo MHC, comprovando o poder das baixas temperaturas no desenvolvimento dos bancos de nervos.

Mohara et al., em 1999, realizam estudo experimental comparando as soluções de armazenamento de tecidos Celsior® e Wisconsin®. Submetem 14 cachorros, divididos em dois grupos de 7 animais cada, a transplantes cardíacos, utilizando órgãos preservados por 12 horas a 4° C com as diferentes soluções. Analisam a taxa de recuperação da função cardíaca 1 e 2 horas após a saída da circulação extracorpórea e, imediatamente após a morte indolor dos animais, retiram amostras de tecido para análises histológicas. Concluem que a solução Celsior® é equivalente ou superior à solução de Wisconsin® para preservação cardíaca.

Fansa et al., em 2000, pesquisam a criopreservação de nervos periféricos em segmentos de nervos ciáticos de ratos armazenados em solução de Dulbecco®, uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Dividem o estudo nos seguintes grupos: o primeiro, usando apenas

a citada solução e congelamento com modificação controlada da temperatura; o segundo, com 10% de sulfóxido de dimetilo adicionado como crioprotetor, também com congelamento controlado; o terceiro, utilizando congelamento sem controle progressivo de temperatura em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}$  C e o quarto grupo, com enxertos convencionais a fresco. Demonstram que histologicamente o congelamento não afeta os elementos estruturais, como tubos de lâmina basal e tecido perineural. Morfometricamente, relatam que todos os enxertos criopreservados reduzem significativamente a contagem de axônios em relação ao grupo controle. Os nervos crioprotetidos não apresentam nenhuma diferença significativa em relação aos que não utilizam sulfóxido de dimetilo. Referem ainda que o congelamento com controle progressivo de temperatura é superior ao congelamento em nitrogênio líquido. Descrevem uma lentidão nas fases iniciais do processo de regeneração nos enxertos criopreservados, o que atribuem principalmente a um atraso na degeneração Walleriana, com revascularização mais lenta.

Sabha Júnior, em 2002, estuda a criopreservação em enxerto de músculo esquelético, submetendo músculos sóleos de ratos a duas diferentes temperaturas por 3 semanas, dividindo a pesquisa em um grupo controle, outro grupo com conservação do enxerto a  $-4^{\circ}$  C e outro grupo a  $-40^{\circ}$  C, e avaliando a regeneração axonal através da contagem direta do número de axônios mielínicos regenerados, bem como da mensuração do diâmetro dos axônios mielínicos, diâmetro das fibras mielínicas e espessura da bainha de mielina, medidas efetuadas em material coletado 50 dias após o autotransplante. Conclui que a regeneração axonal nos dois grupos criopreservados é semelhante à do grupo controle.

Judas et al., em 2007, realizam estudo experimental em tecidos retirados de 7 cadáveres humanos frescos para analisar a viabilidade celular de condrócitos após



congelamento, comparando com amostras não congeladas. Concluem que a criopreservação leva a uma diminuição da capacidade de sobrevivência das células. Como possíveis causas, os autores citam a dificuldade de penetração das soluções preservantes no tecido, as diferentes velocidades de congelamento das diversas camadas da matriz e o alto conteúdo de água na matriz extracelular.

Carone et al., em 2007, comparam as características estruturais de segmentos de nervos tibiais de ratos Wistar armazenados em duas diferentes soluções antes e após transplante autólogo. Os nervos são armazenados em solução de Wisconsin / Belzer® (produzida pela empresa Du Pont Pharma, Amsterdam, Holanda) ou em solução de Collins® (produzida pela empresa B. Braun S.A., Rio de Janeiro, Brasil) por 24 ou por 72 h a 4° C e transplantados, sendo comparados com enxertos autólogos frescos. Após o resfriamento, a densidade dos axônios mielinizados de grande calibre mostra-se maior nos enxertos armazenados em solução de Wisconsin / Belzer® do que naqueles conservados em solução Collins®. Após 50 dias do transplante, a densidade de axônios mielinizados regenerados através dos enxertos conservados em solução de Collins® corresponde somente a cerca de 80% da quantidade registrada nos enxertos conservados a frescos e daqueles preservados em Wisconsin / Belzer®. Além disso, os autores não observam diferenças significativas nos parâmetros morfométricos entre os grupos. O estudo confirma a eficácia da solução de Wisconsin / Belzer® para preservação de enxertos de nervos a frio em curto prazo.

Scabora et al., em 2009, continuando as pesquisas de Carone et al. (2007), estudam a organização ultra-estrutural de enxertos autólogos transplantados em ratos após o armazenamento a frio em dois tipos de soluções diferentes: solução de Wisconsin / Belzer® ou solução de Collins®, conservando-se, em ambos os tipos de solução, por 24 ou por 72 horas a 4° C, e analisando as características dos enxertos 50 dias após

transplante autólogo. Os enxertos conservados em solução de Wisconsin / Belzer® mostram alterações menos significativas tanto em termos de frouxidão das fibras colágenas por entre as fibras nervosas, como em termos de alterações estruturais da bainha de mielina (separação das lamelas lipídicas), porém todos os grupos mostram um grau destas alterações mais significativo do que no grupo controle de enxertos transplantados frescos. Seus achados após 50 dias evidenciam que a preservação das células de Schwann, e demais elementos que suportam a regeneração axonal, é superior nos enxertos conservados na solução de Wisconsin/Belzer®. Estes resultados representam mais uma tentativa de encontrar o melhor meio de conservação para armazenamento a frio de nervos para transplante heterólogo.

Wang et al., em 2014, estudam a criopreservação de membros inteiros de ratos. Doze ratos da linhagem Sprague-Dawley são divididos igualmente em grupo A (amputação acima do joelho) e grupo B (amputação a nível da articulação do tornozelo). Um membro posterior é amputado em cada rato, sendo irrigado com solução preservante, congelado progressivamente até  $-140^{\circ}\text{C}$  e conservado em nitrogênio líquido por 14 dias, quando então é reimplantado. No grupo A houve edema intenso, compressão de vasos sanguíneos e todos os reimplantes falharam. No grupo B, todos os reimplantes foram bem sucedidos e acompanhados por três meses, ocorrendo um caso de autofagia. Concluem que membros que não tenham grande quantidade de massa muscular podem ser criopreservados com sucesso e reimplantados.

Pegg, em 2015, estuda o efeito da preservação de células vivas em baixas temperaturas, ressaltando que soluções conservantes ideais precisam penetrar nas células de modo a aumentar a concentração total de solutos no meio intracelular, reduzindo os danos promovidos nesta região pela ação direta do congelamento, necessitando ao mesmo tempo apresentar baixa toxicidade. Sugere ainda a necessidade do preservante possuir uma

taxa de viscosidade suficiente para permitir a produção de um estado vítreo, que o permita se comportar como um sólido, mas sem qualquer cristalização, tanto no meio extracelular, como no meio intracelular, evitando danos diretos da baixa temperatura em qualquer dessas regiões. Cita glicerol, dimetil-sulfóxido, etanodiol e propanodiol, entre outras soluções, como possuidoras destas propriedades.

### 3.3 Métodos de avaliação da regeneração nervosa periférica

Gutmann e Gutmann, em 1942, observam que em coelhos a habilidade de espalhar os dedos da pata traseira dependia da integridade funcional do nervo peroneiro. Este fato é o ponto de partida para o desenvolvimento de métodos de avaliação funcional em ratos submetidos a uma lesão do nervo ciático, através da observação de parâmetros da marcha dos animais.

De Medinaceli et al., em 1983, desenvolvem um método quantitativo, reproduzível, para avaliação da condição funcional do nervo ciático de ratos, através da análise de dados característicos das pegadas impressas do animal. Este método foi modificado em 1984 pelos próprios autores, adicionando ao mesmo recursos de informática, tornando-o mais prático e de fácil aplicação, mantendo o cálculo do então denominado Índice Funcional do Ciático através da fórmula:

$$SFI = \left[ \frac{ETOF - NTOF}{NTOF} + \frac{NPL - EPL}{EPL} + \frac{ETS - NTS}{NTS} + \frac{EIT - NIT}{NIT} \right] \times \frac{220}{4}$$

Onde: SFI = Índice Funcional do Ciático, N = normal, E = experimental, TOF (“to opposite foot”) = distância ao pé oposto, PL (“print length”) = comprimento da pegada, TS (“total spread”) = espalhar total dos dedos ou distância do primeiro ao quinto dedos, IT (“intermediate toes”) = espalhar dos dedos intermediários ou distância entre o segundo e o quarto dedos.

Bain et al., em 1989, estudam a regeneração de nervos periféricos em ratos Wistar, visando estabelecer uma fórmula confiável para obtenção dos índices funcionais motores dos nervos ciático, tibial posterior e fibular. Ressaltam que os estudos até aquele momento apresentam conflitos em relação aos métodos de avaliação da função motora, sendo que parâmetros histológicos e eletrofisiológicos não necessariamente se correlacionam com a função real do nervo. Determinam um método de avaliação funcional que leva em consideração o comprimento da impressão plantar, a distância máxima entre os dedos e a distância entre os dedos intermediários, criando uma equação para cada um daqueles nervos estudados, fórmulas estas conhecidas como “índice de Bain-Mackinnon-Hunter”. Mostram que animais com lesões seletivas de nervos reproduzem déficits neuromusculares previsíveis, o que fornece aos pesquisadores uma consistente avaliação quantitativa não invasiva da função motora do membro no rato. Consideram os índices funcionais motores dos nervos tibial posterior e fibular mais fidedignos para avaliação da marcha do que o índice funcional motor do ciático, visto este último apresentar maior quantidade de musculatura envolvida. Apresentam as seguintes fórmulas para os índices funcionais motores dos três nervos:

$$SFI = -38,3 \times \frac{EPL-NPL}{NPL} + 109,5 \times \frac{ETS-NTS}{NTS} + 13,3 \times \frac{EIT-NIT}{NIT} - 8,8$$

$$TFI = -37,2 \times \frac{EPL-NPL}{NPL} + 104,4 \times \frac{ETS-NTS}{NTS} + 45,6 \times \frac{EIT-NIT}{NIT} - 8,8$$

$$PFI = -174,9 \times \frac{EPL-NPL}{NPL} + 80,3 \times \frac{ETS-NTS}{NTS} - 13,4$$

Onde: SFI = Índice Funcional do Ciático, TFI = Índice Funcional do Tibial, PFI = Índice Funcional do Peroneiro, N = normal, E = experimental, PL (“print length”) = comprimento da pegada, TS (“total spread”) = espalhar total dos dedos ou distância do primeiro ao quinto dedos, IT (“intermediate toes”) = espalhar dos dedos intermediários ou distância entre o segundo e o quarto dedos.

Dellon et al., em 1989, avaliam a confiabilidade em longo prazo do índice funcional do ciático empregando o método de avaliação funcional através da coleta manual das impressões plantares (método de *walking track*) em ratos Wistar submetidos a uma lesão do nervo ciático. Afirmam que os efeitos em longo prazo da denervação parcial sobre as extremidades do rato incluem o desenvolvimento de contraturas crônicas devido à paralisia muscular parcial residual e desequilíbrio muscular. Observam que 18 e 24 meses após o reparo da lesão as avaliações histomorfométricas mostram número de axônios que estatisticamente não apresenta diferença significativa em relação ao normal, porém relatam avaliação funcional inadequada no 24º mês, devido ao desenvolvimento de dedos em garra, contraturas interfalângicas e tornozelo em inversão ou eversão com ou sem dorsiflexão. Propõem que o número real das fibras nervosas pode não se correlacionar com a recuperação funcional por várias razões: a regeneração do nervo pode ser incompleta, a reinervação pode ocorrer em músculos antagonistas devido a uma regeneração por caminhos impróprios e aferentes sensoriais podem reinervar territórios inadequados, tudo isto resultando em alterações na pata, que pode desenvolver deformidades crônicas relacionadas à denervação parcial de músculos individuais, com subsequente paralisia e contratura da articulação, bem como contraturas resultantes de desequilíbrios musculares. Concluem que a presença dessas deformidades crônicas invalida o emprego do método *walking track* e do índice funcional do ciático como técnica de avaliação adequada para análise em longo prazo da função do nervo após sua reparação. Ressaltam, entretanto, que este método, desde que utilizado com a fórmula do índice funcional do ciático modificada por Bain et al. (1989), mostra-se confiável em outros trabalhos que avaliam a regeneração utilizando apenas o intervalo de 3 ou 4 meses subsequentes ao reparo da lesão.

Hare et al., em 1992, avaliam a recuperação funcional em ratos após lesão completa dos nervos, ciático, tibial ou peroneal, com período de seguimento de 1 ano após o reparo, utilizando análises em *walking track*. O nervo ciático mostra recuperação de 41% da função, enquanto no nervo tibial esta taxa é de 54%. O nervo peroneal exibe as mais elevadas taxas de recuperação, alcançando valores similares ao grupo controle. Consideram a avaliação da regeneração neural usando o método *walking track* como um recurso de valor desde que utilizado em adição aos métodos histomorfométricos e eletrofisiológicos.

Kline e Happel, em 1993, relatam a sua experiência de mais de 25 anos na utilização do potencial de ação neural como método de avaliação motora em cirurgias de reparação de nervos severamente lesionados que ainda permanecem em continuidade. Referem ser o potencial de ação uma ferramenta confiável para comprovar a viabilidade de fibras nervosas.

Weber et al., em 1993, analisam a interferência da autotomia nas avaliações que utilizam o índice funcional do ciático. Submetem 64 ratos Sprague-Dawley a diferentes tipos de lesões seguidas de reparação do nervo. Concluem que a autotomia ocorre mais frequentemente em associação com a secção do nervo do que em lesões por esmagamento, sendo mais comum em machos (66%) do que fêmeas (33%) e predominando na quarta semana pós-operatória. Observam que autotomia resulta em dados não utilizáveis na obtenção do índice funcional do ciático, vez que os pontos de referência da pata necessários para o cálculo são removidos. Sugerem que os pesquisadores considerem a autotomia quando forem escolher o método de avaliação da regeneração nervosa.

Foidart-Dessalle et al., em 1997, estudam a regeneração nervosa comparando enxertos venosos preenchidos com solução salina e células de Schwann com enxertos de

nervos ciáticos em 35 ratos Wistar. Medem a velocidade de condução e a latência distal da resposta motora, analisam a confiabilidade do índice funcional de De Medinacelli e verificam o número total de fibras e o diâmetro dos axônios antes e após a regeneração. Concluem que a adição de células de Schwann em enxertos de veias permite que o nervo possa regenerar-se através de aberturas maiores do que previamente descrito (25 mm contra 15 mm). Apontam o índice funcional do ciático como sendo confiável apenas em lesões agudas e de interesse limitado a lesões ortopédicas e deformidades do pé.

Hamers et al., em 2001, publicam pesquisa sobre a avaliação de lesão medular em ratos através de um método por eles desenvolvido e denominado *catWalk*®. As pegadas dos animais são captadas por câmara de alta velocidade, transformadas em imagens digitais e analisadas por programa de computador que capta uma grande quantidade de parâmetros, em particular medidas relacionadas à coordenação motora dos animais. Relatam que tiveram a idéia de criar tal sistema em 1996, ao estudarem lesão medular em ratos pela escala de classificação locomotora desenvolvida por Basso-Beattie-Bresnahan (escala BBB) e perceberem que o retorno da coordenação motora era algo difícil de ser analisada a olho nu por este método, por ser impossível observar quatro patas ao mesmo tempo, mesmo usando-se dois observadores como recomendado pelos criadores da escala. Referem que, a partir daí, o grupo começou a desenvolver vários protótipos de programas de filmagem para capturar pegadas de animais numa passarela, até chegar ao que consideram ser um sofisticado e confiável método de captação e análise de parâmetros estáticos e dinâmicos da marcha dos animais de pequeno porte.

Varejão et al., em 2004, fazem a proposta de um novo método de avaliação da função motora dos ratos por inspeção direta, através de vídeo-filmagem das pegadas dos animais, apregoando que este método garantiria uma boa avaliação, inclusive nas semanas iniciais após a lesão que registram dificuldades de obtenção de dados. Em sua

avaliação cinemática quantitativa, baseiam-se na medida de um ângulo do pé do animal, usando como pontos de referência o calcâneo e o quinto e o terceiro dedos, avaliados através de análises computadorizadas, porém os próprios autores afirmam que o método é de difícil aplicação.

Ferreira et al., em 2005, demonstram experimentalmente uma padronização de técnica inédita para obtenção do potencial evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. Utilizam 50 ratos Wistar devidamente anestesiados para a captação de respostas musculares através de eletrodos de agulha monopolar colocados em membros anteriores e posteriores, inseridos na musculatura distal dos referidos membros. Colocam também um eletrodo de terra na região lombar dos animais e dois eletrodos de agulha tipo *corkscrew* no couro cabeludo para estimulação elétrica transcraniana. Encontram uma latência mínima média das respostas dos membros anteriores de 2,5 ms e de membros posteriores de 6,5 ms. A amplitude média das respostas é de 3,0 mV nos membros anteriores e de 2,5 mV nos membros posteriores. Concluem que a técnica para captação do potencial evocado motor em ratos apresentada é eficaz na análise da evolução eletrofisiológica de lesões nervosas, podendo ser reproduzida de modo simples, além de apresentar confiáveis padrões de qualidade e aplicabilidade.

Martins et al., em 2006, publicam artigo analisando as correlações entre parâmetros obtidos a partir das avaliações eletrofisiológica, histomorfométrica e do índice funcional ciático após o reparo do nervo ciático de ratos. Utilizam oitenta e seis animais Wistar submetidos à secção do nervo ciático. As avaliações funcionais são feitas durante 12 semanas através do método *walking track*, analisando o registro de imagens das pegadas dos animais numa trilha de marcha. Avaliações eletrofisiológicas através de eletromiógrafo (com determinação de potenciais de ação nervoso e muscular) e histomorfométricas (com determinação da contagem de fibras nervosas proximais e



distais e diâmetro dos nervos) são realizadas no procedimento inicial e em re-abordagem após 6 meses, quando então os animais são submetidos à morte indolor induzida. As avaliações histomorfométricas são expressas através de três índices para todas as amostras obtidas: o índice de regeneração, calculado dividindo-se o número total de fibras regeneradas no segmento distal ao local da reparação pelo número total de fibras regeneradas no segmento proximal; o índice de regeneração extrafascicular, obtido dividindo-se o número total de fibras extrafasciculares regeneradas no segmento distal ao local da reparação pelo número total de fibras regeneradas no mesmo segmento, e o índice de mudança de diâmetro, calculado dividindo-se a média dos diâmetros das fibras no segmento distal ao local de reparação pela média dos diâmetros das fibras no segmento proximal. O índice de regeneração representa a percentagem de axônios que cruzam o local do reparo. Nos resultados, encontram correlação positiva entre a amplitude do potencial de ação final do nervo e a razão entre amplitudes inicial e final do mesmo potencial. Nas avaliações histomorfométricas, descrevem que o número total de fibras no segmento proximal correlaciona-se negativamente com o índice de regeneração e com o índice de mudança de diâmetro, embora notem leve tendência à diminuição do número de fibras distalmente. Por outro lado, o diâmetro das fibras proximais apresenta boa correlação positiva com o diâmetro das fibras distais, assim como o número de fibras extrafasciculares distais correlaciona-se bem com o índice de regeneração das fibras extrafasciculares. Relatam elevada taxa de perda dos animais, com alto índice de complicações, tendo utilizado 86 ratos e obtendo um número final de apenas 30 animais utilizados na pesquisa, devido à ocorrência de 17 retrações músculo-tendíneas, 29 diferentes tipos de lesões secundárias à autofagia nas patas operadas, 3 óbitos durante a anestesia e 7 óbitos no período pós-operatório. Ressaltam que retrações crônicas dos membros, contraturas agudas ou crônicas e a ocorrência de autofagia prejudicam a

habilidade do animal para a marcha e causam erros no cálculo dos índices funcionais dos nervos. Analisam que tais complicações em seu estudo mostram-se responsáveis por 42% de exclusões, porém citam que existem estudos nos quais esse percentual pode chegar a 65% (Weber et al., 1993) ou até mesmo 88% dos animais (Carr et al., 1992), tornando inviável o uso do método *walking track*. Buscando as possíveis correlações entre as análises através do método estatístico de Pearson, testam um total de 17 parâmetros, mas somente duas correlações positivas entre diferentes tipos de avaliações são encontradas. Os autores concluem que não existem correlações significantes entre a avaliação funcional da regeneração nervosa periférica e as avaliações eletrofisiológicas e morfológicas.

Gasparini et al., em 2007, analisam a correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. Utilizam 25 ratos da linhagem Wistar, submetidos a esmagamento controlado do nervo e avaliados por dois métodos convencionais para obtenção da medida manual e computadorizada de parâmetros das impressões das pegadas dos animais, e por um novo método desenvolvido pelos autores, baseado na filmagem das pegadas e medida dos mesmos parâmetros, sendo feita a comparação entre os valores obtidos no pré-operatório com aqueles medidos em vários momentos do pós-operatório e entre os diferentes métodos nos vários períodos. Os resultados mostraram que o método da medida dos parâmetros pela filmagem das pegadas permite melhor visualização da pata acometida pela lesão do nervo e que este método se correlaciona positivamente com os convencionais, mesmo já a partir da primeira semana de pós-operatório, fase em que comumente é mais difícil a obtenção precisa de medidas das pegadas. Os autores ressaltam que pegadas obtidas em tiras de papel podem sofrer algum borramento das

impressões e que a obtenção da medida manual por vezes depende da subjetividade do avaliador. Referem ainda que o índice funcional do ciático é uma medida passível de erro.

Deumens et al., em 2007, estudam a utilidade do sistema de passarela de marcha *catWalk*® para detectar déficits de marcha dinâmicos e estáticos, utilizando modelo de lesão do tipo neurotmesa em nervos ciáticos de ratos, com 1 centímetro de intervalo entre os cotos e ausência da recuperação adequada do movimento. Testes funcionais são realizados durante 8 semanas e uma grande quantidade de parâmetros da marcha são identificados como imediatamente afetados de forma grave na pata ipsilateral, por vezes atingindo níveis correspondentes a apenas 15% dos mesmos parâmetros na pata não afetada. Concluem que a passarela detecta objetivamente deficiências da marcha dinâmica e estática após a secção do nervo ciático.

Bozkurt et al., em 2008, também avaliam a utilização do sistema *catWalk*® na detecção de ambos os déficits dinâmico e estático da marcha após produzirem neurotmesa em nervos ciáticos de ratos, realizando seguimento de 12 semanas. Ressaltam que o método de avaliação da marcha pelo *walking track*, apesar de amplamente utilizado, não é adequado para avaliação concomitante de parâmetros estáticos e dinâmicos da movimentação do animal. Concluem que o sistema *catWalk*® pode ser usado para demonstrar simultaneamente os parâmetros estáticos e dinâmicos da marcha, em especial medidas de coordenação e intensidade de pressão das pegadas dos animais.

## 4. MÉTODOS

## **4 MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo IOT 959, em 28/11/2012 (Anexo A) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPESQ e Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo 321/13, em 13/11/2014 (Anexo B). As análises funcionais realizadas no Laboratório de Regeneração Nervosa do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – IB-UNICAMP foram aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia – CEEA/IB da UNICAMP e pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP através do Protocolo N° 2796-1/2012 (Anexo C).

### **4.1 Casuística e cálculo da amostra**

Foram utilizados 20 animais da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, de peso e idades aproximadamente iguais, machos, divididos em 4 grupos de 05 ratos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que ficaram mantidos em gaiolas com cama de maravalha e água filtrada, no interior do Laboratório de Microcirurgia Experimental do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, em ambiente climatizado, sendo os animais alimentados com ração industrial durante a pesquisa. Durante todo o estudo os animais foram identificados através de marcas circulares em suas caudas, feitas com pincéis hidrocor atóxicos. Após o término da

pesquisa os animais foram submetidos à morte indolor induzida, com uma dose letal de pentobarbital sódico injetado intraperitonealmente, de acordo com os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Medicina Veterinária (American Veterinary Medical Association) em 2001 e aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados com os Animais (Institutional Animal Care and Use Committee) em 2002, sem reaproveitamento dos mesmos para outros experimentos, pois neste estudo poderia ocorrer reinervação incompleta, contraturas, déficits motores, autofagia e outros problemas que afetam a vida do animal. O descarte dos animais ocorreu em caixas de material biológico, seguindo os procedimentos recomendados pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os critérios de inclusão utilizados foram: ratos Wistar machos, com idade aproximada de sete a oito semanas e pesando entre 200 a 300 gramas no momento em que foram introduzidos na pesquisa, que não apresentaram malformações físicas ou sinais clínicos de infecções ou outras patologias na inspeção inicial. Os critérios de exclusão foram: sinais de infecção, malformações físicas ou outras patologias na inspeção inicial e sinais de autofagia, infecção ou evolução para óbito durante a pesquisa.

A escolha do tamanho da amostra foi fundamentada em estudos prévios que demonstram que um número de cinco animais é representativo na observação das mudanças ocorridas na estrutura e na função de nervos submetidos à preservação em baixas temperaturas. Hirasé et al., em 1992, realizaram análises histomorfométricas e funcionais em um grupo de 6 ratos da linhagem Brown Norway submetidos a amputação de membro seguida de reimplante com interposição de enxertos de nervo ciático, artéria femoral e veia femoral coletados de 6 ratos Lewis e criopreservados por mais de 3 semanas, tendo comprovado, através de análises estatísticas de parâmetros da marcha e da regeneração axonal, excelentes resultados aos 3 meses de pós-operatório. Atchabahian

et al. (1999) estudaram a antigenicidade de enxertos em relação ao tempo de conservação a frio, em um grupo de dez ratos Lewis, demonstrando tamanho da amostra significativo, numa espécie que, entretanto, é mais sensível e mais suscetível a infecções e perdas de animais, além de ser uma raça mais difícil de ser obtida do que a espécie Wistar, esta tão bem estudada em trabalhos como os de Scabora et al. (2009) e Lemos et al. (2008). Nesta última pesquisa foram utilizados três grupos de cinco animais para analisar-se enxertos de nervo autógenos, enxertos de nervos alógenos e tubos de veias, sendo esta casuística considerada significativa. Em nosso estudo, por utilizarmos alguns métodos inovadores, não haviam dados para o exato cálculo do tamanho da amostra, motivo pelo qual partimos de um pressuposto no qual foi adotado o número mínimo de animais compatível com experimentos já existentes com enxertos de nervos conservados a frio, respeitando-se os princípios da ética em pesquisa animal.

Por tais motivos, fixamos a casuística em 20 ratos da espécie Wistar, divididos em 4 grupos de 5 animais cada:

- grupo 1 - animais submetidos a secção do nervo ciático por 14 dias e, posteriormente, enxertia autóloga convencional do nervo;
- grupo 2 - animais submetidos a retirada de um segmento do nervo ciático, que foi preservado a frio por 14 dias e, posteriormente, enxertado nos mesmos ratos;
- grupo 3 - animais submetidos a secção do nervo ciático por 50 dias e, posteriormente, enxertia autóloga convencional do nervo;
- grupo 4 - animais submetidos a retirada de um segmento do nervo ciático, que foi preservado a frio por 50 dias e, posteriormente, enxertado nos mesmos ratos.

## 4.2 Técnica cirúrgica

Todos os procedimentos operatórios foram realizados no Laboratório de Microcirurgia Experimental do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, utilizando-se técnica e materiais microcirúrgicos (marca Rhosse®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e microscópio binocular com distância focal em torno de 200 mm e aumento de 20 vezes (marca D.F. Vasconcellos S.A.®, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1).



**Figura 1** - Microscópio e Laboratório de Microcirurgia utilizados nos procedimentos

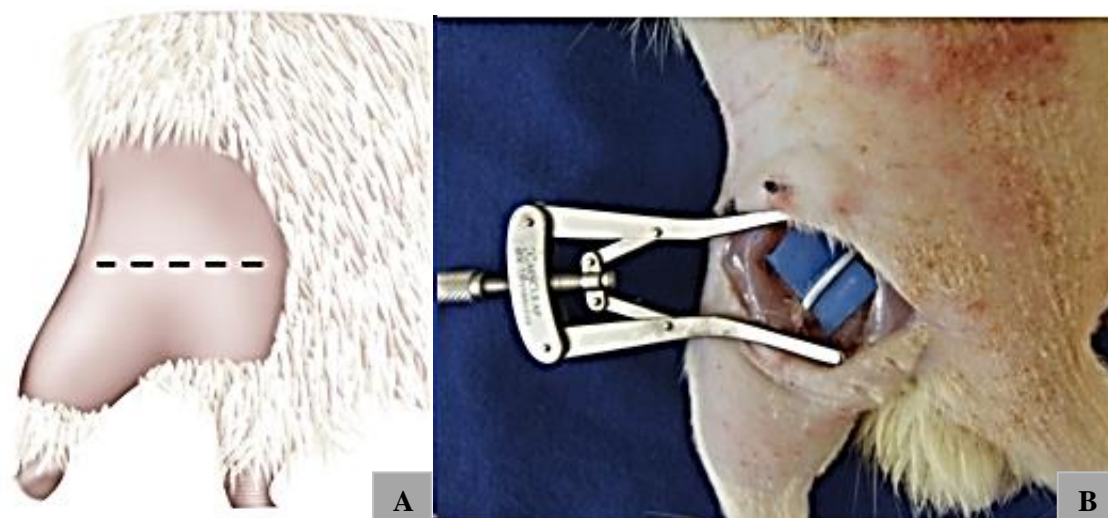
Seguimos o protocolo de anestesia e analgesia conforme Tranquilli et al. (2007). Antes de cada procedimento cirúrgico, foi feita anestesia do animal com Xilazina 10mg/kg + cetamina 50 mg/kg por via intraperitoneal. Os reflexos palpebral e pupilar



foram monitorados para manter o animal em plano anestésico, e, quando necessário, foi realizado 1/3 da dose inicial como reforço anestésico.

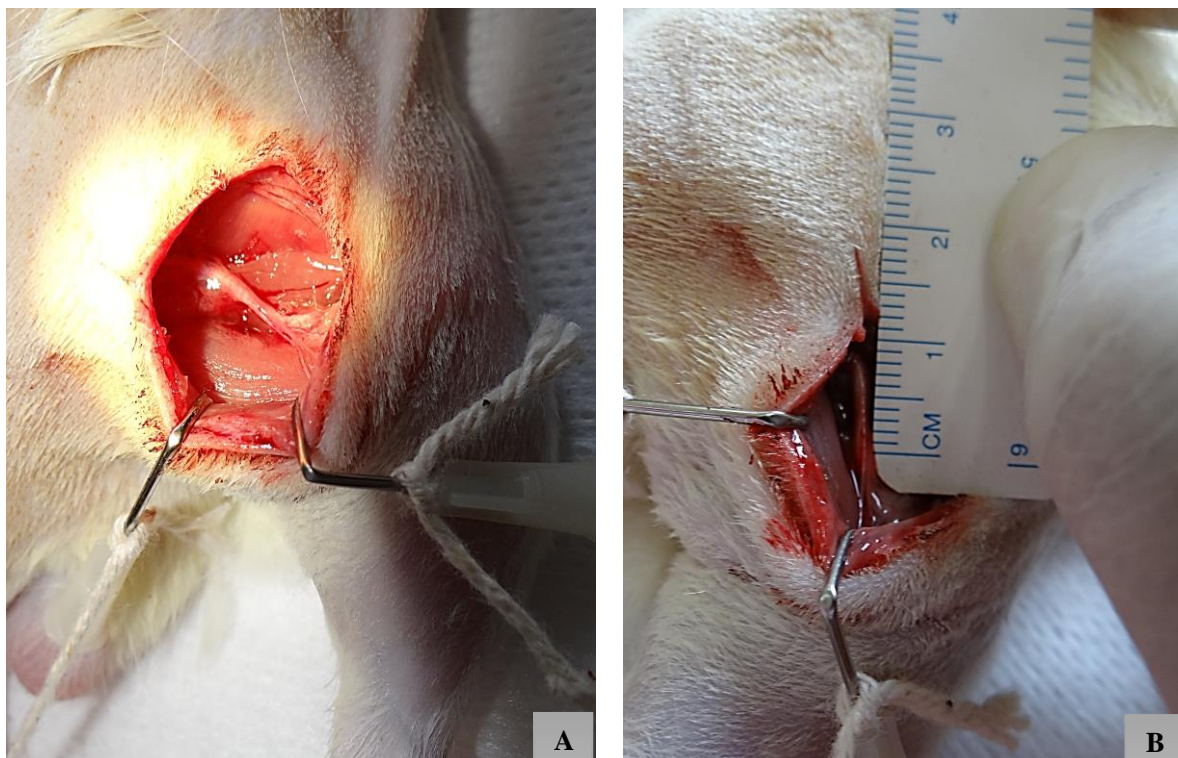
As primeiras cirurgias de cada grupo foram: secção do nervo ciático (grupos 1 e 3) e retirada do enxerto (Grupos 2 e 4).

Os procedimentos iniciaram-se com o membro inferior direito sendo preparado com tricotomia, o animal posicionado em decúbito ventral, em suporte próprio, com as patas traseiras presas em abdução, feito a aspersão de solução anti-séptica e proteção do local com toalhas cirúrgicas. Procedeu-se a incisão cutânea retilínea de aproximadamente 2,5 cm na região glútea direita, divulsão de tecidos, dissecação roma do septo intermuscular (entre os músculos isquio-tibiais e glúteo maior) e exposição do nervo ciático (Figura 2).

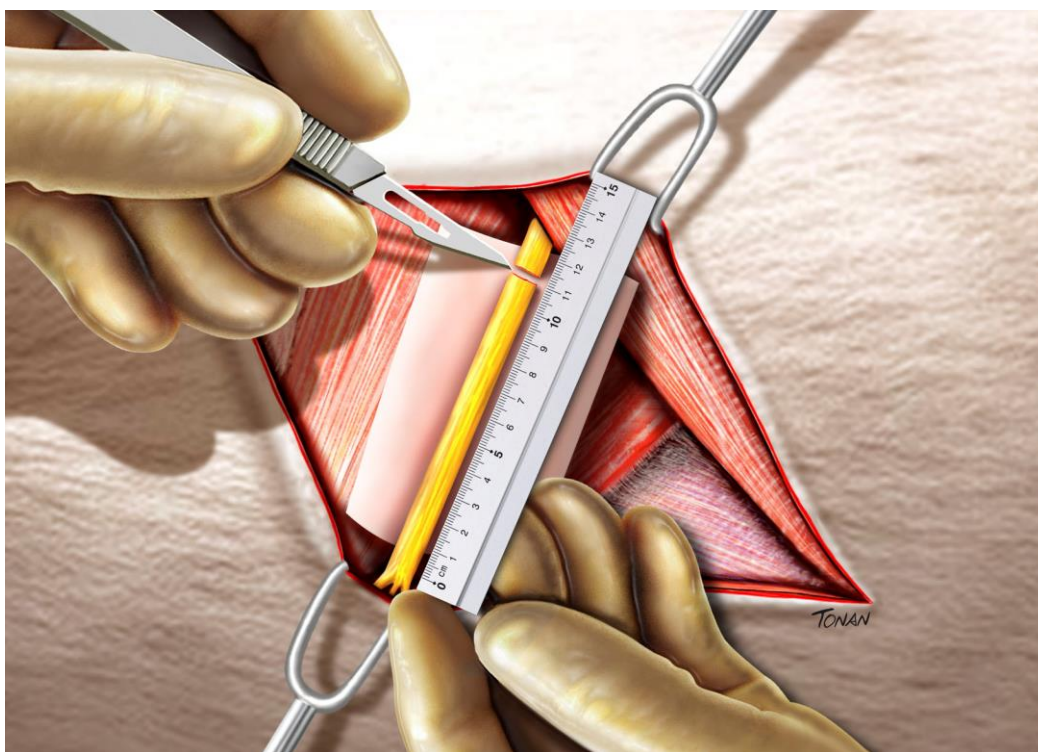


**Figura 2** - Desenho esquemático do acesso cirúrgico para o nervo ciático direito de ratos (A) e exposição do nervo ciático proximalmente à sua trifurcação (B)

Após dissecação e isolamento do nervo, nos grupos 1 e 3, mediu-se o nível para a neurotomia (Figura 3) e realizou-se a secção do nervo, feita sempre no mesmo local, a 11 milímetros acima do local onde esta estrutura se trifurca em nervos sural, tibial e fibular (Figura 4).

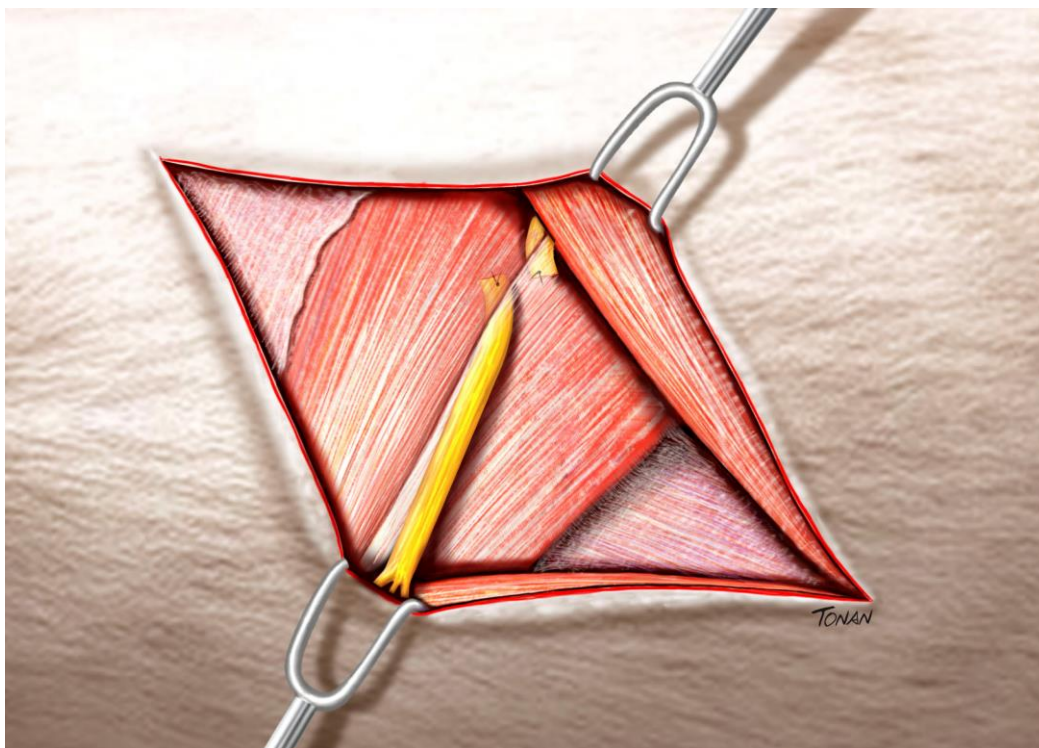


**Figura 3** - Nervo ciático dissecado (A) e medida dos níveis de neurotomia (B)



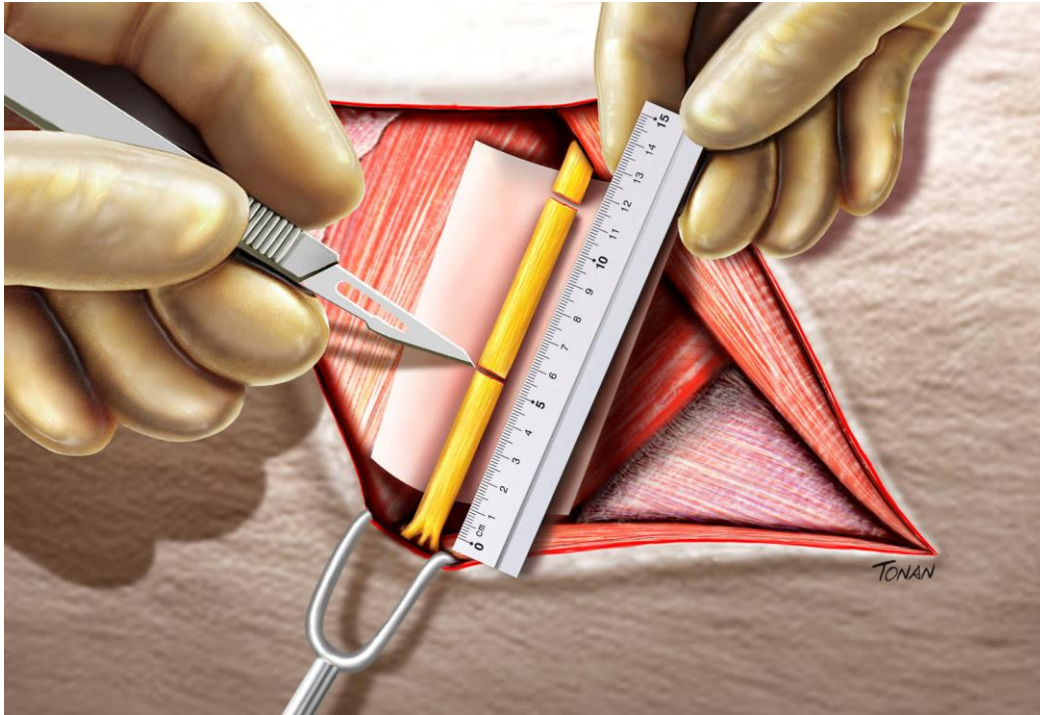
**Figura 4** - Desenho esquemático da localização da secção proximal do nervo ciático

A seguir ancorou-se os cotos proximal e distal em plano submuscular, para evitar a possibilidade de regeneração espontânea decorrente de uma aproximação entre eles (Figura 5).



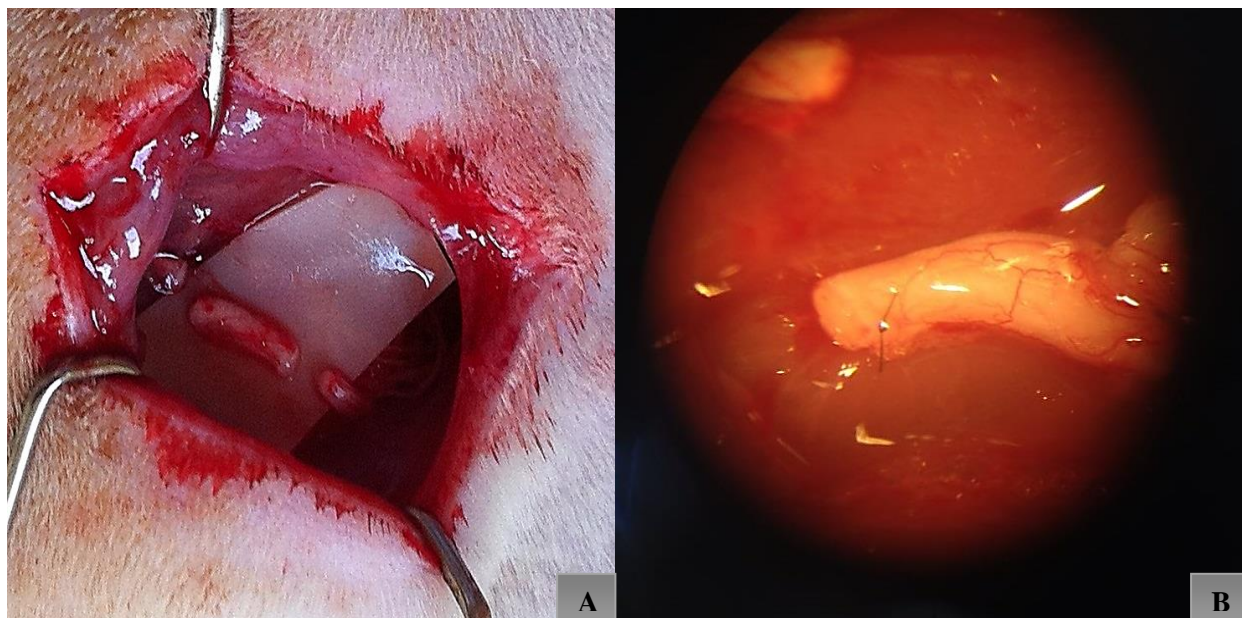
**Figura 5** - Desenho esquemático da ancoragem dos cotos proximal e distal em plano submuscular

Nos grupos 2 e 4, procedeu-se de imediato a retirada do enxerto, colhendo-se um segmento de 6 milímetros de extensão a partir de um ponto distal localizado 5 milímetros acima da trifurcação do nervo, de modo que o ponto mais proximal de secção do nervo também se localizou a 11 milímetros acima da trifurcação desta estrutura (Figura 6).



**Figura 6** - Desenho esquemático da localização das secções proximal e distal para retirada do enxerto

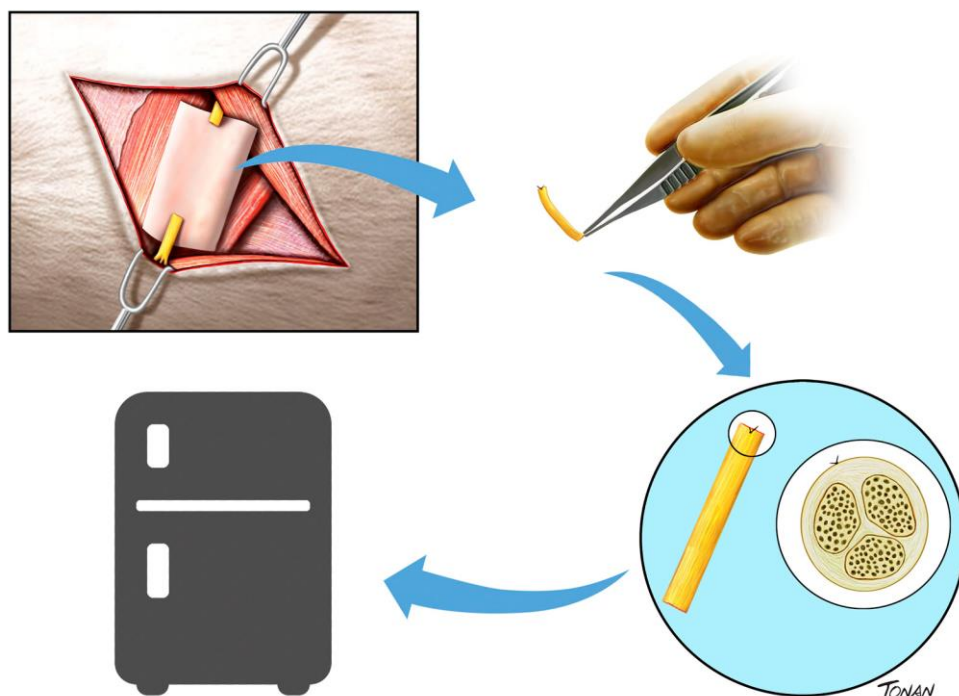
Após os enxertos colhidos, eles tiveram seus cotos proximais marcados com um ponto epineural simples feito com fio de nylon monofilamentado 10-0 (Figura 7).



**Figura 7** - Enxerto colhido (grupo 2) (A), marcado em seu coto proximal com um ponto epineural (B)

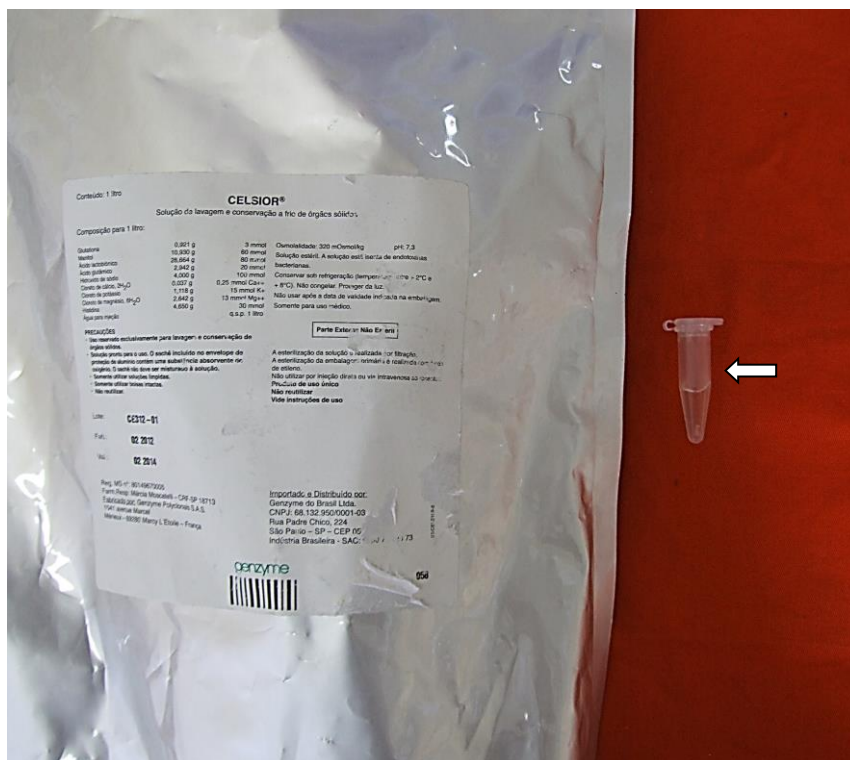
Ao final de cada procedimento, realizou-se sutura de aproximação no plano muscular quando necessário, seguida de sutura de pele com fio de nylon monofilamentado 4-0.

A seguir, os enxertos foram colocados em tubos plásticos identificados (tipo Eppendorf) contendo solução Celsior® e encaminhados para o Banco de Tecidos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo, onde foram conservados em Solução Celsior® por 14 dias (grupo 2) ou por 50 dias (grupo 4) à temperatura de 4 graus Celsius (° C) em refrigerador com sistema de monitoramento e controle contínuo de temperatura (Figura 8).



**Figura 8** - Desenho esquemático mostrando a retirada do enxerto, marcação no coto proximal e encaminhamento para conservação a frio (grupos 2 e 4)

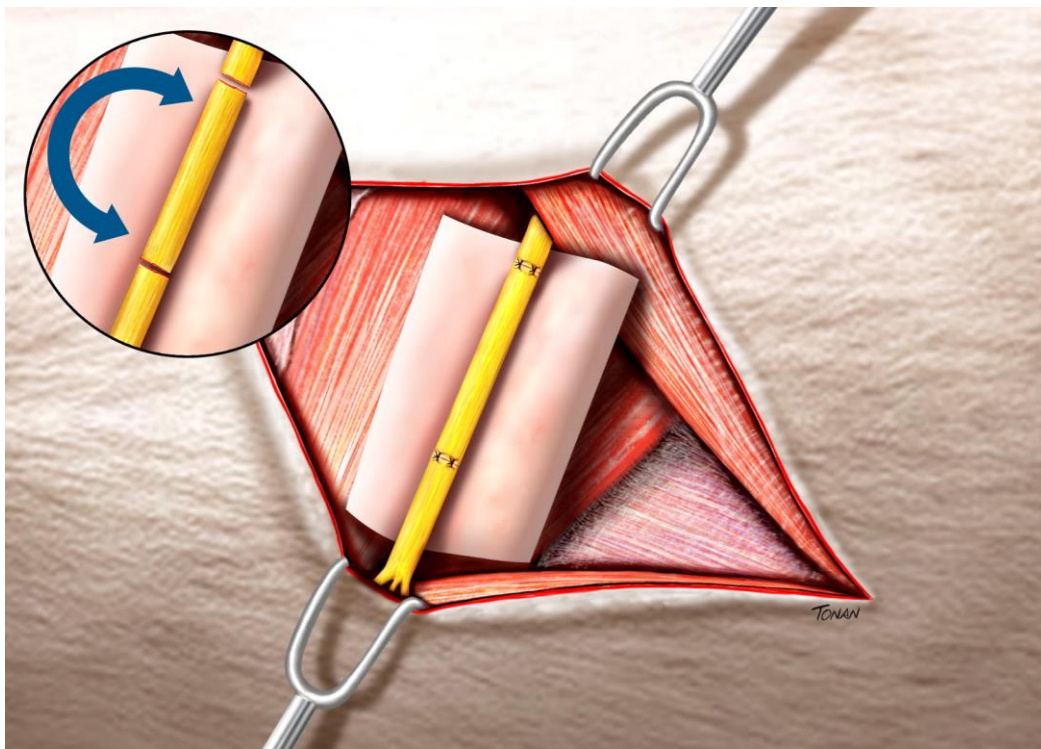
A Solução Celsior® trata-se de uma solução própria para conservação de tecidos a frio composta de glutathione (0,921 g/l), manitol (10,930 g/l), ácido lactobiónico (28,664 g/l), ácido glutâmico (2,942 g/l), hidróxido de sódio (4,000 g/l), cloreto de cálcio (0,037 g/l), cloreto de potássio (1,118 g/l), cloreto de magnésio (2,642 g/l), histidina (4,650 g/l) e adjuvantes, aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob o Registro Nº 80185570001, Processo 25351.329058/2006-87, fabricada em Bensheim, Hessen, Alemanha pelo Laboratório Dr. Franz Kohler Chemie GmbH e comercializada no Brasil pela empresa Contatti Comércio e Representações Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil, sob autorização número 8018557 (Figura 9).



**Figura 9** - Solução Celsior® e tubo plástico onde foi colocado o enxerto (seta)

As segundas cirurgias de cada grupo foram: enxertias convencionais (Grupos 1 e 3) ou enxertias de nervos preservados a frio (Grupos 2 e 4). Os procedimentos seguiram a mesma técnica operatória das cirurgias iniciais, com incisão sobre a incisão prévia, divulsão de tecidos e exposição da região do nervo ciático.

Nos grupos 1 e 3, após respectivamente 14 e 50 dias de denervação, localizou-se os cotos da neurotomia proximal previamente ancorados em plano submuscular e regularizou-se suas bordas, ressecando-se eventuais neuromas. Realizou-se então a secção distal do nervo num ponto 5 mm proximal à trifurcação do mesmo e inverteu-se o enxerto, suturando-se sua borda distal no coto proximal do nervo, e sua borda proximal, no coto distal do nervo, com o intuito de deixar qualquer alinhamento de fibras completamente ao acaso. As suturas foram sempre feitas com 4 pontos simples dispostos em intervalos simétricos, utilizando-se fio de nylon monofilamentado 10-0 (Figura 10).



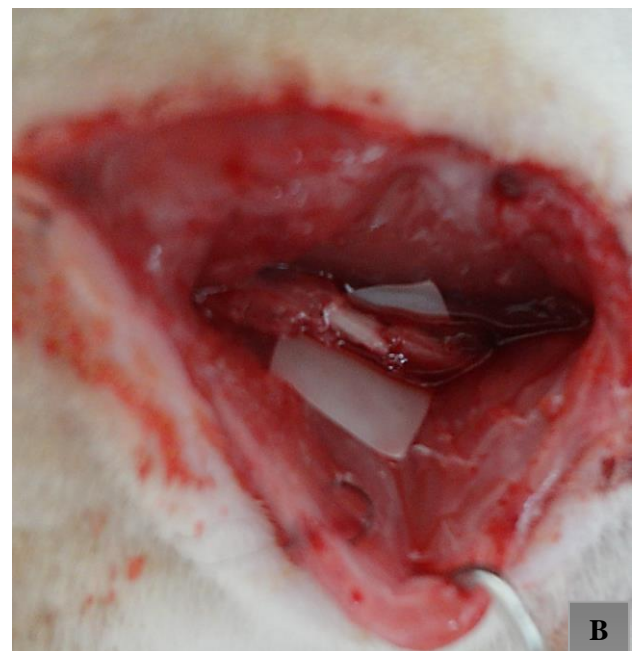
**Figura 10** - Desenho esquemático da secção distal, inversão e sutura do enxerto convencional (grupos 1 e 3)

Nos grupos 2 e 4, após respectivamente 14 e 50 dias de resfriamento, o enxerto foi retirado do refrigerador e colocado no mesmo animal doador, seguindo a mesma técnica utilizada nos outros grupos, procedendo-se a regularização das bordas e sutura epineural com fio de nylon monofilamentado 10-0, tendo sido os cotos também invertidos de forma que a porção proximal do enxerto, previamente marcada com um ponto, foi suturada na extremidade distal do nervo, e a porção distal do enxerto foi suturada na extremidade proximal do nervo, evitando-se qualquer aposição intencional de fibras nervosas (Figuras 11, 12, 13 e 14).





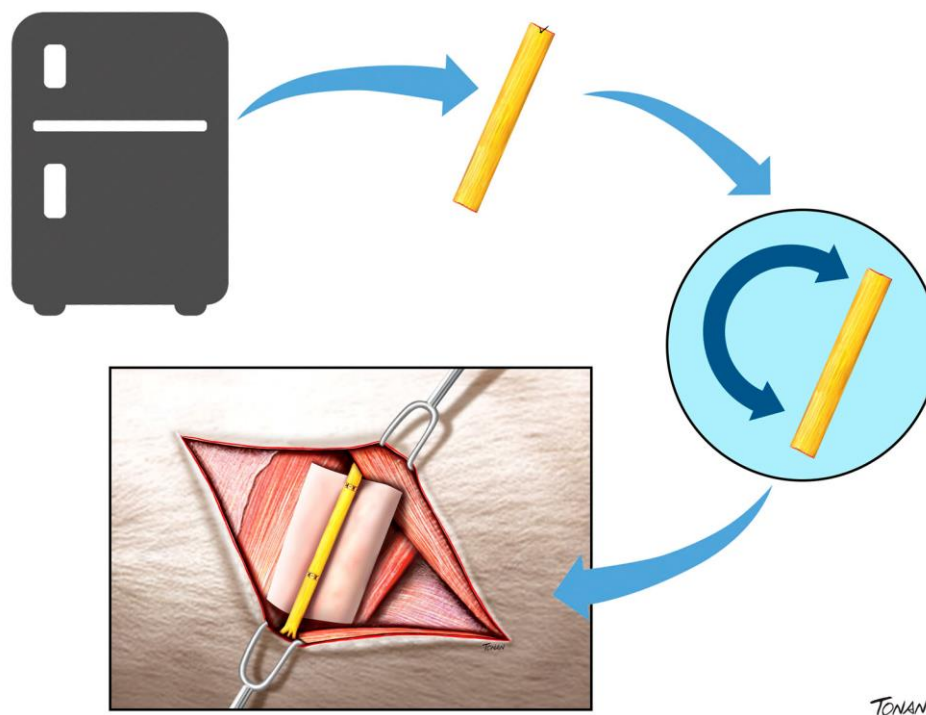
**Figura 11** - Dissecção dos cotos seccionados na cirurgia anterior, aguardando regularização das bordas e enxertia (grupo 2)



**Figura 12** – Nervo pós-resfriamento de 50 dias, notando coloração mais clara (A), reenxertado no animal do grupo 4 de onde foi retirado (B)



**Figura 13** - Enxertia pós-resfriamento do nervo (grupo 2)



**Figura 14** - Desenho esquemático mostrando a enxertia invertida pós-resfriamento (grupos 2 e 4)

Após cada procedimento, realizou-se sutura de aproximação no plano muscular quando necessário, seguida de sutura de pele com fio de nylon monofilamentado 4-0.

No pós-operatório foi sempre ministrado meloxicam 2 mg/kg uma vez ao dia por 7 dias e cloridrato de tramadol 5 mg/100 gramas de peso do animal por via intramuscular por 5 dias.

Em todo o período em que os animais estiveram denervados, foi realizada diariamente, no membro posterior operado, a aplicação local de um produto antibiótico, antisséptico, repelente e cicatrizante (bactrovet prata® aerosol), composto de sulfadiazina, alumínio e cipermetrina, medicamento que forma uma camada protetora sobre a pele do animal e que foi utilizado neste estudo visando evitar a autofagia.

### **4.3 Análises funcionais**

Antes de qualquer procedimento, os animais foram submetidos a um treinamento de marcha em duas fases: inicialmente durante sete dias por 10 minutos ao dia em uma esteira para pequenos animais com velocidade controlada fabricada pela empresa AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil, e, a seguir, durante outros sete dias, também por 10 minutos ao dia, em uma maquete com uma passarela de acrílico construída pela Oficina Ortopédica do Hospital das Clínicas de São Paulo, SP, Brasil, especialmente planejada de forma a simular a passarela para marcha livre da aparelhagem onde posteriormente eles foram colocados para a obtenção das análises funcionais (Figuras 15 e 16).

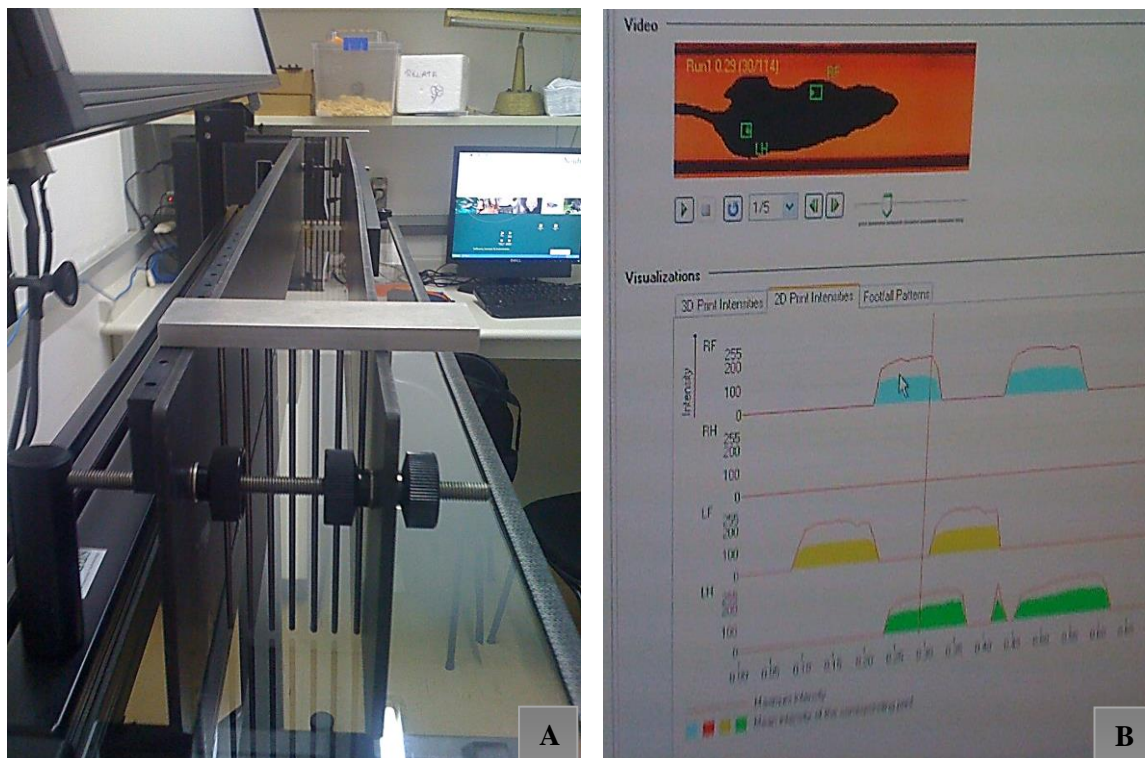


**Figura 15** - Fase 1 do treinamento funcional: esteira com velocidade controlada



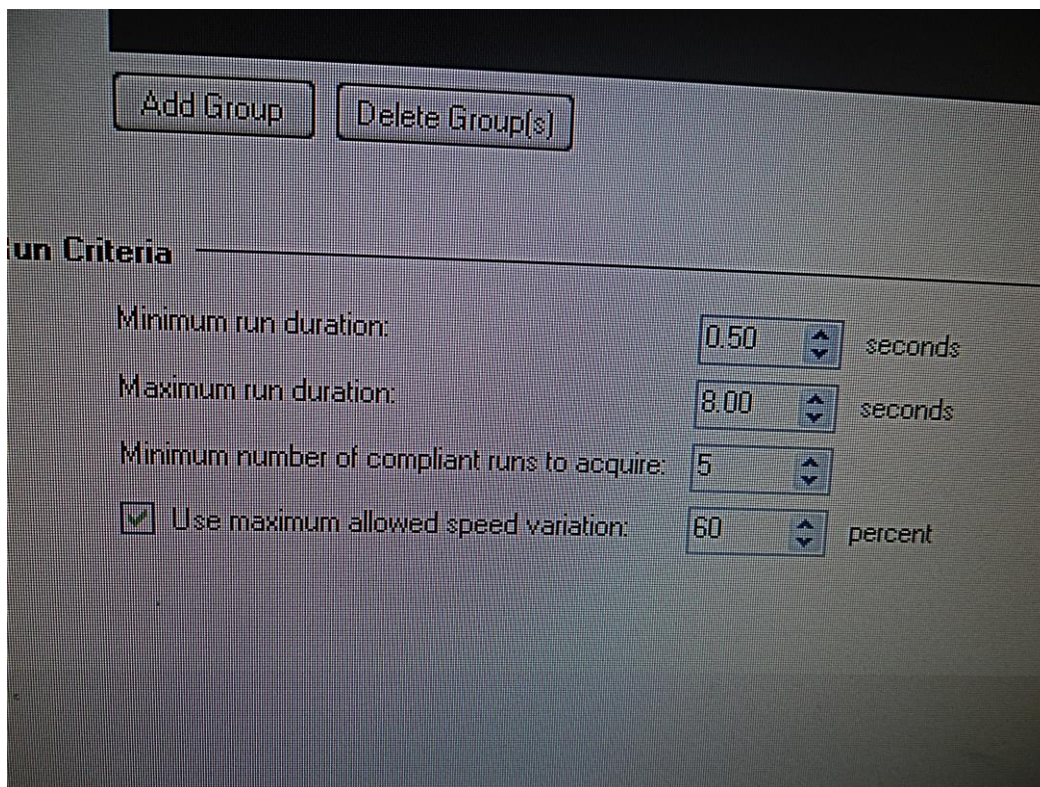
**Figura 16** - Fase 2 do treinamento funcional: maquete para marcha livre

Em todos os grupos, após o treinamento, foi feita a análise funcional da marcha normal como controle, colocando-os em uma aparelhagem própria para análise da marcha de pequenos animais de experimentação constituída de uma passarela de vidro ligada a um programa de computador, sistema chamado catWalk® XT versão 9,1, desenvolvido inicialmente pelo Dr. Frank Hamers do Instituto de Neurociências da Universidade de Utrecht, Holanda, fabricado pela empresa holandesa Noldus Information Technology, Wageningen, Guéldria, Holanda, e comercializado no Brasil pela empresa Sellex S.A., São Paulo, SP, Brasil. O uso de tal aparelhagem para esta pesquisa foi disponibilizado pelo Laboratório de Regeneração Nervosa do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – IB-UNICAMP. O conjunto deste sistema é formado por uma plataforma com fundo de vidro para deambulação dos animais, coberta por uma iluminação que é refletida internamente em toda a passarela, e acoplada a uma câmara filmadora de alta velocidade, que transforma cada cena em imagens digitais, transmitidas a um programa de computador que fornece tabelas e gráficos dinâmicos representativos da marcha, permitindo avaliações dos principais parâmetros da marcha dos animais (Figura 17).



**Figura 17** - Sistema catWalk® XT versão 9,1 (A), que fornece parâmetros dinâmicos da marcha do animal (B)

Antes de iniciar a análise funcional de cada grupo no catWalk®, a aparelhagem foi calibrada e regulada conforme orienta seu manual de instruções, de modo que o programa possa captar apenas as marchas que apresentem uma intensidade de variação de parâmetros adequada para as pegadas e filtrar ruídos de fundo ou interferências de segundo plano. Assim, regulou-se os critérios da seguinte forma: captação da câmara (máxima captação): 30,99 pixels; limiar de intensidade (mínima captação): 0,20 pixels; distância da câmara à passarela: 56 cm; calibração da área da passarela a ser captada: 20 cm x 10 cm; duração mínima da corrida: 0,50 segundos; duração máxima da corrida: 8 segundos; número mínimo de corridas adquiridas por animal: 2; máxima variação de velocidade permitida em cada corrida: 60 %; número mínimo de animais: 5 (Figura 18).



**Figura 18** - Calibração da aparelhagem conforme padrões orientados pelo sistema catWalk®

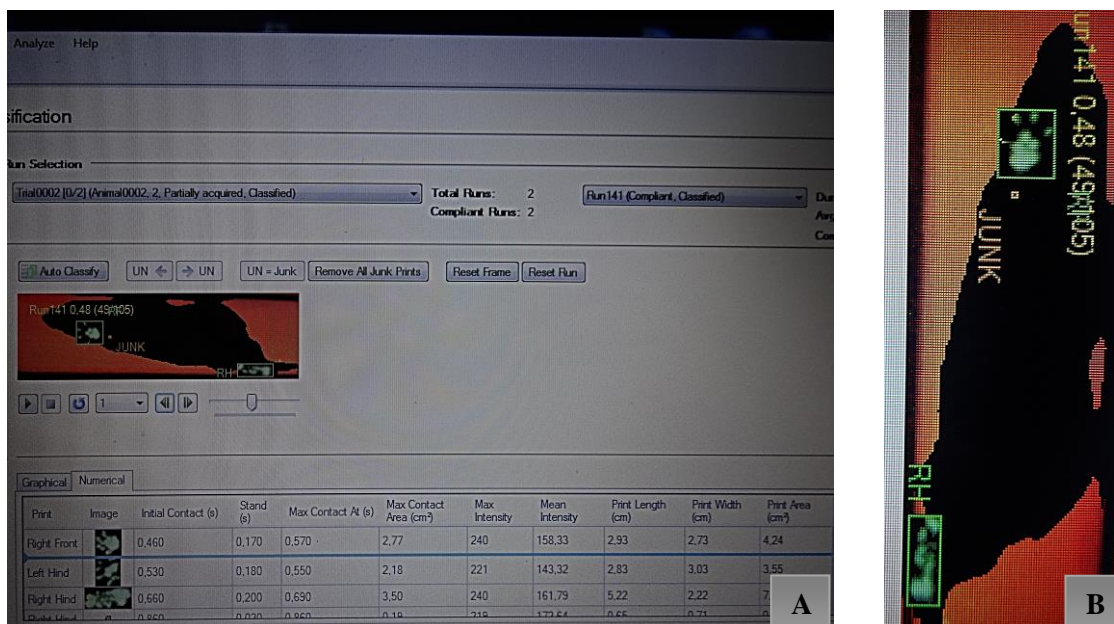
Após higienizar a passarela com papel toalha embebido em álcool 70% para evitar resquícios de odores, sujeiras ou excrementos de experimentos anteriores que podem alterar o comportamento dos animais, posicionou-se os ratos no interior do aparelho, fechando-se a tampa, ligando-se a iluminação da passarela e esperando-se o animal andar livremente na plataforma, até completar no mínimo 2 e no máximo 5 corridas por cada animal (Figura 19).



**Figura 19** - Rato posicionado no sistema catWalk®. Observar marcação do animal na cauda

Ao final de cada avaliação, os vídeos de todas as corridas foram classificados por um processo manual de conferência das imagens, analisando o que o programa considerou como pegadas dos animais e limpando, quadro a quadro, qualquer imagem que representasse impressões do abdomen, pelvis, cauda, nariz ou outras partes do animal que por vezes tocam a passarela, sendo que, após este processo de conferência, o programa fornece uma tabela com os parâmetros da marcha classificada e apresenta a imagem das pegadas, tornando visível a diferença, quantificada na tabela, entre as medidas do membro operado e dos membros não operados. Dentre os parâmetros fornecidos pela máquina, utilizou-se dois deles para as avaliações: a área máxima de contato do membro operado e a máxima intensidade de pressão durante o contato máximo da pata operada (Figura 20). Em cada avaliação realizada, para cada parâmetro calculou-se a média dos valores de todas as corridas do mesmo animal e transportou-se esta média para tabelas Excel®.





**Figura 20** - Marcha classificada, com tabela final dos parâmetros (A) e imagens das pegadas do MAD (não operado) e do MPD (operado) (B)

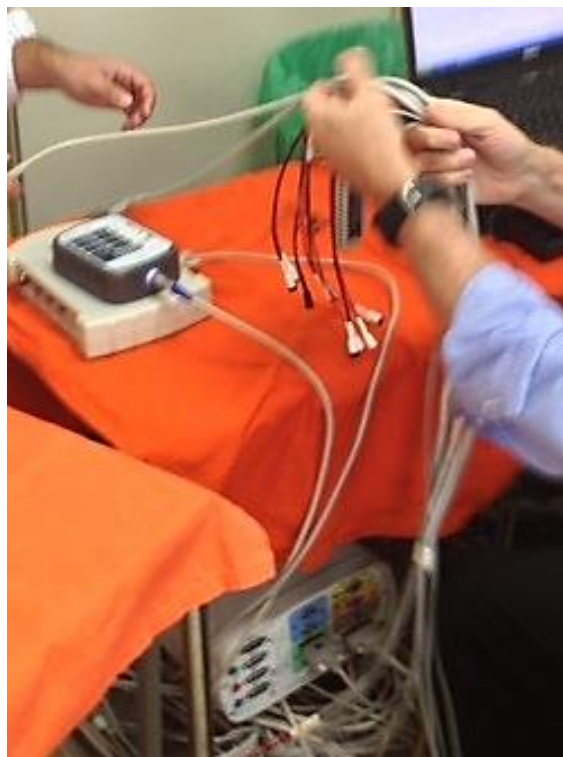
Após as enxertias (convencionais nos grupos 1 e 3 ou preservadas a frio nos grupos 2 e 4), a análise funcional da marcha nesta aparelhagem foi avaliada no terceiro ou quarto dia de pós-operatório e quinzenalmente durante 60 dias, seguindo a mesma metodologia descrita para a avaliação pré-operatória de controle.

#### 4.4 Análises eletrofisiológicas

O estudo eletrofisiológico foi realizado através da análise do potencial evocado motor 60 dias após os procedimentos cirúrgicos da enxertia, obtendo-se a latência (tempo de resposta) e a amplitude do estímulo no membro operado e no membro contralateral, este último servindo como controle.

Os materiais necessários para o procedimento consistiram em aparelho de eletromiografia de quatro canais, 2 eletrodos de agulha monopolares do tipo *corkscrew*

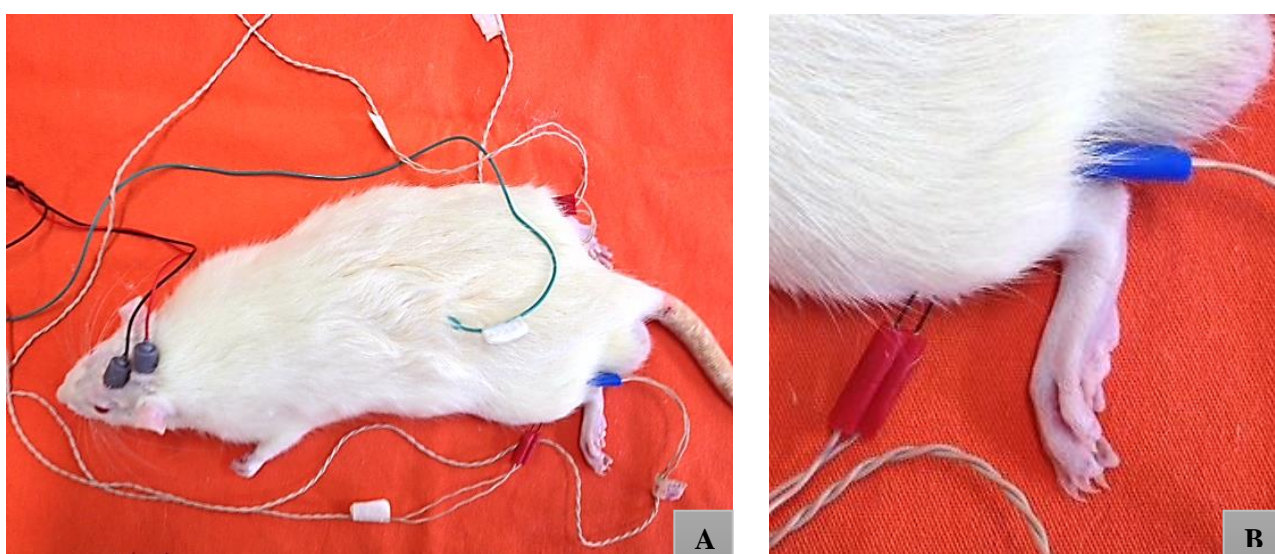
EO401 da empresa Neuromedical Supplies (Horsham, West Sussex, Inglaterra) para estimulação transcraniana, 1 eletrodo de agulha monopolar para ser utilizado como terra e 4 pares de eletrodos de agulhas monopolares para serem utilizados na captação das respostas motoras nos membros posteriores do animal (Figura 21).



**Figura 21** - Eletromiógrafo de quatro canais utilizado na obtenção do potencial evocado

Os passos para obtenção do potencial evocado motor nos ratos foram feitos conforme descrito por Ferreira et al. (2005), iniciando-se com anestesia com 55 a 75 mg/Kg de pentobarbital intraperitoneal associado com 55 a 75 mg/Kg de ketamina intramuscular. A captação das respostas musculares foi realizada com a colocação de pares de eletrodos de agulha monopolar (captador e referência), com distância inter-eletrodos definida e fixa, para captação em membros posteriores, inseridos na musculatura distal dos referidos membros, nos músculos tibial anterior e gastrocnêmio. O eletrodo de terra foi colocado na região lombar através de um eletrodo de agulha

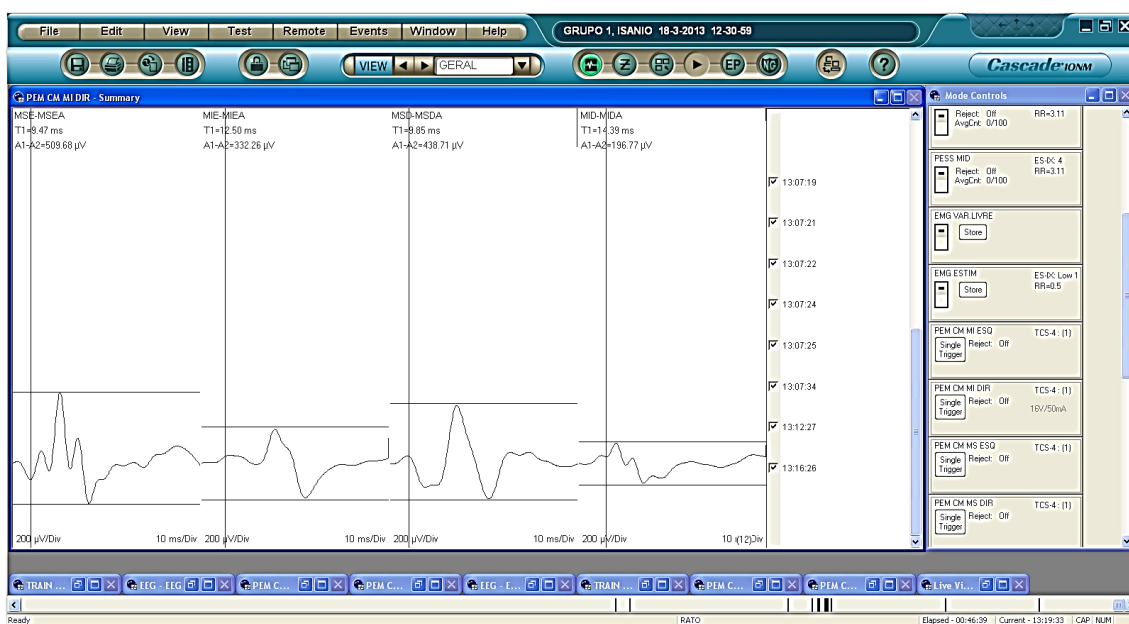
monopolar. A estimulação elétrica transcraniana foi realizada com a colocação de dois eletrodos de agulha tipo *corkscrew*, no couro cabeludo na região frontal (ânodo) e occipital (cátodo) na linha inter-hemisférica, para estimulação bilateral simultânea (Figura 22). Durante o procedimento, cuidados foram tomados para evitar a exposição dos animais a ruídos externos, claridade excessiva ou campos eletromagnéticos nas proximidades. Além disso, o próprio eletromiógrafo possui filtros de ruídos.



**Figura 22** - Animal preparado para obtenção do potencial evocado motor (A), mostrando no detalhe eletrodos inseridos na musculatura de um membro

Após a colocação dos eletrodos no rato, iniciou-se o equipamento e verificou-se a impedância destes eletrodos, para comprovar a boa adaptabilidade dos mesmos, a fim de obter respostas mais nítidas, seguras e fidedignas. A calibração do aparelho foi feita em dois aspectos: a captação das respostas musculares (varredura: janela de 20 ms, sensibilidade: 2 mV/div., filtro de baixa frequência: 10 Hz e filtro de alta frequência: 10 KHz) e a estimulação elétrica transcraniana (através de estímulo de 0,2 ms de duração). A intensidade de estímulo aplicada foi supramáxima, o que se determinou através do aumento gradativo da corrente elétrica de 0,1 em 0,1 mA até que a amplitude dos dois

últimos estímulos fosse a mesma. O eletromiógrafo forneceu os valores e os gráficos da latência (m/s) e da amplitude (mv) dos músculos analisados (Figura 23).



**Figura 23** - Registro do potencial evocado em valores e gráficos pelo eletromiógrafo (grupo 1-rato 5)

#### 4.5 Análises histomorfométricas

O último procedimento realizado foi a coleta de material para exame histomorfométrico, feita na data da avaliação final de cada grupo, aos 60 dias de pós-operatório das enxertias, após a captação do potencial evocado motor e imediatamente antes da eutanásia dos animais. A anestesia e a técnica operatória seguiram os mesmos métodos descritos para as cirurgias anteriores, sendo a abordagem feita sobre as cicatrizes das incisões cirúrgicas prévias. Retirou-se uma amostra com cerca de 2 mm de espessura do nervo ciático de cada rato, tanto na região proximal ao enxerto, como na região distal

ao mesmo (3 mm proximal e 3 mm distal ao local do reparo), evitando-se as áreas de sutura com possíveis fibroses e outras reações teciduais (Figura 24).



**Figura 24** - Procedimento para coleta de material 60 dias pós-enxertia (grupo 4). Notar bom aspecto do nervo regenerado (seta)

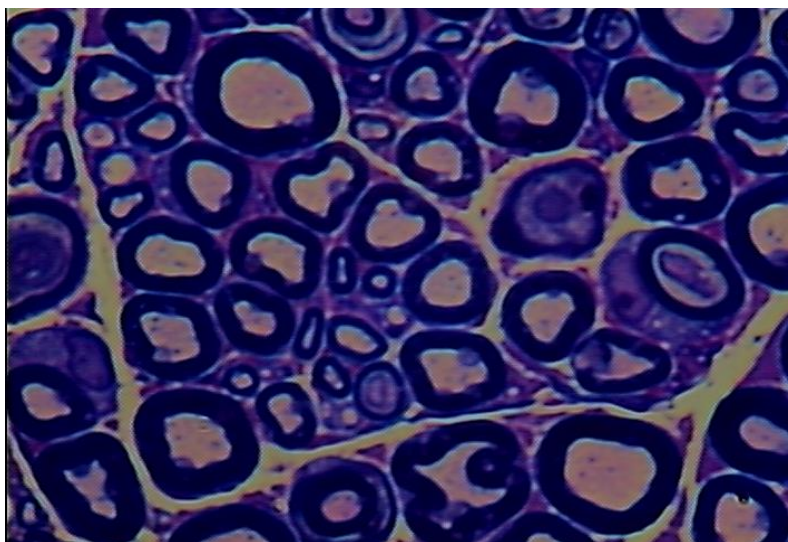
O material coletado foi sempre mergulhado em solução de glutaraldeído e imediatamente encaminhado para análises.

A avaliação histomorfométrica do material foi realizada pelo Setor de Anatomia Patológica do Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético (LIM-41) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O processamento dos nervos iniciou-se pela técnica de inclusão para microscopia eletrônica de transmissão. Fixou-se o material em uma solução composta por glutaraldeído 2,5% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,3), *overnight* (durante a noite), a 4°C. Lavou-se em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,3), 3 vezes por 5 minutos cada

procedimento. Em seguida, contrastou-se o material com tetróxido de ósmio a 2% em água destilada e solução de ferrocianeto de potássio, na proporção de 1:1. Lavou-se 4 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,3) por 5 minutos cada um destes processos. Desidratou-se em concentrações crescentes de acetona 50%, 70%, 90% (por 10 minutos cada etapa) e em acetona 100% (3 vezes por 15 minutos cada etapa). Infiltrou-se em solução composta de resina Epon e acetona pura (1:1) por 3 horas. Colocou-se em Epon puro, *overnight*. Por fim, incluiu-se o material em pequenas formas de silicone, etiquetou-se e polimerizou-se em estufa a 60 °C por 72 horas. Os blocos obtidos tiveram sua extremidade desbastada com uma lima até ser atingido o material. A região a ser estudada foi configurada com gilete na forma de um trapézio e cuidadosamente limpa antes de cortar-se o material. Realizou-se cortes semi-finos com navalha de vidro no ultramicrotomo Sorvall®, na espessura de 0,5 a 1 µm. Os cortes foram colhidos com a ajuda de uma argola de níquel, a qual, por sua vez, foi posicionada de modo a tocar uma gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro, para que os cortes fossem transferidos para a lâmina. Colocou-se as lâminas sobre uma placa aquecida até a água evaporar e o corte fixar-se à lâmina. Então, utilizou-se uma solução de azul de metileno a 1 %, previamente preparada (dissolvendo-se 1 g de borato em água morna e adicionando-se 1 grama de azul de metileno), colocando-se algumas gotas da mesma sobre os cortes e deixando-se aquecer até formar uma borda brilhante. Retirou-se a lâmina da placa aquecedora e lavou-se com água destilada. Secou-se com papel de filtro para depois se observar ao microscópio de luz.

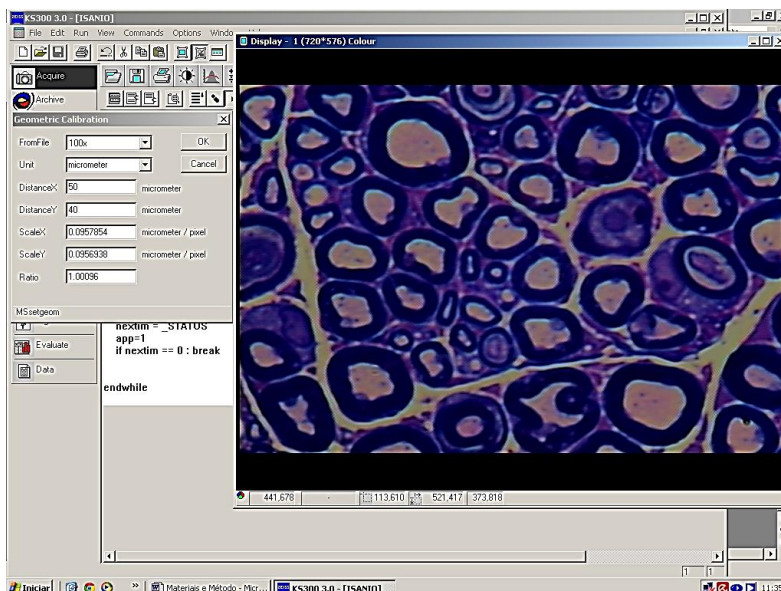
O material corado foi analisado ao microscópio óptico marca Carl Zeiss modelo Axiolab e foram realizadas fotografias digitais de todas as lâminas com objetiva de imersão (X100) e câmera acoplada. A câmera utilizada foi a JVC TK-1270 Color Vídeo

Câmera e as resoluções das imagens foram de 720 pixels de largura e 576 pixels de altura (Figura 25).



**Figura 25** - Axônios corados com azul de metileno após regeneração em objetiva de imersão (X100)

As fotografias foram transferidas ao computador através de um sistema de captura de imagens, denominado “EasyCap®”, do fabricante Feasso, São Paulo, SP, Brasil. A cada corte transversal foram amostrados cinco campos distintos de  $3.123,7\mu\text{m}^2$ , escolhidos de forma aleatória. Pela opção manual, as bainhas de mielina visualizadas foram contornadas com o cursor, sendo então contados os axônios mielínicos e medidas as respectivas áreas. O programa utilizado para tal foi o KS300® 3.0 da Zeiss, que possui várias interfaces que permitem realizar tarefas de processamento e análise de imagens (Figura 26).



**Figura 26** - Uma das interfaces do programa KS300® 3.0 da Zeiss utilizado para contagem e medida de área dos axônios corados com azul de metileno. Aumento: 100X, unidade: micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), distância X: 50  $\mu\text{m}$ , distância Y: 40  $\mu\text{m}$ , escala X: 0.0957854  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , escala Y: 0.0956938  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  e proporção: 1.00096. Área total da foto: 3.123,7  $\mu\text{m}^2$

A partir dos dados obtidos, dois índices, expressos como percentagens, foram determinados para todos os nervos analisados: o índice de regeneração, calculado dividindo-se o número total de axônios mielinizados no segmento distal ao local do reparo pelo número total de axônios mielinizados no segmento proximal e multiplicando-se o resultado por 100, e o índice de mudança de área, calculado dividindo-se a soma das áreas dos axônios no segmento distal pela soma das áreas dos axônios no segmento proximal, com o resultado também multiplicado por 100.

No grupo de enxertia preservada a frio por 14 dias, foi retirado um fragmento de nervo de 1 mm do coto proximal do enxerto imediatamente antes e imediatamente após o processo de resfriamento, sendo ambas amostras encaminhadas para os procedimentos histo-morfométricos seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente e sendo obtidos os dados de número total de axônios mielinizados e soma de suas respectivas áreas.



#### 4.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos nas diferentes avaliações foram armazenados em planilhas Excell para posterior avaliação.

As análises estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prism® Versão 6.0 (produzido pela GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Todos os dados colhidos foram quantitativos. Inicialmente, foi feita a estatística descritiva dos parâmetros analisados, apresentando valores da média, do desvio-padrão e do erro padrão. A homogeneidade das distribuições (parametricidade) foi avaliada pela prova de Kolmogorov-Smirnov. Para a avaliação global dos quatro grupos foi utilizado o teste de análise de variância simples One-way ANOVA. Para comparar os grupos entre eles, aos pares, empregou-se o pós-teste de Bonferroni. Foi adotado o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores de p foram discutidos utilizando os seguintes intervalos:  $p < 0.001$  (extremamente significativa), p de 0.001 a 0.01 (muito significativa), p de 0.01 a 0.05 (significante) e  $p > 0.05$  (não significativa).

Nas análises eletrofisiológicas, além da avaliação global dos grupos com o teste de análise de variância simples One-way ANOVA e da comparação dos grupos entre eles, aos pares, através do pós-teste de Bonferroni, utilizou-se ainda uma análise pareada para comparação do lado esquerdo com o lado direito de cada animal dentro de um mesmo grupo através do teste “t” pareado. Foi também adotado o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), com valores de p utilizados na discussão como descrito:  $p < 0.001$  (extremamente significativa), p de 0.001 a 0.01 (muito significativa), p de 0.01 a 0.05 (significante) e  $p > 0.05$  (não significativa).

Nas análises histomorfométricas, além da avaliação global dos grupos com o teste de análise de variância simples One-way ANOVA e da comparação dos grupos entre eles,

aos pares, através do pós-teste de Bonferroni, também se utilizou uma análise pareada para comparação do número de axônios proximais e distais de cada animal, assim como da área proximal e distal dos axônios mielinizados de cada animal, utilizando-se o teste “t” pareado. Para a comparação do número de axônios pré e pós-resfriamento e da área pré e pós-resfriamento utilizou-se o teste “t” pareado. Foi também adotado o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), com valores de p utilizados na discussão como descrito:  $p < 0.001$  (extremamente significativa), p de 0.001 a 0.01 (muito significativa), p de 0.01 a 0.05 (significativa) e  $p > 0.05$  (não significativa).

Os resultados foram apresentados em tabelas estatísticas e em gráficos lineares ou colunares.

## **5. RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados das análises funcionais

#### 5.1.1 Tabelas das análises funcionais

**Tabela 1** – Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 1: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	1,24	1,44	0,33	0,37	0,34
2	2,38	1,72	1,50	0,84	0,34
3	2,15	1,75	0,39	1,35	0,16
4	1,24	0,50	0,29	1,80	0,21
5	2,70	0,15	0,43	1,20	0,95
Média	1,94	1,11	0,59	1,11	0,40
Desvio padrão	0,67	0,74	0,51	0,54	0,32
Erro padrão	0,30	0,33	0,23	0,24	0,14

Aval = avaliação, cm<sup>2</sup> = centímetros ao quadrado, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.

**Tabela 2** – Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 2: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval.	Pós-op - 3ª aval.	Pós-op - 4ª aval.
1	1,37	0,39	0,64	0,79	0,55
2	1,63	0,42	0,29	0,87	0,40
3	1,80	0,44	0,22	0,42	0,25
4	1,83	0,42	0,16	0,44	0,09
5	1,82	1,12	0,05	0,22	0,58
Média	1,69	0,56	0,27	0,55	0,37
Desvio padrão	0,20	0,31	0,22	0,27	0,20
Erro padrão	0,09	0,14	0,10	0,12	0,09

Aval = avaliação, cm<sup>2</sup> = centímetros ao quadrado, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.

**Tabela 3** – Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 3: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	2,54	0,30	0,21	0,24	0,58
2	2,29	0,14	0,08	0,06	0,37
3	2,72	0,49	0,31	0,32	0,84
4	2,46	0,10	0,07	0,04	0,33
5	1,40	0,09	0,06	0,03	0,30
Média	2,28	0,22	0,15	0,14	0,48
Desvio padrão	0,52	0,17	0,11	0,13	0,23
Erro padrão	0,23	0,08	0,05	0,06	0,10

Aval = avaliação, cm<sup>2</sup> = centímetros ao quadrado, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.

**Tabela 4** – Distribuição dos valores da área máxima de contato do membro operado no grupo 4: média das corridas de cada animal por avaliação (cm<sup>2</sup>)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	2,54	0,66	0,88	3,20	2,77
2	2,29	0,08	0,33	2,85	0,32
3	2,72	0,93	1,28	3,52	3,17
4	1,30	0,05	0,08	2,50	0,28
5	2,56	0,13	0,69	3,10	2,06
Média	2,28	0,37	0,65	3,03	1,72
Desvio padrão	0,57	0,40	0,46	0,38	1,36
Erro padrão	0,25	0,18	0,21	0,17	0,61

Aval = avaliação, cm<sup>2</sup> = centímetros ao quadrado, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.

**Tabela 5** - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 1: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	207,50	184,50	139,00	155,62	194,33
2	219,50	191,25	215,00	181,00	161,67
3	218,00	134,60	135,50	209,00	158,00
4	207,50	125,25	151,00	215,67	138,25
5	223,00	117,00	217,00	208,00	158,11
Média	215,10	150,52	171,50	193,86	162,07
Desvio padrão	7,17	34,75	41,03	25,16	20,25
Erro padrão	3,20	15,51	18,32	11,25	9,04

Aval = avaliação, Pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório.

**Tabela 6** – Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 2: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	235,50	132,80	185,00	206,50	205,00
2	238,50	157,44	171,88	218,00	121,33
3	238,67	156,67	157,00	137,00	124,00
4	234,00	142,50	97,00	123,00	150,00
5	237,33	153,42	99,00	138,67	158,50
Média	236,80	148,56	141,98	164,63	151,77
Desvio padrão	2,01	10,64	41,35	44,08	33,83
Erro padrão	0,90	4,76	18,49	19,71	15,13

Aval = avaliação, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.

**Tabela 7** - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 3: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema)

Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	234,00	89,00	75,92	107,75	112,00
2	236,50	127,33	80,00	142,17	133,86
3	240,00	154,15	84,12	160,00	156,23
4	236,00	82,11	73,34	108,38	104,76
5	237,25	88,24	76,42	164,90	107,82
Média	236,75	108,17	77,96	136,64	122,93
Desvio padrão	2,18	31,32	4,18	27,42	21,83
Erro padrão	0,97	14,01	1,87	12,26	9,76

Aval = avaliação, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.

**Tabela 8** - Distribuição dos valores da máxima intensidade de pressão no contato máximo do membro operado no grupo 4: média das corridas de cada animal por avaliação (unidade própria de pressão do sistema)

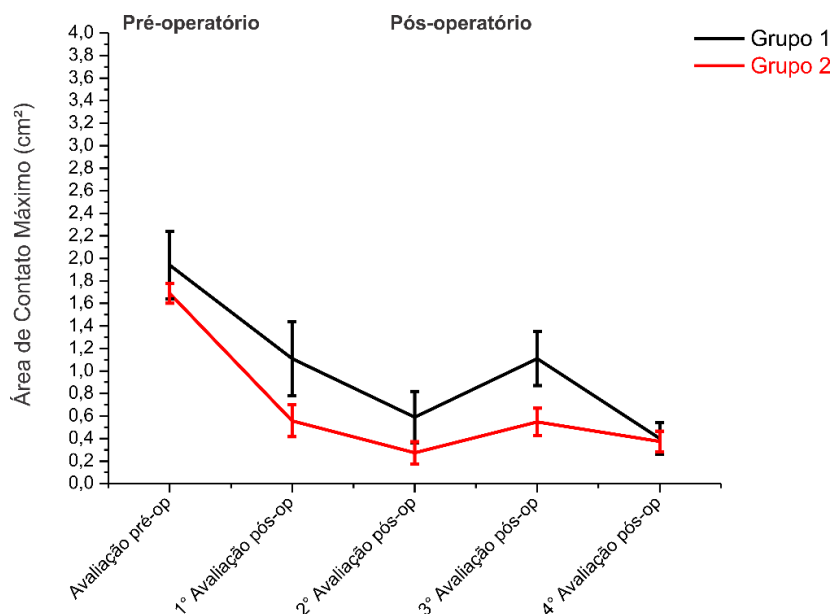
Rato	Pré-op	Pós-op - 1ª aval	Pós-op - 2ª aval	Pós-op - 3ª aval	Pós-op - 4ª aval
1	234,50	174,40	132,00	224,00	248,80
2	236,50	102,75	117,00	203,98	211,00
3	240,00	127,33	228,00	232,02	247,00
4	236,00	92,98	198,89	218,00	207,20
5	236,77	107,50	209,11	212,00	226,00
Média	236,75	120,99	177,00	218,00	228,00
Desvio padrão	2,01	32,37	49,34	10,78	19,49
Erro padrão	0,90	14,48	22,06	4,82	8,71

Aval = avaliação, pós-op = pós-operatório, pré-op = pré-operatório.



### 5.1.2 Gráficos das análises funcionais

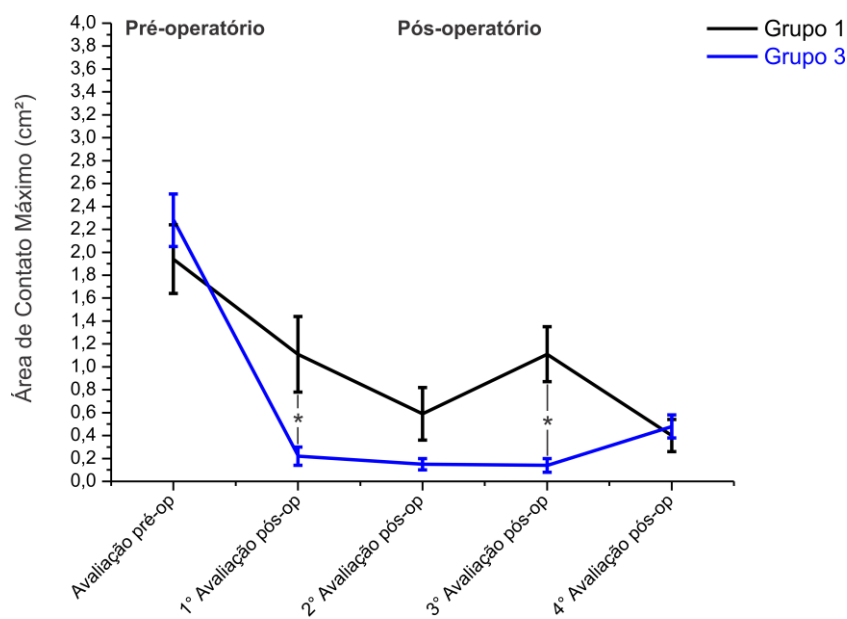
**Gráfico 1** - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 2 (média e erro padrão)



Pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p = 0,4215$ ; 2ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 3ª pós-op:  $p = 0,3947$ ; 4ª pós-op:  $p > 0,9999$

pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

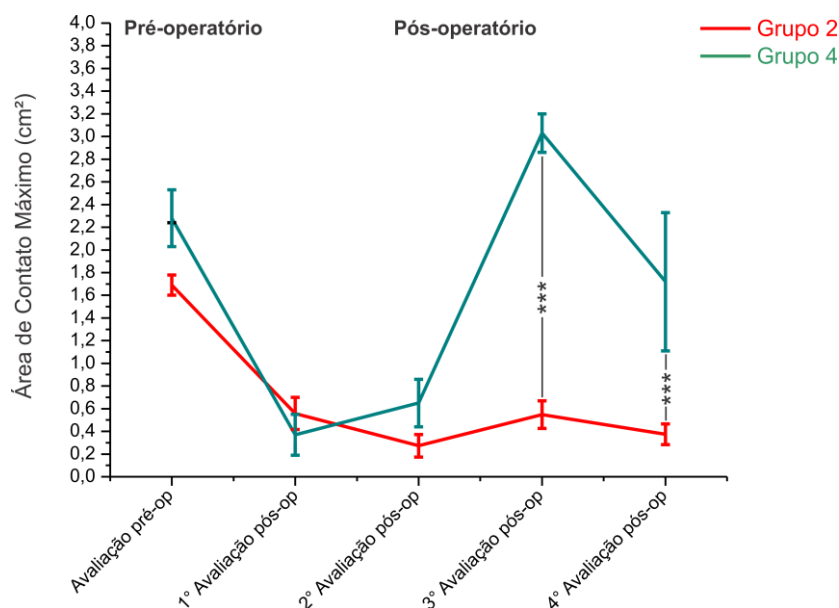
**Gráfico 2** - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 3 (média e erro padrão)



\* =  $p < 0,05$  (significante).

Pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p = 0,0318$ ; 2ª pós-op:  $p = 0,8349$ ; 3ª pós-op:  $p = 0,0145$ ; 4ª pós-op:  $p > 0,999$   
 pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

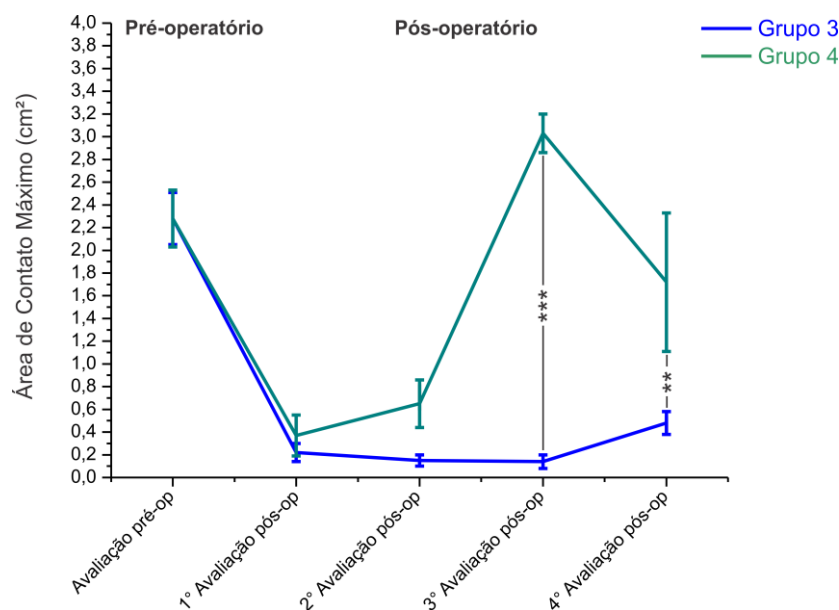
**Gráfico 3** - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 2 e 4 (média e erro padrão)



\*\*\* =  $p < 0,001$  (extremamente significativa)

Pré-op:  $p > 0,3272$ ; 1ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 2ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 3ª pós-op:  $p < 0,0001$ ; 4ª pós-op:  $p = 0,0003$   
 pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

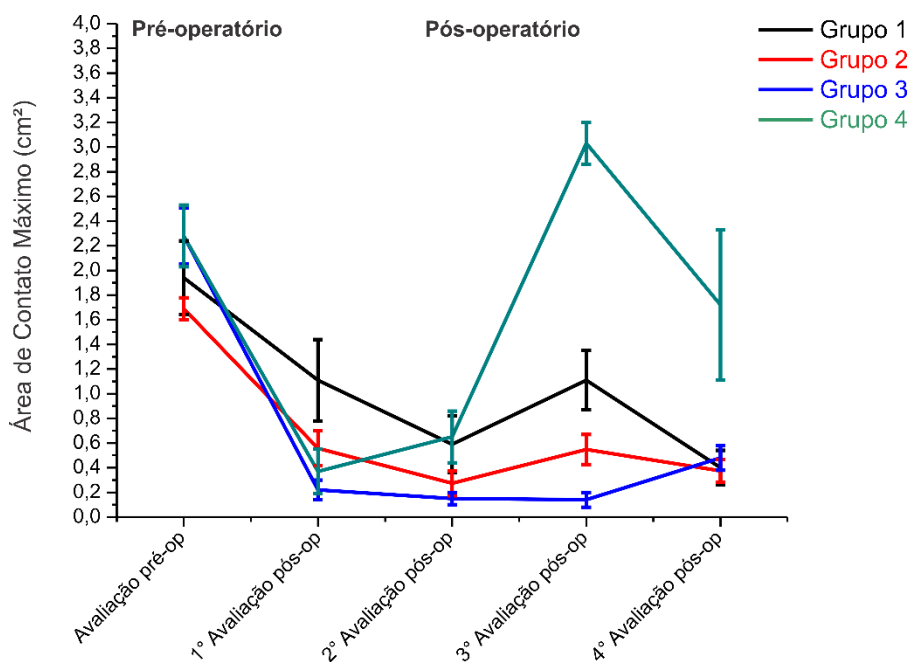
**Gráfico 4** - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada nos grupos 3 e 4 (média e erro padrão)



\*\* =  $p < 0,01$  (muito significativa); \*\*\* =  $p < 0,001$  (extremamente significativa)

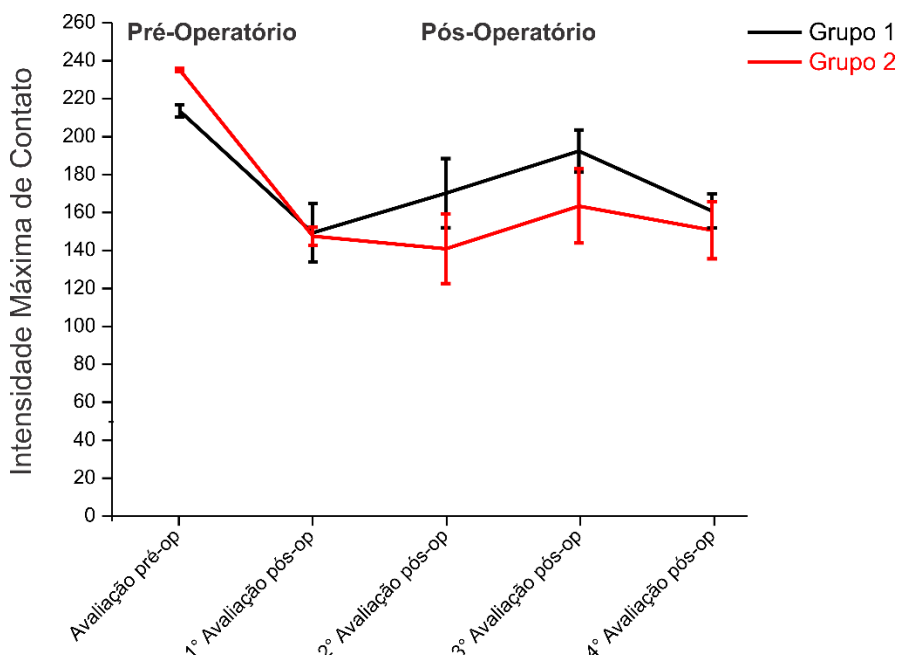
pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 2ª pós-op:  $p > 0,5715$ ; 3ª pós-op:  $p < 0,0001$ ; 4ª pós-op:  $p = 0,0010$   
 pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

**Gráfico 5** - Área de contato máximo do membro operado por avaliação realizada - visão geral em todos os grupos (média e erro padrão)



pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório, cm<sup>2</sup> = centímetros ao quadrado.

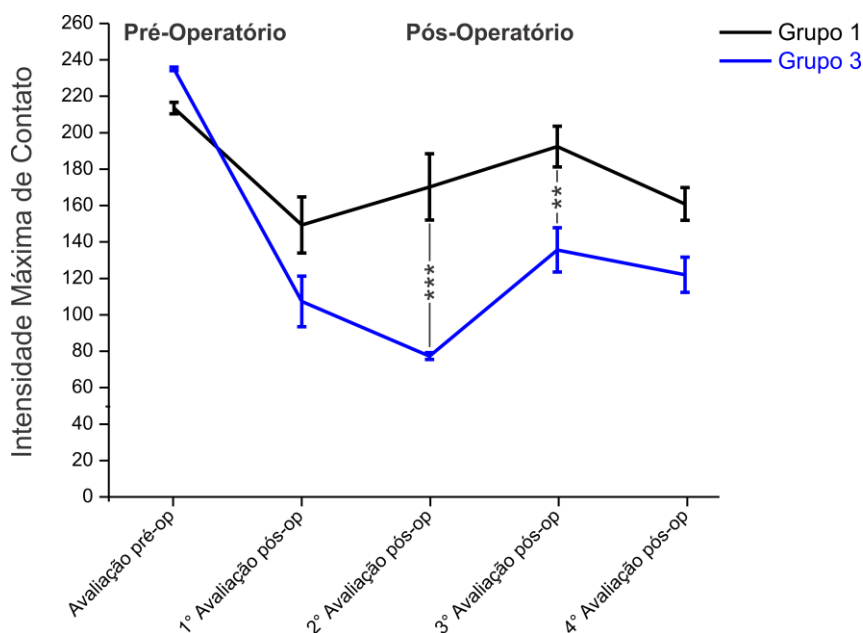
**Gráfico 6** - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 2 (média e erro padrão)



Pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 2ª pós-op:  $p = 0,4592$ ; 3ª pós-op:  $p = 0,0900$ ; 4ª pós-op:  $p > 0,9999$

pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório, cm<sup>2</sup> = centímetros ao quadrado.

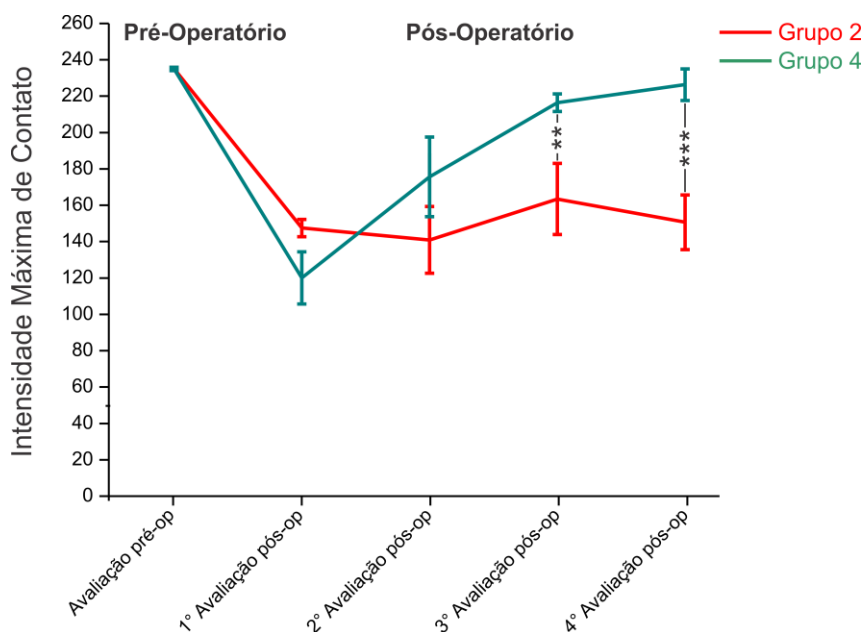
**Gráfico 7** - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 1 e 3 (média e erro padrão)



\*\* =  $p < 0,01$  (muito significativa); \*\*\* =  $p < 0,001$  (extremamente significativa)

Pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p > 0,0815$ ; 2ª pós-op:  $p < 0,0001$ ; 3ª pós-op:  $p = 0,0071$ ; 4ª pós-op:  $p = 0,1321$   
 pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

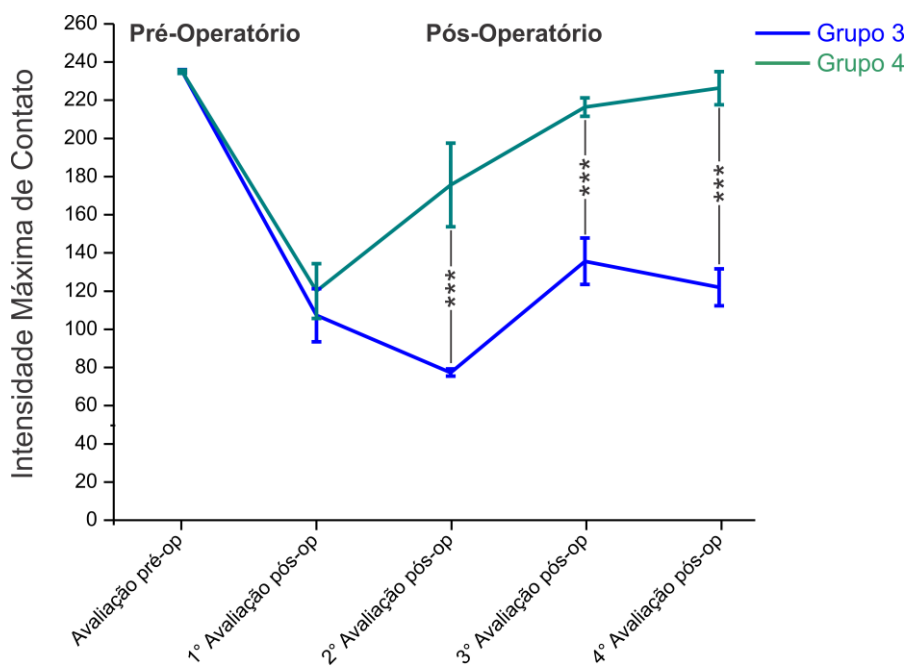
**Gráfico 8** - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 2 e 4 (média e erro padrão)



\*\* =  $p < 0,01$  (muito significativa); \*\*\* =  $p < 0,001$  (extremamente significativa)

Pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 2ª pós-op:  $p = 0,4018$ ; 3ª pós-op:  $p = 0,0014$ ; 4ª pós-op:  $p = 0,0002$   
 pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

**Gráfico 9** - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada nos grupos 3 e 4 (média e erro padrão)

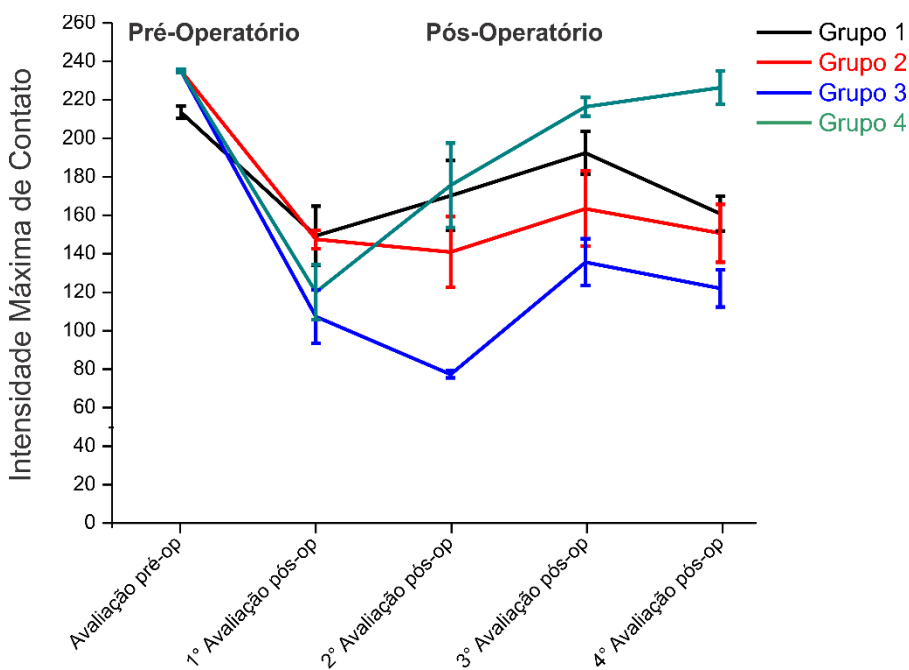


\*\*\* =  $p < 0,001$  (extremamente significante)

Pré-op:  $p > 0,9999$ ; 1ª pós-op:  $p > 0,9999$ ; 2ª pós-op:  $p < 0,0001$ ; 3ª pós-op:  $p < 0,0001$ ; 4ª pós-op:  $p < 0,0001$

pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

**Gráfico 10** - Intensidade máxima de contato do membro operado por avaliação realizada - visão geral em todos os grupos (média e erro padrão)



pré-op = pré-operatório, pós-op = pós-operatório,  $\text{cm}^2$  = centímetros ao quadrado.

## 5.2 Resultados das análises eletrofisiológicas

### 5.2.1 Tabelas das análises eletrofisiológicas

**Tabela 9** - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 1 aos 60 dias após a enxertia

Rato	m tibial anterior E		m gastrocnêmio E		m tibial anterior D		m gastrocnêmio D	
	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)
1	4,10	550,00	16,40	303,11	4,11	1.200,00	13,40	226,10
2	11,71	177,00	35,60	358,02	14,01	1.003,02	19,32	100,06
3	3,20	154,11	8,50	321,00	9,11	678,30	12,80	96,06
4	7,20	716,20	11,50	703,01	12,80	993,01	14,30	164,00
5	9,47	509,68	12,50	332,26	9,85	438,71	14,39	196,77
Média	7,12	421,40	16,90	403,48	9,98	862,60	14,84	156,60
DP	3,56	246,18	10,83	168,62	3,85	301,75	2,58	57,79
EP	5,79	248,41	13,06	170,85	6,09	303,98	4,82	60,02

E = esquerdo, D = direito, m = músculo, ms = milissegundos, mv = microvolts, DP = desvio padrão, EP = erro-padrão

**Tabela 10** - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 2 aos 60 dias após a enxertia

Rato	m tibial anterior E		m gastrocnêmio E		m tibial anterior D		m gastrocnêmio D	
	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)
1	3,90	449,10	18,30	323,60	3,20	940,30	11,90	213,80
2	8,20	224,30	23,50	412,10	8,70	879,40	18,70	342,20
3	4,20	323,10	9,80	258,30	15,80	1023,00	14,60	223,10
4	5,80	412,20	28,90	612,10	11,20	884,20	15,90	512,00
5	6,70	634,30	12,40	443,20	6,20	543,70	13,20	332,30
Média	5,76	408,40	18,58	409,60	9,02	853,80	14,86	324,40
DP	1,78	153,18	7,84	134,70	4,81	183,17	2,62	120,68
EP	0,80	68,50	3,51	60,24	2,15	81,91	1,17	53,97

E = esquerdo, D = direito, m = músculo, ms = milissegundos, mv = microvolts, DP = desvio-padrão, EP = erro-padrão

**Tabela 11** - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 3 aos 60 dias após a enxertia

Rato	m tibial anterior E		m gastrocnêmio E		m tibial anterior D		m gastrocnêmio D	
	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)
1	5,40	295,60	13,60	449,30	7,50	597,10	0,00*	0,00*
2	8,90	960,30	9,60	182,10	9,30	511,00	10,70	176,20
3	3,90	528,50	12,10	823,40	5,00	458,40	27,10	70,10
4	4,60	387,20	10,70	486,20	7,10	390,10	26,40	157,20
5	4,60	772,40	21,80	449,30	11,10	792,90	12,90	475,80
Média	5,48	588,80	13,52	478,06	8,00	549,90	15,42	175,86
DP	1,98	274,76	4,86	228,35	2,31	155,48	11,44	181,95
EP	0,89	122,87	2,17	102,12	1,03	69,53	5,11	81,37

E = esquerdo, D = direito, m = músculo, ms = milissegundos, mv = microvolts, DP = desvio-padrão, EP = erro-padrão

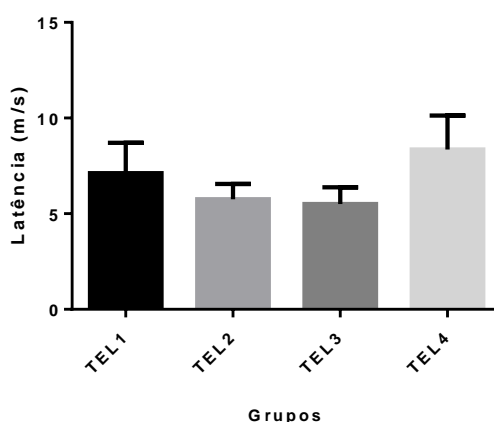
\* = Sem resposta.

**Tabela 12** - Distribuição dos valores do potencial evocado do grupo 4 aos 60 dias após a enxertia

Rato	m tibial anterior E		m gastrocnêmio E		m tibial anterior D		m gastrocnêmio D	
	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)	Latência (m/s)	Amplitude (mv)
1	3,20	448,10	14,70	603,00	2,90	309,00	2,90	78,20
2	14,20	255,20	12,80	214,10	5,30	338,20	3,90	99,30
3	8,00	234,40	32,80	339,30	3,90	198,70	8,60	22,80
4	9,10	332,00	23,90	432,20	6,70	654,10	6,90	168,20
5	7,30	522,50	22,60	678,00	2,40	210,00	5,40	45,90
Média	8,36	358,20	21,36	453,20	4,24	341,80	5,54	82,40
DP	3,95	124,15	8,01	189,53	1,76	184,80	2,28	56,28
EP	1,77	55,52	3,58	84,76	0,79	82,65	1,02	25,17

E = esquerdo, D = direito, m = músculo, ms = milissegundos, mv = microvolts, DP = desvio-padrão, EP = erro-padrão

## 5.2.2 Gráficos das análises eletrofisiológicas

**Gráfico 11** - Latência do músculo tibial anterior esquerdo por grupos (média e erro padrão)

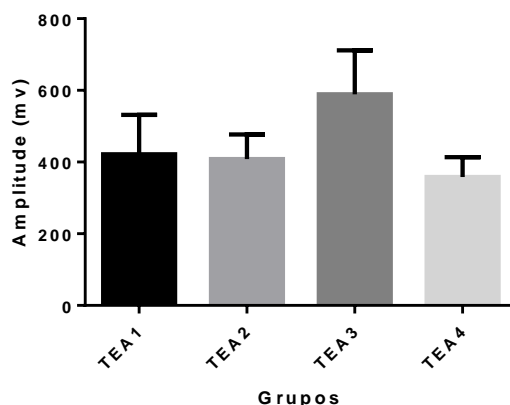
$p > 0,9999$  nas comparações entre TEL1 e TEL2, TEL1 e TEL3, TEL1 e TEL4, TEL2 e TEL3, TEL2 e TEL4

$p = 0,8385$  na comparação entre TEL3 e TEL4

TEL = latência do músculo tibial anterior esquerdo, m/s = metro por segundo



**Gráfico 12** - Amplitude do músculo tibial anterior esquerdo por grupos (média e erro padrão)

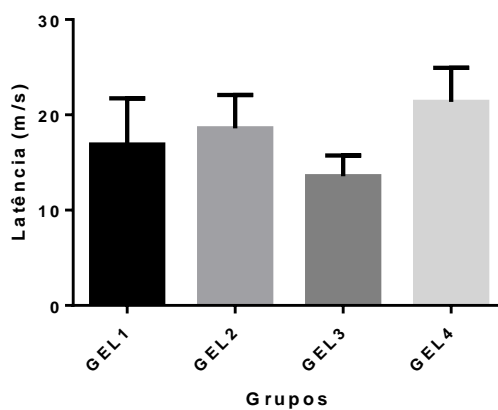


$p > 0,9999$  nas comparações entre TEA1 e TEA2, TEA1 e TEA3, TEA1 e TEA4, TEA2 e TEA3, TEA2 e TEA4

$p = 0,6027$  na comparação entre TEA3 e TEA4

TEA = Amplitude do músculo tibial anterior esquerdo, mv = microvolt

**Gráfico 13** - Latência do músculo gastrocnêmio esquerdo por grupos (média e erro padrão)

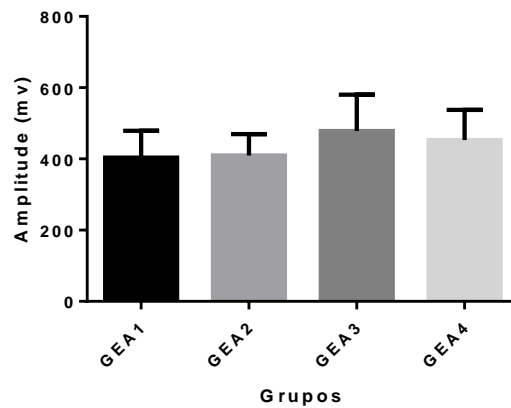


$p > 0,9999$  nas comparações entre GEL1 e GEL2, GEL1 e GEL3, GEL1 e GEL4, GEL2 e GEL3, GEL2 e GEL4

$p = 0,9035$  na comparação entre GEL3 e GEL4

GEL = latência do músculo gastrocnêmio esquerdo, m/s = metro por segundo

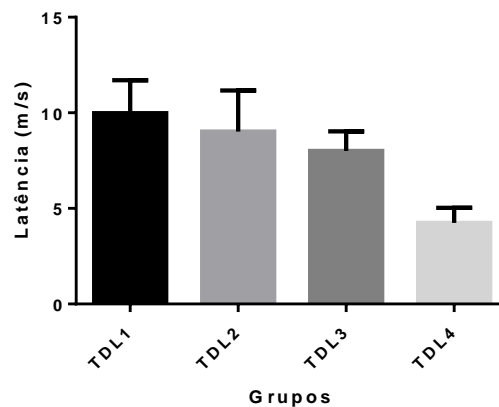
**Gráfico 14** - Amplitude do músculo gastrocnêmio esquerdo por grupos (média e erro padrão)



$p > 0,9999$  nas comparações entre GEA1 e GEA2, GEA1 e GEA3, GEA1 e GEA4, GEA2 e GEA3, GEA2 e GEA4, GEA3 e GEA4

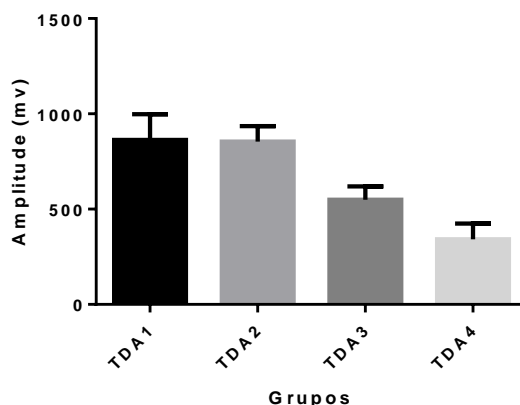
GEA = Amplitude do músculo gastrocnêmio esquerdo, mv = microvolt

**Gráfico 15** - Latência do músculo tibial anterior direito por grupos (média e erro padrão)



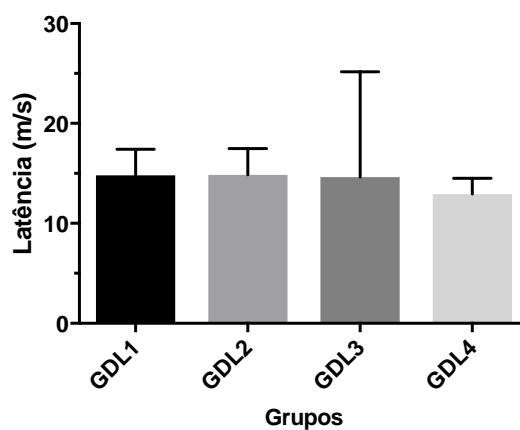
$p > 0,9999$  na comparação entre TDL1 e TDL2 e  $p = 0,6007$  na comparação entre TDL3 e TDL4  
TDL = latência do músculo tibial anterior direito, m/s = metro por segundo

**Gráfico 16** - Amplitude do músculo tibial anterior direito por grupos (média e erro padrão)



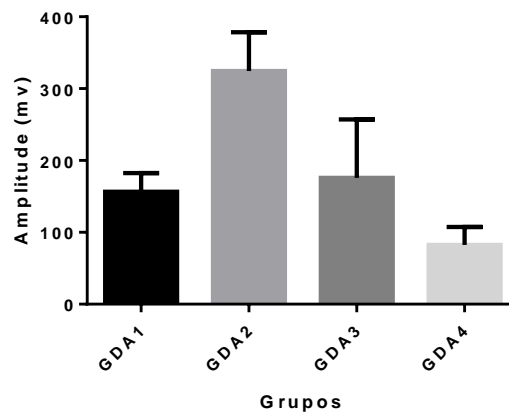
$p > 0,9999$  na comparação entre TDA1 e TDA2 e  $p = 0,8604$  na comparação entre TDA3 e TDA4  
TDA = Amplitude do músculo tibial anterior direito, mv = microvolt

**Gráfico 17** - Latência do músculo gastrocnêmio direito por grupos (média e erro padrão)



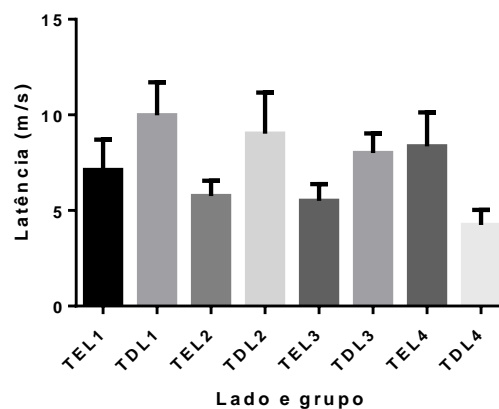
$p > 0,9999$  na comparação entre GDL1 e GDL2 e  $p = 0,1277$  na comparação entre GDL3 e GDL4  
GDL = Latência do músculo gastrocnêmio direito, m/s = metro por segundo

**Gráfico 18** - Amplitude do músculo gastrocnêmio direito por grupos (média e erro padrão)



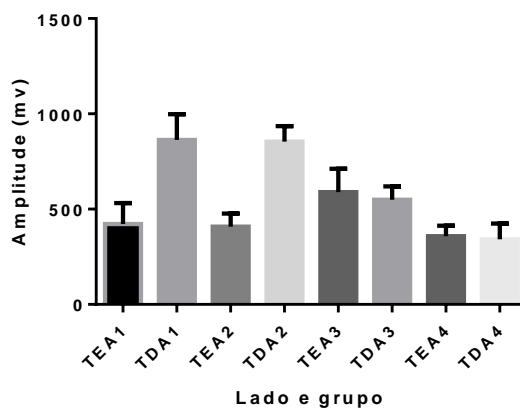
$p = 0,5851$  na comparação entre GDA1 e GDA2 e  $p > 0,9999$  na comparação entre GDA3 e GDA4  
 GDA = Amplitude do músculo gastrocnêmio direito, mv = microvolt

**Gráfico 19** - Latência do músculo tibial anterior dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão)



$p = 0,0826$  na comparação entre TEL1 e TDL1,  $p = 0,2396$  na comparação entre TEL2 e TDL2,  $p = 0,0766$  na comparação entre TEL3 e TDL3,  $p = 0,0451$  na comparação entre TEL4 e TDL4  
 TEL = latência do músculo tibial anterior esquerdo, TDL = latência do músculo tibial anterior direito, m/s = metro por segundo

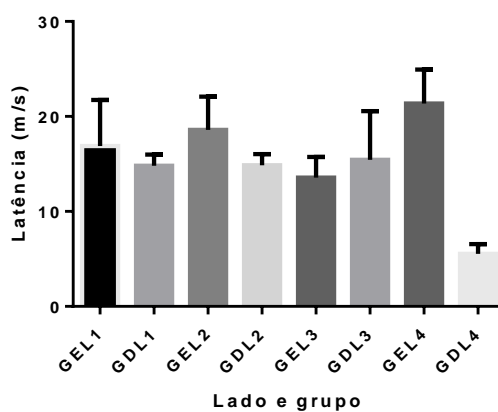
**Gráfico 20** - Amplitude do músculo tibial anterior dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão)



$p = 0,0476$  na comparação entre TEA1 e TDA1,  $p = 0,0344$  na comparação entre TEA2 e TDA2,  $p = 0,7631$  na comparação entre TEA3 e TDA3,  $p = 0,8852$  na comparação entre TEA4 e TDA4

TEA = amplitude do músculo tibial anterior esquerdo, TDA = amplitude do músculo tibial anterior direito, mv = microvolt

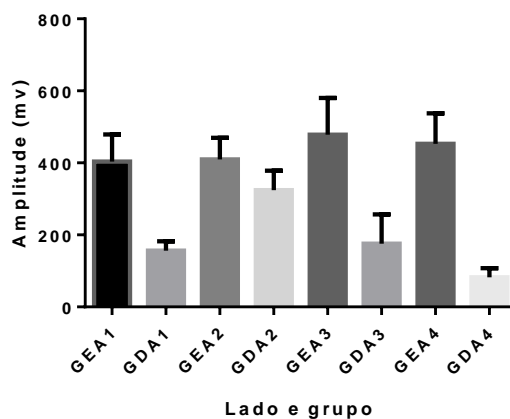
**Gráfico 21** - Latência do músculo gastrocnêmio dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão)



$p = 0,6095$  na comparação entre GEL1 e GDL1,  $p = 0,2912$  na comparação entre GEL2 e GDL2,  $p = 0,7723$  na comparação entre GEL3 e GDL3,  $p = 0,0038$  na comparação entre GEL4 e GDL4

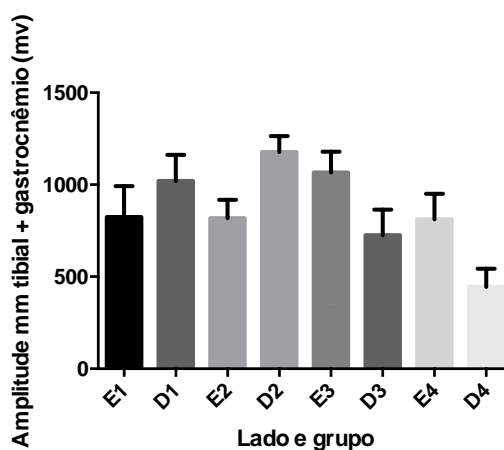
GEL = latência do músculo gastrocnêmio esquerdo, GDL = latência do músculo gastrocnêmio direito, m/s = metro por segundo

**Gráfico 22** - Amplitude do músculo gastrocnêmio dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão)



$p = 0,0365$  na comparação entre GEA1 e GDA1,  $p = 0,0043$  na comparação entre GEA2 e GDA2,  $p = 0,1059$  na comparação entre GEA3 e GDA3,  $p = 0,0162$  na comparação entre GEA4 e GDA4  
 GEA = amplitude do músculo gastrocnêmio esquerdo, GDA = amplitude do músculo gastrocnêmio direito,  
 mv = microvolt

**Gráfico 23** - Soma das amplitudes dos músculos tibial anterior e gastrocnêmio dos lados esquerdo e direito por grupos (média e erro padrão)



$p = 0,3456$  na comparação entre E1 e D1,  $p = 0,0764$  na comparação entre E2 e D2,  $p = 0,0815$  na comparação entre E3 e D3,  $p = 0,1266$  na comparação entre E4 e D4  
 E = esquerdo, D = direito, mv = microvolt

### 5.3 Resultados das análises histomorfométricas

#### 5.3.1 Tabelas das análises histomorfométricas

**Tabela 13** - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 1 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina)

Rato	NAP	NAD	AP ( $\mu\text{m}$ )	AD ( $\mu\text{m}$ )	IR (%)	IMA (%)
1	196,00	447,00	4210,85	5029,95	228,06	119,45
2	390,00	295,00	4454,00	3510,70	75,64	78,82
3	134,00	332,40	2655,36	1679,35	248,05	63,24
4	310,80	143,00	5493,70	276,05	46,01	5,02
5	346,00	328,00	3867,41	3521,36	94,79	91,05
Média	275,40	309,10	4136,30	2803,50	138,50	71,50
DP	106,90	109,20	1026,50	1845,60	92,80	42,50
EPM	47,80	48,80	459,00	825,40	41,50	19,00

NAP = número de axônios proximais, NAD = número de axônios distais, AP = área total dos axônios proximais, AD = área total dos axônios distais, IR = índice de regeneração, IMA = índice de mudança de área,  $\mu\text{m}$  = micrômetro, % = porcentagem, DP = desvio padrão, EPM = erro padrão da média.

**Tabela 14** - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 2 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina)

Rato	NAP	NAD	AP ( $\mu\text{m}$ )	AD ( $\mu\text{m}$ )	IR (%)	IMA (%)
1	249,00	209,00	7483,85	10024,23	83,93	133,94
2	741,00	632,00	6049,10	6257,65	85,29	103,44
3	302,00	874,00	7758,81	4938,72	289,40	63,65
4	172,00	667,00	7890,67	4129,13	387,79	52,32
5	379,00	568,00	7302,15	6631,06	149,86	90,80
Média	368,60	590,00	7296,90	6396,20	199,30	88,80
DP	221,50	241,90	734,50	2263,90	134,50	32,50
EPM	110,70	139,60	367,20	1307,10	77,70	18,80

NAP = número de axônios proximais, NAD = número de axônios distais, AP = área total dos axônios proximais, AD = área total dos axônios distais, IR = índice de regeneração, IMA = índice de mudança de área,  $\mu\text{m}$  = micrômetro, % = porcentagem, DP = desvio padrão, EPM = erro padrão da média.

**Tabela 15** - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 13 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina)

Rato	NAP	NAD	AP ( $\mu\text{m}$ )	AD ( $\mu\text{m}$ )	IR (%)	IMA (%)
1	252,00	406,00	7039,99	5092,11	161,10	72,33
2	246,25	371,00	6814,46	4417,71	150,70	64,83
3	307,50	458,25	6914,58	5387,12	149,00	77,91
4	230,75	349,75	6085,79	4446,33	151,60	73,06
5	318,00	421,00	6815,64	4691,24	132,40	68,83
Média	270,90	401,20	6734,10	4806,90	149,00	71,40
DP	39,20	42,50	374,00	422,20	10,40	4,90
EPM	17,50	19,00	167,30	188,80	4,60	2,20

NAP = número de axônios proximais, NAD = número de axônios distais, AP = área total dos axônios proximais, AD = área total dos axônios distais, IR = índice de regeneração, IMA = índice de mudança de área,  $\mu\text{m}$  = micrômetro, % = porcentagem, DP = desvio padrão, EPM = erro padrão da média.

**Tabela 16** - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do grupo 4 aos 60 dias após a enxertia (soma de 5 campos aleatórios por lâmina)

Rato	NAP	NAD	AP ( $\mu\text{m}$ )	AD ( $\mu\text{m}$ )	IR (%)	IMA (%)
1	292,75	476,50	6868,29	5358,59	162,80	78,02
2	360,00	691,50	7862,63	5965,15	192,10	75,87
3	365,25	495,75	7397,85	4904,47	135,70	66,30
4	240,25	480,25	7410,90	5239,13	199,90	70,69
5	241,25	497,50	7495,15	5285,67	206,20	70,52
Média	299,90	528,30	7407,00	5350,60	179,30	72,30
DP	61,10	91,70	355,60	385,20	29,50	4,70
EPM	27,30	41,00	159,00	172,30	13,20	2,10

NAP = número de axônios proximais, NAD = número de axônios distais, AP = área total dos axônios proximais, AD = área total dos axônios distais, IR = índice de regeneração, IMA = índice de mudança de área,  $\mu\text{m}$  = micrômetro, % = porcentagem, DP = desvio padrão, EPM = erro padrão da média.



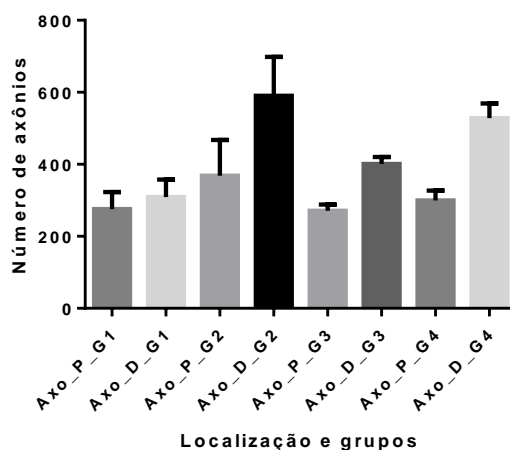
**Tabela 17** - Distribuição dos valores do número de axônios mielinizados e área do coto proximal do enxerto pré-resfriamento e pós-resfriamento no grupo 2 (soma de 5 campos aleatórios por lâmina)

Enxerto	NAPré	NAPós	APré (µm)	APós (µm)
1	127,00	105,00	7203,80	7095,84
2	149,00	95,00	6560,98	7577,47
3	135,00	139,00	8429,44	8108,60
4	183,00	192,00	7336,24	8203,81
5	266,00	199,00	8494,12	6721,37
Média	172,00	146,00	7604,92	7541,42
DP	56,74	48,10	835,67	638,90
EPM	25,38	21,51	373,72	285,72

NAPré = número de axônios pré-resfriamento, NAPós = número de axônios pós-resfriamento, APré = área total dos axônios pré-resfriamento, APós = área total dos axônios pós-resfriamento, µm = micrômetro, DP = desvio padrão, EPM = erro padrão da média.

### 5.3.2 Gráficos das análises histomorfométricas

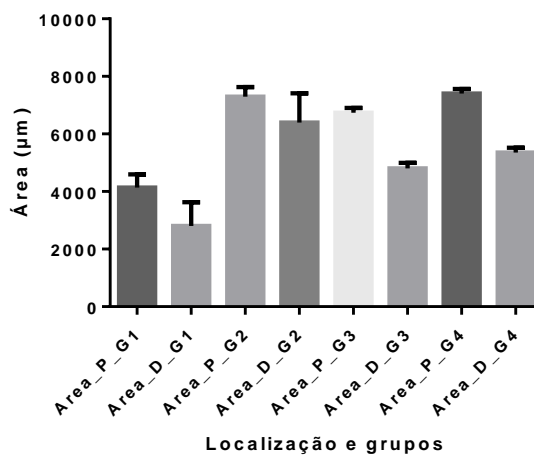
**Gráfico 24** - Número de axônios proximais e distais por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão)



$p = 0,7015$  na comparação entre Axo\_P\_G1 e Axo\_D\_G1,  $p = 0,1818$  na comparação entre Axo\_P\_G2 e Axo\_D\_G1,  $p = 0,0002$  na comparação entre Axo\_P\_G3 e Axo\_D\_G3,  $p = 0,0026$  na comparação entre Axo\_P\_G4 e Axo\_D\_G4.

Axo\_P = número de axônios proximais; Axo\_D = número de axônios distais; G = grupo.

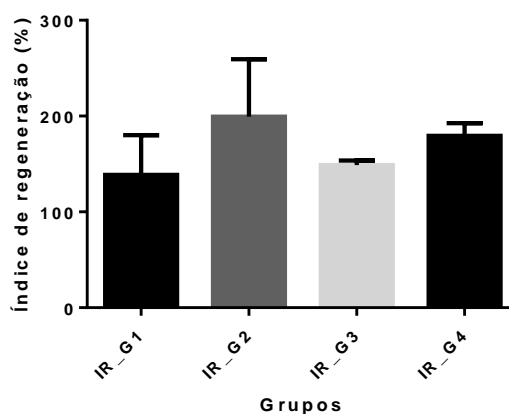
**Gráfico 25** - Área proximal e distal dos axônios mielinizados por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão)



$p = 0,2630$  na comparação entre Área\_P\_G1 e Área\_D\_G1,  $p = 0,4655$  na comparação entre Área\_P\_G2 e Área\_D\_G2,  $p = 0,0003$  na comparação entre Área\_P\_G3 e Área\_D\_G3,  $p = 0,0002$  na comparação entre Área\_P\_G4 e Área\_D\_G4.

Área\_P = área proximal; Área\_D = área distal; G = grupo;  $\mu\text{m}$  = micrômetro.

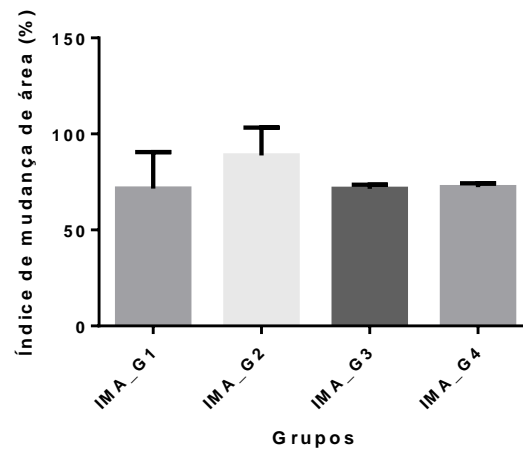
**Gráfico 26** - Índice de regeneração por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão)



$p > 0,9999$  em todas as comparações: entre IR\_G1 e IR\_G2; IR\_G1 e IR\_G3; IR\_G1 e IR\_G4; IR\_G2 e IR\_G3; IR\_G2 e IR\_G4; IR\_G3 e IR\_G4

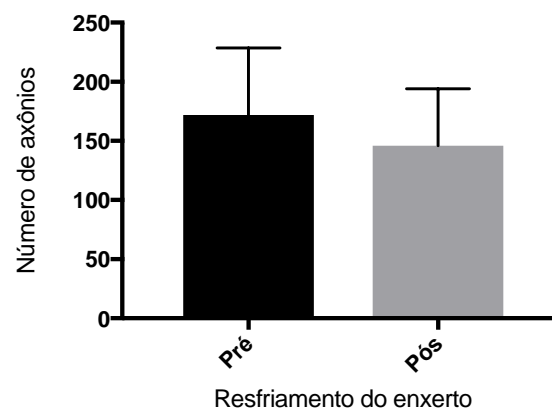
IR = índice de regeneração; G = grupo; % = porcentagem.

**Gráfico 27** - Índice de mudança de área por grupos aos 60 dias após a enxertia - média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão)



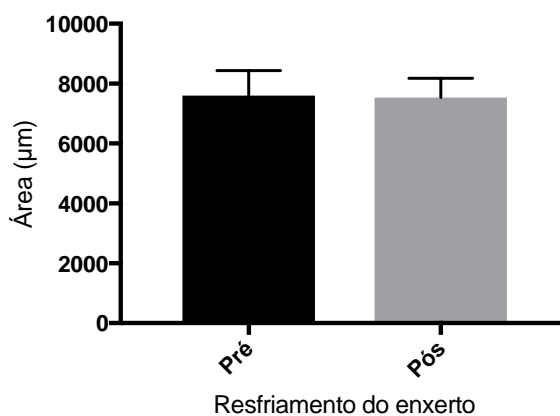
$p > 0,9999$  em todas as comparações: entre IMA\_G1 e IMA\_G2; IMA\_G1 e IMA\_G3; IMA\_G1 e IMA\_G4; IMA\_G2 e IMA\_G3; IMA\_G2 e IMA\_G4; IMA\_G3 e IMA\_G4  
 IMA = índice de mudança de área; G = grupo; % = percentagem.

**Gráfico 28** - Número de axônios do enxerto pré e pós-resfriamento de 14 dias – média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão)



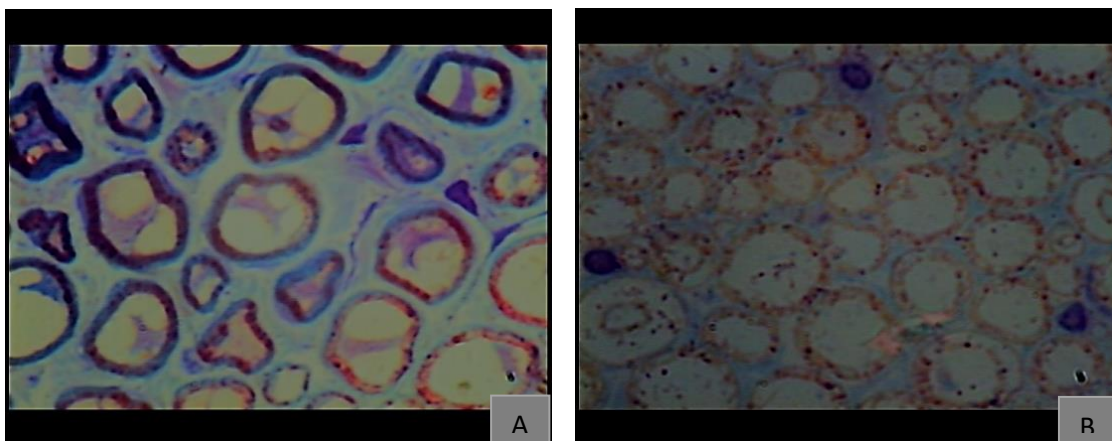
$p = 0,1618$  na comparação entre pré e pós-resfriamento.

**Gráfico 29** – Área dos axônios mielinizados do enxerto pré e pós-resfriamento de 14 dias – média de 5 campos aleatórios por lâmina (média e erro padrão)

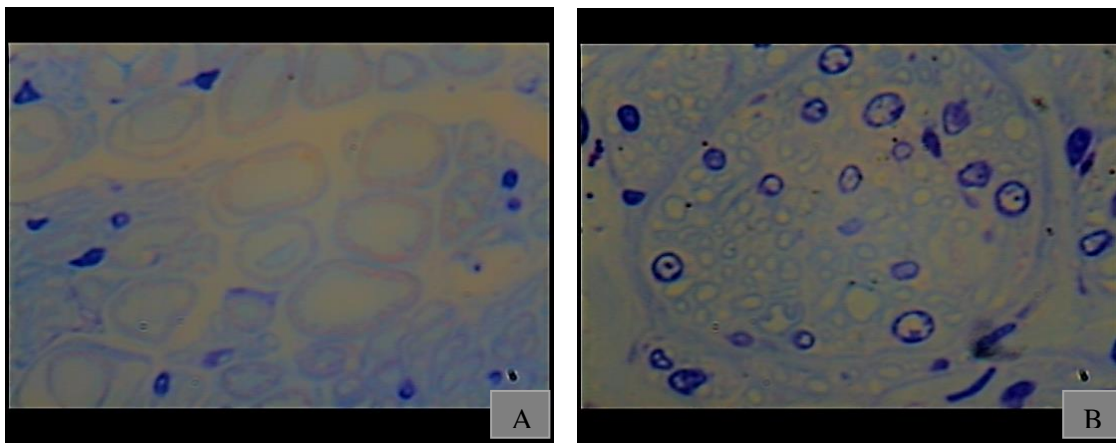


$p = 0,9053$  na comparação entre pré e pós-resfriamento.

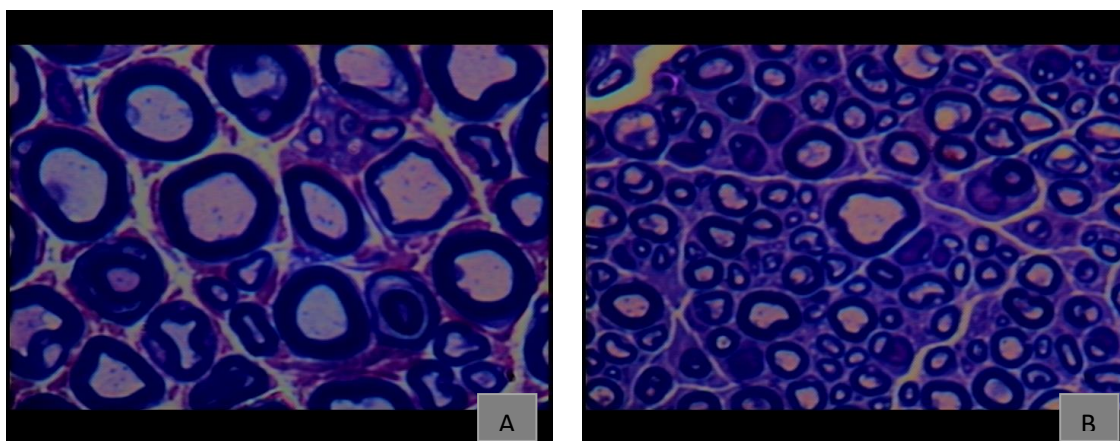
### 5.3.3 Imagens representativas das análises histológicas



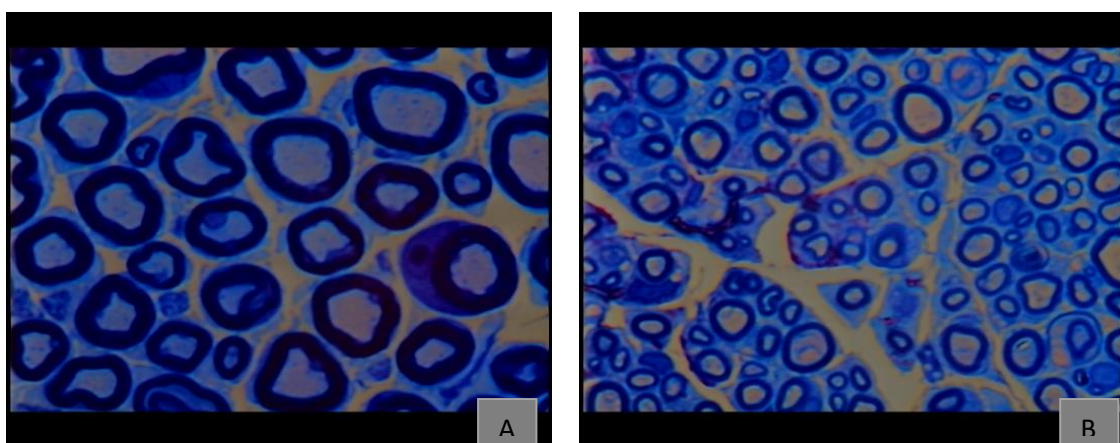
**Figura 27** - Axônios do grupo 1, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 1, campos 5 e 1, respectivamente)



**Figura 28** - Axônios do grupo 2, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 3, campos 5 e 2, respectivamente)



**Figura 29** - Axônios do grupo 3, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 4, campos 3 e 3)



**Figura 30** - Axônios do grupo 4, região proximal (A) e distal (B) aos reparos, corados com azul de metileno em microscopia óptica em aumento de 100X (animal 3, campos 1 e 1)

## 5.4 Complicações

Ocorreram as seguintes complicações: 2 casos de autofagia, todos no grupo 4, que, por este motivo, foi refeito (Figura 31).



**Figura 31** - Dois casos de autofagia

## **6. DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Apesar da evolução das técnicas e materiais utilizados na reparação nervosa periférica com perdas mais extensas, todos os tratamentos existentes, inclusive a enxertia autóloga, apresentam desvantagens próprias, sem que nenhum deles consiga alcançar resultados plenamente suficientes, o que estimula a execução de pesquisas como esta, com o intuito de obter avanços em direção às melhores condições possíveis para conservação a frio e para a utilização de enxertos de nervos periféricos, inicialmente de forma experimental, podendo abrir caminhos para um posterior uso clínico.

Desta forma, no presente estudo buscou-se aplicar experimentalmente as melhores condições possíveis de temperatura, solução preservante e tempo de conservação para a utilização de enxertos autólogos frescos e conservados a frio, tentando simular uma situação o mais próximo possível das condições ideais para o uso clínico dos mesmos, e analisando-se os resultados por diferentes métodos, tanto do ponto de vista funcional, quanto histomorfométrico, como eletrofisiológico, métodos estes escolhidos por terem se mostrado fidedignos e confiáveis dentro daquele tipo de avaliação.

Não foi objeto desta pesquisa a avaliação do uso de enxertos heterólogos de nervos, sua antigenicidade ou a possível utilização de drogas imunossupressoras, por já existirem alguns ensaios consistentes sobre o tema (Hirasé et al., 1992; Zalewski et al.; Wolff et al., 1993; Evans et al., 1998; Atchabahian et al., 1999), bem como pelo fato de que tal análise aumentaria o número de variáveis envolvidas num único estudo, capazes de interferir nos resultados.

Existe atualmente intensa pesquisa em se tentar encontrar um meio de preservação ideal para o armazenamento de enxertos de nervos (Carone et al., 2007; Scabora et al.,



2009; Pegg, 2015). A solução Celsior® foi escolhida como solução conservante neste estudo por ser recomendada pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO em suas Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos (2009) como um meio de preservação indicado para uso em tecidos muito inervados como o miocárdio ou como uma solução conservante a ser utilizada em procedimentos para retirada de múltiplos órgãos. Existem poucas pesquisas que a utilizam, vez que sua liberação comercial ocorreu mais recentemente que da maioria das outras soluções disponíveis, além de possuir elevado custo financeiro. Esta solução foi originalmente desenvolvida com o intuito de combinar os princípios gerais da preservação de tecidos a frio com os princípios específicos do metabolismo de tecidos ricamente inervados, como o miocárdio, sendo capaz de limitar o edema que se desenvolve após isquemia a frio, graças às suas propriedades físicas (pressão osmótica), e capaz de evitar lesão tecidual mediada por radicais livres, graças à sua composição química. Contém em sua fórmula muitos componentes com função de proteção celular, entre eles, o ácido lactobiônico, que tem ação protetora contra radicais livres produzidos pelas células, a glutatona, que protege a viabilidade celular ao participar de várias reações intracelulares, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo do peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos, o íon potássio, que apresenta ação osmótica e reduz o edema tissular, e o íon magnésio, que age como inibidor de enzimas líticas e protege a membrana basal das células. Ensaios clínicos comprovaram estas propriedades na solução Celsior (Menasché et al., 1994; Roberts et al., 1999). Pesquisas utilizando fórmulas contendo algumas substâncias similares às do referido produto atestaram a eficácia de seus componentes químicos na preservação de enxertos de nervos a frio (Carone et al., 2007; Scabora et al., 2009). Estudos comparando a solução Celsior® com as soluções de Collins® e de Wisconsin® comprovaram a superioridade da primeira sobre as demais (Roberts et al.;

Mohara et al., 1999). Por tais motivos, considerou-se a solução Celsior® como a mais adequada para utilização nesta pesquisa.

A temperatura escolhida foi de 4° C por ser considerada em vários protocolos como uma temperatura adequada para conservação de tecidos neurais, conforme Wolff et al. (1993), Lemos et al. (2008) e Scabora et al. (2009), sendo também assim recomendada pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO em suas Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos (2009), no capítulo que trata do acondicionamento e armazenamento dos tecidos. A criopreservação em temperaturas muito baixas vem sendo mais recentemente criticada por promover danos diretos tanto no meio intracelular como no meio extracelular, ação deletéria que pode ser minorada pelo uso de solução preservante capaz de penetrar facilmente nas células e, ao mesmo tempo, possuir viscosidade suficiente para comportar-se como uma substância em estado vítreo (Pegg, 2015). Mesmo assim, as teorias modernas sobre criopreservação consideram que as alterações nos tecidos biológicos em temperaturas muito baixas são complexas, existindo danos difíceis de serem evitados. Autores sustentam que a zona de temperatura mais perigosa durante a criopreservação é de 0 a -60 ° C, especialmente de 0 a -10 ° C, porque o gelo intercelular fica acumulado a estas temperaturas e o dano celular ocorre dentro desta zona de temperatura (Wang et al., 2014). Considerando tais motivos, optou-se pela utilização da temperatura de 4° C nesta pesquisa.

Escolheu-se 14 dias como duração mínima de conservação a frio do enxerto neste estudo por ser este o tempo mínimo necessário, em possíveis situações clínicas, para realização de testes sorológicos (HIV, Hepatites A, B e C, HTLV-1 e 2, Sífilis, Chagas, Toxoplasmose e Citomegalovirus além dos testes de evidência de ácido desoxiribonucleico para HIV e HCV) e microbiológicos (incluindo culturas para microrganismos, bactérias e fungos) do doador do enxerto (Tírico, 2015). A possibilidade

de realizar tais exames é o grande diferencial da utilização de peças de um banco de nervos em relação a um enxerto alógeno retirado de doador vivo ou de cadáver fresco. Existe, por exemplo, um relato de paciente infectado pelo vírus Epstein-Bar como complicação de enxerto alógeno de nervo a partir de doador vivo, que poderia ter levado a uma condição grave de distúrbio linfo-proliferativo pós-transplante (Larsen et al., 2007). Por outro lado, o tempo máximo de resfriamento testado foi de 50 dias, por existirem estudos que demonstram que, a partir de cerca de 7 semanas de preservação a frio, o processo inflamatório (quantidade de células inflamatórias e infiltrado linfocitário) e a antigenicidade de tais enxertos diminui significativamente (Tohyama et al., 1990; Evans et al., 1998; Atchabahian et al., 1999). Isto, por sua vez, foi o que gerou a necessidade de 2 grupos-controle, que correspondessem, respectivamente, a 14 e 50 dias de denervação dos animais.

Em relação às análises funcionais, optou-se por realizá-las através da aparelhagem *catWalk*®, desenvolvida por Hamers et al. (2001), na qual as pegadas dos animais são captadas por câmara de alta velocidade, transformadas em imagens digitais e analisadas por programa de computador que capta parâmetros estáticos e dinâmicos. Este sistema tem sido considerado em estudos recentes como um método confiável de captação e análise da marcha dos animais de pequeno porte, em especial medidas de coordenação e intensidade de pressão das pegadas dos animais (Deumens et al., 2007; Bozkurt et al., 2008). O outro método que ainda é amplamente utilizado para análise da marcha de pequenos animais, o *walking track* (registro de imagens das pegadas numa trilha de marcha), além de ser de aplicação bastante trabalhosa, não é adequado para avaliação concomitante de parâmetros estáticos e dinâmicos da movimentação do animal (Bozkurt et al., 2008; Sarikcioglu e Demirel, 2009). Além disso, estudo comparando métodos manuais de obtenção de parâmetros das impressões das pegadas de animais com método

computadorizado baseado em filmagem demonstra que pegadas obtidas em tiras de papel podem sofrer algum borramento das impressões e que a obtenção da medida manual por vezes depende da subjetividade do avaliador, sendo que o método por filmagem das pegadas permite uma melhor visualização da pata acometida pela lesão do nervo e mostra-se superior aos demais (Gasparini et al., 2007). Não encontramos na literatura nenhuma descrição de análise funcional de enxerto de nervo conservado a frio através do sistema *catWalk*®, significando tal avaliação, portanto, um aspecto inédito desta pesquisa, que visa trazer maior confiabilidade ao exame da função motora dos animais.

Optou-se por avaliar dois parâmetros em cada grupo e nos diversos momentos propostos: a área máxima de contato do membro operado e a máxima intensidade de pressão durante o contato máximo da pata do membro operado.

Alguns fatores influenciaram a não utilização especificamente do índice funcional do ciático nas avaliações deste estudo. Em primeiro lugar, nas fases iniciais de pós-operatório de lesões nervosas ocorrem déficits funcionais musculares, podendo haver também retrações, sendo comum a diminuição da largura da impressão plantar, o que dificulta a captação exata, em separado, das distâncias entre o 1º e 5º dedos e, sobretudo, entre o 2º e 4º dedos, parâmetros necessários àquela fórmula e que, ao tornarem-se medidas pequenas, por vezes apresentam dificuldades para serem captadas pelo sistema do *catWalk*®. O apoio dos dedos não é bem definido e a pata do animal pode inclusive aparecer em posição de inversão, conforme observado em algumas de nossas avaliações e também descrito por alguns autores, que ressaltam a dificuldade de obtenção dos dados das pegadas nas primeiras semanas após a lesão (Varejão et al., 2003; Gasparini et al., 2007). Em nossas pesquisas, observamos que, através do sistema *catWalk*®, não foi possível captar todos os parâmetros de comprimento e largura total e intermediária de todas as pegadas das corridas dos animais, especialmente nas primeiras avaliações pós-

operatórias, com distribuição irregular da captação entre os grupos. Consideramos ainda o fato de que pesquisas já relataram que o índice funcional de um nervo não apresenta correlação significativa com os parâmetros histológicos e eletrofisiológicos (Bain et al., 1989; Martins et al., 2006) e que tal índice é uma medida passível de erro (Gasparini et al., 2007) ou aplicável com maior confiabilidade apenas em situações específicas (Foidart-Dessalle et al., 1997) ou em lesões mais seletivas de nervos, onde estas estruturas apresentem uma quantidade pequena de musculatura envolvida (Bain et al., 1989). Está também descrito que o índice funcional do ciático pode ser alterado pelos efeitos da denervação e regeneração parcial sobre as extremidades do rato, com o desenvolvimento de desequilíbrio muscular e de contraturas crônicas (Dellon et al., 1989). A taxa elevada de ocorrência de retrações músculo-tendíneas e contraturas agudas ou crônicas em graus variáveis muitas vezes prejudica a habilidade do animal para a marcha, podendo causar alterações em parâmetros importantes para o cálculo dos índices funcionais dos nervos (Martins et al., 2006). Contraturas musculares e retrações são descritas por alguns autores como frequentes nos primeiros dias após a secção do nervo (Carr et al., 1992; Martins et al., 2006). Assim, Martins et al. (2006) descreveram a presença de 17 retrações músculo-tendíneas em 86 ratos utilizados na fase inicial de sua pesquisa sobre a correlação entre diferentes métodos de avaliação da lesão nervosa. Por fim, existe ainda o problema do risco da autotomia, quando o animal morde sua pata que está sem sensibilidade, podendo resultar em amputação de um ou mais dedos, o que inviabiliza a captação de parâmetros necessários ao cálculo do índice funcional do ciático, existindo pesquisas que citam o modelo de secção do nervo ciático, especialmente se aplicado a ratos machos, como detentor de elevada incidência desta complicação, devendo ser considerado na escolha do método de avaliação funcional (Weber et al., 1993; Martins et al., 2006).

Reputamos a área máxima de contato do membro operado e a máxima intensidade de pressão durante o contato máximo da pata operada como parâmetros que apresentam uma melhor captação pelo método que utilizamos, sendo mais consistentes para análise, já que resultam de uma medida mais abrangente num determinado momento, referente aos eventos que se manifestam por toda a pata, seja na região anterior, média ou posterior, evitando-se possíveis distorções que possam ser provocadas por uma intensa queda de uma medida mais restrita, como uma diminuição muito acentuada da distância interdígitos na pata denervada após o procedimento operatório, fato que, inclusive, foi observado em alguns de nossos experimentos, especialmente nas primeiras avaliações pós-operatórias. Em casos assim, a área máxima de contato e a pressão máxima parecem-nos medidas mais confiáveis que a distância interdígitos. Além disso, pesquisas avaliando a utilização do sistema *catWalk*® na detecção de déficits da marcha concluem que o mesmo é de especial acurácia em medidas que reflitam a coordenação motora e a intensidade de pressão das pegadas dos animais (Bozkurt et al., 2008).

A área máxima de contato do membro operado corresponde à área total de impressão da pata do animal sobre a placa de vidro, medida em centímetros quadrados, no momento do máximo contato. De forma geral observou-se uma tendência à diminuição desta medida nas primeiras avaliações pós-operatórias quando comparadas com a avaliação pré-operatória, com algum grau de recuperação ocorrendo geralmente na terceira ou quarta avaliações pós-operatórias, como era esperado devido à própria lesão nervosa (Tabelas 1 a 4 e Gráfico 5).

Na comparação estatística entre os grupos, não houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 em relação à área máxima de contato do membro operado, nem na avaliação pré-operatória, nem nas avaliações pós-operatórias (Tabelas 1 e 2 e Gráficos 1 e 5). Buscando na literatura trabalhos que façam a comparação entre enxertos a fresco e

enxertos preservados a frio por curta duração, encontramos apenas o estudo de Sabha Júnior (2002), que avalia a regeneração axonal através de enxertos musculares agrupados em um grupo controle de enxertia convencional, outro grupo de enxertos conservados por 3 semanas a -4 °C e um terceiro grupo preservado pelo mesmo tempo a -40 °C, não tendo encontrado diferenças entre os três grupos. Embora sem importância significativa, em nossa pesquisa, observando-se o gráfico 1 pode-se notar uma tendência a uma área máxima de contato levemente superior no grupo 1 em relação ao grupo 2, atingindo patamares muito semelhantes na última avaliação pós-operatória. É possível que esta tendência ocorra porque, em temperatura ambiente, o tubo neural completa adequadamente o período de degeneração e de remoção das fibras e do axoplasma do seu interior em torno de duas semanas após a denervação, prazo em que esta estrutura também obtém uma regulação bioquímica adequada e cria um microambiente favorável à regeneração nervosa, com o avanço dos axônios ocorrendo de forma mais rápida (Ochi et al., 1994; Chaves Neto, 2006). Por outro lado, existe a possibilidade de que a preservação a frio por curto tempo possa retardar a fase inicial de degeneração dos axônios lesados e a fagocitose de macrófagos e células de Schwann, resultando num atraso inicial do crescimento do axoplasma regenerado (Fansa et al., 2000; Wang et al., 2014). Ensaios experimentais avaliando o efeito da conservação a frio antes e depois da implantação de enxertos nervosos concluíram que a viabilidade, a função celular e a quantidade de células de Schwann dentro dos enxertos diminuem entre 1 e 3 semanas de hipotermia (Levi et al., 1994; Fansa et al., 2000). Entretanto, as estruturas celulares importantes para a regeneração do nervo são preservadas e a regeneração nervosa, mesmo que sofra um leve retardo, atinge posteriormente os mesmos patamares obtidos pelos enxertos convencionais (Evans et al., 1998).

A comparação da área máxima de contato do membro operado entre os grupos 1 e 3 (Tabelas 1 e 3 e Gráficos 2 e 5) resultou um valor de  $p < 0,05$  na primeira e na terceira avaliações pós-operatórias, com tal parâmetro apresentando-se maior no grupo 1, como era esperado, já que este grupo foi submetido a apenas 14 dias de denervação, tendo apresentado de forma geral uma recuperação melhor que o grupo 3, que sofreu 50 dias de denervação, neste último caso com maior atrofia muscular e ainda possivelmente já ocorrendo um colapso estrutural do tubo neural que pode iniciar-se a partir da quarta semana de denervação e dificulta o avanço satisfatório dos axônios, conforme demonstrado em outros trabalhos (Ochi et al., 1994; Chaves Neto, 2006). A área máxima de contato igualou-se na quarta avaliação após a enxertia, mostrando que houve apenas uma discrepância inicial na recuperação funcional, na dependência do tempo de denervação, quando se compara os dois grupos de enxertias convencionais a fresco.

A comparação da mesma medida entre os grupos 2 e 4 (Tabelas 2 e 4 e Gráficos 3 e 5) mostrou um valor de  $p < 0,001$  (extremamente significativa) na terceira e quarta avaliações pós-operatórias, com uma área máxima de contato do membro operado apresentando-se maior no grupo 4 nas duas avaliações citadas. Atribuimos isto ao fato de que, no enxerto com maior tempo de resfriamento, passam a ocorrer alguns efeitos positivos para a regeneração axonal. Baixas temperaturas minimizam as implicações deletérias da isquemia prolongada, tais como acidose metabólica e edema (Scabora et al., 2009). A hipotermia, ao reduzir a taxa metabólica e a atividade enzimática, previne o acúmulo de produtos tóxicos resultantes do metabolismo anaeróbico e diminui o infiltrado linfocitário, facilitando também a passagem dos axônios em regeneração e promovendo melhores resultados dos enxertos após um resfriamento mais duradouro (Wang et al., 2014). Pesquisas demonstram que períodos mais prolongados de armazenamento a frio do enxerto causam uma melhora da regeneração nervosa,



preservando estruturas importantes como a lâmina basal das células de Schwann, a distribuição de laminina e o perineuro (Evans et al., 1998; Fansa et al., 2000) e diminuindo a reação inflamatória (Gutmann e Sanders, 1943; Hare et al., 1993; Atchabahian et al., 1999).

A área máxima de contato do membro operado também foi muito superior no grupo 4 quando comparado com o grupo 3, sendo extremamente significativa na terceira avaliação pós-operatória e muito significativa na quarta avaliação pós-operatória, conforme observado nas tabelas 3 e 4 e nos gráficos 4 e 5, o que pode ser explicado, da mesma forma que na comparação anterior, pelos efeitos da baixa temperatura atuando de forma favorável à uma mais completa regeneração nervosa (Gutmann e Sanders, 1943; Hare et al., 1993; Evans et al., 1998; Atchabahian et al., 1999; Wang et al., 2014). Além disso, neste caso um outro fator já citado anteriormente pode também ter contribuído com essa diferença: após quatro semanas de denervação em temperatura ambiente usualmente inicia-se um colapso do tubo neural, dificultando o avanço dos axônios nos enxertos não resfriados (Chaves Neto, 2006).

O outro parâmetro funcional da marcha analisado foi a máxima intensidade durante o contato máximo da pata operada, que corresponde a uma medida de pressão exercida sobre a placa de vidro. É mensurada em unidade própria de pressão do sistema *catWalk*® da empresa Noldus Information Technology, que varia de 0 a 255.

De maneira geral, a máxima intensidade no máximo contato comportou-se similarmente à área máxima de contato, com tendência a um decréscimo nas primeiras avaliações pós-operatórias quando comparadas com a avaliação pré-operatória, porém com a recuperação ocorrendo um pouco mais precocemente, a partir da segunda ou terceira avaliações pós-operatórias.

Quando se comparou estatisticamente os grupos 1 e 2 em relação a intensidade máxima de contato (Tabelas 5 e 6 e Gráficos 6 e 10), não se observou diferença significativa nem na avaliação pré-operatória nem em nenhuma avaliação pós-operatória. Pode-se, entretanto, notar uma tendência a valores levemente superiores no grupo 1, porém atingindo patamares muito semelhantes na quarta avaliação pós-operatória, da mesma forma que quando analisou-se os mesmos grupos em relação ao parâmetro de área, o que provavelmente também é relacionado ao tempo ideal entre duas e quatro semanas após a denervação para que o tubo neural complete adequadamente o período de degeneração e de remoção das fibras e do axoplasma do seu interior, em temperatura ambiente (Ochi et al., 1994; Chaves Neto, 2006), além de um possível efeito da preservação a frio por curto tempo retardando a fase inicial de degeneração dos axônios lesados (Wang et al., 2014).

Comparando-se os grupos 1 e 3 (Tabelas 5 e 7 e Gráficos 7 e 10), verificou-se valores mais elevados da intensidade máxima de pressão da pata operada no contato máximo nos ratos do grupo 1 (extremamente significativa na 2ª avaliação pós-operatória e muito significativa na terceira avaliação pós-operatória), o que se explica pelo maior tempo de denervação ao qual o grupo 3 foi submetido, com maior atrofia muscular e possivelmente também a presença de algum grau de colapso do tubo neural, que pode ocorrer a partir de 4 semanas de denervação sem resfriamento (Ochi et al., 1994; Chaves Neto, 2006).

Na comparação entre os grupos 2 e 4 (Tabelas 6 e 8 e Gráficos 8 e 10), ocorreram diferenças de valores da máxima intensidade durante o contato máximo na terceira e na quarta avaliações pós-operatórias (muito significativa e extremamente significativa, respectivamente), com valores mais elevados no grupo 4, demonstrando superioridade do enxerto preservado a frio por maior duração de tempo. Conforme citado anteriormente,

pesquisas já demonstraram que o aumento do tempo de armazenamento a frio melhora a regeneração nervosa (Evans et al., 1998), diminuindo o infiltrado linfocitário (Gutmann e Sanders, 1943; Hare et al., 1993; Atchabahian et al., 1999), podendo até reduzir o potencial antigênico dos enxertos de nervo após duas semanas de resfriamento, mas principalmente a partir de 7 semanas deste processo (Tohyama et al., 1990; Lenihan et al., 1998; Atchabahian et al., 1999).

Comparando-se os grupos 3 e 4 em relação à máxima intensidade de pressão durante o contato máximo da pata operada (Tabelas 7 e 8 e Gráficos 9 e 10), observou-se comportamento parecido com a comparação feita entre os grupos 2 e 4, com valores progressivamente melhores no grupo 4, sendo que aqui já surgiu diferença significativa a partir da segunda avaliação pós-operatória, mantendo-se na terceira e na quarta avaliações pós-operatórias (sempre com  $p < 0,001$  = extremamente significativa). A razão para tal fato é a mesma descrita anteriormente, ou seja, a melhora da regeneração nervosa que acontece com o passar do tempo em enxertos armazenados a frio (Gutmann e Sanders, 1943; Evans et al., 1998; Hare et al., 1993; Atchabahian et al., 1999), sendo que nesta comparação ainda interfere o fato de que o enxerto de nervo, em temperatura ambiente, tem como melhor época para existência de um tubo neural livre o período entre 2 e 4 semanas (Ochi et al., 1994; Chaves Neto, 2006), possivelmente já existindo no grupo 3 algum colapso das paredes do tubo, que é evitado no grupo 4, preservado a frio.

Em relação às análises eletrofisiológicas, optou-se pela avaliação através do método do potencial evocado motor, com estimulação elétrica transcraniana e captação das respostas musculares dos membros posteriores dos animais. O método utilizado, descrito originalmente para avaliação de lesões medulares, foi escolhido principalmente por ser de fácil aplicabilidade e confiabilidade (Ferreira et al., 2005). O estímulo elétrico passa pelo córtex cerebral, células do corno anterior da medula, suas projeções axonais e todas

as vias descendentes até chegar às junções neuromusculares, fazendo com que os limiares de disparo sejam sempre atingidos, mesmo sob anestesia, confirmando de forma precisa a qualidade da função motora. Da forma em que foi utilizado, com a simplificação de eletrodos de agulha facilmente posicionados em couro cabeludo e na musculatura distal dos membros posteriores, até o momento foi aplicado apenas em ensaios de lesões medulares, sendo de uso inédito para o modelo de lesão de nervo periférico aqui apresentado. A intensidade do estímulo foi sempre supramáxima, de modo a recrutar todas as fibras musculares inervadas, garantindo consistência aos resultados. Por outro lado, aplicando-se um estímulo tão elevado, há sempre risco de óbito do animal, motivo pelo qual empregou-se o método apenas no último dia de avaliações, imediatamente antes da retirada final de material para exame histomorfométrico e da eutanásia. Desta forma, utilizou-se como controle o membro contra-lateral sadio, também avaliado no mesmo procedimento.

Os parâmetros analisados foram a amplitude e a latência. O primeiro dado, medido em microvolts, corresponde ao número de fibras capazes de responder ao estímulo, sendo, por este motivo, o parâmetro mais importante a ser considerado numa avaliação do processo de regeneração de um nervo, consistindo em método muito confiável quando se aplica intensidade supramáxima. Pesquisas demonstram ser a amplitude muito sensível e fidedigna na avaliação da função neural (Okuno et al., 2005). A latência, por sua vez, corresponde ao intervalo de tempo entre o momento em que o nervo é estimulado e o início da reação, medido em milissegundos. Este último dado pode, por vezes, encontrar-se alterado sem que signifique maior ou menor quantidade de fibras, visto que diversos fatores podem influenciá-lo, alguns de difícil controle, incluindo profundidade da anestesia, temperatura ambiente, temperatura corporal do animal, tamanho da fibra, nível da regeneração ocorrida, localização dos receptores neuro-musculares reinervados (mais

proximalmente ou mais distalmente) e quantidade destes receptores em cada localização (Oh, 2002).

Cada um destes parâmetros foi mensurado aos 60 dias de pós operatório das enxertias (convencionais nos grupos 1 e 3; preservadas a frio nos grupos 2 e 4) para os músculos tibial anterior e gastrocnêmio na região distal dos membros posteriores do animal. A escolha destas estruturas deveu-se ao fato delas serem de fácil localização para colocação dos eletrodos e constituírem os principais componentes distais inervados pelo ciático nos ratos (Tranquilli et al., 2007; Polônio et al., 2010).

Nas comparações estatísticas do potencial evocado entre grupos, nenhum dos parâmetros medidos na pata esquerda mostrou qualquer diferença de um grupo para outro, como, aliás, era de se esperar, visto que este membro não foi submetido ao procedimento cirúrgico, sendo realizado o procedimento de forma bilateral porque a captação de potenciais evocados com eletromiógrafo de quatro canais necessita da aferição nos lados direito e esquerdo, o que permitiu que fossem feitas não apenas comparações entre os grupos de enxertia convencional e preservada a fresco, mas também comparações com medidas de grupos controle do lado não operado. Desta forma, latência do músculo tibial anterior, amplitude do músculo tibial anterior, latência do músculo gastrocnêmio e amplitude do músculo gastrocnêmio foram similares nos quatro grupos analisados quando avaliou-se os membros posteriores esquerdos ( $p > 0,05$ ), como verificado nas tabelas 9 a 12 e nos gráficos 11, 12, 13 e 14..

Na pata operada, nem a latência do músculo tibial anterior, nem a latência do músculo gastrocnêmio, mostraram diferenças entre os quatro grupos ( $p > 0,05$ ), demonstrando não ter ocorrido alterações eletrofisiológicas nestas medidas provocadas pelo resfriamento dos enxertos, conforme pode ser observado nas tabelas 9 a 12 e nos gráficos 15 e 17.

A amplitude do músculo tibial anterior direito não apresentou qualquer diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando realizadas as comparações entre os grupos 1 e 2 e entre os grupos 3 e 4 (Tabelas 9 a 12 e Gráfico 16). Da mesma forma, a amplitude do músculo gastrocnêmio direito também apresentou um valor de  $p > 0,05$  quando realizadas as comparações entre os grupos 1 e 2 e entre os grupos 3 e 4, sem diferenças quando comparado cada grupo preservado a frio com o seu próprio grupo controle de enxerto convencional, demonstrando que o processo de regeneração nervosa não foi alterado pelo processo de resfriamento ao se analisar este parâmetro (Tabelas 9 a 12 e Gráfico 18).

Na análise estatística pareada do potencial evocado comparando-se os membros posteriores esquerdo e direito dentro de um mesmo grupo, os parâmetros de latência do músculo tibial anterior e latência do músculo gastrocnêmio apresentaram  $p > 0,05$  nos grupos 1, 2 e 3 (Tabelas 9 a 11 e Gráficos 19 e 21), sendo que apenas no grupo 4 os dois parâmetros apresentaram diferenças significantes entre os lados direito e esquerdo, com  $p < 0,05$  (= significativo) para a comparação entre as latências do músculo tibial anterior esquerdo e direito (Tabela 12 e Gráfico 19) e  $p < 0,01$  (= muito significativo) para a confrontação entre as latências do músculo gastrocnêmio esquerdo e direito (Tabela 12 e Gráfico 21), ocorrendo, em ambos os casos, valores no lado operado menores do que no lado controle. Em 2012, Ikeda e Oka, em estudo experimental com 30 ratos Sprague-Dawley, comprovaram que a velocidade de condução do impulso em fibras nervosas normais deste animal é aproximadamente proporcional ao comprimento interno das fibras, mas isto não ocorre em fibras após a regeneração, porque neste processo os comprimentos internodais permanecem, em sua maioria, anormalmente curtos. Analisando a velocidade de condução aos 50, 100, 150 e 200 dias após a transecção do ciático, encontraram um aumento progressivo da mesma, atribuindo isto à diminuição da distância internodal. Tal explicação justifica nosso achado no grupo 4, que apresentou a

latência do tibial anterior e a latência do gastrocnêmio diminuídas em relação à pata normal, já que este parâmetro refere-se ao intervalo de tempo entre o estímulo e a resposta, sendo inversamente proporcional à velocidade de condução. Os citados autores relataram ainda que a distância internodal diminuiu como um todo, mas sem regularidade de padrão nas reduções de tal medida, de modo que fatores estruturais do nervo regenerado poderiam prejudicar uma comparação eletrofisiológica entre o membro normal e o membro operado do animal. Além disso, devemos considerar com cuidado nosso resultado de menores latências no grupo 4, visto que este parâmetro não é muito confiável, podendo, como já citado, ser distorcido por diversos fatores, como diâmetro e comprimento da fibra, profundidade da anestesia, nível da regeneração, localização e quantidade dos receptores neuro-musculares reinervados, entre outros (Oh, 2002).

Ainda na análise pareada, comparando-se a amplitude do músculo tibial anterior esquerdo com a amplitude do músculo tibial anterior direito em cada grupo, obteve-se diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) tanto no grupo 1 como no grupo 2, com os valores da pata operada mostrando-se superiores às medidas do lado controle (Tabelas 9 a 12 e Gráfico 20). Por outro lado, a comparação da amplitude do músculo gastrocnêmio entre os lados direito e esquerdo demonstrou também diferenças significantes dentro dos grupos 1, 2 e 4 ( $p < 0,05$  = significante nos grupos 1 e 4;  $p < 0,01$  = muito significante no grupo 2), porém este parâmetro sempre apresentou valores menores na pata operada (Tabelas 9 a 12 e Gráfico 22). Considerando-se que a regeneração nervosa ocorreu ao acaso, com a enxertia sendo realizada com os cotos proximal e distal invertidos, e sabendo-se que os axônios regenerados no enxerto do nervo ciático se dirigem para receptores neuromusculares não apenas do músculo tibial anterior, mas também do gastrocnêmio e outros músculos menores, pode-se tentar compreender o motivo de termos obtido um valor da amplitude do músculo tibial anterior maior no lado operado do que no

controle, já que verificou-se relações de amplitude inversamente proporcionais entre a quantidade de fibras reinervadas no tibial anterior e no gastrocnêmio, ou seja, enquanto a maior parte das fibras está reinervando um dos músculos, uma quantidade menor atinge a outra estrutura muscular, sem que isto signifique um resultado final superior do conjunto das respostas neuro-musculares da pata operada em relação à pata normal, sendo ainda que tais alterações podem variar por influência de fatores como a localização anatômica da maioria dos receptores, bem como o tempo decorrido no processo de regeneração. Depois da lesão de um nervo, as fibras nervosas em crescimento atingem os receptores motores e sensitivos de forma não seletiva e, por causa disto, os padrões de ativação dos músculos podem ser diferentes do normal. Tanto assim que, ao fazermos um teste comparando estatisticamente a soma das amplitudes dos dois músculos (tibial anterior e gastrocnêmio), não houve diferença significativa entre os lados operado e não operado em nenhum dos grupos (Gráfico 23). Além disso, outros fatores podem ser responsáveis por uma maior reinervação de determinado território, incluindo as possibilidades de regeneração por caminhos impróprios e de fibras aferentes, inclusive sensoriais, podendo reinervar territórios inadequados (Dellon et al., 1989; Hare et al., 1992). Deve-se lembrar ainda que, apesar dos cuidados que foram tomados para evitar-se interferências externas na captação dos potenciais, evitando-se exposição dos animais a ruídos, claridade intensa ou campos eletromagnéticos, sempre é possível a ocorrência de algum fator ambiental que possa alterar os estímulos mensurados (Godoy, 2003; Ferreira et al., 2005). Considerando-se esta última comparação, pode-se inferir, de forma geral, em relação aos resultados da soma da amplitude dos músculos expressando número total de fibras reinervadas, que ocorreu, em todos os casos, reinervação de fibras no membro submetido aos procedimentos de enxertia, tanto a fresco como preservado a frio, sem diferenças significativas em relação aos membros normais utilizados como controle.



Em relação às análises histomorfométricas, buscamos demonstrar a reinervação em cada grupo na última avaliação feita nos animais, aos 60 dias de pós operatório dos procedimentos de enxertias (convencionais nos grupos 1 e 3, preservadas a frio nos grupos 2 e 4). Para tanto, inicialmente determinamos a quantidade de axônios mielinizados existentes 3 mm proximal e 3 mm distalmente às áreas de reparo do enxerto, evitando assim as possíveis fibroses dos locais de sutura, e calculamos a soma das áreas destes axônios. Depois, utilizamos estes dados para obtenção de dois índices já descritos na literatura, expressos em percentagens: o índice de regeneração e o índice de mudança de área. O primeiro indica a viabilidade e função celulares, e representa a capacidade de regeneração daquele nervo, sendo obtido através da relação percentual entre o número de axônios mielinizados distais ao local do reparo e o número de axônios mielinizados proximais a este ponto. Já o índice de mudança de área, determinado pela relação percentual entre a soma das áreas dos axônios distais e a soma das áreas dos axônios proximais, apresenta relação com alterações estruturais ocorridas nos axônios, incluindo a espessura da bainha de mielina e a quantidade de colágeno e mielina intra-celulares (Martins et al., 2006; Pereira, 2009).

As análises estatísticas comparando o número de axônios mielinizados proximais e distais dentro de um mesmo grupo na mensuração do material coletado 60 dias após as enxertias, resultaram em  $p > 0,05$  nos grupos 1 e 2, porém mostraram diferenças dentro do grupo 3 ( $p < 0,001$  = extremamente significativa) e dentro do grupo 4 ( $p < 0,01$  = muito significativa), sempre com valores superiores nas fibras distais, conforme representado nas figuras 21 a 24, tabelas 13 a 16 e no gráfico 24. Existem pesquisas sobre criopreservação em enxertos tubulares de tecido muscular que, à semelhança do que ocorreu nos grupos 1 e 2 deste estudo, concluíram que enxertos congelados por até 3 semanas em diferentes temperaturas foram semelhantes a um grupo controle nos

seguintes parâmetros analisados aos 50 dias após o procedimento de enxertia: contagem direta do número de axônios mielínicos regenerados, mensuração do diâmetro dos axônios mielínicos, diâmetro das fibras mielínicas e espessura da bainha de mielina (Sabha Júnior, 2002). Em relação à quantidade de axônios que passam através do enxerto, estudos desenvolvidos por Jenq e Coggeshall, em 1985, e confirmados por Mackinnon et al., em 1991, demonstraram um aumento do número de fibras mielinizadas na região distal à transecção do nervo. Estes últimos pesquisadores observaram uma maior quantidade de fibras nervosas na porção distal já um mês após o reparo, atingindo um pico aos 3 meses e mantendo-se neste patamar elevado até o sexto mês, quando inicia-se então um decréscimo progressivo para chegar novamente aos valores normais ao redor de 2 anos. Justificaram o aumento pelo conceito clássico do fenômeno de brotamento axonal, que afirma que o nervo periférico lesionado regenera-se com múltiplos brotamentos a partir de cada fibra nervosa, e que existem brotamentos que crescem dentro do segmento distal como unidades em regeneração, tornando a quantidade de axônios distais maior que na região proximal, ainda que haja alguma perda ou reabsorção no neuroma da linha de sutura. Descreveram que a subsequente diminuição do número de fibras resulta da degeneração e dissolução lenta dos axônios que não conseguiram estabelecer conexões apropriadas com receptores sensitivos ou motores distais. Dellon et al., em 1989, também já haviam observado que aos 18 e 24 meses após um reparo de uma lesão nervosa as avaliações histomorfométricas mostram número de axônios estatisticamente semelhante ao normal.

A comparação entre a área dos axônios mielinizados proximais à região do enxerto e a área dos axônios mielinizados distais dentro de um mesmo grupo (material coletado 60 dias após as enxertias) não apresentou diferenças dentro dos grupos 1 e 2 ( $p > 0,05$ ), como pode ser observado nas tabelas 13 e 14 e no gráfico 25, da mesma forma que ocorreu

em relação à quantidade de axônios proximais e distais. Entretanto, nos grupos 3 e 4, a relação foi inversamente proporcional ao número de axônios, tendo ocorrido diminuição significativa da área total distal em relação à área total proximal em ambos os grupos, com valor de  $p < 0,001$  (Figuras 27 a 30, Tabelas 15 e 16 e Gráfico 25). Vários estudos têm demonstrado a diminuição da área e do diâmetro axonal após lesões nervosas. Tohyama et al., em 1990, estudando a regeneração em enxertos nervosos pré-denervados e pré-congelados reimplantados em animais posteriormente sacrificados em vários momentos entre 1 e 14 semanas de pós-operatório, afirmaram que o diâmetro dos axônios em regeneração, tanto mielinizados quanto não mielinizados, mostra-se menor que o diâmetro de axônios normais em qualquer das fases examinadas. Martins et al., em 2006, relataram diminuição do diâmetro das fibras distais em relação às proximais em análises da regeneração nervosa aos 6 meses após a realização do reparo. Santos, em 2007, avaliou a regeneração axonal em enxertos nervosos sensitivos autólogos e, por estudos de microscopia óptica e eletrônica de transmissão feitos em material coletado após 10 semanas de pós-operatório, demonstrou que os enxertos apresentam média inferior da área das fibras, área dos axônios, diâmetro das fibras, diâmetro dos axônios e espessura da bainha de mielina quando comparados ao nervo doador. Todavia, a interpretação deste dado deve ser cautelosa e as causas da diminuição de área e diâmetro dos axônios distais em relação aos proximais precisam ser criteriosamente analisadas antes de serem colocadas como exclusividade das características próprias do processo de regeneração, pois são diversos os fatores que podem influenciar nas dimensões da fibra nervosa e de seus componentes estruturais. O processo de fixação e o preparo do material podem afetar a morfologia do tecido nervoso, desidratando-o ou levando a um alongamento da fibra. Carências nutricionais, diminuição da ingestão alimentar e o estado de hidratação do animal podem contribuir para o processo de retração da fibra nervosa. A diminuição do

metabolismo com decréscimo no transporte de proteínas para o interior do axônio, segundo alguns autores, também pode causar atrofia axonal. Pesquisas relatam ainda uma diminuição progressiva do tamanho das fibras nervosas motoras de ratos, principalmente das fibras maiores, com o transcorrer da idade, ocorrendo atrofia axonal, com redução do calibre dos mesmos e diminuição da espessura da mielina (Knox et al., 1989; Machado et al., 2000). Todos estes fatores devem sempre encontrar-se sob rigoroso controle em ensaios que avaliem as características estruturais da regeneração nervosa. Além disso, deve-se ter conhecimento de que a redução da área distal do enxerto também foi relatada como alteração temporária, que tende a se reaproximar dos valores normais entre 18 e 24 meses após a reparação nervosa, mas, segundo alguns estudos, não apresenta relação direta com a recuperação funcional (Mackinnon et al., 1991).

Deve-se ressaltar que, mesmo não ocorrendo diferenças estatísticas significantes dentro dos grupos 1 e 2 quando se comparou as regiões proximal e distal ao enxerto em relação ao número de axônios mielinizados e à área total das fibras mielinizadas, houve uma tendência em números absolutos ao mesmo padrão demonstrado nos grupos 3 e 4, qual seja, uma maior quantidade de axônios e uma menor área total das fibras mielinizadas na região distal em comparação à região proximal. Uma vez que estes achados correspondem à análise de material coletado aos 60 dias de pós-operatório das enxertias, consideramos resultados compatíveis com as descrições da literatura, conforme citado anteriormente (Dellon et al., 1989; Tohyama et al., 1990; Mackinnon et al., 1991).

Já os índices de regeneração e de mudança de área não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os quatro grupos analisados, nem na análise global, nem em nenhuma das múltiplas comparações feitas entre os grupos, dois a dois, no material coletado (Tabelas 13 a 16 e Gráficos 26 e 27). Tal fato comprova que, 60 dias após os procedimentos cirúrgicos das enxertias, a atividade e capacidade de regeneração do

nervo, bem como as suas modificações estruturais, já encontram-se equiparadas. Este achado está em conformidade com o estudo de Martins et al. (2006), que também não encontrou diferenças entre estes índices em três grupos de animais submetidos a diferentes formas de reparo, muito embora a sua análise tenha tido um período de observação mais longo, sendo feita aos 6 meses após os procedimentos cirúrgicos. Pereira, em 2009, também não encontrou diferença entre esses mesmos índices quando comparou um grupo controle e um grupo de sutura epineural com 6 pontos e fio de nailon 10-0, avaliados exatamente com o mesmo tempo que utilizamos em nosso estudo, ou seja, 60 dias após a sutura.

Apesar de não ser objetivo específico deste trabalho a análise das alterações histomorfométricas provocadas pelo resfriamento de nervos, foi retirado um fragmento do coto proximal dos enxertos no grupo 2 e realizada a contagem do número de axônios mielinizados e sua respectiva área total imediatamente antes e imediatamente após o resfriamento dos enxertos por 14 dias. Não se encontrou diferença significativa entre equisquer dos parâmetros avaliados (Tabela 17 e Gráficos 28 e 29). De modo contrário, existem pesquisas que relatam uma diminuição da viabilidade, função celular e quantidade de células de Schwann dentro dos enxertos após 1 a 3 semanas de hipotermia (Levi et al., 1994; Fansa et al., 2000). Porém, também foi demonstrado que as estruturas celulares importantes para a regeneração do nervo são preservadas, não comprometendo a evolução do processo de avanço axonal (Evans et al., 1998).

Em se tratando de regeneração nervosa, não só em relação às medidas histomorfométricas, mas em relação a todos os parâmetros avaliados, é fundamental que se diferencie o tempo de evolução do processo quando se compara resultados de experimentos. Utilizando-se o mesmo modelo animal e técnica de lesão e reparo do nervo semelhantes, mas observando-se os efeitos em momentos diferentes, estarão sendo

analisados, na verdade, eventos fisiológicos diferentes. Em estudos com menor tempo de observação, a análise fica mais limitada ao evento da passagem dos brotos axonais pelo local do reparo, com menor interferência do efeito da integração sináptica dos axônios com os receptores neuro-musculares, que, por sua vez, é melhor vista a longo prazo. A localização anatômica daquilo que se está analisando também deve ser correlacionada com a observação da progressão da regeneração, o que modifica o evento fisiológico avaliado e os efeitos que podem ser verificados. Assim, análises histomorfométricas das regiões circunvizinhas ao enxerto avaliam momentos diferentes da regeneração de um nervo quando comparadas a análises eletrofisiológicas, que captam estímulos oriundos das conexões terminais entre os axônios e os receptores no órgão alvo, ou quando comparadas a análises da função motora, que avaliam em conjunto músculos reinervados em níveis e momentos distintos. Por exemplo, através da contagem de axônios proximais e distais ao enxerto, não é possível saber se os axônios atingiram os receptores no órgão alvo ou não. Portanto, a extrapolação de análises de resultados histomorfométricos pode levar a interpretações inapropriadas sobre o retorno da função (Sarikcioglu et al., 2008). Se a natureza da investigação é sobre resultados funcionais, então uma análise de parâmetros da motricidade é mais apropriada. Segundo vários trabalhos, análise funcional em passarela de marcha é um método de avaliação global que reproduz, ao mesmo tempo, diversos momentos e resultados da regeneração do nervo periférico, correspondendo a uma medida da função motora distal e da coordenação do animal, de forma integral, o que requer funções sensoriais e motoras intactas. Desta forma, a correlação das medidas de função com parâmetros de microscopia ou de potenciais elétricos raramente é observada (Bain et al., 1989; Mackinnon et al., 1991; De Medinaceli, 1995; Martins et al., 2006). Atualmente, muitos autores consideram que estes métodos avaliam diferentes estágios do processo regenerativo e, por isso, não podem ser comparados (De Medinaceli,

1995; Martins et al., 2006; Pereira, 2009). Assim, métodos histomorfométricos avaliam a quantidade de axônios regenerados e a área e diâmetro das fibras em determinada fase, porém, se buscarmos a qualidade funcional no mesmo momento, fibras regeneradas podem não apresentar resultados funcionais adequados, pois, por exemplo, axônios podem ter seguido por caminhos impróprios, pode ocorrer reinervação muscular aberrante, ou a presença de fibras musculares polineuronamente inervadas, ou músculos antagonistas mais intensamente reinervados, ou aferentes sensoriais que eventualmente alcançaram territórios inadequados, entre outras possibilidades. Da mesma forma, métodos eletrofisiológicos podem avaliar uma subpopulação de fibras que sejam eletricamente efetivas, porém podem não ser funcionalmente eficazes. Portanto, para decisão correta sobre o método adequado de avaliação em determinado estudo, é fundamental que se considere qual o estágio da regeneração do nervo deverá ser analisado. Por exemplo, se o objetivo for a avaliação de uma técnica de sutura epineural, métodos histomorfométricos serão mais adequados para investigação das fibras que atravessaram o local do reparo, podendo-se complementar com avaliação do potencial elétrico do nervo e das respostas musculares distais à sutura. Por outro lado, se o propósito for, por exemplo, a avaliação de determinadas patologias que possam ser reproduzidas experimentalmente, onde o estudo da função seja importante, ou mesmo a análise experimental de novas técnicas cirúrgicas onde não haja maior interesse em quantificar os efeitos da secção do nervo, métodos funcionais serão melhor aplicados, lembrando-se sempre que não existem correlações entre a avaliação funcional e as avaliações histomorfométricas e eletrofisiológicas.

Como complicações, além de algumas retrações musculares leves, tivemos a ocorrência de dois casos de autofagia (ou autotomia), que resultaram em amputações do primeiro e quinto dedos da pata operada em um animal e dos dois últimos dedos em outro

rato (Figura 31). Um caso deu-se em torno da terceira semana pós-enxertia e o outro na quinta semana após este procedimento, o que, somado aos 50 dias de resfriamento do nervo, correspondeu, respectivamente, à décima e décima segunda semanas após a secção do nervo, ambos no grupo 4, que, por este motivo, teve que ser totalmente refeito. Consideramos esta incidência baixa quando comparada à encontrada por outros autores. Martins et al. (2006) relataram 29 diferentes tipos de lesões nas patas operadas secundárias à autofagia nos 86 ratos Wistar com os quais iniciaram seus estudos de análise da regeneração nervosa. Weber et al., em 1993, pesquisando as características da autotomia, descreveram que 66% dos casos ocorrem na quarta semana após a lesão nervosa, enquanto Sarikcioglu et al., em 2009, relataram que o fenômeno usualmente inicia-se na terceira semana pós-operatória. Atribuímos a baixa incidência e a ocorrência tardia em nosso estudo à rigorosa aplicação diária de um produto antibiótico, antisséptico e repelente na pata operada do animal (bactrovet prata® aerosol), que forma uma película protetora sobre o local aplicado e protege contra a autofagia. Sarikcioglu et al., em 2009, também relataram pesquisas utilizando substâncias antiinflamatórias e com sabor desagradável (metilprednisolona, glicerol e dizocilpina) na tentativa de evitar a autofagia. Embora tenha sido sugerido que este comportamento é simplesmente um esforço do animal para retirar um apêndice sem sensibilidade, diversos pesquisadores têm atribuído tal reação a uma resposta do animal a uma condição dolorosa que ele percebe como vindo daquela parte do corpo, denominada “anestesia dolorosa”. Esta percepção de dor vinda de um nervo lesado pode originar-se a partir de impulsos espontaneamente gerados pela regeneração de numerosos brotos axonais provocando uma compressão mecânica dentro da fibra (Sarickcioglu et al., 2008). De forma correspondente, em nossas análises histomorfométricas, a maior diferença demonstrando um número de axônios distais superior ao número de axônios proximais ocorreu no grupo 4 (com  $p < 0,001$ ), sugerindo



intenso brotamento axonal nos ratos onde o enxerto foi submetido a resfriamento por 50 dias, fato que, de modo similar, poderia ter levado a esta compressão mecânica no grupo que foi desconsiderado devido às autofagias.

Como considerações finais desta discussão, diante de três diferentes tipos de análises utilizados e de tantos parâmetros avaliados, por vezes em momentos diversos, e sabendo-se da importância de se diferenciar o método e o tempo de evolução do processo na comparação dos dados, torna-se necessário tentarmos fazer uma correlação dos principais resultados obtidos com seus respectivos significados em termos de regeneração nervosa.

Em se tratando das análises funcionais da marcha, ficou então demonstrado que:

- a enxertia com nervo preservado a frio por 14 dias apresentou resultados semelhantes ao seu grupo controle de enxertia convencional quando analisadas a área máxima de contato e a intensidade máxima de pressão no contato máximo em todas as avaliações entre os dois grupos;
- a enxertia com nervo preservado a frio por 50 dias apresentou melhor resultado funcional em todas as avaliações pós-operatórias quando comparada com seu grupo controle de enxertia convencional e também com a enxertia com nervo preservado a frio por 14 dias nas avaliações de 30, 45 e/ou 60 dias de pós-operatório, tanto em relação à área máxima de contato, quanto em relação à intensidade máxima de pressão no contato máximo.

Em relação às análises eletrofisiológicas, os resultados mostraram que:

- a enxertia com nervo preservado a frio por 14 dias e seu grupo controle de enxertia convencional apresentaram resultados semelhantes de fibras eletricamente efetivas na região distal ao enxerto, tanto em relação à latência quanto em relação à amplitude dos dois músculos avaliados (tibial anterior e gastrocnêmio), aos 60 dias de pós-operatório;

- a enxertia com nervo preservado a frio por 50 dias e seu grupo controle de enxertia convencional apresentaram resultados semelhantes de fibras eletricamente efetivas na região distal ao enxerto, tanto em relação à latência quanto em relação à amplitude dos dois músculos avaliados (tibial anterior e gastrocnêmio), aos 60 dias de pós-operatório.

Os resultados das análises histomorfométricas demonstraram que:

- a enxertia com nervo preservado a frio por 14 dias, a enxertia com nervo preservado a frio por 50 dias e os enxertos convencionais apresentaram semelhantes índices de regeneração e de mudança de área dos axônios mielinizados, aos 60 dias de pós-operatório, em todas as comparações entre os grupos;

- tanto o grupo de enxertos com nervo preservado a frio por 50 dias quanto seu grupo controle convencional apresentaram maior quantidade absoluta de axônios mielinizados e menor área total das fibras mielinizadas na região distal ao reparo do que na região proximal ao reparo, aos 60 dias de pós-operatório, nas comparações dentro de um mesmo grupo, padrão este que manifestou-se como uma tendência, em números absolutos, também no grupo de enxertos com nervo preservado a frio por 14 dias e em seu grupo controle.

Por fim, diante de todas estas colocações, ficou claro que não observamos correlação entre os diferentes métodos de avaliação em um mesmo momento da evolução da regeneração nervosa em relação aos enxertos com nervo preservado a frio por 14 dias, por 50 dias e aos dois grupos controle de enxertias convencionais.

Ficou evidente também a presença de evolução satisfatória do processo de regeneração no modelo de nervo ciático de ratos em enxertos preservados a 4°C por 14 dias e por 50 dias em solução Celsior® quando comparados aos correspondentes grupos de enxertia convencional, mostrando o potencial da utilização desse tipo de enxerto, com futuro promissor no reparo das lesões nervosas.

## **7. CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

A conservação a frio do enxerto de nervo durante 14 dias e durante 50 dias permitiu resultados funcionais finais da regeneração nervosa respectivamente iguais e superiores aos enxertos convencionais;

As enxertias com nervo preservado a frio por 14 dias e por 50 dias apresentaram resultados finais semelhantes aos seus respectivos grupos controle em termos de fibras eletricamente efetivas na região distal ao reparo;

As enxertias com nervo preservado a frio por 14 dias e por 50 dias apresentaram índices de regeneração e de mudança de área dos axônios mielinizados semelhantes aos respectivos grupos controle na avaliação final.

## **8. ANEXOS**

## 8 ANEXOS

### ANEXO A - Documento de aprovação do projeto na Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

#### COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT nº 959

**Pesquisador Responsável:** Dr. Marcelo Rosa de Rezende  
**Pesquisador Executante:** Dr. Isanio Vasconcelos Mesquita  
**Título:** Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional e enxerto de nervo criopreservado.  
**Grau de Pesquisa:** Doutorado

#### APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

Proposta adequada completa, bem elaborada para doutorado com os recursos do laboratório de microcirurgia.

Sugiro captação de recurso junto às agências de fomento (FAPESP).

**RELATOR**

**Comissão Científica**

**28.11.2012**

#### **DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 28.11.12: Projeto aprovado.**

- Aguardar a inscrição do aluno na pós-graduação e o parecer da Comissão de Pós-Graduação do DOT, para enviar o projeto de pesquisa ao CEP-FMUSP (Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP) para avaliação.

**ANEXO B - Documento de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/11/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **321/13** intitulado: **“Estudo experimental comparativo entre enxerto de nervo convencional e enxerto de nervo criopreservado”** que utilizará **20** animais da espécie **rato**, apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à 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: Marcelo Rosa de Rezende**  
**Pesquisador (a) Executante: Isanio Vasconcelos Mesquita**

**CEUA-FMUSP, 13 de Novembro de 2014**



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

## ANEXO C - Documento de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Campinas



UNICAMP



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo Experimental Comparativo entre Enxerto de Nervo Convencional e Criopreservado" (protocolo nº 2796-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Alexandre L.R. Oliveira / Prof. Dr. Marcelo Rosa de Resende / Isanio Vascelos Mesquita, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 17 de setembro de 2012.

Campinas, 17 de setembro de 2012.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alônsó  
Secretária Executiva



## **9. REFERÊNCIAS**

## 9 REFERÊNCIAS

Almquist EE, Nachemson A, Auth D, Almquist B, Hall S. Evaluation of the use of the argon laser in repairing rat and primate nerves. *J Hand Surg Am.* 1984;9(6):792-9.

Assaf K. *Reparo de nervos periféricos com a utilização de PCL e nanoestruturas de carbono* [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas; 2015.

Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. *Diretrizes básicas para captação e retirada de múltiplos órgãos e tecidos.* São Paulo: ABTO; 2009.

Atchabahian A, Mackinnon SE, Hunter DA. Cold preservation of nerve grafts decreases expression of icam-1 and class II MHC antigens. *J Reconstr Microsurg.* 1999;15(4):307-11.

Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(1):129-38.

Bain JR. Peripheral nerve and neuromuscular allotransplantation: a current status. *Microsurgery.* 2000;20(8):384-8.

Best TJ, Mackinnon SE. Peripheral nerve revascularization: a current literature review. *J Reconstr Microsurg.* 1994;10(3):193-204.

Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O'Dey DM, Weis J, Joosten EA, et al. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods*. 2008;15;173(1):91-8.

Breidenbach WC, Terzis JK. Vascularized nerve grafts: an experimental and clinical review. *Ann Plast Surg*. 1987;18(2):137-46.

Bruck W, Bruck C, Marushak B, Fried RL. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol*. 1995;89(4):363-7.

Bunnell S, Boyes JH. Nerve grafts. *Am J Surg*. 1939; 44(1):64-75.

Carone AL, Scabora JE, Barros BR, Esquisatto MAM, Figueiredo JF, Langone F. Viability of nerve grafts preserved in different storage medium. *Braz J of Morphol Sci*. 2007;24(1):39-46.

Carr MM, Best TJ, Mackinnon SE, Evans PJ. Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair. *Ann Plast Surg*. 1992;28(6):538-44.

Chaves Neto GLV. *Estudo experimental comparativo entre auto-enxerto convencional e pré-degenerado na reconstrução de nervo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Davenport HA, Chor H. The ratio of myelinated to unmyelinated fibers in regenerated sciatic nerves of *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol*. 1937;67(3):483-91.

Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989;10(3):220-5.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. Peripheral nerve reconnection: improvement of long-term functional effects under simulated clinical conditions in the rat. *Exp Neurol*. 1983;81(2):488-96.

De Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995;58(1-2):29-37.

Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods*. 2007;164(1):120-30.

Evans P, Mackinnon SE, Levi ADO, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, et al. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity and regeneration. *Muscle Nerve*. 1998;21(11):1507-22.

Fansa H, Lassner F, Kook PH, Keilhoff G, Schneider W. Cryopreservation of peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve*. 2000;23(8):1227-33.

Fawcett JW, Keynes RJ. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J Neurosurg.* 1986;65(3):354-63.

Ferreira R, Oliveira AR, Barros Filho TEP. Padronização da técnica para captação do potencial evocado motor em ratos através de estimulação elétrica transcraniana. *Acta Ortop Bras.* 2005;13(3):112-4.

Foidart-Dessalle M, Dubuisson A, Lejeune A, Severyns A, Manassis Y, Delree P, et al. Sciatic nerve regeneration through venous or nervous grafts in the rat. *Exp Neurol.* 1997;148(1):236-46.

Frykman GK, Cally D. Interfascicular nerve grafting. *Orthop Clin North Am.* 1988;19(1):71-80.

Gasparini ALP, Barbieri CH, Mazzer N. Correlation between different methods of gait functional evaluation in rats with ischiatic nerve crushing injuries. *Acta Ortop Bras.* 2007;15(5):285-9.

Glasby MA. Nerve growth in matrices of orientated muscle basement membrane: developing a new method of nerve repair. *Clin Anat.* 1990;3(3):161-82.

Godoy BO. *Estudo eletromiográfico funcional da neurocondução motora em nervo ciático e músculo gastrocnêmio de ratos, antes e após neurotomia* [dissertação]. São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba; 2003.

Gordon L, Buncke H, Jewett DL, Muldowney B, Buncke G. Predegenerated nerve autografts as compared with fresh nerve autografts in freshly cut and pre-cut motor nerve defects in the rat. *J Hand Surg Am.* 1979;4(1):42-7.

Gutmann E, Gutmann L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesion. *J Neurol Psychiatr.* 1942;5(3-4):117-29.

Gutmann E, Sanders FK. Recovery of fiber numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J Physiol.* 1943;101(4):489-518.

Hamers FPT, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispens WH. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma.* 2001; 18(2):187-201.

Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(2):251-8.

Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Midha R, Wade JA, et al. Effect of cold preservation on lymphocyte migration into peripheral nerve allografts in sheep. *Transplantation.* 1993;56(1):154-62.

Hirasé Y, Kojima T, Uchida M, Takeishi M. Cryopreserved allogenic vessel and nerve grafts: hind-limb replantation model in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 1992;8(6):437-43.

Ijpma FF, Nicolai JP, Meek MF. Sural nerve donor-site morbidity: thirty-four years of follow-up. *Ann Plast Surg.* 2006;57(4):391-5.

Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav.* 2012;2(4):382-90.

Jenq BB, Coggeshall RE. Numbers of regenerating axons in parent and tributary peripheral nerves in the rat. *Brain Res.* 1985; 326(1):27-40.

Jewett DLH, McCarroll R. *Nerve regeneration and repair. Its clinical and experimental basis.* St Louis: Mosby Company; 1980.

Judas F, Rosa S, Teixeira L, Lopes C, Ferreira Mendes A. Chondrocyte viability in fresh and frozen large human osteochondral allografts: effect of cryoprotective agents. *Transplant Proc.* 2007;39(8):2531-4.

Kanaya F, Firrell J, Tsai TM, Breidenbach WC, Christine M. Functional results of vascularized versus nonvascularized nerve grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 1992;89(5):924-30.

Kingham PJ, Terenghi G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat.* 2006;209(4):511-26.

Kline DG, Happel LT. Penfield Lecture. A quarter century's experience with intraoperative nerve action potential recording. *Can J Neurol Sci.* 1993;20(1):3-10.

Knox CA, Kokmen E, Dyck PJ. Morphometric alteration of rat myelinated fibers with aging. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1989;48(2):119-39.

Kohama I, Lankford KL, Preiningerova J, White FA, Vollmer TL, Kocsis JD. Transplantation of cryopreserved adult human Schwann cells enhances axonal conduction in demyelinated spinal cord. *J Neurosci.* 2001;21(3):944-50.

Koshima I, Harii K, Orabe K. Experimental studies on vascularized nerve grafts: Part II. Morphometric study of axonal regeneration. *Jpn J Plast Reconstr Surg.* 1983;3:303-12.

Larsen M, Habermann TM, Bishop AT, Shin AY, Spinner RJ. Epstein-Barr virus infection as a complication of a nerve allograft from a living related donor. *J Neurosurg.* 2007;106(5):924-8.

Lemos SPS, Hayashi I, Cunha AS, Silva CS, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. Nervo alógeno conservado em glicerol. Estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras.* 2008;16(3):133-7.

Lenihan DV, Carter AJ, Glasby MA. An electrophysiological and morphological comparison of the microwave muscle graft and the freeze-thawed muscle graft. *Br J Plast Surg.* 1998;51(4):300-6.

Levi AD, Evans PJ, Mackinnon S, Bunge RP. Cold storage of peripheral nerves: an in vitro assay of cell viability and function. *Glia.* 1994;10(2):121-31.



Luchetti R, De Santis G, Soragni O, Deluca S, Pederzini L, Alfarano M, et al. Vascularized nerve graft: a clinical contribution. *Chir Organi Mov*. 1990;75(2):153-61.

Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA (editors). *Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia*. 4ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007.

Lundborg G, Dahlin L, Dohi D, Kanie M, Terada N. A new type of "bioartificial" nerve graft for bridge in extended defects in nerves. *J Hand Surg Br*. 1997;22(3):299-303.

Lux P, Breidenbach W, Firrell J. Determination of temporal changes in blood flow in vascularized and nonvascularized nerve grafts in the dog. *Plast Reconstr Surg*. 1988;82(1):133-44.

Machado JLM, Macedo, AR, Silva, MD, Spadella, CT, Montenegro, MRG. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. *Acta Cir Bras*. 2000;15(2):86-93.

Mackinnon SE, Dellon AL. A comparison of nerve regeneration across a sural nerve graft and a vascularized pseudosheath. *J Hand Surg Am*. 1988;13(6):935-42.

Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Change in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve*. 1991;14(11):116-22.

Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Correlações entre parâmetros obtidos das avaliações eletrofisiológicas, histomorfométrica e do índice funcional ciático após o reparo do nervo ciático do rato. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 2006;64(3b):750-56.

Mattar Júnior R. *Reparação microcirúrgica de nervos periféricos – estudo comparativo entre sutura epineural e o adesivo de fibrina* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1989.

Mattar Júnior R, Starck R, Guarnieri MV, Azze RJ, Mitteldorf CS, Ferreira MC. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos: estudo experimental. *Rev Bras Ortop.* 1990;25(8):287-92.

Mattar Júnior R, Azze RJ, Starck R, Paula E JL, Ferreira MC. Enxerto de nervo vascularizado - Estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop.* 1992;27:806-10.

McCullough CJ, Gagey O, Higginson DW, Sandin BM, Crow JC, Sebille A. Axon regeneration and vascularization of nerve grafts: an experimental study. *J Hand Surg.* 1984;9(3):323-7.

Menasché P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, et al. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(4):207-13.

Mohara J, Morishita Y, Takahashi T, Oshima K, Yamagishi T, Takeyoshi I, et al. A comparative study of Celsior and University of Wisconsin solutions based on 12 hr preservation followed by transplantation in canine models. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(12):1202-10.

Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakata A, Itoi S-I, Kanemaru S-I, Endo K, Shimizu Y. Experimental study on regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res*. 2004;1027(1-2):18-29.

Norris RW, Glasby MA, Gattuso JM, Bowden REM. Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. *J. Bone Jt. Surg*. 1988;70(4):530-33.

Ochi M, Wakasa M, Ikuta Y, Kwong WH. Nerve regeneration in predegenerated basal lamina graft: the effect of duration of predegeneration on axonal extension. *Exp Neurol*. 1994;128(2):216-25.

Oh SJ. *Clinical electromyography: nerve conduction studies*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Okuno S, Nakamura A, Kobayashi T, Orito K. Effectiveness of intraoperative somatosensory evoked potential monitoring during cervical spinal operations on animals with spinal cord dysfunction. *J Vet Med Sci*. 2005;67(7):719-22.

Ozcan G, Shenaq S, Mirabi B, Spira M. Nerve regeneration in a bone bed: vascularized versus nonvascularized nerve grafts. *Plast Reconstr Surg*. 1993;91(7):1322-31.

Palhares A, Viterbo F, Cardoso RG. Muscle graft as a substitute for peripheral nerve graft in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(3):221-25.

Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:3-19.

Pereira HSG. *Influência do número de pontos na regeneração axonal e produção de matriz extracelular na sutura epineural terminoterminal no nervo ciático do rato* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Polônio JT, Mazzer N, Barbieri CH, Mattiello-Sverzut AC. Eletroestimulação seletiva mantém estrutura e função do tibial anterior desnervado de ratos. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(2):85-9.

Rappaport WD, Valente J, Hunter GC, Rance NE, Lick S, Lewis T. Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. *Am J Surg*. 1993; 166(3):252-6.

Restrepo Y, Merle M, Michon J, Folliguet B, Barrat E. Free Vascularized nerve grafts: an experimental study in the rabbit. *Microsurgery*. 1985;6(2):78-84.

Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Sakamaki Y, Starnes VA, Barr ML. A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury. *Transplantation*. 1999;67(1):152-5.

Sabha Júnior MJJ. *Emprego de enxerto muscular criopreservado na reparação nervosa periférica* [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas; 2002.

Sanders FK, Young JZ. The influence of peripheral connections on the diameter of regeneration nerve fibre. *J Exp Biol.* 1954;22:203-12.

Santo Neto H, Teodori RM, Somazz M.C, Marques M.J. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg.* 1998;51(7):555-60.

Santos NB. *Estudo da regeneração axonal em enxerto nervoso sensitivo (n. sural) autólogo a partir de nervo craniano intacto (n. vago)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

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

Scabora JE, Carone AL, Figueiredo JF, Esquisatto MAM, Langone F. Viability of nerve grafts preserved in different storage medium: ultrastructural features. *Braz J Morphol Sci.* 2009;26(2):97-103.

Seckel BR, Ryan SE, Simons JE, Gagne RG, Watkins E. Vascularized versus non-vascularized nerve grafts: an experimental structural comparison. *Plast Reconstr Surg.* 1986;78(2):211-20.

Settergren CR, Wood MB. Comparison of blood flow in free vascularized versus nonvascularized nerve grafts. *J Reconstr Microsurg.* 1984;1(2):95-101.

Shibata M, Tsai TM, Firrell J, Breidenbach WC. Experimental comparison of vascularized and nonvascularized nerve grafting. *J Hand Surg Am.* 1988;13(3):358-65.

Schmidhammer R, Zandieh S, Hopf R, Mizner I, Pelinka LE, Kroepfl A, et al. Alleviated tension at the repair site enhances functional regeneration: the effect of full range of motion mobilization on the regeneration of peripheral nerves--histologic, electrophysiologic, and functional results in a rat model. *J Trauma.* 2004;56(3):571-84.

Staniforth P, Fisher TR. The effects of sural nerve excision in autogenous nerve grafting. *Hand.* 1978;10(2):187-90.

Sunderland S. *Nerves and nerve injuries.* 2ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1978.

Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57(4):413-26.

Tírico LEP. *Protocolo de captação, processamento e transplante de enxertos osteocondrais homólogos a fresco na articulação do joelho* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Tohyama K, Ide C, Osawa T. Nerve regeneration through the cryoinjured allogenic nerve graft in the rabbit. *Acta Neuropathol.* 1990;80(2):138-44.

Varejão AS, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto PM, Filipi VM, Gramsbergen A, et al. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol*. 2003;183(2):695-9.

Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004;26(2):186-94.

Waller AV. Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1850;140(1850):423-9.

Wang Z, He B, Duan Y, Shen Y, Zhu L, Zhu X. Cryopreservation and replantation of amputated rat hind limbs. *Eur J Med Res*. 2014;19(1):19-28.

Weber RA, Proctor WH, Warner MR, Verheyden CN. Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery*. 1993;14(5):323-7.

Wolff KD, Walter G, Zimmer C. Nerve reconstruction with glycerol-preserved allogenic grafts in the rat. *Microsurgery*. 1993;14(5):315-22.

Zalewski AA, Fahy GM, Azzam NA, Azzam RN. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. *J Comp Neurol*. 1993;331(1):134-47.

Zumiotti AV. *Enxerto longo de nervo com emprego de técnica microcirúrgica – trabalho experimental realizado em nervo fibular de coelho* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1987.